

多巴胺能神经元细胞原代培养实验报告

一、实验材料

1. 实验动物

SPF 级，SD 孕鼠 2 只（10 只 1 周龄幼鼠用于正式实验），购自常州卡文斯实验动物有限公司，实验动物许可证号：SCXK（苏）2016-0010。

2. 主要试剂

H-DMEM 培养基（美国 Gibco，11965092）
Neurobasal 培养基（美国 Gibco，10888022）
FBS（美国 Gibco，12664025）
青霉素-链霉素溶液（双抗，武汉普诺赛，PB180120）
0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）
PBS（南京生兴生物，SN331）
无水乙醇（上海国药化学试剂，10009218）

3. 主要实验仪器

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）
-80℃超低温冰箱（澳柯玛 AUCMA，DW-86L500）
超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）
高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）
CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher，3131）
离心机（美国 Eppendorf，5417R）
倒置相差显微镜（日本 Olympus，CKX31 型）

二、实验方法

1. 细胞提取

(1) 将 1 周龄的 SD 大鼠幼鼠麻醉处死，置于 75%乙醇浸泡 30 min。

(2) 将大鼠转移至超净台中，无菌条件下剪开头部，取出脑组织，用预冷的 PBS 冲洗，放入置于冰盒的培养皿中。

(3) 将培养皿置于显微镜下，去脑膜，用镊子沿中线将脑中间皮质（大脑半球）向两侧外翻，暴露内侧面半月状的海马组织和海马上方的纹状体（椭圆形有横纹的核团）。

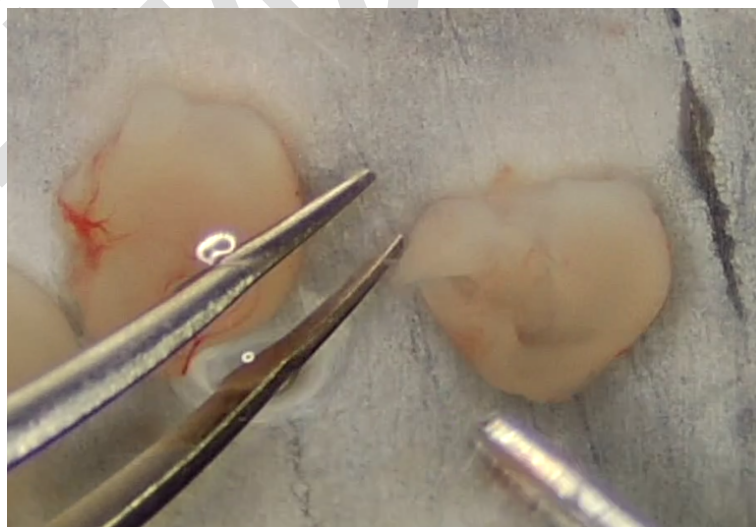
(4) 用镊子将纹状体取出放置于无菌 EP 管中，然后加入 PBS 冲洗。

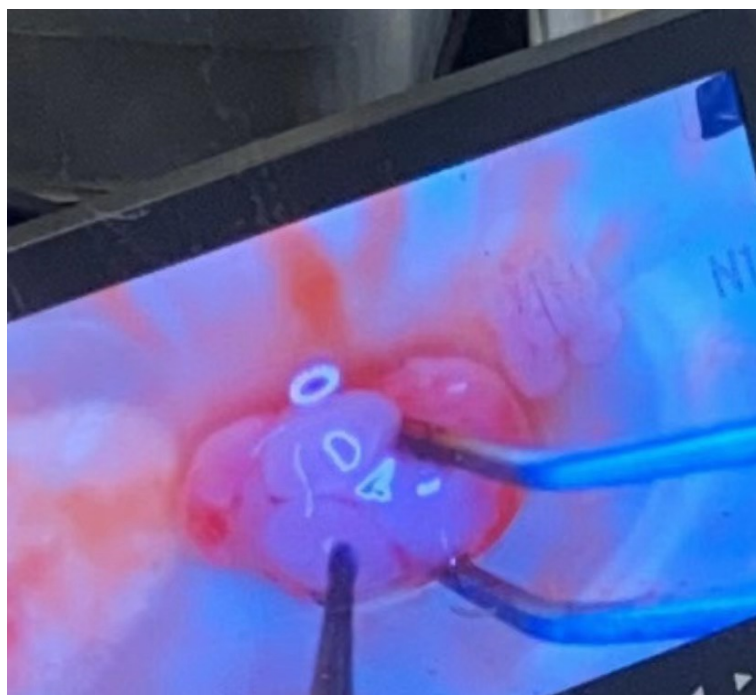
(5) 加入 0.25%胰酶晃动并消化 10 min，用移液器吸取组织，尽量少的吸取消化液至新的 EP 管中。

