

大鼠肺大动脉内皮细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-608

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

大鼠肺大动脉内皮细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠肺大动脉内皮细胞开发的。经验证，按照本试剂盒方法标准操作，1 Test 可获得一瓶细胞（T25 培养瓶），细胞数量 $>1 \times 10^6$ cells，按照 1:2 比例传代，可传 2-3 代，经 CD31 免疫荧光鉴定，细胞纯度可达 90% 以上。

二、适用范围

本产品适用于从 20-30 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的大鼠中提取肺大动脉内皮细胞。组织经分离、消化、铺板 72 h 后可获得肺大动脉内皮细胞 $>1 \times 10^6$ cells。

备注：提取 10 只大鼠的完整肺大动脉（每只鼠获得肺大动脉组织量如图 11a），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肺大动脉长短和数量不同而有所变化。若取得的组织量少可适当增加实验鼠用量，以免细胞量不足。

三、试剂盒组成成分

本试剂盒组分如下表：

成分名称	产品规格	性状	有效期
大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Pulmonary Great Artery Endothelial Cells	3Tests (250 mL) 10Test (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠肺大动脉内皮细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Rat Pulmonary Great Artery Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
大鼠肺大动脉内皮细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Pulmonary Great Artery Endothelial Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠肺大动脉内皮细胞添加剂 Supplement For Rat Pulmonary Great Artery Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (20 mL)	黄色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
大鼠肺大动脉内皮细胞铺板工作液 Plating Solution For Rat Pulmonary Great Artery Endothelial Cells	3Tests (3 mL) 10Tests (10 mL)	无色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
100 μm 细胞滤网 100 μm Cell Filter	3Tests (3 个) 10Tests (10 个)	绿色	常温, 有效期三年



备注：各成分请根据试剂管上的标签所示温度进行保存。消化液、铺板工作液、添加剂解冻后保质期仅一个月，建议初次使用试剂盒后按照说明书用量进行分装，冻存于-5~-20°C冰箱内，使用时再次解冻，避免反复冻融。

四、注意事项

1. 正式实验之前，推荐使用 1-2 只正常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，肺大动脉取材难，务必练习找准肺大动脉位置后再开始正式实验。
2. 试剂配制或分装需严格遵循无菌操作规范。分装后应立即用封口膜封住瓶口，做到即取即用，以避免培养基受到污染。

五、操作流程

(一) 实验前准备

1. 实验需自备试剂和耗材：PBS、手术器械（至少包含 3 把眼科剪、1 把直镊、2 把弯镊、1 把显微直镊、1 把显微弯镊、1 把显微剪）、6 cm/10 cm 培养皿、T25 培养瓶、6 孔板、解剖板（可用泡沫板替代）、若干个注射器针头以及若干个 2 mL/15 mL/50 mL 离心管，如需扩大培养需自备完培、胰酶。
2. 试剂解冻与复温：
 - 1) 大鼠肺大动脉内皮细胞专用消化液、大鼠肺大动脉内皮细胞添加剂：4°C 冰箱解冻，恢复至室温；
 - 2) 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液、大鼠肺大动脉内皮细胞基础培养基：恢复至室温。
3. 大鼠肺大动脉内皮细胞完全培养基配制：将 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞添加剂加入 50 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞基础培养基，混匀后待用。

备注：大鼠肺大动脉内皮细胞完全培养基保存条件：2-8°C，有效期：3 个月。配制完全培养基时可根据使用量进行配制，剩余添加剂需按照比例进行分装后，置于-5~-20°C 冰箱内保存，避免反复冻融。

4. 培养器皿包被：将 1 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞铺板工作液加入 6 cm 皿中，轻轻摇晃至均匀铺满孔底，然后将培养皿放入 37°C，5% CO₂ 培养箱内孵育 0.5-2 h 以上。

