



(10) 授权公告号 CN 112342182 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 20

(21) 申请号 202011180816.9

(22) 申请日 2020.10.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112342182 A

(43) 申请公布日 2021.02.09

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72) 发明人 曹红翠 陈文怡 俞炯 潘巧玲
杨金凤

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

专利代理师 周世骏

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件

EP 2103686 A1, 2009.09.23

WO 2016148216 A1, 2016.09.22

CN 110257331 A, 2019.09.20

CN 103031270 A, 2013.04.10

US 2007238175 A1, 2007.10.11

刘小卫.《Jagged1介导的Notch信号通路激活诱导大鼠肝移植术后胆管上皮-间质转变的研究》.《中国优秀博士学位论文全文数据库(电子期刊) 医药卫生科技辑》.2012, (第2012/07期), 第E066-9页.

王艳红等.小鼠肝内胆管上皮细胞的分离与鉴定.《动物医学进展》.2015, 第36卷(第7期), 第43~46页.

何瑶等.大鼠肝脏非实质细胞分离及鉴定.《中国实用医刊》.2010, 第37卷(第9期), 第42~44页.

董炎.脑死亡供肝移植术后缺血性胆道损伤及其机制研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 医药卫生科技辑》.2018, (第2018/12期), 第E066-206页.

张焯.胆管上皮细胞上皮-间质转变以及BMP-7的逆转效应.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 医药卫生科技辑》.2009, (第2009/11期), 第E066-105页.

审查员 张范范

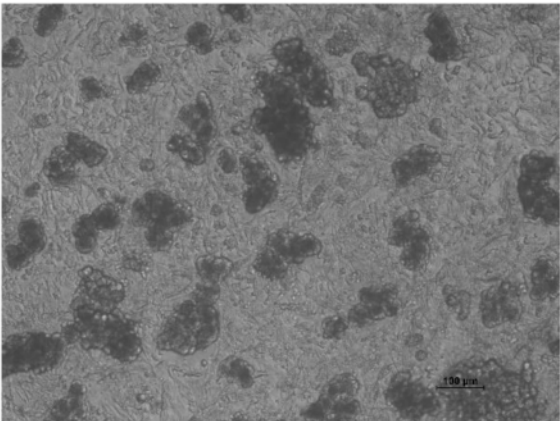
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效分离小鼠肝脏胆管细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及细胞分离技术,旨在提供一种高效分离小鼠肝脏胆管细胞的方法。包括主要步骤:分离肝脏内胆管;沉降与多步离心富集导管干细胞;消化成单个细胞。本发明通过胆管片段的重力沉降和多步骤离心,分离得到较纯的胆管细胞。本发明能够提高细胞得率和细胞活率。与显微镜下手工挑选胆管细胞相比,由于减少了手工操作步骤,能够减轻操作者的工作负担;与流式细胞分选术相比,由于不需要孵育流式抗体和使用流式分析仪,因此能够降低经济成本。



1. 一种高效的分离小鼠肝脏胆管细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(一)分离肝脏内胆管:

(1)取新鲜小鼠尸体,用75%酒精棉擦拭干净后剪开腹部,经下腔静脉注射无菌PBS 1×灌肝去除红细胞;切下整个肝脏,在装有无菌PBS1×的培养皿中清洗后,置于含预冷改良DMEM培养基的培养皿中备用;

所述改良DMEM培养基是指,包含1%体积比的100×谷氨酰胺、110mg/L的丙酮酸盐、1%体积比的FBS和1%体积比的青霉素/链霉素的DMEM培养基;

(2)将肝脏剪切成1mm³的碎片,然后转移到50ml离心管中;

(3)加入15毫升预冷清洗液,用10毫升移液管上下吹打,去除漂浮在溶液上部的红细胞和脂肪;待肝脏组织碎片沉到管底,尽量弃去上清液,包括任何漂浮的脂肪块;按本步骤重复洗涤一次;

