

## 动物肝星状细胞分离培养试剂盒产品说明书

### 主要用途

HL 动物肝星状细胞分离培养试剂是一种旨在从动物活体肝组织中分离出活力保证、高度纯化的原代细胞株的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。适合于各种动物肝星状细胞的制备。其制备产量高，活力保证，纯度可达 90%。可以被用于细胞与细胞之间和细胞与基质之间相互作用的分析，以及肝纤维化、肝硬化、肝再生等的研究。产品即到即用，严格无菌、性能稳定，分离产量和纯度堪称同类产品最佳。

### 技术背景

肝星状细胞（Hepatic stellate cells; HSC），也称为Ito细胞、维生素A储存细胞、脂肪细胞、或脂肪储存细胞。其位于实质细胞（parenchymal cell）和内皮细胞（endothelial lining）之间，具有维甲类化合物储存和体内平衡、胞外基质重建、生长因子和细胞因子的制造、窦腔收缩和舒张、肝组织发育和再生的功能，与肝纤维化的发生和肿瘤转移有关。

### 产品内容

HL 清理液（Reagent A）	25 毫升
HL 酶解液（Reagent B）	25 毫升
HL 强化液（Reagent C）	25 毫升
HL 平衡液（Reagent D）	25 毫升
HL 净化液（Reagent E）	100 毫升
HL 离心液（Reagent F）	25 毫升
HL 培养液（Reagent G）	500 毫升
产品说明书	1 份

### 保存方式

保存 HL 酶解液（Reagent B）、HL 强化液（Reagent C）、HL 平衡液（Reagent D）和 HL 净化液（Reagent E）在 -20°C 冰箱里；其余的保存在 4°C 冰箱里，HL 离心液（Reagent F），避免光照；有效保证 6 月

### 用户自备

2 升三角烧瓶：用于盛放麻醉动物的容器

乙醚：用于麻醉动物

手术器械：用于解剖动物

18 号静脉穿刺针：用于静脉灌注

恒温水浴摇床：用于孵育反应

15 毫升锥形离心管：用于细胞制备的容器

50 毫升锥形离心管：用于组织收集后

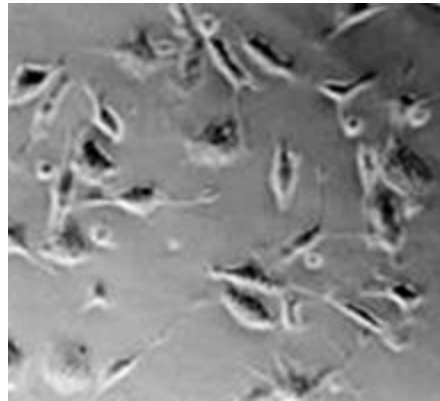
1 毫升无菌塑料吸管：用于提取细胞  
75cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶或 100mm 细胞培养皿：用于原代细胞培养的容器  
4°C 台式离心机：用于沉淀细胞  
光学显微镜：用于观察细胞形态

## 实验步骤

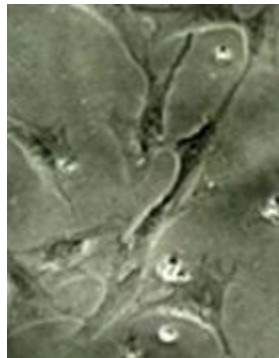
实验开始前，将 -20°C 冰箱里的试剂置于冰槽里冻融，同时将 **HL 培养液 (Reagent G)** 置于 37°C 恒温水槽预热。然后进行下列操作。

