

## 小鼠椎间盘纤维环细胞分离培养试剂盒

产品货号：GP-CA-718

产品规格：3Tests/10Tests

### 一、产品描述

小鼠椎间盘纤维环细胞分离培养试剂盒是专为提取原代小鼠椎间盘纤维环细胞开发的。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（I 型胶原蛋白） $>90\%$ 。

### 二、适用范围

本产品适用于从 14 日龄的 KM、C57、Balb/C 等不同品系的小鼠中提取椎间盘纤维环细胞。经组织经分离、消化、接种纯化后可获得一个 T25 培养瓶的椎间盘纤维环细胞。

备注：提取 5 只小鼠的椎间盘纤维环组织，可获得一个 T25 培养瓶的细胞，具体需要的小鼠数量可能因取材获得的椎间盘纤维环组织大小和数量不同而有所变化。

### 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	储存条件
小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Mouse Intervertebral Disc Annulus Fibrosus Cells	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
小鼠椎间盘纤维环细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Mouse Intervertebral Disc Annulus Fibrosus Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
小鼠椎间盘纤维环细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Mouse Intervertebral Disc Annulus Fibrosus Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
小鼠椎间盘纤维环细胞添加剂 Supplement For Mouse Intervertebral Disc Annulus Fibrosus Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (20 mL)	黄色澄清液体	-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
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°C 保存试剂（如消化液等）解冻后可以 4°C 保存 30 天，若需长期保存，需按单次用量分装并于 -5~-20°C 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 只正常小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。



## 五、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、1把显微弯镊、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) 小鼠椎间盘纤维环细胞专用消化液、小鼠椎间盘纤维环细胞添加剂: 4°C冰箱解冻, 恢复至室温;
  - 2) 小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液、小鼠椎间盘纤维环细胞基础培养基: 恢复至室温。
3. 小鼠椎间盘纤维环细胞完全培养基配置: 将10 mL小鼠椎间盘纤维环细胞添加剂加入50 mL小鼠椎间盘纤维环细胞基础培养基, 混匀后待用。

**备注:** 小鼠椎间盘纤维环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-20°C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。每次使用后将弯镊放回原有位置, 并确保它们之间不相互触碰, 防止交叉污染;
  - 2) 固定小鼠: 在超净工作台内, 使用针头俯卧姿势固定小鼠, 准备进行取材操作;
  - 3) 取材操作:
    - ① 使用直镊1夹起小鼠背部皮肤, 用眼科剪1沿着夹起部分剪开小鼠背部皮肤, 暴露出背部肌肉组织。  
**备注:** 确保皮肤从颈部至臀部部分完全暴露。注意将毛发撕扯远离解剖区域, 防止污染。
    - ② 左手使用弯镊2辅助固定, 右手用眼科剪2从剪去颈部多余脂肪组织, 剪断颈椎, 从两侧向下剪断肋骨, 分离出脊椎。
    - ③ 左手使用弯镊2辅助固定, 右手使用弯镊3和眼科剪2, 撕下脊椎表面残留的肌肉、结缔组织。
    - ④ 左手使用弯镊2辅助固定脊柱, 使用眼科剪2一侧刀刃沿脊髓处插入, 沿着白色椎间盘部分两侧剪断椎间盘组织与外侧骨骼的连接, 取得椎间盘组织。
    - ⑤ 左手使用弯镊2辅助固定脊柱, 右手持手术刀, 沿白色椎间盘纤维环组织两侧将其切下, 使用弯镊3将白色椎间盘组织转移至另一新的含有10mL小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液的培养



皿里。

备注：椎间盘组织为白色半透明状，具有一定的弹性，如果有明显硬物是切到了脊椎，应将刀片退回，继续沿着脊椎处红白分界线切下椎间盘组织。

### （三）组织处理及消化：

#### 1. 组织处理：

- 1) 左手持弯镊 3，右手持手术刀对椎间盘纤维环组织进行操作：将取下的椎间盘组织漂洗一遍，清除多余血污、结缔组织，将组织转移至新的含 10 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液的培养皿内；
- 2) 左手使用弯镊 3 固定组织，右手用手术刀清除椎间盘周围多余纤维组织，使用手术刀或显微镊掏出椎间盘中间髓核组织，从外围纤维环处切开一个缺口。

