

## 大鼠主动脉内皮细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-606

产品规格：3Tests/10Tests

### 一、产品描述

大鼠主动脉内皮细胞分离培养试剂盒是专为提取原代大鼠主动脉内皮细胞开发的。经验证，按照本试剂盒方法标准操作，1Test 可获得一瓶细胞（T25 培养瓶），细胞数量 $>1 \times 10^6$  cells，按照 1:2 比例传代，可传 2-3 代，经 CD31 免疫荧光鉴定，细胞纯度可达 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主动脉内皮细胞。组织经分离、消化、铺板 72 h 后可获得主动脉内皮细胞 $>1 \times 10^6$  cells。

备注：提取 8 只大鼠的完整胸主动脉（每只鼠获得主动脉组织量如图 3），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胸主动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	储存条件
大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Rat Aortic Endothelial Cells	3Tests (250 mL) 10Test (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠主动脉内皮细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Rat Aortic Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	黄色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
大鼠主动脉内皮细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Aortic Endothelial Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8°C, 有效期一年
大鼠主动脉内皮细胞添加剂 Supplement For Rat Aortic Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (20 mL)	黄色澄清液体	-5~-20°C, 有效期一年
大鼠主动脉内皮细胞铺板工作液 Plating Solution For Rat Aortic Endothelial Cells	3Tests (3 mL) 10Tests (10 mL)	无色澄清液体	-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

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、铺板工作液、添加剂解冻后 4°C 可保存 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 4°C 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 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、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）、若干个注射器针头以及若干个 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) 大鼠主动脉内皮细胞专用消化液、大鼠主动脉内皮细胞添加剂、大鼠主动脉内皮细胞铺板工作液：4°C 冰箱解冻，恢复至室温；
  - 2) 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液、大鼠主动脉内皮细胞基础培养基：恢复至室温。
3. 大鼠主动脉内皮细胞完全培养基配制：将 5 mL 大鼠主动脉内皮细胞添加剂加入 50 mL 大鼠主动脉内皮细胞基础培养基，混匀后待用。

**备注：大鼠主动脉内皮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。**

4. 培养器皿包被：将 1 mL 大鼠肺大动脉内皮细胞铺板工作液加入 T25 细胞培养瓶中，轻轻摇晃至均匀铺满瓶底，然后将培养皿放入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 0.5-2 h 以上。用于步骤（四），细胞分离后的接种培养。

### （二）解剖操作

1. 动物消毒及处死：使用戊巴比妥钠过量注射处死动物后，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超净台内已消毒的 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 固定夹住大鼠上腹部皮肤，用眼科剪 1 从上腹部开口，由开口向左右锁骨两侧剪开皮肤，用直镊 1 将剪开的皮肤向上掀起，眼科剪 1 剪断黏连的肉膜组织，使胸骨完全暴露。



备注：皮肤剪至暴露出整个胸部，注意将毛发撕扯远离解剖区域，防止污染。

- ② 使用弯镊 2 夹住大鼠剑突软骨右下侧肋弓上的肌肉组织，用眼科剪 2 剪下肌肉，暴露出肋骨，使用弯镊 2 夹住肋骨，眼科剪 2 从右下侧肋骨剪断上至右肩胛骨锁骨处，再用眼科剪 2 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。

备注：胸腔内的剪刀不要太深，应轻挑向上向前剪，防止剪破肺组织，容易引发污染。

- ③ 左手使用弯镊 3 将肺组织向左扒开，暴露出主动脉组织，注意区分食管和主动脉，主动脉紧贴胸椎生长，灰白色，管内有血；食管独立生长，黄白色。用弯镊 3 夹住主动脉，眼科剪 3 将主动脉与胸椎完全剥离，使用眼科剪 3 上沿主动脉弓剪下，下沿胸膈膜处与腹主动脉交界处剪下，得到一根完整的胸主动脉组织，放入装有 10 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液培养皿内（如图 1）。