(4)用100μl微量移液枪除去残留的清洗液,加入10毫升37℃预热的消化液;将混合液移至振荡器中,在37℃条件下震荡处理45~90分钟;所述消化液是指,包含0.125mg/ml胶原酶D、0.125mg/ml分散酶II和0.1mg/ml DNase I的DMEM培养基;

(5)将混合液在37℃条件下震荡50-60分钟时,混匀后用微量移液枪吸取200ul,在显微镜4倍目镜下检查等分试样是否存在大于3个的多个细胞聚集的胆管细胞团;如果不存在,则将混合液再返回振荡器,在37℃下继续震荡处理;每20分钟检查一次等分试样,直至胆管细胞团出现;

(6)将混合液的上清移至50ml离心管中,加入等量预冷洗涤液,在250G 和4℃ 条件下离心5分钟;弃上清,加入预冷洗涤液至15ml,混匀后再次离心,去除剩余的消化液,得到细胞团;

(二)沉降与多步离心富集导管干细胞:

(7)将细胞团重悬于含10ml清洗液的50ml离心管中,然后垂直置于冰上;静置30分钟后去除上清,留下沉淀;

(8)向沉淀中加10ml清洗液,经筛网过滤至另一个50ml离心管中;用无菌镊子夹除组织块,用移液枪吸取1ml清洗液轻柔冲洗筛网,将筛网上的白色细胞团收集至过滤后的滤液中;将滤液在60G和4℃条件下离心1min;

(9)去上清后,沉淀加5ml预冷清洗液混匀,在60G和4℃离心条件下1min;

(10)去上清,沉淀加1ml预冷清洗液混匀,转移到1.5ml离心管内,在500rpm和4℃条件下离心1min;

转移的操作方法为:先加600μl清洗液至沉淀中,吹打混匀后转移到1.5ml离心管内;再加入400μl清洗液轻柔吹打管壁3次,将剩余溶液转移到1.5ml离心管内;

(三)消化成单个细胞:

(11)将沉淀转移至经37℃预热的5ml 酶溶液内,孵育10min;每隔2分钟取10ul,在显微镜下观察是否消化成单个细胞,直至90%~95%的胆管片段都消化成单个细胞;所述酶溶液是指,含有0.1mg/ml DNase I的TrypLE溶液;

(12)加等量预冷清洗液,在350G和8℃条件下离心5min,去除酶溶液;按本步骤重复清洗一次;

(13)加1ml预冷清洗液,混匀后取10μl行细胞计数,其余在500rpm和4℃条件下离心

1min;

(14) 去上清,得到单个胆管细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,肝脏的剪碎操作应在含培养基的平皿中进行,且平皿放置在冰上。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(7)中,所述垂直放置是指,将整个离心管垂直埋入冰中。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(8)中,所述筛网的孔径为100 μm 。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述预冷,是指预先冷却至4℃。

一种高效分离小鼠肝脏胆管细胞的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及细胞分离技术,特别涉及一种高效分离小鼠肝脏胆管细胞的方法。

背景技术

[0002] 胆管细胞是位于肝内和肝外胆管内的上皮细胞,具有增殖性,参与胆汁的产生和体内稳态。胆管细胞与肝细胞损害、肝脏再生密切相关,故原代胆管细胞在体外的分离和培养,是肝脏疾病体外研究的基础。在现有技术中,胆管细胞的分离方式主要有显微镜下手工挑选和流式细胞分选法两种。前者的挑选过程对无菌条件要求较高,且耗费精力;后者经济成本较高,获得的胆管细胞的活率容易受到影响。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术中的不足,提供一种高效分离小鼠肝脏胆管细胞的方法。

[0004] 为解决技术问题,本发明的解决方案是:

[0005] 提供一种高效的分离小鼠肝脏胆管细胞的方法,包括以下步骤:

[0006] (一)分离肝脏内胆管:

[0007] (1)取新鲜小鼠尸体,用75%酒精棉擦拭干净后剪开腹部,经下腔静脉注射无菌PBS 1×灌肝去除红细胞;切下整个肝脏,在装有无菌PBS1×的培养皿中清洗后,置于含预冷改良DMEM培养基的培养皿中备用;

