

大鼠心肌细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-RK008

产品描述

心脏是脊椎动物身体中最重要的一个器官，主要功能是为血液流动提供压力，把血液运行至身体各个部分。心肌细胞分离自心脏组织，呈菱形、多边形等不规则形状；细胞培养 2h 后开始贴壁，呈梭形；到 12h 左右，细胞开始伸出伪足，呈菱形、多角形；细胞分离培养48h 以后，大部分伸出伪足、呈巴掌状，部分心肌细胞会出现搏动。体外培养的心肌细胞可保持结构及功能上的某些特点，并具有自发性节律搏动，且心肌细胞的培养具有简便、定量、重复性好以及不受神经体液因素的影响等特点。利用培养的心肌细胞在探索非血液动力学因素所致的心肌肥厚的调节，研究心肌细胞的生物力学、凋亡、受体下调、缺血预处理、信号通路、对作用于心脏的新药进行筛选并对其安全性进行评价以及从培养的心肌细胞中提取有价值的生物因子等方面具有广阔的应用前景，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。

适用范围

该试剂盒适用于 Sprague-Dawley、Wistar-Imamichi 等不同品系的新生 0-3 天大鼠原代心肌细胞提取试剂盒。

规格

本试剂盒规格为 10 次（以3-5 只新生大鼠为 1 次计）

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. 分离培养试剂盒组成信息

产品名称	产品规格	储存条件
大鼠心肌细胞组织专用消化液 I	100 mL	-20℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞组织专用消化液 II	50 mL	-20℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞组织消化终止剂	10 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
组织处理缓冲液	500 mL*2	2-8℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞清洗液	125 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
0.1%明胶	50mL	-20℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞纯化培养基 I	200 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞纯化培养基 II	200 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞纯化培养基 III	200 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
大鼠心肌细胞专用培养基	500 mL	2-8℃，避光保存，3 个月

分离步骤

实验前准备：大鼠心肌细胞组织专用消化液 I、II、组织处理缓冲液、大鼠心肌细胞纯化培养基 I、II、III、心肌细胞专用培养基；实验需自备 PBS、70μm 细胞筛、手术器械、6cm/10cm 培养皿、离心管若干。

一、大鼠心肌细胞提取：下面以新生 1 天 Wistar-Imamichi 大鼠为例。

大鼠心肌细胞分离 D1（第一天所有操作在冰上进行）

1. 准备新生乳鼠（0-3d）5 只，使用异氟烷将乳鼠麻醉，麻醉后放到 10 cm 细胞培养皿盖上，喷酒精后放置超净工作台。
2. 用灭菌工具取出跳动的心脏，并将心脏放入 50 mL 离心管中的 30mL 预冷的组织处理缓冲液中（尽快取出心脏并立即将它们放在冰上，从身体上取出心脏后，所有步骤都应在冰上进行）。
3. 五个心脏放入同一个离心管，旋转离心管清洗心脏组织，清洗后转入新的装有 30mL 预冷的组织处理缓冲液中的离心管中继续清洗。

4. 转入安全柜，去除上清，将心脏组织转入装有预冷的组织处理缓冲液的 10 cm培养皿，小心吸取，注意不要吸出心脏。使用器械去除大血管及结缔组织等。

5. 完成以上步骤，将组织转入新的装有预冷的组织处理缓冲液的 10 cm培养皿，置于冰上，使用手术剪取心室部分（心室约占心脏的2/1~1/3），剪成小于 1mm³ 组织块。

6. 加入预冷的 5 mL 大鼠心肌细胞组织专用消化液 I 重悬组织块，4℃过夜消化。

大鼠心肌细胞分离 D2

1. 0.1%明胶包被培养皿，以 6cm板为例，每孔加入2-3mL 明胶溶液，置入 37℃培养箱孵育，两小时，去除明胶溶液，PBS 清洗 1-2 遍即可使用。

2. 将过夜消化的心脏组织消化液全部转入 50 mL 离心管，加入 1mL 大鼠心肌细胞组织消化终止剂，37℃培养箱孵育30 分钟。

3. 加入 5 mL 大鼠心肌细胞组织专用消化液 II，置于培养箱 170-220 rpm 消化45min。

4. 使用移液器以 3mL/S 的速度吹打 20 次（来回记为一次），随后静置 3 分钟。取上清过 70μm 细胞筛。

5. 剩余的组织进行充分研磨，继续加入 5 mL 的大鼠心肌细胞清洗液冲洗离心管，再次过 70μm 细胞筛，收集到同一个离心管中。随后用2 ml 的大鼠心肌细胞清洗液清洗细胞筛。

6. 室温放置 20-60 分钟消化剩余的细胞团块。

7. 100xg，离心 5 min，去上清。

8. 使用20mL 大鼠心肌细胞纯化培养基 I 重悬细胞，将细胞悬液铺于 1 个 10 cm培养皿中，放入培养箱培养 1 小时。

9. 轻轻地旋转培养皿，收集 10cm培养皿中的上清，上清为大鼠心肌细胞。（大多数大鼠心肌细胞在孵育 1 小时后仍会漂浮在上清液中。为了避免被轻微附着在培养皿上的成纤维细胞污染，不要通过移液来收集上清液。）

10. 100 xg 离心 5 min，使用2ml 大鼠心肌细胞纯化培养基 II 重悬细胞，计数，将细胞悬液接种于明胶包被的六孔板中（2x10⁵/孔），37℃，5%CO₂ 培养箱培养，24 小时内勿挪动细胞。

11. 24 小时后换液，更换大鼠心肌细胞纯化培养基 III。

12. 24 小时后换液，更换大鼠心肌细胞专用培养基，后续每2-3 天换液。

注意事项

1. D1 天全程建议在冰上操作，分离大鼠心肌细胞时应避免过度消化、过度重悬等操作导致细胞损伤。
2. 大鼠心肌细胞为终末分化细胞，在体外不增殖。
3. 大鼠心肌细胞消化液避免反复冻融，建议分装成小份保存，近期使用可保存于4℃。
4. 大鼠心肌细胞专用消化液、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，按照所需要量分装，并且用封口膜封住瓶口，即取即用，以避免污染。