

大鼠关节软骨细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-RK011

产品描述

软骨组织由软骨细胞、基质及纤维构成。软骨组织再生能力强，这些增生的幼稚细胞形似纤维母细胞，以后逐渐变为软骨母细胞，并形成软骨基质，细胞被埋在软骨陷窝内而变为静止的软骨细胞。根据软骨组织内所含纤维成分的不同，可将软骨分为透明软骨、弹性软骨和纤维软骨三种，其中以透明软骨的分布较广，结构也较典型。软骨细胞位于软骨陷窝内。软骨细胞在软骨组织中负责分泌 II 型胶原和其它类型的胶原以及非胶原的细胞外基质大分子，其增殖和分化与脊椎动物骨架的发育有着密切的关系，同时能分泌和响应一系列的生长因子，包括IGF-1 和 IL1。体外培养的大鼠关节软骨细胞是研究软骨修复和关节炎病理的有用模型，对于研究其生理功能、药物作用以及各种致病因素作用下的病理生理改变具有重要意义。试剂盒采用消化法，使用本试剂盒提取所得的大鼠关节软骨细胞纯度>90.0%，后续可直接进行 RT-qPCR、Western blot 等基本生物学实验。

适用范围

该试剂盒适用于不同型号新生大鼠（7 天内）关节软骨细胞的分离，规格为 5T，1T 可供 4-6 只新生大鼠使用。

运输和存储条件

2-8 °C 保存与运输，保质期为参考下表。所有组分开封后，有效期为 6-8 周，建议尽快使用。

配套培养基信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品名称	产品规格	储存条件
大鼠关节软骨细胞消化液 I	50 mL	2-8°C 3 个月
大鼠关节软骨细胞消化液 II	25 mL	2-8°C 3 个月

大鼠关节组织处理缓冲液	250 mL	2-8℃ 3 个月
大鼠关节软骨细胞专用培养基	250 mL	2-8℃ 6 个月

分离步骤

一、大鼠关节软骨细胞分离及培养

实验前准备：分装所需大鼠关节软骨细胞消化液 I、II、大鼠关节组织处理缓冲液、大鼠关节软骨细胞专用培养基；实验需自备手术器械、40μm 细胞筛、培养皿、巴氏管若干、离心管若干。

1. 将新生鼠麻醉后处死，用酒精喷洒大鼠全身进行消毒，放在培养皿里面，喷洒培养皿放入生物安全柜。
2. 将新生鼠以**腹面朝下**的姿势固定，用无菌剪刀和钳子去除后腿上的皮肤和软组织，使股骨脱位并丢掉废弃组织。
3. 使用无菌手术刀将股骨头、股骨髁和胫骨分离，并放置在大鼠组织处理缓冲液中清洗 1-2 次。
4. 取出所有软骨片，并将其放入装有 5 mL 大鼠软骨细胞消化液 I 的离心管中，在 37℃培养箱消化 45 min。
5. 用巴氏管轻轻吹打 10 次左右，将软骨及消化液 I 转移至培养皿中，弃消化液 I，加入**新鲜的** 5 mL 大鼠软骨细胞消化液 I，一并转移至离心管内，于 37℃培养箱消化45 min。
6. 用巴氏管轻轻吹打 10 次左右，将软骨及二次消化使用的消化液 I 转移至培养皿中，弃消化液 I。加入 5 mL 大鼠软骨细胞消化液 II，并使用无菌剪刀将软骨碎片化，使用巴氏管吹打混匀，转移至离心管内，于 37℃培养箱消化过夜（约 15 个小时）
7. **过夜消化**完毕后，用巴氏管吹打关节软骨及消化液 II 使其混匀，分散完毕后用 40μm 细胞筛网过滤，过滤完毕后离心：**400 xg**，10 分钟。
8. 弃上清，用 5 mL 大鼠软骨细胞专用培养基重悬，再次离心：**400 xg**，10 分钟。
9. 用大鼠软骨细胞专用培养基重悬后计数，即可进行铺板培养，铺板密度见表2。

表 2. 大鼠关节软骨细胞推荐铺板密度

培养器皿	细胞量（×10 ⁴ 个）
10cm培养皿	300

6cm培养皿	150
6 孔板	60
12 孔板	20
24 孔板	10

注意事项

1. 组织分离操作建议在冰上操作，组织处理缓冲液建议预冷处理。
2. 分离时应避免过度消化、过度重悬等操作导致细胞损伤。
3. 细胞专用消化液、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，按照需要量分装，并且用封口膜封住瓶口，即取即用，以避免污染。