1. 准备 1 个 2 升三角烧瓶
2. 放入 300 至 500 克左右的大鼠
3. 注入 2 毫升乙醚，盖上（注意：剂量过高或过低，会影响肝脏供体的质量）
4. 观察大鼠，直至其四肢瘫软、背部肌肉松弛
5. 取出大鼠，局部消毒
6. 手术剖腹：上腹部十字形切口
7. 游离肝脏，并找到门静脉和下腔静脉
8. 剪开下腔静脉，使静脉血放掉
9. 封扎下腔静脉
10. 使用 18 号静脉穿刺针在脾静脉开口平面以下穿刺门静脉
11. 缓慢由门静脉注入 5 毫升 4°C 预冷的 **HL 清理液 (Reagent A)**
12. 室温下静置 2 分钟（注意：通过下腔静脉去除上述溶液）
13. 再次缓慢注入 5 毫升 4°C 预冷的 **HL 酶解液 (Reagent B)**
14. 室温下静置 10 分钟（注意：通过下腔静脉去除上述溶液）
15. 继续缓慢注入 5 毫升 4°C 预冷的 **HL 强化液 (Reagent C)**
16. 放进 37°C 培养箱里静置 30 分钟（注意：可以保留 **HL 强化液 (Reagent C)**）
17. 手术切除并剥离肝脏
18. 即刻用刀片切碎组织
19. 放进 50 毫升锥形离心管
20. 加入 5 毫升 4°C 预冷的 **HL 平衡液 (Reagent D)**
21. （选择步骤）4°C 温度下，使用组织匀浆器匀化组织（注意：如果刀切效果欠佳）
22. 放进 37°C 恒温水浴摇床孵育 30 分钟，速度为 50RPM（注意：严格无菌）
23. （选择步骤）使用尼龙网（100 至 200 微米孔径）过滤
24. 放进 4°C 台式离心机离心 2 分钟，速度为 50g
25. 小心移取上清液到新的 15 毫升锥形离心管
26. 放进 4°C 台式离心机离心 10 分钟，速度为 450g
27. 小心抽掉上清液（注意：避免过多液体残留）
28. 加入 5 毫升 **HL 净化液 (Reagent E)**，混匀细胞颗粒群
29. 加入 5 毫升 **HL 离心液 (Reagent F)**，轻柔上下倾倒，充分混匀（注意：使用前，摇匀 **HL 离心液 (Reagent F)**）
30. 放进 4°C 台式离心机离心 20 分钟，速度为 1450g（注意：离心刹车为 0）
31. 小心取出离心管，可见上层和顶面弥散的白色样品带（此为肝星状细胞）
32. 用 1 毫升无菌塑料吸管小心吸取白色样品带
33. 移入到新的 15 毫升锥形离心管

34. 加入 10 毫升 **HL 净化液 (Reagent E)**
35. 放进 4°C 台式离心机离心 10 分钟，速度为 450g
36. 小心抽去上清液
37. 加入 10 毫升 37°C 预热的 **HL 培养液 (Reagent G)**，混匀细胞颗粒群
38. 转移到 75cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶或 100mm 细胞培养皿
39. 放进 37°C 二氧化碳细胞培养箱孵育 48 小时贴壁生长
40. 更换 **HL 培养液 (Reagent G)**
41. 光学显微镜观察：静止型肝星状细胞—脂肪滴胞浆，细胞狭小，细胞核偏离中心



42. (选择步骤) 或 295nm 波长下可见维生素 A 自发荧光现象
43. 以后，每间隔 48 小时更换 **HL 培养液 (Reagent G)** 一次，直至细胞生长铺满培养瓶或培养皿平面
44. 7 至 10 天后的细胞为激活型肝星状细胞—形态呈现为肌成纤维细胞 (myofibroblast; MFB) 形状；细胞变长，没有脂肪滴



## 注意事项

1. 本产品为 5 次操作
2. 本产品适合小鼠和人体肝星状细胞分离
3. 本产品适合各种周龄的大、小鼠
4. 注意调整小鼠麻醉剂量
5. 所有操作均须在 4°C 或以下状态进行
6. 所有操作均须在无菌状态下进行
7. 建议严格控制操作时间：建议小鼠的 **HL 强化液 (Reagent C)** 和 **HL 平衡液 (Reagent D)** 孵育时间为大鼠的二分之一
8. 用户根据实际情况，调整试剂用量：建议小鼠剂量为大鼠剂量的五分之一
9. 在使用 **HL 清理液 (Reagent A)** 灌注前，用户可以使用生理盐水清除血液一次

10. 本产品所获得的肝星状细胞纯度（可达到90%）和产量（ $2-10 \times 10^5$ 细胞/克组织）
11. 使用**HL离心液（Reagent F）**前，须摇匀后加入；并注意避免污染母液
12. 含有样品的**HL净化液（Reagent E）**和**HL离心液（Reagent F）**容量之比为1:1
13. 分离的肝星状细胞活力检测建议使用HL细胞活力台盼蓝染色试剂盒—HL10009
14. 肝星状细胞的鉴定可以使用DESMIN抗体免疫组化染色
15. 用户根据需要，可以加入胰岛素（0.02 IU/毫升）或PDGF生长因子（40纳克/毫升）或TGF因子（10纳克/毫升）到肝星状细胞培养液中
16. 本公司提供系列细胞培养产品

## 质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定分离的细胞维持正常活性
3. 本产品经鉴定分离的细胞纯度达 90%