(二) 解剖操作

1. 动物消毒及处死：使用戊巴比妥钠过量注射处死动物后，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. 解剖取材步骤：
 - 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 和弯镊 2、眼科剪 3 和弯镊 3。
备注：将眼科剪和镊子成对放置，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) 固定大鼠：在超净工作台内，使用针头仰卧姿势固定大鼠，准备进行取材操作；
 - 3) 取材操作：
 - ① 使用直镊 1 固定夹住大鼠上腹部皮肤，用眼科剪 1 从上腹部开口，由开口向左右锁骨两侧剪



开皮肤，用直镊 1 将剪开的皮肤向上掀起，眼科剪 1 剪断黏连的肉膜组织，使胸骨完全暴露。

备注：皮肤剪至暴露出整个胸部，注意将毛发撕扯远离解剖区域，防止污染。

- ② 使用弯镊 2 夹住大鼠剑突软骨右下侧肋弓上的肌肉组织，用眼科剪 2 剪下肌肉，暴露出肋骨，使用弯镊 2 夹住肋骨，眼科剪 2 从右下侧肋骨剪断上至右肩胛骨锁骨处，再用眼科剪 2 横向剪断胸膈膜，沿左下侧肋骨剪断至左肩胛骨锁骨处，剪断胸骨柄，向上翻。

备注：胸腔内的剪刀不要太深，应轻挑向上向前剪，防止剪破肺组织，容易引发污染。

- ③ 转解剖板，将大鼠头朝向自己，左手使用弯镊 3 将胸腺扯下，以免阻碍视线，随后用弯镊 3 夹住心房轻轻向上提起，找到起于右心室的肺大动脉血管与主动脉弓，用眼科剪 3 略微向左偏从血管顶端向下剪，避免剪到食管，剪下包含肺大动脉血管的一团组织（包括心脏，主动脉弓，一小部分连接肺大动脉的肺组织），将组织放于装有 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液（如图 1）。

备注：肺大动脉取材操作难，建议先了解肺大动脉在体内的生长位置与走向，找准定位再下剪刀。以免取错组织。

（三）组织处理及消化

1. 组织处理：

- 1) 将显微直镊、显微弯镊和显微剪放在超净台内的 EP 管架上方，前端悬空；
- 2) 用这套新的显微剪镊，对组织进行操作：右手使用显微弯镊将组织在大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液中来回漂洗，去除血污，将组织转移到新的装有 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液的培养皿中。
- 3) 左手使用显微直镊，右手使用显微剪，将心脏底端 1/2 剪掉（如图 2）。右手使用显微弯镊，将血管内凝结的血块挤压掏出，将清理好的组织放入另一个新的装有 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液的培养皿中备用（如图 3）。

备注：取下的血管组织会有很多血污，可多清洗两遍，洗去大部分血污，以免后续分离目的血管时清洗液过于浑浊，影响视野。

- 4) 准备两个分别装有 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液的培养皿，左手使用显微直镊，右手使用显微弯镊，夹一块组织在其中一个培养皿内进行清理，首先找到主动脉弓与肺大动脉，轻轻撕下两个血管之间的淡黄色脂肪（如图 4）。
- 5) 沿着血管生长方向找到肺大动脉分支血管（如图 5），用显微直镊夹住分支，显微弯镊将分支从其它组织中剥离下来（如图 6），随后用显微剪沿血管根部连接心脏的位置剪下，得到了主动脉弓与肺大动脉组织（如图 7），清理掉血管上的黄粉色脂肪组织（如图 8）。
- 6) 将主动脉弓与肺大动脉血管用显微剪剪开（如图 9），清理掉多余的脂肪组织，留取纯净的肺大动脉组织（如图 10）。



7) 将组织放入装有 10 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液的培养皿中，纵向剖开血管（如图 11）。

备注：全程剥离撕扯的力道应当轻柔，避免对血管过度拉扯，影响细胞活性。

2. 组织消化：

- 1) 将剖开的肺大动脉组织放入装有 5 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用消化液的 6 cm 培养皿内，将培养皿放入 37°C、5% CO₂ 培养箱消化 30 min。
- 2) 消化完成后，从培养箱内取出培养皿，使用 5 mL 移液枪或巴氏吸管，向培养皿内加入 5 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液，吹打悬液约 30 次，将内皮细胞吹打下来。吹打混匀后，用显微弯镊将未消化完的大块肺大动脉组织夹出丢弃。

