

# 大鼠髌白软骨细胞分离培养试剂盒

产品货号: GP-CA-624

产品规格: 3Tests/10Tests

## 一、产品描述

大鼠髌白软骨细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠髌白软骨细胞开发的。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髌白软骨细胞。组织经分离、消化、铺板纯化后可获得髌白软骨细胞 $>1 \times 10^6$  cells。

备注:提取 3 只大鼠髌白软骨组织(6 个髌白软骨),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
大鼠髌白软骨细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Acetabular Chondrocytes	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8 °C, 有效期一年
大鼠髌白软骨细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Rat Acetabular Chondrocytes	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20 °C, 有效期一年
大鼠髌白软骨细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Acetabular Chondrocytes	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8 °C, 有效期一年
大鼠髌白软骨细胞添加剂 Supplement For Rat Acetabular Chondrocytes	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-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。



## 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、冰盘/冰盒1个、PBS、手术器械(手术刀、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) 大鼠髌白软骨细胞专用消化液、大鼠髌白软骨细胞添加剂: 4°C冰箱解冻, 恢复至室温;
  - 2) 大鼠髌白软骨细胞专用清洗液、大鼠髌白软骨细胞基础培养基: 恢复至室温。
3. 大鼠髌白软骨细胞完全培养基配置: 将10 mL大鼠关节软骨细胞添加剂加入50 mL大鼠关节软骨细胞基础培养基, 混匀后待用。

**备注:** 大鼠髌白软骨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。

### (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夹起大鼠腿部、腹部皮肤, 用眼科剪1沿着夹起部分剪开腿部、腹部皮肤, 直至胸部。

**备注:** 尽可能多的剪开皮肤, 可以从腿部剪到胸部。注意将毛发撕扯远离解剖区域, 防止污染。
    - ② 髌白解剖位置: 髌白位于髌骨外侧面中央, 呈半球形深凹。其结构由髌骨、坐骨和耻骨共同构成, 开口朝向前下外侧, 表面覆盖厚约2 mm的透明关节软骨。关键标志: 髌白边缘的环形关节孟唇可加深髌白, 增加股骨头覆盖率, 是分离软骨时的重要边界参考(如图1)。
    - ③ 找到大鼠膝关节处, 左手使用弯镊2夹起大鼠大腿肌肉组织, 右手使用眼科剪2剪开大腿肌肉至大腿根部, 剪去多余肌肉组织, 暴露出髌关节区域。
    - ④ 方案一: 左手使用弯镊2夹住大鼠股骨, 右手使用眼科剪2剪断髌关节上方与侧方髌骨连接处, 用弯镊3夹住并取出髌白软骨, 置于含有10 mL大鼠髌白软骨细胞专用清洗液的培养皿内。



方案二：使用弯镊 2 和眼科剪 2 使髌关节脱位，保留完整的股骨头软骨帽。股骨头与大鼠身体连接处即为髌臼软骨窝，再使用眼科剪 2 将髌臼软骨窝剪下，用眼科剪 3 夹住并取出髌臼软骨，置于含有 10 mL 大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液的培养皿内。

**备注：髌关节是身体与大腿的连接处，如果初学者无法分辨髌关节的位置，可以使用弯镊 2 夹住大鼠股骨，移动股骨，可以观察到股骨与身体连接处，此处即为髌关节。**

### （三）组织处理及消化：

#### 1. 组织处理：

- 1) 将显微直镊与显微弯镊放在超净台内的EP管架上方，前端悬空；
- 2) 左手持显微直镊，右手持手术刀对软骨组织进行操作：将取下的软骨组织漂洗一遍，清除多余血污、结缔组织，将组织转移至新的含10 mL大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液的培养皿内；
- 3) 左手使用显微直镊固定髌关节，右手使用眼科剪3剪去白色髌臼软骨之外的其他骨骼、结缔组织，留取纯净白色髌臼软骨组织，将组织转移至新的含10 mL大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液的培养皿内；  
**备注：软骨组织具有一定的弹性，可通过使用镊子或眼科剪刮蹭分辨组织是否为纯净软骨组织。**
- 4) 吸弃培养皿内的清洗液，左手使用显微直镊固定组织，右手用手术刀将每个髌臼软骨组织切成4-6块大小相等的碎块。

#### 2. 组织消化：

- 1) 向一个新的培养皿内加入5 mL大鼠髌臼软骨细胞专用消化液，右手使用显微弯镊将髌臼软骨组织碎块转移至装有大鼠髌臼软骨细胞专用消化液的培养皿内，用移液枪将轻轻吹打后将该培养皿置于37°C培养箱内消化48 h。
- 2) 消化结束后，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。
- 3) 将100 μm细胞滤网、70 μm细胞滤网放置在全新的50 mL离心管管口，使用3-5 mL大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液分别润洗100 μm细胞滤网、70 μm细胞滤网。接着，用移液枪小心吸取上一步中的组织消化液，通过100 μm细胞滤网、70 μm细胞滤网进行过滤。在过滤过程中，可用干净枪头向滤网上方缓慢加入3-5 mL大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液，收集滤液于15 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。
- 5) 向离心管内加入5 mL大鼠髌臼软骨细胞专用清洗液，重悬沉淀，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大鼠髌臼软骨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天后，细胞未完全贴壁（呈圆形）。吸弃原上清液，保留贴壁细胞，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大鼠髌臼软骨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3-5天，形态展开、恢复正常（呈多角、短梭形）。

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大鼠髌臼软骨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°C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
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
	传代后接种密度较低	1:2 传代时确保是按照器皿底面积进行换算，细胞离心后完全消化、离心后沉淀明显无细胞损失，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。

## 七、图片



图1 人体髌臼区域结构图片



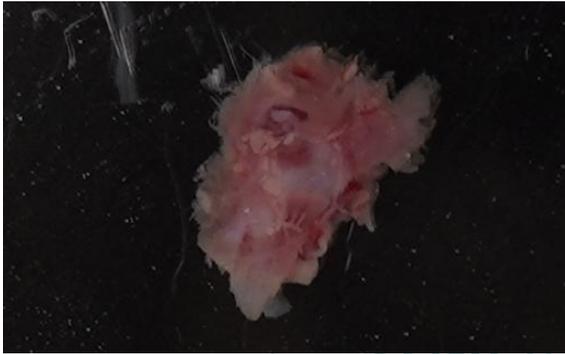


图2 剪下的髓白软骨组织



图3 清理后的髓白软骨组织

普诺赛® | Procell system

普诺赛® | Procell system

