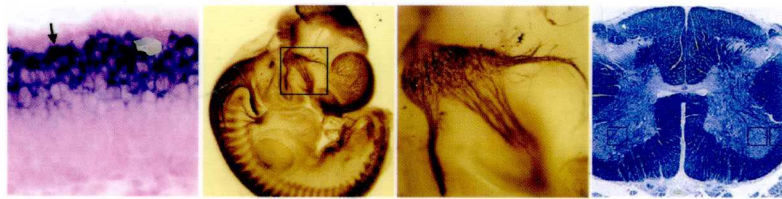


学 | 实 | 验 | 技 | 术 | 系 | 列 | 丛 | 书

# 神经生物学 实用实验技术

主 审 鞠 躬

主 编 赵 湘 辉



 第四军医大学出版社

基础医学实验技术系列

# 神经生物学实用实验技术

主 审 鞠 躬

主 编 赵湘辉

副主编 王 曦 邢俊玲

编 委 (以姓氏笔画排序)

丁银秀 于才勇 马全瑞 王 涛

王世全 王亚周 王春婷 卞千兰

邝 芳 冯国栋 刘 玲 刘 翌

刘芳芳 杨 方 杨 浩 杨安安

吴 江 宋 英 张西京 张欲凯

罗 层 段 丽 段建红 姚安铸

徐 晖 高 方 彭正午 程 鹏

解柔刚 魏晓燕

第四军医大学出版社·西安

## 图书在版编目(CIP)数据

神经生物学实用实验技术 / 赵湘辉主编. —西安 :  
第四军医大学出版社, 2012.7  
基础医学实验技术系列丛书  
ISBN 978 - 7 - 5662 - 0238 - 3

I. ①神… II. ①赵… III. ①神经生物学 - 实  
验技术 IV. ①R338 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 152892 号

Shenjing Shengwuxue Shiyong Shiyang Jishu

## 神经生物学实用实验技术

主 编 赵湘辉  
责任编辑 相国庆  
出版发行 第四军医大学出版社  
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)  
电 话 029 - 84776765  
传 真 029 - 84776764  
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>  
印 刷 西安永惠印务有限公司  
版 次 2012 年 7 月第 1 版 2012 年 7 月第 1 次印刷  
开 本 889 × 1194 1/32  
印 张 6.75  
字 数 140 千字  
书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0238 - 3/R · 1063  
定 价 20.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

# 序

孔子在论语中写道：工欲善其事，必先利其器。器者技术也。远的且不说，30年来，诺贝尔的化学、物理学及生理或医学奖共颁发了90项，其中20项是有关技术的，占22.2%之多，可见技术对科学发展的重要性。每一项发明都是一把钥匙，为理论研究开辟了新天地。本书就是为从事神经科学的研究者，尤其是初学者写的基本技术。

国内外许多技术手册只写方法。我向来主张一本技术书不仅需要写怎么做，而且需要说明道理，“知”和“行”两者必须相互结合。本书就是按这种策略编写的。

尽管编者及参编人员竭尽全力，不足之处（不能用“众口难调”来推卸，难调也得想尽办法调）在所难免。我希望读者多提点建议和批评。子路说“闻过而喜”，其实我觉得做错了事岂能“而喜”而已。首先应该是觉得对不起读者，痛己之不足吧。然后才能知错而改，从这个意义上也可有所“喜”。

鞠 躬  
2012年夏

# 前 言

神经生物学领域的研究是涉及多学科、多层次的研究，特别是细胞和分子神经生物学的兴起，使得该领域相关研究方法不但范围广泛，而且综合了很多传统的实验技术。面对大量逐渐成熟的技术方法，如何帮助研究生尽快掌握实验技巧并顺利完成研究计划，是我们在多年研究中的重要体会。在《基础医学实验技术系列丛书》之《分子生物学实用实验技术》获得读者的广泛关注和好评后，我们感受到作为刚开始接触科学研究的年轻人对于简洁实用的实验操作手册的需要。因此，我们邀请了一群活跃于科研一线的年轻学者将自己在神经生物学相关实验研究中的成功与失败经验加以总结，并编写了这本《神经生物学实用实验技术》。

全书共五章：第一章在概述神经细胞培养特点的基础上，详细介绍了几种有代表性的神经细胞培养的方法，以及建立体外神经细胞损伤模型的方法；第二章在阐述神经形态学实验设计的基础上，介绍了神经形态学常用实验技术；第三章着重介绍了常用的神经电生理实验方法，并将细胞内钙成像技术纳入本章；第四章为神经系统疾病动物模型的制作和相关行为学评价方法；第五章介绍了一些在神经生物学研究中常用的分析软件，主要包括图像分析、神经电生理数据采集和分析软件。最后我们还以附录的形式简要介绍了近年来兴起的体式学方法如何在神经形态学研究中得以应用，并以表格的方式总结了常见神经细胞系的培养、主要几类神经细胞标记物及相关抗体的选择。

本书除了延续《基础医学实验技术系列丛书》的一贯风格，还具有以下特点。一是全书图文并茂，充分体现了神经科学的特色，尤其是在“结果判读”部分，编者选取了来自于个人实验所得的高质量结果图片与读者分享并详细阐述；在一部分“原理、