3. 细胞分离：

- 1) 将 100 μm 细胞滤网放置在全新的 50 mL 离心管管口，使用 1 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液润洗 100 μm 细胞滤网。
- 2) 用 5 mL 移液枪或巴氏吸管小心吸取上一步中的组织消化悬液，通过 100 μm 细胞滤网进行过滤。过滤完成后，可用干净枪头向滤网上方缓慢加入 2 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液来收集滤网上的组织消化悬液，收集滤液于 50 mL 离心管内。

备注：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) 将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内，1200 rpm 离心 5 min，弃上清，保留沉淀。

（四）细胞培养及传代

1. 细胞接种与培养：取出包被好的 T25 细胞培养瓶，吸弃大鼠肺大动脉内皮细胞铺板工作液，加入 3 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液（加入液体时缓慢沿壁加入，不要冲刷瓶底）润洗 T25 细胞培养瓶后，吸弃大鼠肺大动脉内皮细胞专用清洗液。用 5 mL 肺大动脉内皮细胞完全培养基重悬沉淀，接种于 T25 细胞培养瓶，于 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养。
2. 细胞换液：首次换液在第 48 h 进行离心换液，以后每 2-3 天换液一次。接种约 5-7 天后，细胞汇合度将达到 80-90%，且经本实验室验证，细胞的纯度可达 90% 以上。
3. 细胞传代：待细胞汇合度达到 80-90% 即可开始传代。首先，吸弃原上清液，加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，弃去 PBS，添加 0.25% 胰蛋白酶消化液 1 mL 至培养瓶中，轻微转动培养器皿至消化液覆盖整个皿底后，吸出多余胰蛋白酶消化液，37°C 温浴 1-3 min；倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆，轻敲培养板，大部分细胞脱落后加入 5 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞专用培养基终止消化。用 5 mL 移液枪或巴氏吸管轻轻吹打混匀，根据传代比例或实验需求，将细胞接种到新的培养器皿中，并置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。



六、常见问题

问题	可能原因	解决方法
细胞得量少	消化不充分	检查消化液保存条件，确保 4°C 存放时间没有超过 30 天
		确保组织轻柔吹打充分
	消化过度	严格控制消化时间
细胞增殖缓慢	培养基配制不当	确保完培配制比例正确，没有反复冻融
		确保完培在有效期内，配制时间没有超过三个月
	大鼠日龄过大	确保大鼠日龄在 20-30 天，日龄过大容易出现消化不充分、细胞增殖速度慢、细胞传代次数减少的情况
	传代比例不当	1:2 传代时确保是按照器皿底面积进行换算，保证细胞初始接种数量
	传代次数过多	确保细胞传代次数为 2-3 代，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
取材组织量不足	若肺大动脉组织得量少，可适量增加鼠量	
细胞纯度低	组织外膜、脂肪组织未去除彻底	确保血管清理干净
	组织块太小	若取材组织块小，可适当缩短消化时间 5-10 min

