

大小鼠肝细胞提取试剂盒-15T 说明书

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-15T	DHHE-2515	15 T

产品描述

大小鼠肝细胞提取试剂盒-15T 可以将小鼠或 SD 大鼠（6 ~ 9 weeks）肝脏组织温和、快速、高效地制备成肝实质细胞悬液。这一优化方案能够获得尽可能多、细胞活率高且碎片少的单细胞悬液。制备获得的单细胞悬液可继续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：使用两步灌注法，将肝脏组织制备成单细胞悬液，在保证不损伤细胞的情况下温和的释放更多单细胞，试剂盒发挥酶解消化作用，解离后用细胞滤器过滤样本，以去除样本中的组织残渣，从而获得单细胞悬液。

产品成分

产品名称	组分名称	规格	储存条件
大小鼠肝细胞提取试剂盒-15T	酶 A 试剂（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	酶 B 试剂（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	酶 C 试剂（干粉）	1 瓶	-25 ~ -15℃
	Buffer B（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃
	Buffer C（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃
	试剂 E（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	试剂 G（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	活细胞纯化液（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃

测试容量

单次建议处理组织如下：

组织类型	测试容量	样本起始量
小鼠肝脏组织	15 T	每次处理 1 只小鼠
SD 大鼠肝脏组织	7 T	每次处理 1 只大鼠

运输和保存

- ✧ 本产品应当 2 ~ 8℃运输。
- ✧ 本试剂盒因各组分储存温度不同分为两个包装，请按照各包装盒贴温度标识进行分开存储。
- ✧ 酶试剂建议溶解后混匀分装保存，避免反复冻融和剧烈振荡。
- ✧ 本产品从生产之日起有效期 12 个月。

试剂与仪器要求

试剂	HBSS 缓冲液（含 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ ）	PBS 缓冲液	FBS 胎牛血清
	RPMI 1640 或 DMEM 培养基	NaOH 溶液	
耗材	小型注射针或留置针	100 μm 细胞滤器	组织处理管（可选，瑞沃德）
	加热套（可选，瑞沃德：#HJ-400）	0.22 μm 针头过滤器（可选）	
仪器设备	高速台式冷冻离心机（瑞沃德：#M1416R）	恒温水浴锅	蠕动泵
	单细胞悬液制备仪（可选，瑞沃德）		

实验操作

试剂准备

- 配制酶 A 溶液：用 14 mL HBSS 缓冲液（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）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）。
- 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。
- 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。
- 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，该试剂在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- 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，该试剂在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。

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 针头过滤器进行无菌过滤处理，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 40 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⁺ ）	/

- ⚠ 注意：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。
- ⚠ 注意：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 140 mL。
- ⚠ 注意：离心过程全程需要在 4℃条件下，实验前请提前预冷离心机。

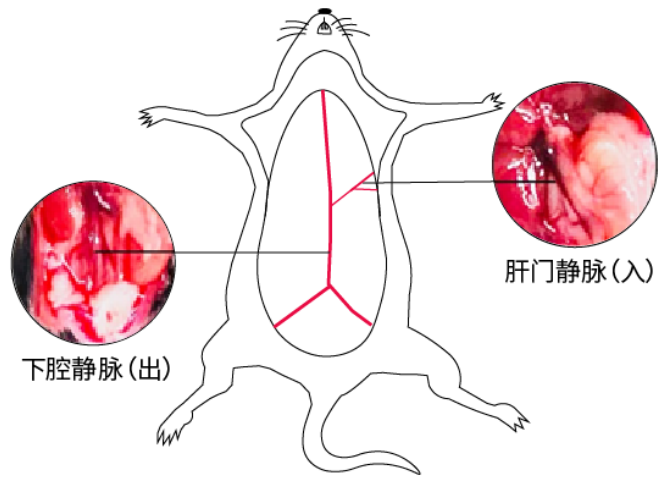
手工裂解方案

- 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。

⚠ 注意：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，将灌注管装置空气排除，将灌流速度设置为 5mL/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 5~10s 后将灌流速度逐步缓慢加大到 8mL/min (大鼠的最大灌流速度为 12mL/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 8mL/min (大鼠的最大灌流速度为 12mL/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。

⚠ 注意：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。

⚠ 注意：如果不使用单细胞悬液制备仪，可使用手工撕开或挤压组织方法处理残留的组织，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。

⚠ 注意：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。

(6) 处理结束后，用含有 10% FBS 且预冷的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基润洗 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 20~30 mL 含有 10% FBS 且预冷的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基冲洗平皿及组织处理管并滤过 100 μ m 细胞滤器，收集于 50 mL 离心管，轻轻上下颠倒混匀 5 次。

⚠ 注意：如想获得更多细胞，可使用镊子轻轻将筛网上有残留的组织撕开再用培养基冲洗细胞滤器，尽可能将细胞滤器上面的细胞悬液冲洗下来。

(7) 离心：4℃，50×g，离心 3 min，离心结束后，使用 5 mL 移液器弃掉上清液。

(8) 使用 20 mL 含有 10% FBS 且预冷的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基重悬步骤 (7) 的细胞沉淀，混匀后再次 4℃，50×g，离心 3 min，离心结束后，使用 5 mL 移液器彻底弃掉上清液。

(9) 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 (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，然后使用 1mL 移液器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)。

⚠ 注意：滴加速度尽可能慢，否则影响纯化后分层效果。

⚠ 注意：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℃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 50 mL 离心管中，加入 20 mL 含有 10% FBS 且预冷的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基，轻轻上下颠倒混匀 5 次。

(d) 4℃，50×g 离心 3 min，离心结束后，使用 5 mL 移液器弃掉上清液。

(e) 使用含有 10% FBS 且预冷的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基或含有 0.5% BSA 冷的缓冲液重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

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℃冰箱溶解后使用。

©2026 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