#### 2. 组织消化：

- 1) 向培养皿内加入 5 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞专用消化液，轻轻吹打后将该培养皿置于 37°C 培养箱内消化 48 h。
- 2) 48 h 后消化结束，取出培养皿，用 5 mL 移液枪反复吹打培养皿内的消化液及组织 30 次（标准：无明显组织块）。
- 3) 将 100  $\mu\text{m}$  细胞滤网、70  $\mu\text{m}$  细胞滤网放置在全新的 50 mL 离心管管口，使用 3-5 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液分别润洗 100  $\mu\text{m}$  细胞滤网、70  $\mu\text{m}$  细胞滤网。接着，用移液枪小心吸取第四步中的组织消化液，通过 100  $\mu\text{m}$  细胞滤网、70  $\mu\text{m}$  细胞滤网进行过滤。在过滤过程中，可用干净枪头向筛网上方缓慢加入 3-5 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液，收集滤液于 50 mL 离心管内。  
备注：若在此步骤中遇到液体过滤缓慢或不向下流通的情况，可能是因为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。
- 4) 收集的滤液于 15 mL 离心管内，经 1200 rpm 离心 5 min；丢弃上清，保留沉淀。向离心管内加入 5 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞专用清洗液，重悬沉淀，将细胞悬液转移至新的 15 mL 离心管内，经 1200 rpm 离心 5 min。

### （四）细胞培养及传代：

1. 细胞接种与培养：取出 T25 瓶，用 5 mL 小鼠椎间盘纤维环细胞完全培养基重悬沉淀，接种于 T25 细胞培养瓶，于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。细胞贴壁培养 3-5 天后，细胞汇合度达到 80% 左右。
2. 细胞传代：细胞汇合度达到 80-90% 后，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后，吸出多余胰蛋白酶消化液，将培养瓶放入 37°C 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 小鼠椎间盘纤维环细胞完全培养基终止消化，轻轻吹匀、分散细胞。按照 1:2 比例进行传代，将细胞接种到新的包被好的培养瓶中，并置于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、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℃ 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	注意不要将组织块剪太碎，严格控制消化时间
细胞增殖缓慢	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
	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 3-5 次，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
细胞纯度低	组织取材不纯	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。
细胞初次贴壁呈圆形	正常现象	贴壁 2-3 天后若细胞为圆形，正常按照 1:2 比例传代，传代后细胞形态正常。

## 七、图片

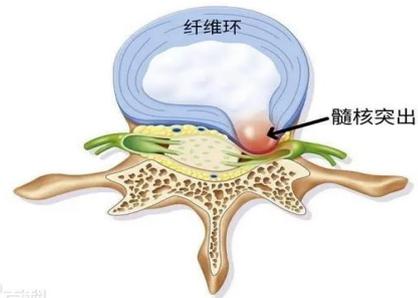
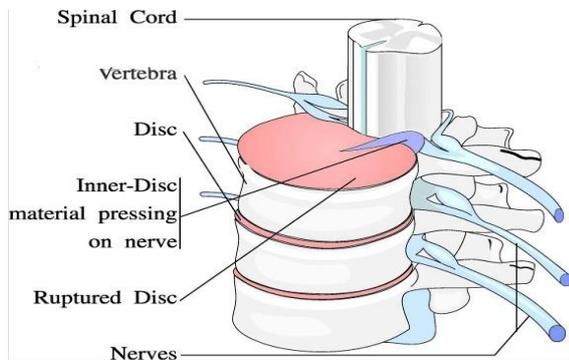


图1 椎间盘及纤维环示意图



图2 剪下的脊椎组织



图3 清除血管和脊椎上多余肌肉



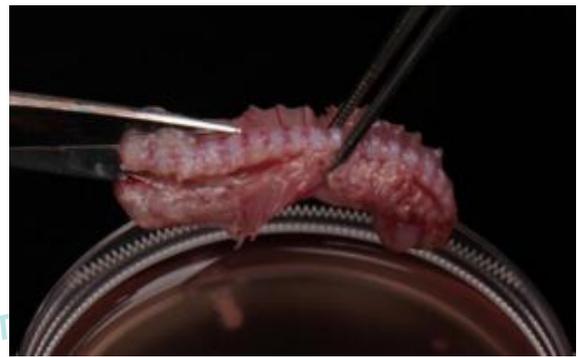


图4 剪去脊椎两侧多余肋骨，留取纯净脊椎组织



图5 纯净脊椎组织

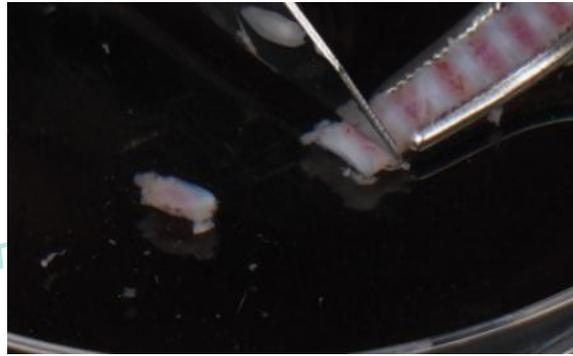


图6 切去白色椎间盘两侧骨头，留取椎间盘



图7 椎间盘组织



图8 清理椎间盘组织外侧多余肌肉及结缔组织





图9 掏出中间髓核组织



图10 切碎消化