七、解剖参考图片

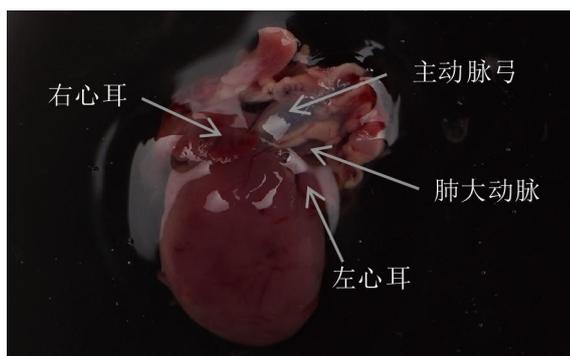


图 1 剪下包含肺大动脉血管的一团组织

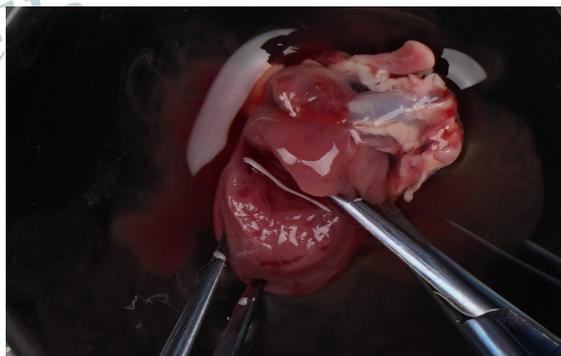


图 2 剪掉心脏底端 1/2



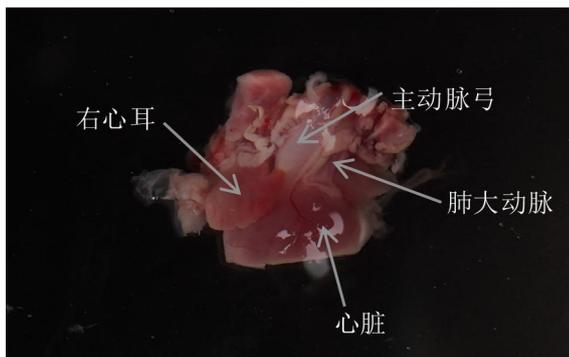


图 3 清理完血污的组织团

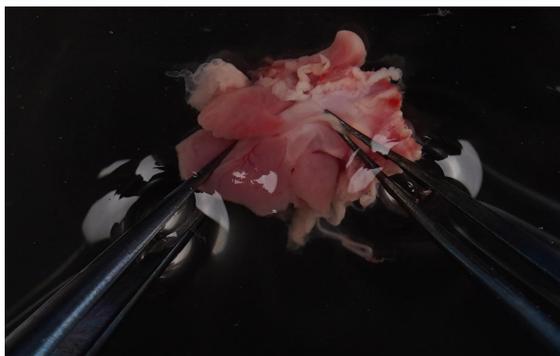


图 4a 去除主动脉弓与肺大动脉间的脂肪

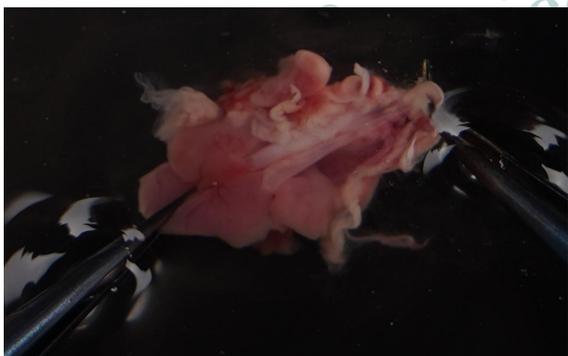


图 4b 去除主动脉弓与肺大动脉间的脂肪



图 5 找到肺大动脉，用显微直镊夹住

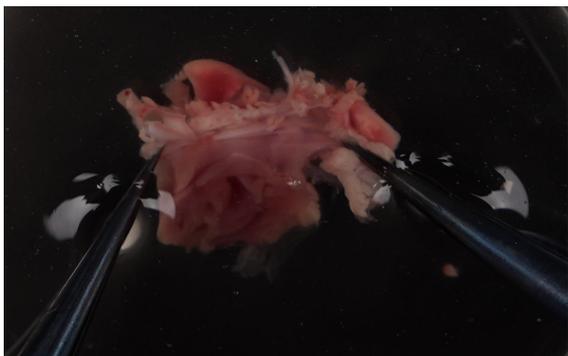


图 6a 剥离肺大动脉分支

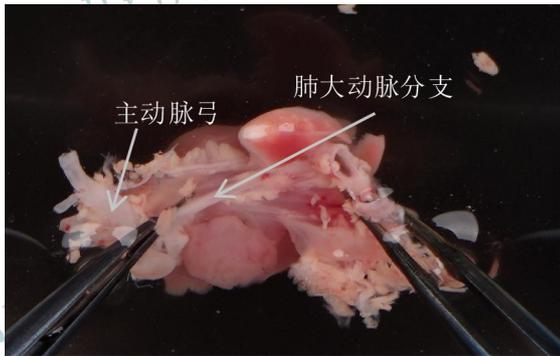


