

小鼠星型胶质细胞原代培养

1. 准备

- 1.1 提前 1 天用 0.1% 多聚赖氨酸 (PLL) 包被培养皿 / 板, 37°C CO₂ 培养箱孵育过夜, 使用前用 PBS 洗 2-3 次
- 1.2 配制完全培养基: Neurobasal 培养基中加入 2% B27 添加剂、1mmol/L L - 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素, 4°C 避光保存
- 1.3 实验器械、耗材灭菌后, 超净工作台内紫外线照射灭菌 30 分钟以上

2. 取材

- 2.1 取 1-3 天乳鼠, 75% 乙醇擦拭消毒, 超净台内断头
- 2.2 剥离颅骨, 取出脑组织, 去除脑膜和血管, 用预冷 PBS (无钙镁) 洗 2-3 次

3. 细胞分散 与分离

- 3.1 将脑组织剪成 1mm³ 小块, 加入 0.25% 胰蛋白酶 - EDTA 溶液, 37°C 水浴消化 10-15 分钟, 每 5 分钟摇晃一次
- 3.2 加等量含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 轻轻吹打至细胞分散, 经 70μm 细胞筛过滤
- 3.3 1000r/min 离心 5 分钟, 弃上清, 保留细胞沉淀

4. 接种

- 4.1 加完全培养基重悬细胞, 台盼蓝计数后调整浓度至 1×10^6 - 2×10^6 个 /mL
- 4.2 接种到 PLL 包被的培养器皿中, 每平方厘米约 1×10^5 - 2×10^5 个细胞, 轻轻摇晃使细胞均匀分布

5. 培养

- 5.1 放入 37°C、5% CO₂ 培养箱, 48 小时后更换一半培养基, 之后每 2-3 天更换一半培养基

常见问题解析

1. 细胞污染怎么办？

培养基出现浑浊，有絮状沉淀或颗粒状物质，细胞生长受到抑制，形态变得不规则，甚至死亡提示细胞污染，原因为无菌操作不严格，如操作时未遵守无菌规范、试剂或耗材被污染；培养箱内部环境被污染；实验动物本身携带病原体等。一旦发现细胞污染，应立即将污染的细胞培养物及相关试剂处理掉，避免污染扩散。对超净工作台、培养箱等进行彻底消毒，可用75%乙醇擦拭，再用紫外线照射30 min以上。重新检查所有试剂和耗材的灭菌情况，确保无菌后再进行实验。

2. 细胞存活率低怎么办？

细胞接种后，贴壁细胞数量少，大部分细胞漂浮在培养基中，显微镜下观察到大量死细胞的原因多为乳鼠年龄过大，细胞活力差；胰蛋白酶消化时间过长或浓度过高，导致细胞损伤；离心速度过快或时间过长，对细胞造成机械损伤；培养基配方不当或营养成分不足；培养环境不适宜等。培养过程需严格选择出生1-3天的乳鼠；控制好胰蛋白酶的消化时间和浓度，避免过度消化；离心时采用适宜的转速（800-1000 r/min）和时间（5 min）；检查培养基配方，确保营养成分充足；维持培养箱的各项参数稳定。

3. 细胞贴壁不良怎么办？

细胞接种后长时间不能贴壁，大部分细胞悬浮在培养基中，即使贴壁也容易脱落，原因多为培养器皿未用多聚赖氨酸包被或包被效果不佳；多聚赖氨酸溶液浓度过低、孵育时间不足或包被后未充分洗涤；细胞悬液中含有过多的杂质或死细胞；培养基中血清浓度过低等。培养过程中需确保培养器皿用0.1%多聚赖氨酸充分包被，孵育时间足够，并在使用前用PBS缓冲液充分洗涤；接种前通过过滤和离心等方法去除细胞悬液中的杂质和死细胞；适当提高培养基中胎牛血清的浓度至10%-15%。