

大鼠脑微血管内皮细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-601

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

大鼠脑微血管内皮细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠脑微血管内皮细胞开发的。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 1-2 代，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（CD31 阳性率） $>90\%$ 。

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脑微血管内皮细胞。组织经分离、消化、铺板纯化 48 h 后可获得脑微血管内皮细胞 $>1 \times 10^6$ cells。

备注：提取 3 只大鼠的完整脑组织（6 个完整的大脑半球），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脑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
大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (250 mL) 10Test (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 A Specialized Digestive Solution A For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 B Specialized Digestive Solution B For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (1.8 mL) 10Tests (6 mL)	无色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞专用分离液 Specialized Isolation Solution For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞添加剂 Supplement For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (5 mL) 10Tests (10 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞铺板工作液 Planting Solution For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (3 mL) 10Tests (10 mL)	无色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
大鼠脑微血管内皮细胞筛选工作液 Screening Solution For Rat Brain Microvascular Endothelial Cells	3Tests (60 μL) 10Tests (200 μL)	无色澄清液体	-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

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，解冻后 4℃可保存 30 天，若需长期保存，需按单次用量分装并于-5~-20℃冻存，使用时再次解冻，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. 整个分离操作过程中，建议将装组织的小皿放在冰盘/冰盒上（2-8℃）保持低温，但注意不要使组织和液体因温度过低而结冰，以免冻伤组织，影响提取效果。
3. 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（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）、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、胰酶或 Accutase 消化液。
2. 试剂解冻与复温：
 - 1) 大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 A、大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 B、大鼠脑微血管内皮细胞添加剂、大鼠脑微血管内皮细胞铺板工作液：4℃冰箱解冻，恢复至室温；
 - 2) 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液、大鼠脑微血管内皮细胞专用分离液、大鼠脑微血管内皮细胞铺板工作液、大鼠脑微血管内皮细胞筛选工作液、大鼠脑微血管内皮细胞基础培养基：恢复至室温。
3. 大鼠脑微血管内皮细胞完全培养基配制：将 5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞添加剂加入 50 mL 大鼠脑微血管内皮细胞基础培养基，混匀后待用。
备注：大鼠脑微血管内皮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。
4. 培养器皿包被：将 1 mL 大鼠脑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，然后将培养瓶放入 37℃，5% CO₂ 培养箱内孵育 0.5-2 h 以上。

（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 固定夹住大鼠背部皮肤，用眼科剪 1 从背中到鼻梁部左右两侧剪开皮肤，两侧向



下剪至下颌处，用直镊 1 向两侧翻转头部皮肤使头骨完全暴露。

备注：皮肤剪至暴露出眼球，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 从颈部剪断颈椎，将眼科剪 2 沿颈椎切口处向头盖骨中部剪开头盖骨。

备注：头部内侧的剪刀不要太深，应轻挑向上向前剪，不要离头盖骨过远，防止剪碎头盖骨下方的脑组织。

- 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 将两侧头盖骨与颅底连接处剪断，使用眼科剪 2 沿眼眶中间黑线处剪断嗅球，再用弯镊 2 向两侧小心撕开头盖骨。

备注：弯镊 2 尽量只夹头盖骨，避免触及脑组织，防止脑组织被夹碎或受到污染。

- ④ 使用弯镊 3 轻轻挑起脑组织，分离出完整脑组织。将组织放于培养皿内，向培养皿内加入 10 mL 的大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液（如图 1）。然后，将整个培养皿放在冰盘/冰盒上以保持低温环境。

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。若操作时间较长，需不时观察并轻轻摇晃培养皿，防止组织和清洗液由于长时间接触冰盘/冰盒而结冰，冻伤组织，影响提取效果。

