

大鼠心脏微血管内皮细胞分离培养试剂盒

产品货号：GP-CA-620

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

本产品专为分离各种原代大鼠心脏微血管内皮细胞而开发，采用二步消化法消化组织、密度梯度离心纯化细胞，经实验室验证，可分离 1×10^6 cells 以上数量的细胞，免疫荧光鉴定（CD31 阳性率）达 90% 以上。

二、适用范围

本产品适用于从 15-20 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的大鼠中提取心脏微血管内皮细胞。每次实验取用 4 只大鼠的心脏组织，组织经分离、消化、铺板纯化 48 h 后，可获得微血管内皮细胞 $>1 \times 10^6$ cells，分离后，按照 1: 2 比例传代，可传代 2-3 次，细胞可培养 1-2 周。

备注：提取 4 只大鼠的完整心脏组织，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完整心脏组织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

本试剂盒组成成分如下表：

表 1：原代大鼠心脏微血管内皮细胞分离培养试剂盒组成成分及相应信息

产品名称	产品规格	性状	保存条件
大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL)	淡黄色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞消化液A Digestive Solution A For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	无色澄清液体	-5~20°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞消化液B Digestive Solution B For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (3 mL) 10Tests (10 mL)	无色澄清液体	-5~20°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (100 mL) 10Tests (250 mL)	红色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞添加剂 Supplement For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (25 mL)	黄色澄清液体	-5~20°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞专用分离液A Specialized Isolation Solution A For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (30 mL)	淡黄色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠心脏微血管内皮细胞专用分离液B Specialized Isolation Solution B For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	淡黄色澄清液体	2-8°C，有效期一年



续表 1: 原代大鼠心脏微血管内皮细胞分离培养试剂盒组成成分及相应信息

大鼠心脏微血管内皮细胞铺板工作液 Planting Solution For Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells	3Tests (3 mL) 10Tests(10 mL)	无色澄清液体	-5~-20℃, 有效期一年
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

注: 各成分请根据试剂管上标签所示的温度进行保存。消化液解冻后保质期仅一个月, 建议初次使用试剂盒后将消化液按照说明书用量进行分装, 冻存于-20℃冰箱内, 使用时再次解冻, 避免反复冻融。

四、注意事项

1. 建议初学者在正式实验前提前使用 1-2 只鼠进行解剖模拟操作, 提升解剖熟练度;
2. 整个分离操作过程建议在冰上进行, 注意不要让组织和液体由于温度过低而结冰;
3. 培养基中含有微生物生长所需的营养成分, 请在超净工作台内打开, 按照需要的量进行分装, 并用封口膜封住瓶口, 即取即用, 以避免污染。
4. 本试剂盒中的分离液在储存过程中可能会出现瓶口析出晶体颗粒物的情况, 属于正常现象, 可放心使用。

五、操作流程

(一) 实验前准备:

1. 试剂解冻复温:
 - (1) 大鼠心脏微血管内皮细胞消化液 A、大鼠心脏微血管内皮细胞消化液 B、大鼠心脏微血管内皮细胞添加剂、大鼠心脏微血管内皮细胞铺板工作液: 4℃ 冰箱解冻, 恢复至室温;
 - (2) 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液、大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 A、大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 B、大鼠心脏微血管内皮基础培养基: 恢复至室温。
2. 实验自备试剂和物品: 冰盘/冰盒、手术器械(含 3 把眼科剪、1 把直镊、2 把弯镊、1 把显微剪)、6 cm/10cm 培养皿、解剖板(可用泡沫板替代)、1.5 mL/15 mL/50 mL 离心管若干。
3. 大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基配制: 向 10 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞基础培养基中加入 1 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞添加剂, 颠倒混匀, 备用。
4. 培养器皿包被: 将 1 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞铺板工作液加入 T25 培养瓶中, 轻轻摇晃至均匀铺满瓶底后, 将培养瓶放入 37℃ 培养箱内孵育 0.5-2 h。

(二) 解剖操作:

1. 动物消毒及处死: 将实验小鼠安乐死处理后放置于 75% 医用酒精内浸泡 5 min, 消毒后将动物转运至超净工作台内。
2. 解剖取材:
 - (1) 准备工作: 将两个干净孔板放在超净台内, 将眼科剪 1、直镊 1, 眼科剪 2、弯镊 2、眼科剪 3、弯镊 3、显微剪从左向右依次放置在孔板上方, 注意将眼科剪和镊子成对放置, 前方约三分之一部位悬空,



