

原代小胶质细胞提取（磁珠分选法）

1. 器械准备

- 1.1 手术器械及枪头提前进行高温灭菌
- 1.2 器械和试剂放于工作台，75%酒精消毒后紫外照射30分钟

2. 取脑剥膜

- 2.1 乳鼠浸泡在75%酒精，斩首乳鼠，将颅骨剥开，取出大脑，放于预冷的PBS培养皿中清洗1遍
- 2.2 显微镊将大脑表面的脑膜剥离干净，放于装满DMEM培养基的小皿

3. 消化过滤

- 3.1 剪碎脑组织，加入2.5 mL的0.25%胰蛋白酶（含EDTA），37°C培养箱中消化15 min，每隔5 min摇晃1次，加入等体积含有20%血清的DMEM培养基终止消化
- 3.2 湿润滤网后，将上述液体依次通过70 μm 和40 μm 的细胞滤网，收集滤液，1000 rpm离心5 min

4. 去除髓鞘

- 4.1 将细胞重悬于30% Percoll中，并以700 g离心10 min，弃上清，加入PBS洗涤细胞后，1000 rpm离心5 min，重复两次

5. 磁珠孵育

- 5.1 用PE偶联的抗CD11b抗体在IMAG缓冲液（含有0.5% BSA和2 mM EDTA）中的细胞孵育10 min，再用抗PE磁珠孵育15 min

6. 过柱接种

- 6.1 润洗MS色谱柱，加入上述液体，完全排出后再加入1 mL IMAG缓冲液，灌满MS色谱柱，一次性往下推，液体即为CD11b⁺细胞溶液
- 6.2 1000 rpm离心5 min，采用含有20%血清的DMEM培养基重悬细胞沉淀，放置培养箱，每三天进行一次换液

原代小胶质细胞提取（差异黏附分离法）

1. 器械准备

- 1.1 手术器械及枪头提前进行高温灭菌
- 1.2 器械和试剂放于工作台，75%酒精消毒后紫外照射30分钟

2. 取脑剥膜

- 2.1 乳鼠浸泡在75%酒精，斩首乳鼠，将颅骨剥开，取出大脑，放于预冷的PBS培养皿中清洗1遍
- 2.2 显微镊将大脑表面的脑膜剥离干净，放于装满DMEM培养基的小皿

3. 消化过滤

- 3.1 剪碎脑组织，加入2.5 mL的0.25%胰蛋白酶（含EDTA），37°C培养箱中消化15 min，每隔5 min摇晃1次，加入等体积含有20%血清的DMEM培养基终止消化
- 3.2 湿润滤网后，将上述液体依次通过70 μm 和40 μm 的细胞滤网，收集滤液，1000 rpm离心5 min

4. 接种换液

- 4.1 采用含有20%血清的DMEM培养基重悬细胞沉淀，放置培养箱，每三天进行一次换液
- 4.2 第三天换液时将培养瓶中的全部液体更换为含有20%血清的DMEM/高糖培养基，第六天时更换为1/2上述培养基，第九天时更换为含有1/5的上述培养基

5. 观察纯化

- 5.1 当混合胶质细胞培养至10-12天时，可以观察到附着的小胶质细胞
- 5.2 拍打培养瓶底部数次直至小胶质细胞悬浮在培养基中，或者采用摇床摇动培养瓶1小时，收集上清液，1000 rpm离心5 min，采用含有20%血清的DMEM培养基重悬细胞沉淀，放置培养箱，每三天进行一次换液

原代小胶质细胞提取（密度梯度离心法）

1. 器械准备

- 1.1 手术器械及枪头提前进行高温灭菌
- 1.2 器械和试剂放于工作台，75%酒精消毒后紫外照射30分钟

2. 取脑剥膜

- 2.1 乳鼠浸泡在75%酒精，斩首乳鼠，将颅骨剥开，取出大脑，放于预冷的PBS培养皿中清洗1遍
- 2.2 显微镊将大脑表面的脑膜剥离干净，放于装满DMEM培养基的小皿