（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) 用这套新的显微镊子，对脑组织进行操作：左手使用显微直镊固定组织，右手用显微弯镊分离大脑前部嗅球组织（如图 2），将大脑与小脑分离（如图 3），从大脑中部划开分离左右大脑（如图 4）；
- 3) 翻转左右大脑（如图 5），清除脑髓质，仅保留大脑皮层（如图 6）；再用显微镊轻轻刮除大脑皮层上明显的血管组织，留取纯净皮层组织（如图 7）。
- 4) 将处理好的皮层组织转移至 3 个 2 mL 离心管内，每个离心管内加入 0.5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液，使用眼科剪 3 将皮层组织快速剪碎至 1 mm³ 碎块（此过程大约需要剪 200 次），用 5 mL 移液枪或巴氏吸管将组织转移至 15 mL 离心管内，加入 10 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液重悬沉淀。将离心管置于离心机（常温）中，经 1200 rpm，离心 1 min，丢弃上清，保留沉淀。

2. 组织消化：

- 1) 向离心管内加入 5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 A，轻柔混匀后将组织消化悬液转移至一个 6 cm 培养皿内，将该培养皿置于 37°C，5% CO₂ 培养箱内消化 40 min。
- 2) 消化结束后，向培养皿内添加 0.6 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用消化液 B，使用 5 mL 移液枪或巴氏吸管轻柔吹打悬液约 10 次，混匀后，再次将培养皿放入 37°C，5% CO₂ 培养箱内消化 40 min。
- 3) 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 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液。



3. 细胞分离：

- 1) 将 100 μm 细胞滤网放置在全新的 50 mL 离心管管口，使用 3-5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液润洗 100 μm 细胞滤网。
- 2) 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，通过 100 μm 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 大鼠脑微血管内皮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。

- 3) 将 50 mL 离心管内的滤液，经 800 g 离心 5 min；弃上清，保留沉淀。向离心管内加入 5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用分离液，重悬沉淀，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内，经 1000 g 离心 30 min。
- 4) 离心结束后，可以在离心管内观察到明显的分层现象，从上至下依次为上层组织层、中间分离液层、下层沉淀层。使用 5 mL 移液枪或巴氏吸管小心吸弃全部上层组织层后，更换一个干净的枪头，尽可能完整地吸弃中间层分离液，保留下方沉淀。

备注：这一步要分层吸取，避免上层和中层组织残留接触到下层沉淀，影响细胞纯度。

- 5) 完成中间层的吸弃后，更换干净的枪头吸取 0.5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液重悬沉淀，重悬后将细胞悬液转移至另一干净 15 mL 离心管内。
- 6) 向装有细胞悬液的离心管中加入 5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液，经 1200 rpm 离心 5 min，离心后，弃上清，保留沉淀。

(四) 细胞培养及传代：

1. 细胞接种：取出包被好的 T25 细胞培养瓶，吸弃大鼠脑微血管内皮细胞铺板工作液，加入 5 mL 大鼠脑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，吸弃大鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液。用 5 mL 大鼠脑微血管内皮细胞完全培养基重悬离心管内沉淀，接种于包被好的 T25 细胞培养瓶，同时向培养瓶内加入 20 μL 大鼠脑微血管内皮细胞筛选工作液，于 37°C，5% CO_2 培养箱中静置培养（铺板时可获得约 2.5×10^6 cells，经过纯化 48 h 后细胞量大于 1×10^6 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% 胰蛋白酶或 Accutase 消化液（推荐使用 Accutase 消化液，若使用胰蛋白酶，请严格控制消化时间），轻轻晃动培养瓶，确保消化液浸润瓶中所有细胞，吸弃多余胰蛋白酶（使用 Accutase 消化液则不用吸出），将培养瓶放入 37°C 培养箱内消化 1-3 min（Accutase 消化液时间延长至 5 min 以上）。待大部分细胞收缩变圆后，加入 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°C、5% CO_2 、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 组织不够新鲜	严格控制两步消化时间 组织取材速度加快，防止组织放置过久
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
	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
	传代次数过多	确保细胞传代次数为 1-2 代，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
细胞纯度低	筛选液使用不当	确认筛选液保存方式及使用量符合说明书要求
	分层吸取操作不当	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