使用完成后将剪镊放回原有位置，相互不触碰，防止污染。

- (2) 在超净工作台内，使用针头仰卧位将实验鼠固定在解剖板上。
- (3) 解剖操作：用直镊 1 提起实验鼠的皮肤，眼科剪 1 剪开胸部皮肤和下方黏连的肉膜组织，使用直镊 1 将皮肤拉向脖颈上方，换取另一套眼科剪 2 与弯镊 2，使用弯镊 2 夹住大鼠右下侧肋弓，用眼科剪 2 向上剪开肋骨至锁骨处，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，完全打开胸腔，暴露出心脏。
- (4) 取材操作：用眼科剪 2 剪下与心脏相连的血管，弯镊 2 轻轻挑出心脏组织，将组织放于玻璃培养皿内，培养皿内预先加 10 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液。然后，将整个培养皿放在冰盘/冰盒上以保持低温环境。

(三) 组织处理及消化：

1. 组织清洗：用于一套新的眼科剪 3、弯镊 3，将组织漂洗一遍，清洗多余的血污和剪除心脏上方的结缔组织（如图 1 所示），将组织转移至新玻璃培养皿内，培养皿内预先加入 10 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液。

注：可选步骤——用眼科剪 3 斜向剪开心脏，留取心室部分，用显微剪剪去心室外层 1/4 组织，外层组织含有较多的成纤维细胞，剪去此层组织可减少成纤维污染，留取心脏内侧组织（如图 2 所示）。

2. 组织处理：将组织转移至 1.5 mL EP 管内，加入大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基至刚好没过组织，用眼科剪 3 剪成 1 mm³ 碎块，用移液枪将组织转移至 15 mL 离心管内。加入 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液，用 5 mL 移液枪反复吹打管内组织 5 次，经 300 g，离心 1 min，丢弃上清，保留组织沉淀。

3. 组织消化

- (1) 向 15 mL 离心管内加入 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞消化液 A，吹打混匀；将离心管斜放入 37°C 水浴摇床，转速 150 rpm，消化 1 h。
- (2) 消化完成后取出离心管，向离心管内补加 1 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞消化液 B，将离心管斜放入 37°C 水浴摇床，转速 150 rpm，再次消化 30 min。
- (3) 消化等待过程中取出 70 μm 细胞滤网，套在 50 mL 离心管上方，用 2 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液润洗细胞滤网。
- (4) 消化完成后，取出离心管，用移液枪反复吹打 20-30 次至无明显组织块，向离心管内加入 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液，轻柔吹打混匀，吸取消化后的细胞组织液，经润洗过的 70 μm 细胞滤网过滤，收集滤液于 50 mL 离心管内。

(四) 细胞分离

1. 将 50 mL 离心管中收集的滤液，经离心机 300 g，离心 5 min；丢弃上清，保留沉淀。



2. 将保留的沉淀用 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液重悬后，再次经离心机，300 g，离心 5 min。离心完成后，弃去上清，保留沉淀，用 3 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 A 重悬沉淀，得到细胞悬液。
3. 取一支新的 15 mL 离心管，加入 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 B，备用。
4. 倾斜步骤 3 中准备的 15 mL 离心管，使用 1 mL 移液枪吸取步骤 2 中得到的细胞悬液，吸头抵住 15 mL 管壁，轻柔打出细胞悬液，使其沿管壁缓慢加入到大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 B 的上方，形成液面分层。

注：若不能确保能够使两种分离液产生分层，可用 200 μ L 枪头吸取重悬后的细胞悬液按上述操作先打入 5-6 枪左右，待看见明显的液面分层后，再使用 1 mL 枪头加入剩余的悬液，液面分层可在灯光下观察，能看见两种分离液之间有明显的分界线。
5. 经离心机 900 g，离心 15 min（设置升速为 1、降速为 0）。
6. 离心完成后，在大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 A、大鼠心脏微血管内皮细胞分离液 B 交界处有明显的微血管段组织（如图 3 所示，以下简称白膜层），先吸弃最上层的死细胞和碎片，换用新的枪头伸至白膜层上方，小心吸取白膜层的细胞并转移到新的无菌 15 mL 离心管中。
7. 向 15 mL 离心管内加入 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞专用清洗液重悬白膜层细胞，经离心机 300 g，离心 5 min；丢弃上清，保留沉淀。

