

大小鼠肝细胞提取试剂盒说明书

1 产品信息

产品名称	产品型号	产品规格
大小鼠肝细胞提取试剂盒	DHHE-2515	15 T

2 产品描述

大小鼠肝细胞提取试剂盒可以将小鼠或 SD 大鼠（6~9 weeks）肝脏组织温和、高效地制备成肝实质细胞悬液。这一优化方案能够获得更多活率高且碎片少的单细胞样本，可用于原代细胞培养与药理学、毒理学肝脏疾病发病机理、肝细胞移植以及代谢疾病研究模型等下游实验应用。

主要原理：选用二步灌注法进行灌注，将成年大小鼠肝脏组织制备成单细胞悬液。瑞沃德单细胞悬液制备仪主要发挥机械解离作用，在保证不损伤细胞的情况下温和的释放更多单细胞，而大小鼠肝细胞提取试剂盒则主要发挥酶解消化作用。解离后用细胞滤器过滤样本，去除样本中的组织残渣，从而获得高活性的单细胞悬液。

3 产品成分

共 8 瓶试剂，包括：

- 1 瓶酶 A 试剂（粉末）
- 1 瓶酶 B 试剂（粉末）
- 1 瓶酶 C 试剂（粉末）
- 1 瓶 Buffer B
- 1 瓶 Buffer C
- 1 瓶试剂 E（粉末）
- 1 瓶试剂 G（粉末）
- 1 瓶活细胞纯化液

4 测试容量

可以进行 15 次小鼠或 7 次 SD 大鼠肝脏组织解离，每次可处理 1 只大小鼠的肝脏组织。

5 运输和保存

2~8℃运输；

试剂盒里面的酶 C 组分置于-25~-15℃存储，其余组分置于 2~8℃存储，有效期 12 个月。

6 试剂与仪器要求

- PBS 缓冲液
- NaOH 溶液
- FBS 胎牛血清
- DMEM 或 RPMI 1640 培养基
- HBSS 缓冲液（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）
- 蠕动泵
- 水浴锅

- 100 μm 细胞滤器
- 小型注射针或留置针
- 组织处理管*（可选，瑞沃德）
- 加热套（可选，瑞沃德：# HJ-400）
- 单细胞悬液制备仪（可选，瑞沃德）

7 使用方法

7.1 试剂分装

- (1) 配制酶 A 溶液：用 14 mL HBSS 缓冲液（含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）溶解酶 A 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月（可借助 50 mL 离心管辅助溶解）。
- (2) 配制酶 B 溶液：用 3.2 mL Buffer B 溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- (3) 配制酶 C 溶液：用 0.8 mL Buffer C 溶解酶 C 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- (4) 配制 Buffer E 溶液：用 28 mL 超纯水溶解试剂 E 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- (5) 配制 Buffer G 溶液：用 22.4 mL 超纯水溶解试剂 G 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。

7.2 灌注液配制

根据下表配制灌注液，灌注液现配现用，该灌注液能处理 1 只小鼠的肝脏组织。若后续需要进行细胞培养，配制灌注液后可用 0.22 μm 的滤头进行无菌过滤处理，过滤后保证溶液总体积在 70 ±1 mL。

名称	配制方法	PH 值
灌注液①	1.75 mL Buffer E + 0.7 mL Buffer G + 67.55 mL PBS	调节 PH 至 7.2 ~ 7.4 (推荐：加入 45 μL 4M NaOH 即可)
灌注液②	0.875 mL 酶 A + 0.2 mL 酶 B + 0.05 mL 酶 C + 0.7 mL Buffer G + 68.175 mL HBSS 缓冲液（含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）	/

- ⚠ 注：配置完分装 10 mL 灌注液②放 37℃水浴锅备用（第(5)步），其余灌注液①和②也需要在 37℃水浴锅中预热 30 min 后才能进行灌注实验。
- ⚠ 注：如需要处理 SD 大鼠肝脏组织，灌注液需增加 1 倍，即灌注液①与灌注液②均为 140mL。
- ⚠ 注：离心过程全程需要在 4℃条件下，实验前请提前预冷离心机。

7.3 组织温和酶解方案

- (1) 选择 6 ~ 9 weeks 的大小鼠，然后将其麻醉，固定，腹部喷酒精消毒。
- (2) 用镊子夹起小鼠腹部皮肤，剪开直至暴露整个腹腔，用固定针固定两侧内层皮肤，防止皮毛污

