

小鼠胚胎成纤维细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-MK011

产品描述

成纤维细胞(Fibroblast)是疏松结缔组织的主要细胞成分，由胚胎时期的间充质细胞分化而来。刚分离的胚胎成纤维细胞（Embryonic fibroblast）呈圆形、折光性良好，悬浮于培养基中。30min 细胞贴壁，其中部分开始伸出伪足，表现为小的突起；6h 后细胞基本贴壁完全，伸展成梭形，胞核清晰，分布较均匀，散在生长，不聚集成团；细胞生长迅速，5-7 天即呈融合状态，细胞排列紧密，有的交叉重叠生长，平坦、胞体较大，细胞质透明，细胞核较大，呈椭圆形，颜色淡。细胞融合，并彼此连接成网状；细胞呈突起的纺锤形或星形的扁平分布。是 ES 细胞培养常用的饲养层细胞，能产生抑制 ES 细胞自主分化和促进 ES 细胞增殖的因子，故能有效地促进 ES 细胞的增殖并维持其未分化特性和多潜能性，且分泌效果优于外源添加的一些因子，可以为 ES 细胞的培养提供类似于体内的微环境，故在研究哺乳动物 ES 细胞中得到广泛使用。

适用范围

该试剂盒适用于 C57BL/6J、BALB/c 等不同品系的孕 13.5 d 小鼠原代胚胎成纤维细胞提取试剂盒。

规格

本试剂盒规格为 10 次（以2 只胎鼠为 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

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
------	------	------	------

IMP-MK011A	小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 I	30 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月
IMP-MK011B	小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 II	100 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月
IMP-MK011C	小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 III	30 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月
IMP-MK011D	小鼠胚胎成纤维细胞组织处理缓冲液	500 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月
IMP-MK01101	小鼠胚胎成纤维细胞专用完全培养基	500 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月
IMP-MK011E	重组胰蛋白酶（含 EDTA，不含酚红）	100 mL	2-8℃，避光保存， 3 个月

分离步骤

实验前准备：小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 I、II、III、组织处理缓冲液、小鼠胚胎成纤维细胞专用完全培养基；实验需自备 PBS、含 10%FBS 完全培养基、手术器械、6cm/10cm培养皿、离心管若干。

一、小鼠胚胎成纤维细胞提取：下面以C57BL/6J 小鼠为例

1. 配鼠：实验开始前，于当天 18:00-19:00 时将雌、雄小鼠按 3:1 比例合笼。第 2 天 8:00 时分笼，并观察雌性小鼠有无阴栓，有阴栓确定为怀孕，记 0.5 d，并分开单独饲养。
2. 取孕 13.5 d 小鼠,断颈处死，置于体积分数为 75%酒精消毒3 min。无菌打开孕鼠腹腔，可见腹腔两侧呈“V”字型串珠样子宫，用镊子提起子宫(不能碰到皮毛，以防污染)，并用眼科剪去除子宫系膜和结缔组织，剥离子宫。将子宫放入含有组织处理缓冲液的一次性无菌培养皿中，漂洗两三遍，去除淤血。
3. 用眼科剪和镊子去除胎盘、羊膜等胚胎外组织，取出胚胎放入另一平皿，用组织处理缓冲液洗涤，直到没有血迹为止。
4. 用眼科剪和镊子去除胚胎的头部、四肢及内脏，留取躯干部 (注:头部、四肢及内脏需去除干净)，将躯干部放入皿中，用组织处理缓冲液洗涤 1 次
5. 用眼科剪将胚胎躯干部剪碎成糊状，加入 5 mL PBS 混匀移入离心管中，自然沉降 3 min 后，将上清液轻轻吸出弃掉。
6. 加入3 mL 小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 I 轻轻吹打后室温下自然沉降2 min，将上清液轻轻吸出弃掉。

7. 加入3 mL 小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 II 轻轻吹打后室温下消化3 min，将上部的单细胞悬液轻轻吸出放入另一离心管中，加等量培养基终止消化，重复消化两次(一共 3 次)。若还有未消化的组织，再加入3 mL 小鼠胚胎成纤维细胞组织专用消化液 III 轻轻吹打至完全消化,终止消化。

8. 混匀离心管收集所有细胞悬液，自然沉降 1 min，将大块沉淀吸出弃掉。

9. 800 r/min 离心 5 min，弃上清，使用小鼠胚胎成纤维细胞专用完全培养基重悬至 5 mL。计数，按 5×10^6 /瓶接种到 T25 培养瓶中，一个 T25 培养瓶添加5-6ml 小鼠胚胎成纤维细胞专用完全培养基，记为原代(PO)。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。

10. 24 小时后，换液以去除未贴壁的细胞及碎片，细胞融合至 80%-90%时，消化，按 1 : 3-1 : 4 比例传代培养。

二、小鼠胚胎成纤维细胞传代：

贴壁细胞

1. 吸弃原培养液上清。

2. 加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，吸弃 PBS.

3. 加入 1-2ml 重组胰蛋白酶消化液至培养瓶中，并轻轻晃动培养瓶至消化液浸润所有细胞，放入 37℃培养箱消化细胞 2-3min。

4. 倒置显微镜下观察，待细胞明显变圆有间隙后（全程请不要拍打培养瓶），再加入 3-5ml 含 10% 血清的培养基终止消化（稀释法终止消化，则培养基用量不应低于 5ml）。

5. 用巴氏管轻轻吹打混匀、分散细胞，1000rpm，离心 3-5min 以去除残留胰酶。

6. 去掉上清，按 1 : 3-1 : 4 比例传代培养。

注意事项

1. 全程分离操作过程建议在冰上进行，分离小鼠胚胎成纤维细胞时应避免过度消化、过度重悬等操作导致细胞损伤。

2. 小鼠胚胎成纤维细胞传代时使用重组胰蛋白酶（含 EDTA，不含酚红）消化液消化。

3. 小鼠胚胎成纤维细胞专用消化液、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。