（五）细胞培养传代：

1. 取出包被好的 T25 细胞培养瓶，吸弃大鼠心脏微血管内皮细胞铺板工作液，加入 5 mL 大鼠心脏微血管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）润洗瓶底后，吸弃清洗液。于 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置备用
2. 用 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基重悬离心管内细胞沉淀，接种于包被完成的 T25 瓶中，镜下观察细胞，可见十分明显的微血管点组织漂浮于培养基中（如图 4 所示），将细胞培养瓶置于 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养。
3. 细胞培养 48 h 后，在贴壁细胞上方可以看到大量的死细胞、碎片、红细胞等，请勿直接冲洗瓶底，这样可能会导致细胞被冲洗掉，应先缓慢吸去上清，再加入 2-3 mL PBS 润洗，轻轻拍打瓶底，使杂物脱落，吸去 PBS，加入新鲜的大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基，之后每 2-3 天换液一次。
4. 细胞传代
 - (1) 待细胞汇合度达到 80-90% 即可开始传代，吸弃原上清液，加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，弃去 PBS。
 - (2) 加入 1 mL Accutase 消化液（切勿使用胰酶，其易导致细胞死亡），轻轻晃动至消化液浸润瓶中所有细胞，37°C 培养箱内消化 5 min。待大部分细胞收缩变圆后，加入 3-5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基终止消化，轻轻吹打皿底，收集细胞悬液于 15 mL 离心管中。



(3) 经 300 g，离心 5 min 后，弃上清，用 5 mL 大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基重悬细胞沉淀。

(4) 轻轻吹匀、分散细胞，按传代比例或者实验需求进行分瓶接种，置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。

六、常见问题

表 2.心脏微血管内皮细胞分离常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
细胞得量少	消化不充分/过度	检查消化液保存条件，确保 4℃ 存放时间没有超过 30 天，严格控制两步消化时间。
	组织取材量过多导致消化不充分、组织不够新鲜。	确保组织的沉淀量不多于消化液的 1/3，将组织尽量剪碎，取用处死不久的小鼠组织。
细胞增殖缓慢。	培养基保存、配制不当。	确保完培配制比例正确，添加剂没有反复冻融，配制时间没有超过三个月。
	小鼠日龄过大、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。	确保小鼠日龄在 14 天以上，最大日龄不超过 30 天。
	传代比例不当和传代次数较多，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢。	确保细胞传代次数为按照 1:2 传代，不超过 2-3 次，按照器皿底面积进行换算，保证细胞初始接种数量足够。
细胞纯度低。	分层吸取操作不当，枪头接触到其他层的细胞导致污染。	使用分离液分离时，避免上层组织碰到下层沉淀，尽可能将分离液中的上层组织全部吸净。
	取材不当，取到大血管内皮导致污染。	取用靠近心尖的 3/4 心脏组织。
细胞大量损失。	细胞在贴壁后因剧烈处理，如冲洗、用力拍打导致脱落。	按照流程（五）步骤 2 描述操作，在细胞贴壁后 2-3 天，换液时请勿使用 PBS、培养基等冲洗皿底，拍打皿底时动作也应轻柔。



