

大鼠肝星状细胞分离培养试剂盒

产品货号: P-CA-612

产品规格: 3Tests/10Tests

一、产品描述

大鼠肝星状细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠肝星状细胞研发。经验证, 按照本试剂盒的方法标准操作, 1 Test 可获得一瓶细胞 (T25 培养瓶), 细胞量 $>1 \times 10^6$ cells, 按照 1:2 比例传代, 可传代次数为 3 次左右, 经免疫荧光鉴定, 细胞纯度 (α -SMA 阳性率) $>90\%$ 。

二、适用范围

本产品适用于从 1-2 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的大鼠中提取肝星状细胞。经组织分离、消化、铺板接种纯化 48 h 后可获得肝星状细胞 $>1 \times 10^6$ cells。

备注: 提取 5 只大鼠的完整肝脏组织, 可获得一个 T25 培养瓶的细胞, 具体需要的大鼠数量可能因取材获得的肝组织数量不同而有所变化。

三、试剂盒组成成分

本试剂盒组成成分如下表:

表1.大鼠肝星状分离试剂盒组成成分及相应信息

成分名称	产品规格	性状	储存条件
大鼠肝星状细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL)	淡黄色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠肝星状细胞专用消化酶稀释液 Diluent of Digestive Enzyme For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	无色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠肝星状细胞专用消化酶 Specific Digestive Enzyme For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (1.5 mL) 10Tests (5 mL)	淡黄色澄清液体	-5~20°C, 有效期一年
大鼠肝星状细胞专用分离液A Specific Separation Solution A For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	无色澄清液体	2-8°C、避光, 有效期一年
大鼠肝星状细胞专用分离液B Specific Separation Solution B For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	无色澄清液体	2-8°C、避光, 有效期一年
大鼠肝星状细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (150 mL) 10Tests (500 mL)	红色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠肝星状细胞添加剂 Supplement For Rat Hepatic Stellate Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	棕色澄清液体	-5~20°C, 有效期一年
100 μ m 细胞滤网 100 μ m Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	绿色	常温, 有效期三年
70 μ m 细胞滤网 70 μ m Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	橙色	常温, 有效期三年

网站: www.procell.com.cn

电话: 400-999-2100

邮箱: techsupport@procell.com.cn

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



备注：各成分请根据试剂管上标签进行表示温度保存。消化酶、添加剂解冻后4℃可保存30天，若需长期保存，需按单次用量分装，并于-5~-20℃保存，使用时再次4℃解冻，避免反复冻融。

四、注意事项

1. 正式实验之前，推荐使用 1-2 只新生的大鼠进行解剖模拟训练，以熟悉操作流程，提升组织分离速度。
2. 整个分离操作过程中，建议将装组织的小皿放在冰盘/冰盒上（2-8℃）保持低温，但注意不要使组织和液体因温度过低而结冰，以免冻伤组织，影响提取效果。
3. 试剂配制或分装需严格遵循无菌操作规范。分装后立即用封口膜封口，即取即用，避免反复冻融或污染。

五、操作流程

（一）实验前准备

1. 实验需自备试剂和耗材：EP 管架 2 个、PBS、冰盘/冰盒、手术器械（含 3 个眼科剪、2 个直镊、2 个弯镊）、6 cm/10 cm 培养皿、T25 培养瓶、解剖板（可用泡沫板替代）、若干个注射器针头以及若干个 15 mL/50 mL 离心管、0.25%胰蛋白酶消化液（细胞消化传代使用），如需扩大培养需自备完培、胰酶。
 2. 试剂解冻复温：
 - (1) 大鼠肝星状细胞专用消化酶、大鼠肝星状细胞培养基添加剂：4℃ 冰箱解冻，恢复至室温。
 - (2) 大鼠肝星状细胞专用清洗液、大鼠肝星状细胞专用消化酶稀释液、大鼠肝星状细胞专用分离液 A、大鼠肝星状细胞专用分离液 B（分离液 A、B 需避光放置）、大鼠肝星状细胞基础培养基：恢复至室温。
 - (3) 大鼠肝星状细胞完全培养基配制：取 5 mL 大鼠肝星状细胞培养基添加剂，加入到 50 mL 大鼠肝星状细胞基础培养基中，混匀备用。
 - (4) 大鼠肝星状细胞消化工作液配制：取 500 μL 大鼠肝星状细胞专用消化酶，加入 5 mL 大鼠肝星状细胞专用消化酶稀释液，混匀备用。
- 注：大鼠肝星状细胞完全培养基保存条件：2-8℃，有效期：3 个月；大鼠肝星状细胞消化工作液配制完成后保存条件：2-8℃，有效期：1 个月。剩余添加剂需按照比例进行分装后，置于-5~-20℃冰箱内保存，避免反复冻融。