3. 消化过滤

- 3.1 剪碎脑组织，加入2.5 mL的0.25%胰蛋白酶（含EDTA），37°C培养箱中消化15 min，每隔5 min摇晃1次，加入等体积含有20%血清的DMEM培养基终止消化
- 3.2 湿润滤网后，将上述液体依次通过70 μm 和40 μm 的细胞滤网，收集滤液，1000 rpm离心5 min

4. 梯度配制

- 4.1 采用三级密度梯度（自下而上）：底层：70% Percoll（密度 $\approx 1.090 \text{ g/mL}$ ）；中层：37% Percoll（密度 $\approx 1.058 \text{ g/mL}$ ，小胶质细胞所在密度范围）；顶层：30% Percoll（密度 $\approx 1.040 \text{ g/mL}$ ），每层体积严格等分（如各10 mL），用注射器沿管壁缓慢铺层避免混合

5. 梯度加载

- 5.1 将重悬细胞液小心铺于30% Percoll层上方，形成四层结构（自下而上：70% \rightarrow 37% \rightarrow 细胞悬液 \rightarrow 30%）
- 5.2 900g，加速度/减速度小于9档，室温离心30 min，

6. 纯化接种

- 6.1 目标层在37%与70% Percoll间的透明界面（含小胶质细胞），用1 mL移液枪水平吸取界面细胞（约8 mL），加等量PBS稀释，900 g离心17 min
- 6.2 采用含有20%血清的DMEM培养基重悬细胞沉淀，放置培养箱，每三天进行一次换液

常见问题解析

1. 是否可以提取成年小鼠大脑的小胶质细胞？

可以提取成年小鼠大脑的小胶质细胞，但需采用特殊分离技术以克服其丰度低、髓鞘干扰强及细胞活性难维持等问题。成年鼠小胶质细胞丰度仅为新生鼠的1/5，且成熟血脑屏障增加了分离难度，需合并至少3只成年鼠的脑组织（优先选取皮层或海马区）以保障基础细胞量。在提取过程中首先需经心灌注冷PBS清除循环血细胞，彻底剥离脑膜与血管，避免成纤维细胞污染（残留血管可致25%污染率），采用胶原酶联合Dispase II协同消化，控制时间小于30 min，离心力低于300g以减少机械损伤，同时通过CD11b/IBA1抗体磁珠分选或流式分选提高细胞纯度。值得注意的是，成年小鼠小胶质细胞无法冻存复苏（活性丧失>80%），且脂多糖刺激阈值显著高于新生鼠，因此一般情况下选择乳鼠进行实验更为合适。

2. 如何减少少突胶质细胞污染？

虽然可以通过引入机械力来提高小胶质细胞的产量，但额外的机械力也会增加少突胶质细胞和星形胶质细胞的解离，导致小胶质细胞纯度降低。因此在差异黏附分离法中我们可以增加梯度优化的环节，使用1.058-1.070 g/mL的Percoll密度梯度离心，可有效分离小胶质细胞（CD11b⁺）与少突胶质细胞（O4⁺），纯度提升至90%以上，且全程保持4℃环境，低温可阻断少突胶质前体细胞对机械刺激的增殖响应；在分选环节，可以通过标记排除CD140a⁺少突胶质前体细胞群体，避免残留少突胶质细胞。

参考文献

- [1] Du S, Xiong S, Du X, et.al. Primary Microglia Isolation from Postnatal Mouse Brains [J]. J Vis Exp. 2021, (168). doi: 10.3791/62237.
- [2] Nikodemova M, Watters JJ. Efficient isolation of live microglia with preserved phenotypes from adult mouse brain [J]. J Neuroinflammation. 2012, (9): 147.
- [3] Tamashiro TT, Dalgard CL, Byrnes KR. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue [J]. J Vis Exp. 2012, (66): e3814.