[0008] 所述改良DMEM培养基是指,包含1%体积比的100×谷氨酰胺、110mg/L的丙酮酸盐、1%体积比的FBS和1%体积比的青霉素/链霉素的DMEM培养基;

[0009] (2)将肝脏剪切成1mm³左右的碎片,然后转移到50ml离心管中;

[0010] (3)加入15毫升预冷清洗液,用10毫升移液管上下吹打,去除漂浮在溶液上部的红细胞和脂肪;待肝脏组织碎片沉到管底,尽量弃去上清液,包括任何漂浮的脂肪块;按本步骤重复洗涤一次;

[0011] (4)用100μl微量移液枪除去残留的清洗液,加入10毫升37℃预热的消化液;将混合液移至振荡器中,在37℃条件下震荡处理45~90分钟;

[0012] (5)将混合液在37℃条件下震荡50-60分钟时,混匀后用微量移液枪吸取200μl,在显微镜4倍目镜下检查等分试样是否存在大于3个的多个细胞聚集的胆管细胞团;如果不存在,则将混合液再返回振荡器,在37℃下继续震荡处理;每20分钟检查一次等分试样,直至胆管细胞团出现;

[0013] (6)将混合液的上清移至50ml离心管中,加入等量预冷洗涤液,在250G和4℃条件下离心5分钟;弃上清,加入预冷洗液至15ml,混匀后再次离心,去除剩余的消化液,得到细胞团;

[0014] (二)沉降与多步离心富集导管干细胞:

[0015] (7)将细胞团重悬于含10ml清洗液的50ml离心管中,然后垂直置于冰上;静置30分

钟后去除上清,留下沉淀;

[0016] (8) 向沉淀中加10ml清洗液,经筛网过滤至另一个50ml离心管中;用无菌镊子夹除组织块,用移液枪吸取1ml清洗液轻柔冲洗筛网,将筛网上的白色细胞团收集至过滤后的滤液中;将滤液在60G和4℃条件下离心1min;

[0017] (9) 去上清后,沉淀加5ml预冷清洗液混匀,在60G和4℃离心条件下1min;

[0018] (10) 去上清,沉淀加1ml预冷清洗液混匀,转移到1.5ml离心管内,在500rpm 和4℃条件下离心1min;

[0019] (三) 消化成单个细胞:

[0020] (11) 将沉淀转移至经37℃预热的5ml酶溶液内,孵育10min;每隔2分钟取 10ul,在显微镜下观察是否消化成单个细胞,直至90%~95%的胆管片段都消化成单个细胞;

[0021] (12) 加等量预冷清洗液,在350G和8℃条件下离心5min,去除酶溶液;按本步骤重复清洗一次;

[0022] (13) 加1ml预冷清洗液,混匀后取10ul行细胞计数,其余在500rpm和4℃条件下离心1min;

[0023] (14) 去上清,得到单个胆管细胞。

[0024] 本发明中,所述步骤(2)中,肝脏的剪碎操作应在含培养基的平皿中进行,且平皿放置在冰上。

[0025] 本发明中,所述步骤(4)中,所述消化液是指,包含0.125mg/ml胶原酶D、0.125mg/ml 分散酶II和0.1mg/ml DNase I的DMEM培养基。

[0026] 本发明中,所述步骤(7)中,所述垂直放置是指,将整个离心管垂直埋入冰中。

[0027] 本发明中,所述步骤(8)中,所述筛网的孔径为100μm。

[0028] 本发明中,所述步骤(10)中,转移的操作方法为:先加600ul清洗液至沉淀中,吹打混匀后转移到1.5ml离心管内;再加入400ul清洗液轻柔吹打管壁3次,将剩余溶液转移到1.5ml离心管内。

[0029] 本发明中,所述步骤(11)中,所述酶溶液是指,含有0.1mg/ml DNase I的TrypLE溶液。

[0030] 本发明中,所述预冷,是指预先冷却至4℃。

[0031] 发明原理描述:

