

原代肺微血管内皮细胞提取

1. 分离肺组织

1. 小鼠麻醉后暴露心肺→含1%双抗的PBS冲肺→剪取肺组织→置肺于含有1%双抗无血清的DMEM培养基中；

2. 消化

2. 离每片肺叶→将肺全部剪碎（不能太碎）→将剪碎的肺组织倒入盛有2 mg/mL的I型胶原酶的50 mL离心管中（2 mg/每只），混匀→37°C水浴锅中消化1 h（每10 min剧烈摇晃5-8次）；

3. 离心

3. 消化常温下，1000 rpm离心10 min；离心后去除上清液，用无血清的DMEM培养基重悬，使用70 μm 的无菌滤网缓慢，常温1000 rpm离心10 min；离心后去除上清液，再次用无血清的DMEM培养基重悬，使用40 μm 的过滤后，常温1000 rpm离心10 min；离心后去除上清液，用预冷的磁珠分选缓冲液重悬，充分混匀后在4°C条件下，300 g离心10 min；

4. 磁珠包被

4. 离心后去除上清液，再次用预冷的磁珠分选缓冲液重悬，在4°C条件下，300 g离心10 min；离心后去除上清液，依据细胞计数的结果，每 10^7 个细胞加入适量CD31磁珠混悬液，充分混匀后再4°C条件下避光孵育15 min；孵育结束后，加入磁珠分选缓冲液终止反应，在4°C条件下，300 g离心10 min；离心后去除上清液，用500 μL 预冷的磁珠分选缓冲液重悬；

5. 细胞分选

5. 湿润分选柱后，将用500 μL 磁珠分选缓冲液重悬的细胞悬液加入磁力分选柱中，可见液体缓慢流下，待细胞悬液完全停止流动，分三次加入3 mL磁珠分选缓冲液。待缓冲液完全停止流动后，自磁珠分选架上取下磁力分选柱入15 mL离心管中，将活塞插入磁力分选柱，用力向下将细胞推出；在常温条件下，1000 rpm离心10 min；离心后去除上清液，所得沉淀即CD31阳性细胞（原代肺微血管内皮细胞）。

6. 细胞培养

6. 小鼠原代肺微血管内皮细胞需要用ECM完全培养基培养，刚提取出来的原代肺微血管内皮细胞置于细胞培养箱中培养。