染肝脏细胞。

⚠注：剪切过程中需保证肝脏的完整性，切记不要破坏肝脏。

- (3) 用镊子轻轻将胃及肠子往右翻开，暴露肝门静脉和下腔静脉，灌注管路提前连接好灌注液①，整个灌注装置已排除空气，将灌流速度设置为 5 mL/min，然后将注射针插入肝门静脉，启动蠕动泵，可明显看到肝脏有膨胀变白的倾向说明插针正确，随后立即剪断下腔静脉最下沿位置，释放血液，待灌注稳定 5~10 s 后将灌流速度逐步缓慢加大到 8 mL/min（大鼠的最大灌流速度为 12 mL/min），用镊子夹住下腔静脉时肝脏组织膨大并立起来，说明灌注过程正常，无漏液现象。



- (4) 直到瓶内灌注液①即将吸干时（避免吸入空气），需暂停蠕动泵，更换为灌注液②继续灌注 60 mL（SD 大鼠 130 mL），灌注流速依然为 8 mL/min（大鼠的最大灌流速度为 12 mL/min）；灌注过程中，可适当将下腔静脉夹住，观察是否出现漏液，如有漏液情况需及时调整注射针的位置。

⚠注：灌注液更换过程中不能有气泡进入灌注管内，灌注液之间的衔接要紧密。

- (5) 灌注结束后，取下完整的肝脏组织，转移到盛有 5 mL 灌注液②的平皿中，轻轻地将组织撕扯成小块，释放单细胞，残留的组织加入含有 3~5 mL 灌注液②的组织处理管中，安装到单细胞悬液制备仪的套管中，并装上加热套，运行程序 M_Hepatocyte_Heater。

⚠注：如需进行原代细胞培养，灌注完毕取下肝脏时，需确保肝脏完整不破损，并在含有 1%双抗的培养基内漂洗肝脏表面，再进行后续单细胞的释放，避免后续细胞培养产生污染。

⚠注：灌注完毕释放单细胞必须在含有灌注液②的平皿或组织处理管里进行，如果不使用单细胞悬液制备仪，可通过手工撕开或挤压组织方法获取单细胞悬液。

- (6) 处理结束后，用 1 mL 冷的 DMEM 或 RPMI 1640（含 10%FBS）培养基润湿 100 μ m 细胞滤器，将平皿或组织处理管中的细胞悬液滤过 100 μ m 细胞滤器，再用 5~10 mL 冷的 DMEM 或 RPMI 1640（含 10%FBS）培养基冲洗平皿或组织处理管并滤过上述 100 μ m 细胞滤器，收集于 50 mL 离心管。

- (7) 离心：4°C，50 \times g，离心 3 min，离心结束后，使用移液器弃掉上清液。


⚠注：离心过程需要在 4°C 条件下进行。

- (8) 活细胞纯化实验：

(a) 活细胞纯化稀释液=3 mL 活细胞纯化液 + 5.1 mL 冷的 DMEM 或 RPMI 1640（含 10%FBS）

培养基，充分混匀即可使用。

- (b) 如纯化 1 只鼠的肝细胞，加入 8 mL 活细胞纯化稀释液重悬细胞沉淀，分别取 4 mL 加入 15 mL 离心管中，然后沿管壁向离心管小心地加入 4 mL DMEM 或 1640 培养基（切勿扰动下层，加入后可见明显分层）。

 注：如想获得尽可能多的活细胞数量，需增加活细胞纯化稀释液用量，并分多管纯化。

- (c) 离心：800×g，升 5 降 3，4°C 离心 10 min；离心后，吸取活细胞纯化液和 1640 培养基之间的浑浊带（活细胞层），转移到新的 15 mL 离心管中，加入 5~10 mL 冷的 DMEM 或 RPMI 1640（含 10%FBS），轻轻上下颠倒混匀。

- (d) 50×g，4°C 离心 3 min，离心结束后，使用移液器弃掉上清液。

- (e) 使用冷的 DMEM 或 RPMI 1640（含 10%FBS）培养基重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

8 注意事项

- (1) 本试剂盒有效期为 12 个月，瑞沃德不保证过期产品的有效性。
- (2) 如组织解离后进行下游细胞培养，应保证在无菌条件下完成所有操作。
- (3) 酶试剂分装保存，避免反复冻融，且使用时为保持酶活性需要在冰上或 4°C 冰箱溶解后使用。

*注意：组织处理管不在美国销售。

©2024 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司，版权所有，保留所有权利。

深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司

地址：深圳市南山区西丽街道西丽社区打石一路深圳国际创新谷七栋 A 座 1901 房（A 座 9 层、19 层、20 层，D 座 9 层）

邮编：518000

电话：0755-86111281 400 966 9516

售后邮箱：service@rwdls.com

网址：www.rwdls.com

在线商城：www.rwdmall.com