

肺泡II型上皮细胞

1.麻醉

- 1.1 腹腔注射戊巴比妥钠（80 mg/kg）
- 1.2 腹部消毒开胸，取出心肺，置于预冷的无菌PBS中

2.消化

- 2.1 预冷PBS中分离肺叶，将肺组织剪碎
- 2.2 转移到含有protease II和DNase I的15 mL离心管，37 °C恒温摇床上孵育30 min

3.过滤

- 3.1 加入含2%FBS的培养基终止消化
- 3.2 细胞悬液依次通过70 μm 和40 μm 的细胞筛
- 3.3 1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀

4.裂红

- 4.1 弃上清，加入5 mL红细胞裂解液；
- 4.2 4 °C冰上静置10 min；1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀

5.清洗

- 5.1 弃上清，加入10 mL PBS清洗重悬细胞
- 5.2 1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀（同条件重复一次）

6.CD45 阴选

- 6.1 细胞重悬于缓冲液，加入CD45⁺的磁珠，4 °C震荡孵育15min
- 6.2 分选液重悬细胞；1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀
- 6.3 分选液重悬细胞，并转移至分选柱，过磁力架磁珠分选仪
- 6.4 收集 CD45⁻的细胞，1000 g，4°C 离心10 min，将细胞沉淀

7.CD326 阳选

- 7.1 CD45细胞重悬于缓冲液，加入FcR 封闭剂，4 °C孵育10 min
- 7.2 分选液重悬细胞；1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀
- 7.3 加入CD326⁺的磁珠，4 °C震荡孵育30 min
- 7.4 分选液重悬细胞；1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀；分选液重悬细胞并过磁力架
- 7.5 收集CD326⁺的细胞，1000 g，4°C离心10 min，将细胞沉淀

8.布板

- 8.1 细胞用肺泡II型上皮细胞专用完全培养基重悬，接种于孔板

9.鉴定

- 9.1 免疫荧光检测SP-C蛋白是否表达

常见问题解析

1. 细胞提取量较低怎么办？

①酶活性及浓度优化：根据货号在官网查询酶活，由于批次问题，酶活会有差异，可自行换算酶活确定剂量；优化酶浓度（常用胶原酶I/IV 1-3 mg/mL，胰蛋白酶0.05-0.25%）和消化时间（通常30-60 min，37°C），确保温度稳定并避免过度消化导致细胞损伤；②结合温和的机械解离（如轻柔反复吹打、使用带筛网的注射器），操作时注意力度和频率，以避免对细胞造成物理损伤；③使用含EDTA的消化液（如DPBS+EDTA）预处理去除Ca²⁺/Mg²⁺，有助于细胞解离，同时保持细胞膜的完整性，提高细胞存活率。

2. 提取的细胞活力差？

①消化损伤：使用低浓度酶（如0.05%胰蛋白酶）+含血清培养基及时终止消化；加入DNase I（10-50 µg/mL）防止DNA释放导致的细胞粘连，确保细胞分散均匀；②离体操作时间长、缺氧、缺乏保护因子：全程快速操作，减少细胞在室温暴露时间；使用预冷缓冲液和冰上操作，保持细胞低温环境，避免细胞受损。

参考文献

- 1 Jansing NL (2018) Isolation of Rat and Mouse Alveolar Type II Epithelial Cells. *Methods Mol Biol* 1809:69-82.