

大鼠大隐静脉平滑肌细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-610

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

大鼠大隐静脉平滑肌细胞分离培养试剂盒专为提取原代大鼠大隐静脉平滑肌细胞研发。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 5 代左右，3 代以内状态最佳。经 α -SMA 免疫荧光鉴定，细胞纯度高达 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大隐静脉平滑肌细胞。组织经分离、消化、铺板 48 h 后可获得大隐静脉平滑肌细胞 $>1 \times 10^6$ cells。

备注：提取 7 只大鼠的大隐静脉组织（每只鼠每条后肢获得大隐静脉组织量如图 5），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大隐静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
大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Saphenous Vein Smooth Muscle Cells	3Tests (250 mL) 10Test (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Rat Saphenous Vein Smooth Muscle Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
大鼠大隐静脉平滑肌细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Saphenous Vein Smooth Muscle Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
大鼠大隐静脉平滑肌细胞添加剂 Supplement For Rat Saphenous Vein Smooth Muscle Cells	3Tests (5 mL) 10Tests (10 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年

备注：各成分请根据试剂管上标签所示的温度进行保存。消化液、添加剂解冻后 4℃后可保存 30 天，若需长期保存，需按单次用量分装并于 -5~-20℃保存，使用时再次 4℃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。



2. 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：PBS、手术器械（至少包含 2 把眼科剪、1 把直镊、1 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、解剖板（可用泡沫板替代）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) 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用消化液、大鼠大隐静脉平滑肌细胞添加剂：4℃冰箱解冻，恢复至室温；
 - 2) 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液、大鼠大隐静脉平滑肌细胞基础培养基：恢复至室温。
3. 大鼠大隐静脉平滑肌细胞完全培养基配制：将 5 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞添加剂加入 50 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞基础培养基，混匀后待用。
备注：大鼠大隐静脉平滑肌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。
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 左手使用直镊 1 固定夹住后肢脚踝皮肤，用眼科剪 1 从下到上左右两侧剪开皮肤，两侧向上剪至腹部。
 - ② 在大腿内侧，找到最粗最明显的大隐静脉，左手使用弯镊 2 夹住脚踝上的大隐静脉，右手使用眼科剪 2 小心剪下连带肌肉的大隐静脉组织，将组织放入装有 10 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液的玻璃皿中。

备注：皮肤剪至暴露出整个后肢腿部，注意将毛发撕扯远离解剖区域，防止污染。

(三) 组织处理及消化



1. 组织处理:

- 1) 将显微直镊、显微弯镊与眼科剪 3 放入超净台内的孔板上放置;
- 2) 用这套新的显微剪镊, 对大隐静脉组织进行操作: 将组织漂洗一遍, 放入新的装有 10 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液的培养皿中。
- 3) 左手使用显微直镊固定血管组织粗的一端, 右手用显微弯镊小心撕开血管外膜肌肉、结缔组织, 找到一根独立生长的白色隐神经 (如图 1), 用显微弯镊将隐神经拉出丢弃。
- 4) 左手使用显微直镊固定血管组织, 右手使用显微弯镊小心清理血管组织外的肌肉组织和结缔组织 (如图 2), 留取干净完整的血管组织 (如图 3), 将两根生长在一起的大隐静脉和动脉分开, 去除动脉组织, 清理明显的外膜 (如图 4)。
- 5) 左手用显微直镊夹住大隐静脉粗的一端, 右手将显微剪的一片剪刀刃插入大隐静脉血管内, 尝试纵向剖开大隐静脉组织 (如图 5), 放入含 10 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液的培养皿内。

备注: 大隐静脉与动脉伴行, 较动脉血管粗, 颜色偏黑, 有小血管分支, 注意与光滑的隐神经区分开, 操作中避免过度拉伸组织导致细胞撕裂死亡; 注意组织可能接触到毛发, 可多清洗几次, 避免污染。

2. 组织消化:

- 1) 将纯净的大隐静脉组织放入装有 5 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用消化液的 6 cm 培养皿内, 左手使用显微直镊夹住大隐静脉中层组织, 右手使用眼科剪 3 将组织剪成 5 mm² 的小片 (如图 6), 将培养皿放入 37°C 培养箱过夜消化 17-18 小时。
- 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, 吹打悬液约 30 次, 混匀后, 向培养皿内加入 5 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞专用清洗液。

备注: 消化时间根据实际消化效果来定, 可在显微镜下观察, 刚消化好的组织块上会有明显圆形细胞排列 (如图 7), 消化液中游离着部分细胞。吹打混匀后仍会有少部分细胞团和碎片, 是正常现象。