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。

### （三）组织处理及消化

#### 1. 组织处理：

- 1) 将显微直镊、显微弯镊和显微剪放在超净台内的 EP 管架上方，前端悬空；
- 2) 用这套新的显微剪镊，对主动脉组织进行操作：左手用显微直镊固定主动脉组织的一端，右手用显微弯镊夹住主动脉组织，将主动脉外膜的黄粉色脂肪和结缔组织轻柔撕下（如图 2），清理干净，放入装有 10 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液培养皿内（如图 3）。
- 3) 左手用显微直镊夹住主动脉组织的一端，右手将显微剪的一片剪刀刃插入主动脉血管内，纵向剖开主动脉组织（如图 4），放入含 10 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液培养皿内。

#### 2. 组织消化：

- 1) 将剖开的主动脉组织放入装有 5 mL 大鼠主动脉内皮细胞专用消化液的未包被 6 cm 培养皿内，左手使用显微直镊夹住组织，右手使用显微剪将组织剪成大约 1 cm 长的小段，将培养皿放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱消化 30 min。
- 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，将内皮细胞吹打下来。吹打混匀后，用显微弯镊将未消化完的大块主动脉组织夹出丢弃，向培养皿内加入 5 mL 大鼠主动脉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 1 mL 大鼠主动脉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 2 mL 大鼠主动脉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：取出包被好的 T25 细胞培养瓶，吸弃大鼠主动脉内皮细胞铺板工作液，加入 5 mL 大鼠主动脉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，吸弃大鼠主动脉内皮细胞专用清洗液用 5 mL 大鼠主动脉内皮细胞完全培养基重悬离心管内沉淀，接种于 T25 细胞培养瓶中，于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。
2. 细胞换液：首次换液在第 48 h 进行离心换液，以后每 2-3 天换液一次。接种约 5-7 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 细胞培养瓶中，轻微转动培养皿至消化液覆盖整个培养皿底后，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，待细胞回缩变圆，轻敲培养瓶，大部分细胞脱落后加入大鼠主动脉内皮细胞完全培养基，用 5 mL 移液枪或巴氏吸管轻轻吹打混匀沉淀，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°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	严格控制组织块大小，避免剪得太小块
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 2-3 代，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢
	取材组织量不足	若主动脉组织得量少，可适量增加鼠量



细胞纯度低	组织外膜、脂肪组织 未去除彻底	确保血管清理干净
	组织块剪得过小，消 化过度	确保组织约 1 cm 长，不宜过小

## 七、解剖参考图片

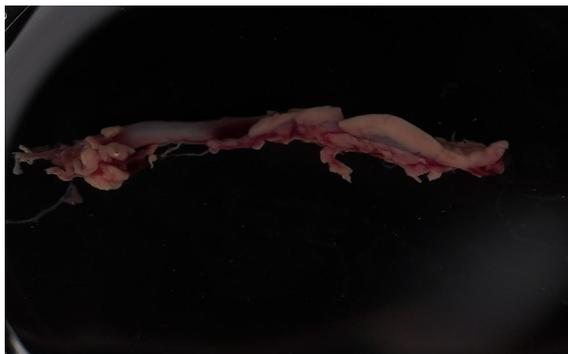


图 1 分离下的完整的胸主动脉组织

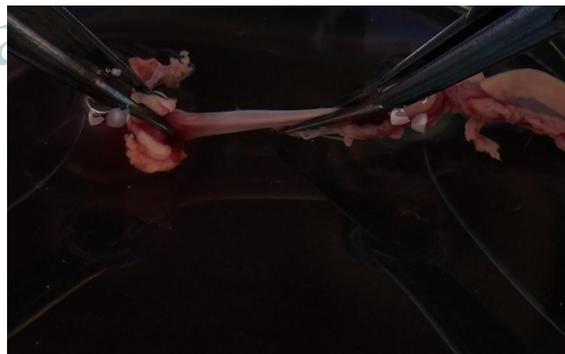


图 2a 清理主动脉外膜脂肪、结缔组织



图 2b 清理主动脉外膜脂肪、结缔组织



图 3 纯净的主动脉组织



图 4a 纵向剖开主动脉



图 4b 纵向剖开主动脉