七、实验参考图片

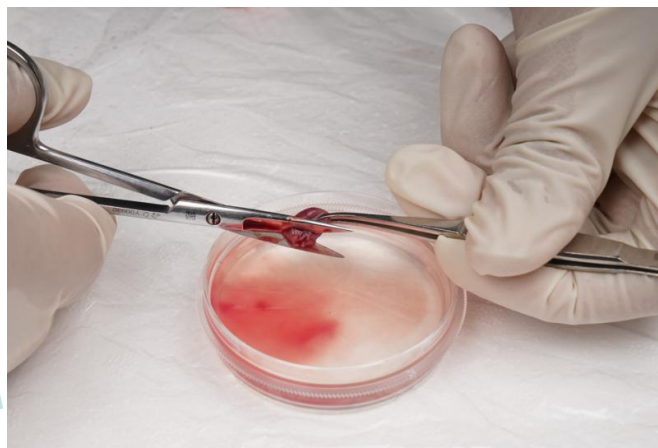


图 1.剪开心脏组织上方的血管

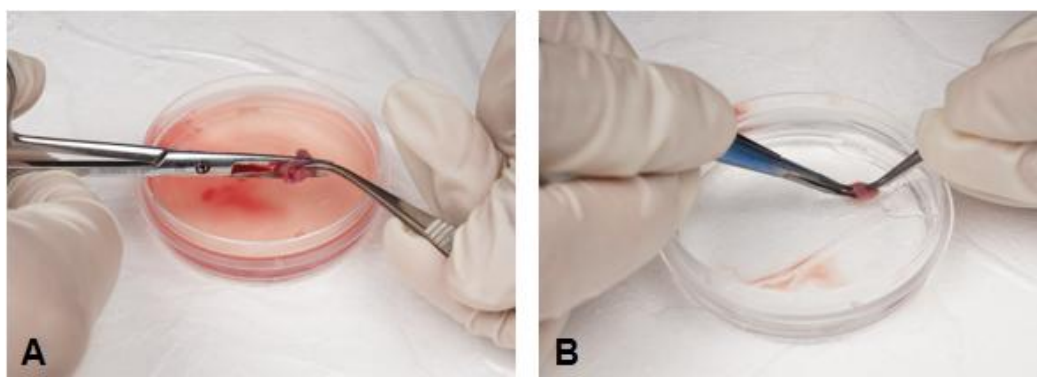


图 2.心室靠内部分组织取材

A:斜向剪开心脏，留取心室部分；B: 用弯镊 3 固定组织，配合显微剪减去心室外的约 1/4 的部分。

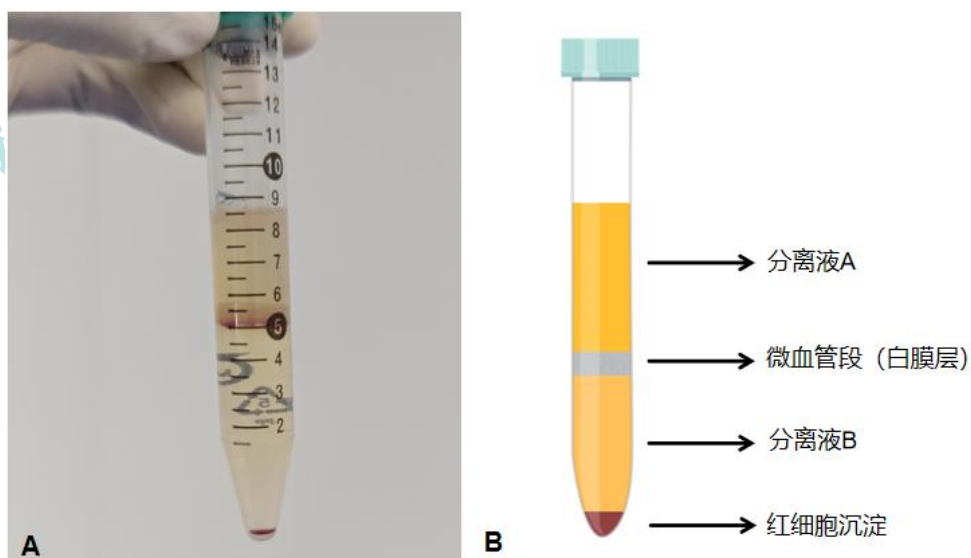


图 3.细胞经分离液纯化后图

A:细胞经分离液纯化后实拍图；B: 细胞经分离液纯化后示意图。



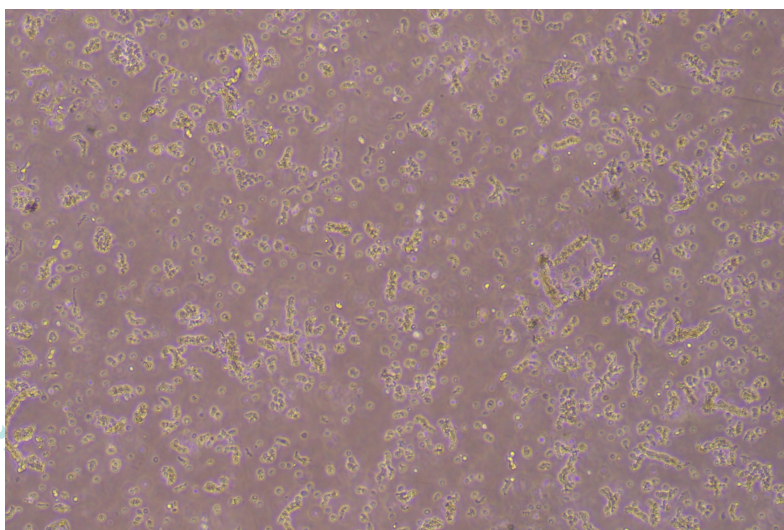


图 4.刚接种后的细胞悬液，可见明显的微血管段组织
(仅为参考，微血管段的数量和大小会依据实验条件差异而不同)

普诺赛® | Procell system

普诺赛® | Procell system