3. 细胞分离:

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: 取出 T25 细胞培养瓶, 用 5 mL 大鼠大隐静脉平滑肌细胞完全培养基重悬离心管内沉淀, 接种于 T25 细胞培养瓶, 于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养 (铺板时可获得约 1×10⁶ cells)。
2. 细胞换液: 首次换液在第 48 h 进行, 以后每 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。首先吸出 T25 细胞培养瓶中的培养基, 用 2-3 mL PBS 清洗细胞一次; 添加 0.25% 胰蛋白酶消化液 1 mL 至 T25 培养瓶中, 轻微转动培养瓶至消化液覆盖整个培养瓶底后, 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, 待细胞收缩, 轻敲培养瓶, 大部分细胞脱落后再加入 5 mL 大鼠大隐静脉平滑肌完全培养基终止消化, 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℃、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℃ 存放时间没有超过 30 天
		确保组织量和试剂盒要求一致
		尝试剖开血管，组织不要剪得太大块
		确保组织轻柔吹打充分
	消化过度	严格控制组织块大小，避免剪得过碎
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 3-5 代，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
	取材组织量不足	若大隐静脉组织得量少，可适量增加鼠量
细胞纯度低	组织未清理干净	确保脂肪、明显外膜及肌肉组织完全去除

七、解剖参考图片



图 1a 撕开肌肉、结缔组织，去除隐神经

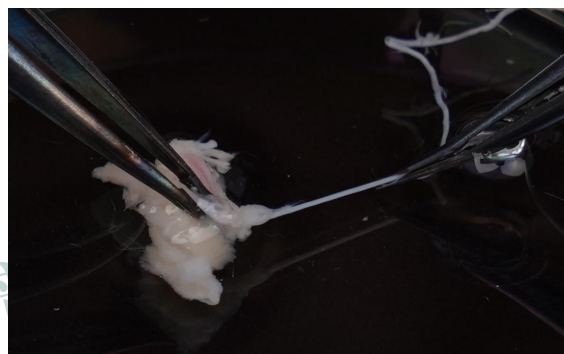


图 1b 撕开肌肉、结缔组织，去除隐神经



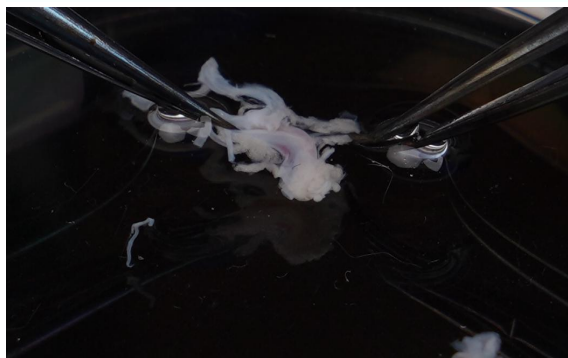


图 2a 清理肌肉组织和结缔组织



图 2b 清理肌肉组织和结缔组织



图 3 留取干净完整的血管组织



图 4 分离大隐静脉和动脉血管



图 5 尝试纵向剖开大隐静脉



图 6a 剪碎大隐静脉

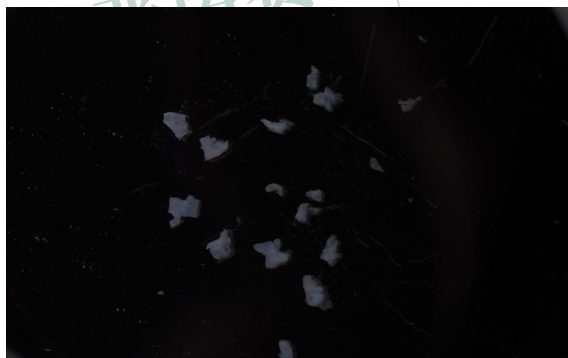


图 6b 剪碎大隐静脉

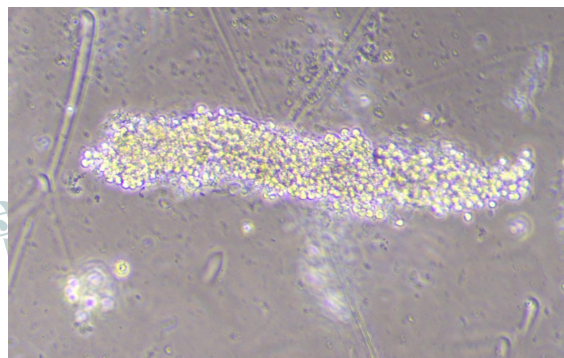


图 7 显微镜下观察消化好的组织