(6) 加入适量 H-DMEM 完全培养基（90% H-DMEM 培养基+10% FBS+1% 双抗）并吹打均匀，1000 rpm 离心 5 min。

(7) 去上清，加入适量 Neurobasal 完全培养基（90% Neurobasal 培养基+10% FBS+1%双抗）反复吹打均匀成单细胞悬液，过 70 μm 的细胞筛网。

(8) 过滤的液体加入到细胞培养瓶中，加入适量 Neurobasal 完全培养基并置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。





2. 细胞培养

(1) 细胞提取 1 天后更换培养瓶中的培养基，于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养。

(2) 之后细胞每 2~3 天更换一次培养基或者培养基变黄时也要立即更换培养基，将培养瓶中原有的培养基吸掉，加入新鲜的培养基。

3. 细胞传代

(1) 待细胞汇合度为 70~90%，弃掉培养瓶中的原培养基，加入无菌的 PBS 冲洗两次，加入 1 ml 的 0.25% 胰酶，37°C 孵育 1~2 min。

(2) 显微镜观察到大量细胞脱离呈漂浮状态时，立即加入两倍胰酶量的含血清的培养基，终止胰酶消化，倾斜培养皿或培养瓶，自上而下吹打，使未脱落的细胞脱离。

(3) 将培养瓶的液体转移到灭菌的 15 ml 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 将离心管上清液去掉，加入新鲜的培养基吹打均匀，使重悬于培养基中。

(5) 正常传代按照 1:2~1:3 的比例将细胞悬液分装在装有新鲜培养基的培养瓶或培养皿中，于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养。若进行实验细胞接种，则需用血细胞计数板进行细胞计数。

(6) 细胞计数：取少量细胞悬液，将细胞悬液滴入盖有盖玻片的血细胞计数板中间平台两侧的沟槽中，使细胞悬液充满盖玻片与计数板间（不要有气泡），静置 2~3 min，通过显微镜计算四个大方格（由 4×4 的小方格组成）中的细胞，计算细胞总量。公式为：细胞数/ml=四大格细胞总数/4×10⁴

(7) 吹打细胞悬液，按照实验需求将适量细胞悬液接种于细胞培养板中，加入适量新鲜培养基，于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

三、实验结果

倒置显微镜下可观察到，正常的多巴胺能神经元细胞细胞体呈圆形或多角形，胞体较厚，具有空泡状核，有明显的核仁，神经元有多条突起且突起明显，树突由粗至细，有分支，单核，单层贴壁生长，排列不规则。

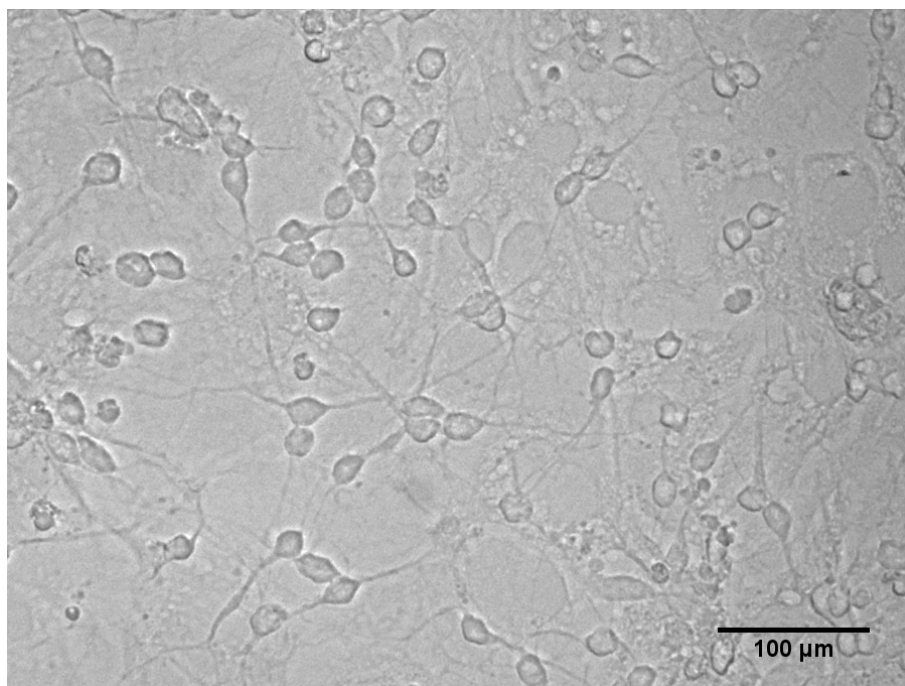


图 1 倒置显微镜下多巴胺能神经元细胞形态观察（100×）