

大鼠颞下颌关节软骨细胞分离培养试剂盒

产品货号：GP-CA-625

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

大鼠颞下颌关节软骨细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠颞下颌关节软骨细胞开发的。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 $>1 \times 10^6$ cells，按照 1:2 比例传代，可传代次为 3-5 代，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（II 型胶原蛋白） $>90\%$ 。

二、适用范围

本产品适用于从 14 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的大鼠中提取颞下颌关节软骨细胞。组织经分离、消化、铺板纯化后可获得颞下颌关节软骨细胞 $>1 \times 10^6$ cells。

备注：提取 8 只大鼠的颞下颌关节软骨组织（16 个颞下颌关节软骨），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颞下颌关节软骨组织大小和数量不同而有所变化。

三、试剂盒组分

本试剂盒组分如下表：

成分名称	产品规格	性状	储存条件
大鼠颞下颌关节软骨细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Temporomandibular Joint Chondrocytes	3Tests (250 mL) 10Test (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8℃, 有效期一年
大鼠颞下颌关节软骨细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Rat Temporomandibular Joint Chondrocytes	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃, 有效期一年
大鼠颞下颌关节软骨细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Temporomandibular Joint Chondrocytes	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8℃, 有效期一年
大鼠颞下颌关节软骨细胞添加剂 Supplement For Rat Temporomandibular Joint Chondrocytes	3Tests (10 mL) 10Tests (20 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃, 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
70 μm 细胞滤网 70 μm Cell Filter	3Tests (3 个) 10Tests (10 个)	橙色	常温, 有效期三年

备注：各成分请根据试剂管上标签所示的温度进行保存。上述-5~-20℃保存试剂（如消化液等）解冻后可以 4℃保存 30 天，若需长期保存，需按单次用量分装并于-20℃冻存，使用时再次解冻，避免反复冻融。

四、注意事项

- 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。
- 试剂配制或分装需严格遵循无菌操作规范。分装后立即用封口膜封口，即取即用，避免反复冻融或污染。



操作流程

（一）实验前准备：

1. 实验需自备试剂和耗材：EP 管架 2 个、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、一手术刀及刀片）、6 cm/10 cm 培养皿、T25 培养瓶、解剖板（可用泡沫板替代）以及若干个 2 mL/15 mL/50 mL 离心管。
2. 试剂解冻与复温：
 - 1) 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用消化液、大鼠颞下颌关节软骨细胞添加剂：4℃冰箱解冻，恢复至室温；
 - 2) 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用清洗液、大鼠颞下颌关节软骨细胞基础培养基：恢复至室温。
3. 大鼠颞下颌关节软骨细胞完全培养基配制：将10 mL大鼠颞下颌关节软骨细胞添加剂加入50 mL大鼠颞下颌关节软骨细胞基础培养基，混匀后配置成为大鼠颞下颌关节软骨细胞完全培养基。

备注：大鼠颞下颌关节软骨细胞完全培养基保存条件：2-8℃，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℃冰箱内保存，避免反复冻融。

（二）解剖操作：

1. 动物消毒及处死：使用戊巴比妥钠过量注射或断颈处死动物后，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两个已消毒的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，使用针头俯卧姿势固定大鼠，准备进行取材操作；
 - 3) 取材操作：
 - ① 使用直镊 1 固定夹住大鼠颈部皮肤，用眼科剪 1 从颈部至鼻部剪开头部所有皮肤及耳朵，使头骨完全暴露。

备注：尽可能完全剪去头部皮肤，仅嘴部留下些许毛发即可，注意将毛发撕扯远离解剖区域，防止污染。
 - ② 使用直镊 1 以垂直方向夹住大鼠嘴部固定，用眼科剪 2 分离下颌骨旁边肌肉层，暴露出下颌骨，找到颞下颌关节与髁突。

备注：用剪刀或镊子钝性分离肌肉层，避免剪断下颌骨。找不到颞下颌关节时可以使用直镊 1 移动大鼠下颞，下颞与颞骨连接处即是颞下颌关节（腮帮处）。
 - ③ 使用直镊 1 以垂直方向夹住大鼠嘴部进行固定，用眼科剪 2 轻轻插入下颌骨与颞骨的交界处，轻轻挑起眼科剪 2 以将下颌骨与颞骨分开，可以观察到髁突及前端的白色软骨组织，使用眼



科剪 2 剪下髌突，用弯镊 3 将髌突转移至装有 10 mL 大鼠颞下颌关节软骨专用清洗液的培养皿内。

备注：在整个取材操作过程中，仅有第一套剪刀和镊子可以接触大鼠外部皮肤，其他器械严禁触碰外部皮肤及毛发，若有触碰，需更换无菌器械，以防污染。

（三）组织处理及消化：

1. 组织处理：

- 1) 将显微直镊、显微弯镊与显微剪放在超净台内的 EP 管架上方，前端悬空，向解剖镜上喷洒 75% 医用酒精，将解剖镜放入超净台内；
- 2) 左手使用显微直镊固定组织，右手用显微弯镊分离外侧白色包膜，留取顶部纯净软骨组织，用显微剪将软骨组织与髌突分离，将纯净软骨组织；
- 3) 左手使用显微直镊固定软骨组织，右手使用眼科剪将处理好的软骨组织均等剪成两个大小相同的碎块。