七、解剖参考图片



图1 分离的脑组织



图2 分离的嗅球组

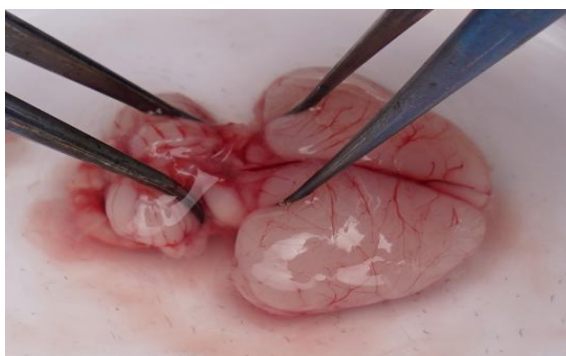


图3 分离大脑与小脑

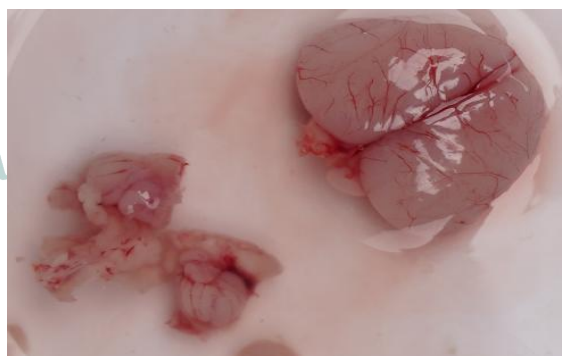


图3 分离大脑与小脑

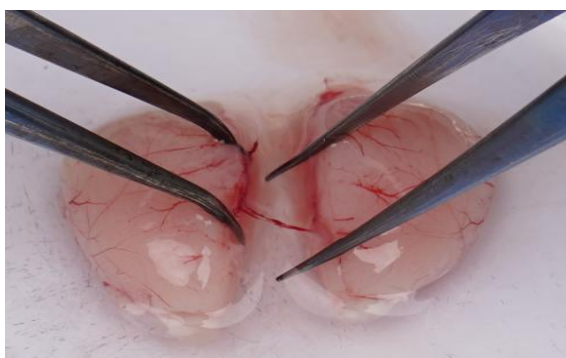


图4 分离左右大脑

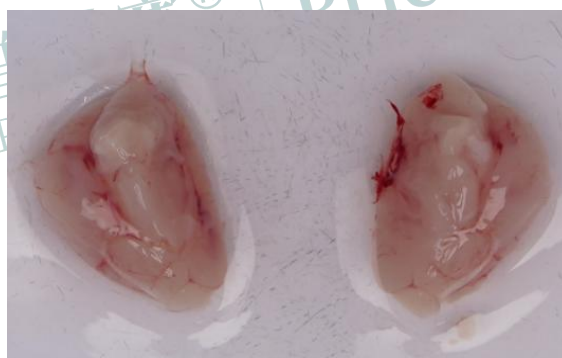


图5 翻转左右大脑



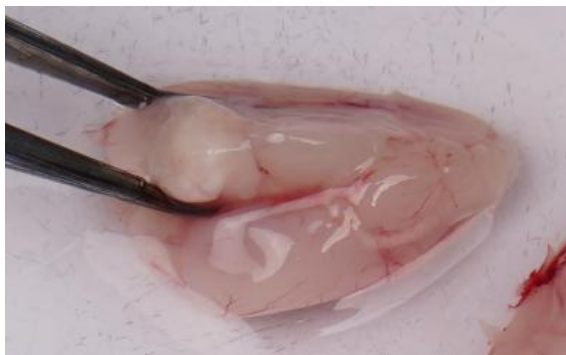


图6 分离髓质留取大脑皮层



图6 分离髓质留取大脑皮层



图7 刮去明显血段（如右侧）