图 6b 剥离肺大动脉分支

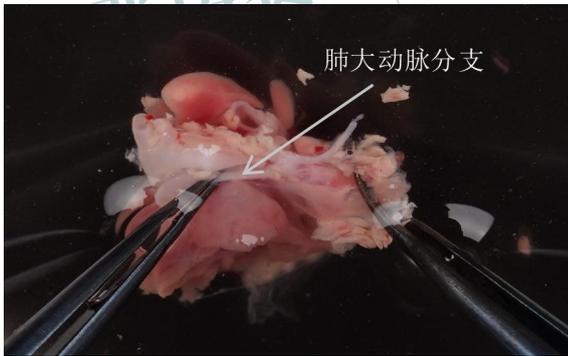


图 6c 剥离肺大动脉分支

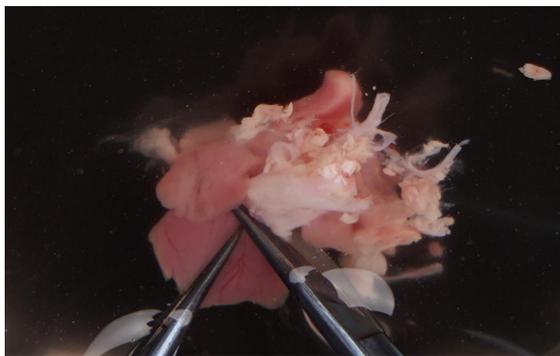


图 7a 沿血管根部连接心脏的位置剪下



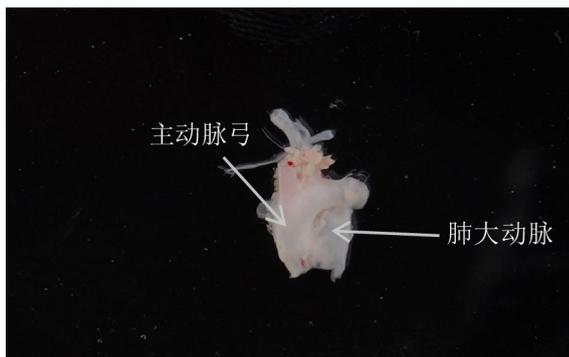


图 7b 剪下的主动脉与肺大动脉

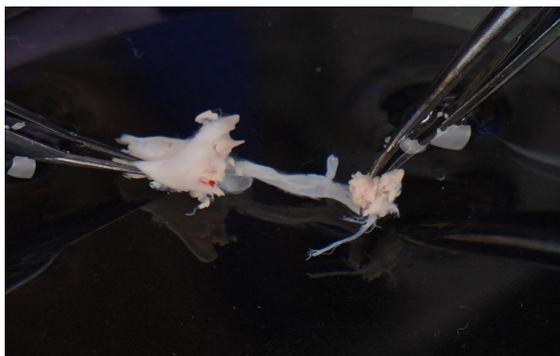


图 8 清理掉血管上的黄粉色脂肪



图 9 用显微剪将两根血管剪开



图 10 清理掉多余脂肪、外膜组织

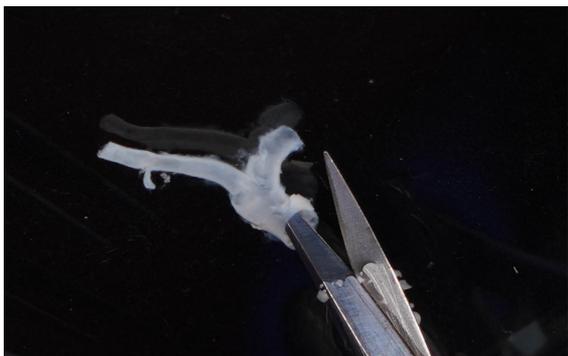


图 11a 纵向剖开肺大动脉



图 11b 纵向剖开肺大动脉



图 11c 纵向剖开肺大动脉



图 11d 纵向剖开肺大动脉