2. 组织消化：

- 1) 向另一新的培养皿内加入 5 mL 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用消化液，用显微弯镊将上一步的软骨组织转移至培养皿内，使用移液枪轻柔混匀后将该培养皿置于 37°C，5% CO₂ 培养箱内消化 24 h。
- 2) 消化完成后，从培养箱内取出培养皿，使用 5 mL 移液枪或巴氏吸管轻柔吹打悬液约 30 次，混匀后，向培养皿内加入 5 mL 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用清洗液。
- 3) 将 100 μ m 细胞滤网、70 μ m 细胞滤网分别放置在两个全新的 50 mL 离心管管口，分别使用 3-5 mL 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用清洗液润洗 100 μ m 细胞滤网。
- 4) 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，依次通过 100 μ m 细胞滤网、70 μ m 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 3-5 mL 大鼠颞下颌关节软骨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。

- 1) 将第二个 50 mL 离心管内的滤液，经 1200 rpm 离心 5 min；弃上清，保留沉淀。向离心管内加入 5 mL 大鼠颞下颌关节软骨细胞专用清洗液，重悬沉淀，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内，经 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：取出 T25 细胞培养瓶，用 5 mL 大鼠颞下颌关节软骨细胞完全培养基重悬离心管内沉淀，接种于 T25 细胞培养瓶内，于 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养。
2. 细胞换液：每 2-3 天换液一次。接种约 2-3 天后，细胞汇合度将达到 80-90%。
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，向培养瓶中加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶，轻轻晃动培养瓶，确保消化液浸润瓶中所有细胞，吸出多余胰蛋白酶消化液，将培养瓶放入 37℃培养箱内消化 1-3 min。待大部分细胞收缩变圆后，加入 3-5 mL 完全培养基终止消化，轻柔吹匀、分散细胞。根据传代比例或实验需求，将细胞接种到新的包被好的培养瓶中，并置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。

五、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℃存放时间没有超过 30 天
		确保组织量和试剂盒要求一致
		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	组织不够新鲜	组织取材速度加快，防止组织放置过久
	培养基配置不当	确保完培配置比例正确，没有反复冻融
		确保完培在有效期内，配置时间没有超过三个月
	大鼠日龄过大	确保大鼠日龄在 14 天，日龄过大容易出现细胞增殖速度慢、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
细胞纯度低	取材不纯净	确保细胞传代次数为 3-5 次，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
		确保最后消化的组织均为白色纯净软骨组织，如果不能确定可以使用剪刀或镊子进行按压，软骨组织有一定的弹性与韧性，按压时不会特别硬，但会有一定的阻力。不含有粉色、红色骨头或白色结缔组织、肌肉等
用鼠年龄不正确	用鼠年龄过大或过小	用鼠年龄过小可能造成取材困难，组织较少，细胞得量少。用鼠年龄过大可能造成软骨生长成熟为骨头，取材少，无法得到细胞。实验室经验推荐使用 14 日龄的鼠进行实验最佳，2-4 周内均可获得细胞，不建议使用更大年龄的鼠进行实验。

六、解剖参考图片

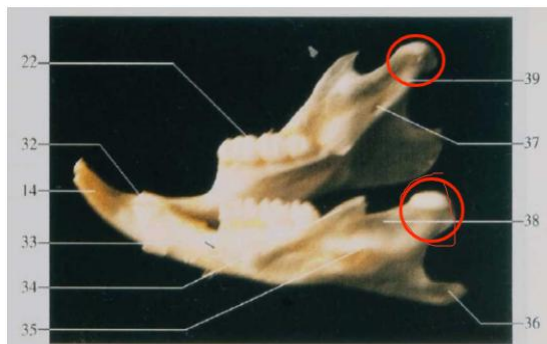


图1 颞下颌解剖示意图人（左图）、鼠（右图）



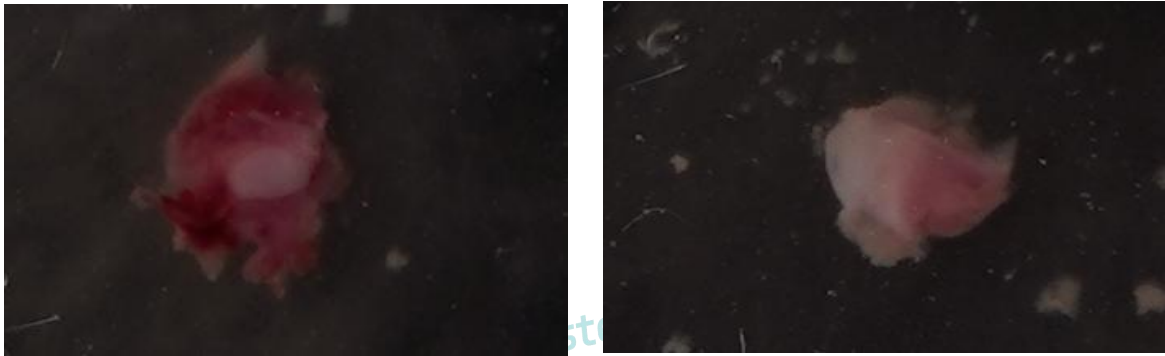


图2 取下的颞下颌组织



图3 剥离后的外膜（右侧）和颞下颌软骨组织（左侧）