[0032] 本发明通过胆管片段的重力沉降和多步骤离心,分离得到较纯的胆管细胞;这是本领域技术人员通常不会采用的技术手段。

[0033] 由于聚集的胆管细胞团的比重比其余细胞碎片的比重大,易于通过物理方式分离的原因,本发明能够提高细胞得率。由于分离得到的胆管细胞受到化学损伤小,细胞大部分时间处于4℃低温状态,整体实验操作时间较短等原因,本发明能够提高细胞活率。

[0034] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0035] (1) 本发明简化了胆管细胞的提取步骤,即通过胆管片段的重力沉降和多步骤离心,分离得到较纯的胆管细胞;与现有技术中的分离结果相比,本发明分离的小鼠胆管细胞得率大于 1×10^6 /只,且细胞活率大于85%。显微镜下手工挑选分离方式中,细胞得率通常在 $(5-10) \times 10^5$ /只,细胞活率在70-80%。流式细胞分选法的分离方式中,细胞得率通常在 $(1-5) \times 10^5$ /只,细胞活率在60-80%。

[0036] (2) 本发明与显微镜下手工挑选胆管细胞相比,由于减少了手工操作步骤,能够减轻操作者的工作负担;与流式细胞分选术相比,由于不需要孵育流式抗体和使用流式分析仪,因此能够降低经济成本。

附图说明

[0037] 图1为显微镜下观察消化过程中出现的胆管细胞团(10倍物镜观察);

[0038] 图2为显微镜下观察单个胆管细胞(10倍物镜观察)

具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例子,对本发明的技术方案详细描述。

[0040] 肝脏来源说明:

[0041] 本发明选择大于7周龄、体重20克以上的新鲜小鼠尸体,用75%酒精棉擦拭干净后剪开腹部,在生物安全柜进行后续试验。

[0042] 本发明所用的小鼠肝脏均取自实验室废弃的新鲜成年C57BL/6小鼠尸体,技术方案本身并不涉及任何针对活体小鼠的手术或解剖操作。

[0043] 仪器与试剂:

[0044] 恒温摇床(Thermo,America),离心管(Corning,America),离心机(Eppendorf, German),100微米滤网(Corning,America),水浴箱(Thermo,America),倒置显微镜(Nikon, Japan),载玻片(世泰,中国),培养皿(Thermo,America),移液管(Thermo,America),移液枪(Eppendorf,German)。

[0045] DMEM(Gibco,America),PBS(吉诺,中国),脱氧核糖核酸酶I(Sigma,America), DMEM(Gibco,America),胶原酶D(Roche),Dispase II(Life Technologies),FBS(Gibico),青霉素/链霉素(Corning)、HEPES(Life Science Products&Services), GlutaMAX(Gibico)、TrypLE(Life Technologies)。

[0046] 本发明所述分离小鼠肝脏胆管细胞的方法,包括以下步骤:

[0047] (一)分离肝脏内胆管:

[0048] (1)取新鲜小鼠尸体,用75%酒精棉擦拭干净后剪开腹部,经下腔静脉注射无菌PBS 1×灌肝去除红细胞;切下整个肝脏,在装有无菌PBS1×的培养皿中清洗后,置于含预冷(预先冷却至4度,以下同)改良DMEM培养基的培养皿中备用;

[0049] 所述改良DMEM培养基是指,包含质量百分比1%(体积比)100×谷氨酰胺、110mg/L丙酮酸盐、1%(体积比)FBS和1%(体积比)青霉素/链霉素的DMEM培养基;

[0050] (2)使用细剪刀将肝脏剪切成1mm³左右的碎片,然后转移到50ml离心管中;肝脏的剪碎操作应在含培养基的平皿中进行,且平皿放置在冰上。

[0051] (3)加入15毫升预冷清洗液,用10毫升移液管上下吹打,去除漂浮在溶液上部的红细胞和脂肪;待肝脏组织碎片沉到管底,尽量弃去上清液,包括任何漂浮的脂肪块;按本步骤重复洗涤一次;