（二）组织处理及消化

1. 动物消毒及处死：使用逐渐降温法处死小鼠，放置于 75%医用酒精内浸泡 5 min 进行消毒。消毒完成后，将动物转运至超净工作台内，进行后续操作。
2. 解剖取材：
 - (1) 准备工作：将剪刀器械按照使用顺序从左向右依次排列在超净台内已消毒的 EP 管架上方：眼科剪 1 和直镊 1，眼科剪 2 和直镊 2、弯镊 1，眼科剪 3 和弯镊 2。

备注：将眼科剪和镊子按上述顺序放置，这些工具的前端约三分之一部位悬空放置，以避免与 EP 管架接触造成污染。

每次使用后将剪镊放回原有位置，并确保它们之间不相互触碰，防止交叉污染。



(2) 超净工作台内，使用注射器针头将新生大鼠仰卧姿势固定在解剖板上。

(3) 取材操作：

- ① 左手用直镊 1 轻轻挑起小鼠腹部皮肤，右手用眼科剪 1 的刀尖沿挑起皮肤下方剪开一个小口，注意不要剪破腹膜，用直镊 1 从皮肤开口处撕开皮肤，将腹部皮肤拉至大鼠脖颈处，暴露出腹腔。

备注：皮肤剪至暴露出整个腹腔，注意将皮肤撕扯远离解剖区域，防止污染。

- ② 换取眼科剪 2、直镊 2，使用直镊 2 拉起腹膜，眼科剪 2 剪开腹膜拉向两侧，使得肝组织能够完全暴露，打开腹腔，沿胸腔下方剪开与腹腔内连接的血管与隔膜，用弯镊 1 挑出肝脏组织，完整取出肝组织放入含有 5-10 mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液的培养皿中，将整个培养皿放在冰盘/冰盒上以保持低温环境。

备注：在整个取材操作过程中，仅有第一套剪刀和镊子可以接触大鼠外部皮肤，其他器械严禁触碰外部皮肤及毛发，若有触碰，需更换无菌器械，以防污染。若操作时间较长，需不时观察并轻轻摇晃培养皿，防止组织和清洗液由于长时接触冰盘/冰盒而结冰，冻伤组织，影响提取效果。

(三) 组织处理及消化

1. 组织处理：

- (1) 将眼科剪 3、弯镊 2 放在超净台内的 EP 管架上方，前端悬空。
- (2) 用这套新的剪镊，对肝脏组织进行操作：用弯镊 2 将皿中的肝脏组织用大鼠肝星状细胞专用清洗液漂洗 1-2 次，清理肝脏周围血污，用眼科剪 3 去除胆管、血管，获得纯净组织。
- (3) 将获得的纯净组织转移至新的培养皿内，将皿提起大概 45°角左右，用镊子将组织拨向最底处，加入少许大鼠肝星状细胞专用清洗液至刚好没过组织为宜，用眼科剪 3 将组织快速剪成 1 mm³ 碎块（肉眼观察呈砂糖状即可），加入 5 mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液吹散组织块，转移组织碎块转移至 15 mL 离心管内，重悬，经 1200 rpm，离心 1 min，丢弃上清，保留组织块沉淀。

2. 组织消化：向离心管内加入 5 mL 大鼠肝星状细胞消化工作液，轻柔吹打混匀后，使用封口膜缠紧离心管口，将离心管放入 37°C 水浴摇床，调整转速 150 rpm，消化 30-40 min。

(四) 细胞纯化

1. 组织消化过程中，可预先取出 100 μm 细胞滤网、70 μm 细胞滤网，分别套在 2 个 50mL 离心管上方，使用 2 mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液润洗滤网，待用。
2. 组织块消化完成后取出离心管，用 5 mL 移液枪反复吹打管内组织 30 次以上，直至肉眼观察组织无明显大块，向离心管内加入 5 mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液，轻轻重悬稀释管内消化液，然后吸取组织消化悬液，经 100 μm 细胞滤网过滤，再次吸取 50mL 离心管内滤液，经 70 μm 细胞滤网过滤，过滤完成后，可用干净枪头向滤网上方缓慢加入 3-5mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液来收集滤网上的组织消化悬液，收集管内的细胞滤液。



备注：过滤标准：悬液容易通过筛网，无大量胶状物质。若在此步骤中遇到悬液过滤缓慢或无法过滤的情况，可能是由于细胞筛与离心管管口贴合太紧，此时可以尝试将细胞筛稍微倾斜放置在 50 mL 离心管上，以改善这一现象。

