

## 小鼠神经元原代培养

### 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 CO<sub>2</sub>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。

### 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 洗 2-3 次

### 3.细胞分散与分离

- 3.1 将脑组织剪成 1mm<sup>3</sup> 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 加等量完全培养基终止消化, 轻轻吹打至细胞分散, 经 40μm 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  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  个 /mL
- 4.2 接种到 PLL 包被的培养器皿中, 每平方厘米约  $1 \times 10^5$  个细胞, 轻轻摇晃使细胞均匀分布

### 5.培养

- 5.1 放入 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱, 24 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？

培养基浑浊，出现絮状沉淀或颗粒状物质，细胞生长受到抑制，形态发生改变一般为细胞受到污染。原因是无菌操作不严格，器械、耗材或试剂被污染；培养箱内环境被污染；动物组织本身携带微生物等。解决方法是一旦发现细胞污染，应立即将污染的细胞培养物丢弃，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，再用紫外线照射灭菌。重新检查所有器械、耗材和试剂的灭菌情况，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，大量细胞死亡，贴壁细胞数量少一般原因为乳鼠出生时间过长，神经元活力降低；或消化时间过长或胰蛋白酶浓度过高，导致细胞损伤；或离心速度过快或时间过长，对细胞造成机械损伤；或培养基配方不当或营养成分不足；培养环境不适宜等。需选择出生1-3天的乳鼠进行取材；严格控制胰蛋白酶的消化时间和浓度；离心时采用适宜的速度和时间；检查培养基配方，确保营养成分充足；维持培养箱的温度、CO<sub>2</sub>浓度和湿度稳定。

### 3. 细胞贴壁不良怎么办？

细胞接种后，大部分细胞不能贴壁，悬浮在培养基中一般原因多为培养皿或培养板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或孵育时间不足；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高或过低等。需确保培养皿或培养板用适宜浓度的多聚赖氨酸充分包被，并孵育足够的时间；在细胞接种前，彻底去除细胞悬液中的杂质和死细胞；调整培养基中血清的浓度至适宜范围。