[0052] (4)用100μl微量移液枪除去残留的清洗液,加入10毫升37℃预热的消化液;将混合液移至振荡器中,在37℃条件下震荡处理45~90分钟;

[0053] 所述消化液是指,包含0.125mg/ml胶原酶D、0.125mg/ml分散酶II和0.1mg/ml

DNase I的DMEM培养基。

[0054] (5) 将混合液在37℃条件下震荡50-60分钟,混匀后用微量移液枪吸取200 μ l,在显微镜4倍目镜下检查等分试样是否存在大于3个的多个细胞聚集的胆管细胞团;如果不存在,则将混合液再返回振荡器,在37℃下继续震荡处理;每20分钟检查一次等分试样,直至胆管细胞团出现;

[0055] (6) 将混合液的上清移至50ml离心管中,加入等量预冷洗涤液,在250G和4℃条件下离心5分钟;弃上清,加入预冷洗液至15ml,混匀后再次离心,去除剩余的消化液,得到细胞团;

[0056] (二) 沉降与多步离心富集导管干细胞:

[0057] (7) 将细胞团重悬于含15ml清洗液的50ml离心管中,然后垂直置于冰上(将整个离心管垂直埋入冰中);静置30分钟后去除上清,留下沉淀;

[0058] (8) 向沉淀中加10ml清洗液,经孔径100 μ m的筛网过滤至另一个50ml离心管中;用无菌镊子夹除组织块,用移液枪吸取1ml清洗液轻柔冲洗筛网,将筛网上的白色细胞团收集至过滤后的滤液中;将滤液在60G和4℃条件下离心1min;

[0059] (9) 去上清后,沉淀加5ml预冷清洗液混匀,在60G和4℃离心条件下1min;

[0060] (10) 去上清,沉淀加1ml预冷清洗液混匀,转移到1.5ml离心管内,在500rpm 和4℃条件下离心1min;

[0061] 转移的具体操作方法为:先加600 μ l清洗液至沉淀中,吹打混匀后转移到1.5ml离心管内;再加入400 μ l清洗液轻柔吹打管壁3次,将剩余溶液转移到1.5ml离心管内。

[0062] (三) 消化成单个细胞:

[0063] (11) 将沉淀转移至经37℃预热的5ml酶溶液内,孵育10min;每隔2分钟取 10 μ l,在显微镜下观察是否消化成单个细胞,直至90%~95%的胆管片段都消化成单个细胞;所述酶溶液是指,含有0.1mg/ml DNase I的TrypLE溶液。

[0064] (12) 加等量预冷清洗液,在350G和8℃条件下离心5min,去除酶溶液;按本步骤重复清洗一次;

[0065] (13) 加1ml预冷清洗液,混匀后取10 μ l行细胞计数,其余在500rpm和4℃条件下离心1min;

[0066] (14) 去上清,得到单个胆管细胞。

[0067] 实验过程及结果验证:

[0068] 1. 分离的胆管细胞团形态观察(图1):

[0069] 在倒置显微镜下对胆管细胞进行观察发现,刚分离出来的细胞呈现卵圆形,饱满且透亮度好(10倍物镜),细胞核呈深褐色。细胞团内含至少2-4个细胞,紧密排列在一起。

[0070] 2. 消化后单个胆管细胞形态观察(图2):