3. 将过滤后含有组织悬液的 50 mL 离心管，调整离心机转速 1600 rpm，离心 10 min，丢弃上清，向 50 mL 离心管内加入 4 mL 大鼠肝星状细胞专用分离液 B 重悬沉淀，转移细胞悬液至一支新的 15 mL 离心管内，在细胞悬液上方沿管壁缓慢打入 4 mL 大鼠肝星状细胞专用分离液 A（此为关键步骤，操作过程中动作尽量轻柔，确保液体打出后沿管壁流向下方液面），使二者产生明显的液面分层，最后再沿管壁缓慢加入 2 mL 大鼠肝星状细胞专用完全培养基，同样使得培养基与下方液体形成液面分层，调整离心机转速 1400 g，离心 30 min（设置升速为 1、降速为 0）。
4. 离心后可见管内液体呈四层，从上到下依次为培养基层、白膜层、分离液 A 层、分离液 B 层，吸取大鼠肝星状细胞专用分离液 A 与培养基交界的白膜层（从上至下第二层），用枪头吸取白膜层上下 1-2 mL 液体，转移至新的 15 mL 离心管内，加入 10 mL 大鼠肝星状细胞专用清洗液重悬白膜层悬液，调整离心机：转速 1600 rpm，离心 10 min，丢弃上清，保留沉淀。
5. 用 5 mL 大鼠肝星状细胞专用培养基重悬沉淀，吸取细胞悬液接种于 6 cm 皿内，37°C、5% CO₂ 培养箱静置培养 40 min。
6. 取出培养皿，吸取皿内培养液至新的培养皿内，37°C、5% CO₂ 培养箱静置培养 40 min，原皿内添加新鲜培养基。重复此步骤两次，首次接种的皿内可能含有其他的杂细胞，如肝枯否和肝窦内皮细胞，后两次接种的皿内即为纯度较高的肝星状细胞。

（五）细胞培养及传代

1. 换液：将上一步骤中得到的细胞培养液（内含细胞）转移至新的 T25 瓶中，37°C，静置培养 18 小时后，见大部分细胞已经贴壁，弃上清液，加入新鲜培养基，之后每 2-3 天换液一次。
2. 形态观察：新分离的细胞呈圆形，12 h 后大部分细胞已经贴壁，24 h 后细胞呈圆形或纺锤形，48 h 后贴壁的细胞体积增大开始伸展，数量增多，呈现梭形或星形，少数细胞伸出伪足，培养 5-7 d 后，细胞数量明显增多，呈梭形或星形，伸出伪足，细胞开始活化。
3. 传代：待细胞汇合度达到 80-90%即可开始传代。吸弃原上清液，加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，弃去 PBS，加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化液，轻轻晃动至浸润瓶中所有细胞，吸出多余胰蛋白酶消化液，37°C 培养箱内消化 1-3 min。待大部分细胞收缩变圆后，加入 3-5 mL 大鼠肝星状细胞完全培养基终止消化，轻轻吹匀、分散细胞。根据传代比例将细胞接种至新的培养瓶，置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。



六、常见问题

表2. 大鼠肝星状细胞分离常见问题、原因及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
消化完成后，组织间有透明胶状黏连。	取材量过大导致消化不充分。	取用适量的组织，组织沉淀量体积不超过消化液的三分之一。
消化后吹打组织仍有部分组织块无法吹散、分离液中B中悬浮絮状、条状组织。	消化不充分。	检查取材量与是组织剪碎程度。适当延长消化时间。
消化后有许多结缔组织无法吹散。	取材时没有去除多余组织。	正常实验，用滤网过滤其余组织即可。
分离液分离后未见白膜层、白膜层不明显。	分离液之间没有形成液面分层，分离液失效。	分离液需避光保存，请在使用时将其从暗处拿出。严格按照规范操作使二者形成液面分层
最后得到的细胞纯度低。	差速贴壁没有去除杂细胞。	进行二次差速贴壁，对细胞进行消化后参考步骤（四）中第6步操作
差速贴壁后第二天观察，发现细胞少。	差速时间过长。	建议差速贴壁后保留所有的培养皿，观察目的细胞滞留于哪一步的培养皿中。
细胞状态差。	培养基配制有误、保存条件不当，没有及时换液。	确保完培配制比例正确，没有反复冻融，纯化分离后及时换液。
细胞增殖缓慢	传代比例不当、传代次数过多	按照皿底面积进行传代、传代次数控制在2-3次内