[0071] 显微镜下细胞呈现卵圆形,细胞单个分散,饱满且透亮(10倍物镜),细胞核呈深褐色。

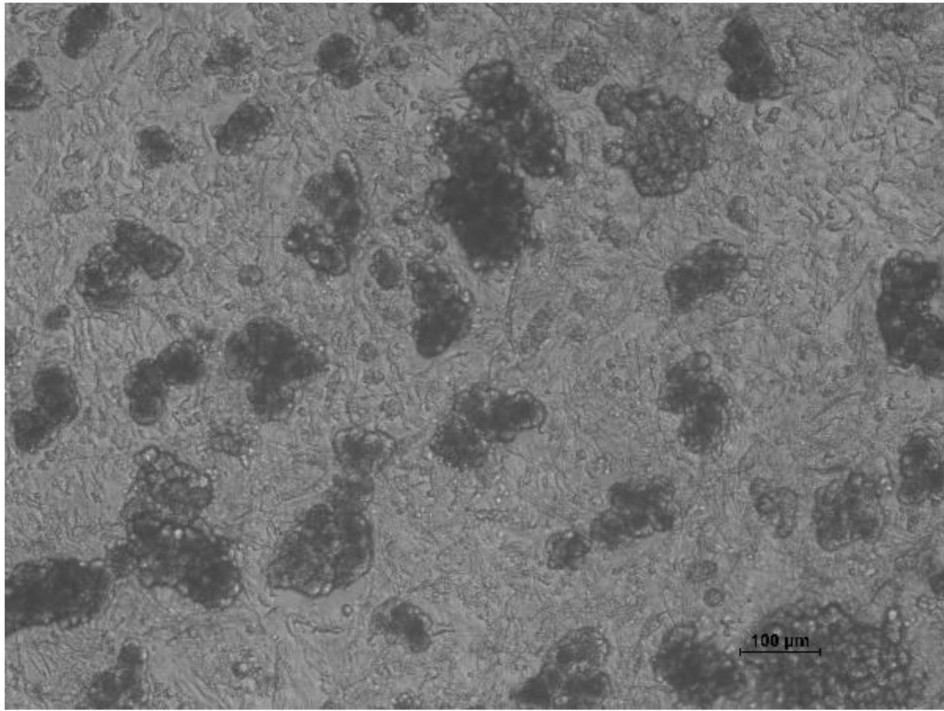


图1

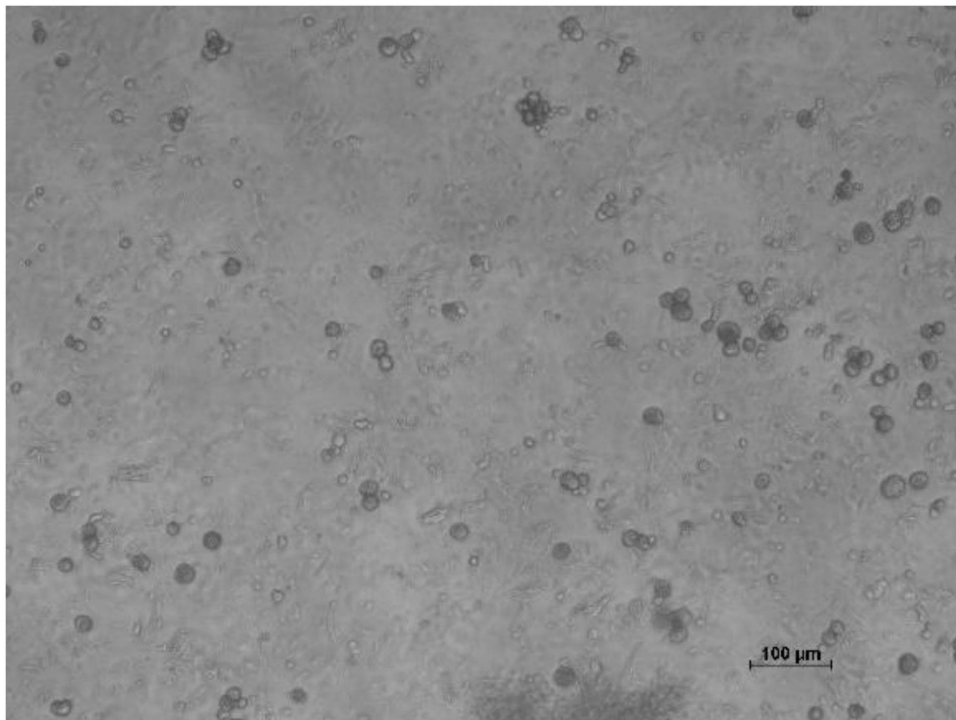


图2