步骤”的介绍中根据需要添加了清晰的图片，利于实验者掌握。二是参与编写本书的作者不仅来自于基础学科，还来自于相关的临床科室；这有利于为从事神经科学相关专业的基础、临床研究生和技术人员开展研究提供帮助。三是从收录的内容上来说，以目前神经生物学研究最常开展的、较为经典的实验技术为主，体现了丛书面向初学者、强调实用性的宗旨。

在对所写内容的正确性和准确性进行反复推敲的过程中，我们得到了鞠躬院士的大力帮助。鞠院士不但从本书的收录内容等大的方面给予我们建议，更是在本书完稿后通读全书，并对部分章节内容作了多次修改。老科学家对待科学问题的严谨精神和一丝不苟的态度促使我们力求将最准确的信息传递给本书读者。尽管如此，受年轻编者知识和能力水平的限制，难免有不足和错误之处，真诚希望读者提出宝贵意见和建议。

赵湘辉

2012年5月

# 目 录

## 第一章 神经细胞培养常用技术

- 第一节 培养神经细胞常用试剂的介绍 ..... ( 1 )
- 第二节 神经细胞原代培养总述 ..... ( 11 )
- 第三节 皮层/海马神经元的原代培养 ..... ( 15 )
- 第四节 小脑颗粒神经元的原代培养 ..... ( 18 )
- 第五节 背根神经节细胞的原代培养 ..... ( 20 )
- 第六节 振荡摇床法纯化培养少突胶质细胞 ..... ( 23 )
- 第七节 皮质星形胶质细胞的原代培养 ..... ( 27 )
- 第八节 小胶质细胞原代培养 ..... ( 28 )
- 第九节 施万细胞的原代培养 ..... ( 31 )
- 第十节 嗅鞘细胞的原代培养 ..... ( 33 )
- 第十一节 神经干细胞的培养 ..... ( 36 )
- 第十二节 常用神经细胞损伤模型介绍 ..... ( 40 )

## 第二章 神经形态学常用技术

- 第一节 神经形态学实验技术总论 ..... ( 43 )
- 第二节 光学显微镜用神经组织、切片制备 ..... ( 52 )
- 第三节 常用神经组织化学染色法 ..... ( 58 )
- 第四节 免疫组织化学染色 ..... ( 63 )
- 第五节 全胚胎免疫组化染色技术 ..... ( 72 )
- 第六节 神经系统束路追踪技术 ..... ( 75 )
- 第七节 神经组织的原位杂交技术 ..... ( 77 )
- 第八节 电子显微镜技术在神经科学中的应用 ..... ( 82 )

## 第三章 电生理实验技术和细胞内钙成像技术

- 第一节 单纤维记录 ..... ( 97 )

第二节	在体动物的细胞外记录技术 .....	( 99 )
第三节	细胞内记录技术 .....	( 103 )
第四节	培养细胞膜片钳记录技术 .....	( 106 )
第五节	神经组织块膜片钳全细胞记录技术 .....	( 111 )
第六节	组织薄片膜片钳全细胞记录技术 .....	( 118 )
第七节	细胞内钙成像技术 .....	( 123 )
<b>第四章</b>	<b>神经系统疾病常用动物模型的制作</b>	
第一节	概述 .....	( 129 )
第二节	脊髓机械性损伤模型的制作 .....	( 130 )
第三节	脊髓损伤后的运动功能学评价 .....	( 137 )
第四节	视神经损伤模型 .....	( 144 )
第五节	线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型 .....	( 151 )
第六节	帕金森病模型的制作 .....	( 155 )
第七节	锂 - 匹罗卡品大鼠癫痫模型制作 .....	( 159 )
第八节	神经系统免疫性疾病模型 .....	( 162 )
第九节	慢性不可预知温和应激(CUMS)模型 .....	( 170 )
第十节	疼痛实验动物模型简介及常用痛行为学检测方法 .....	( 172 )
<b>第五章</b>	<b>常用软件介绍</b>	
第一节	图像分析软件 Image - Pro Plus 的使用 .....	( 179 )
第二节	神经电生理学常用工具软件 .....	( 186 )
第三节	ImagJ 软件简介 .....	( 194 )
<b>附录:</b>	<b>体视学简介 .....</b>	<b>( 196 )</b>



# 第一章 神经细胞培养常用技术

## 第一节 培养神经细胞常用试剂的介绍

### 一、基本原理及实验目的

神经细胞培养是神经生物学研究中非常重要的技术手段。通过神经细胞的体外培养，结合其他技术手段，可以在较长时间对神经细胞生长、发育、分化、形态和功能变化进行观察研究。细胞培养的常用设备、无菌操作基本技术以及实验用品的清洗、灭菌等在常规细胞培养书籍中均有详细描述，在此我们不多予以阐述。在本节中主要介绍神经细胞培养所需的基础培养基、添加剂、包被试剂等。

### 二、培养基及添加剂

细胞培养基是人工模拟细胞在体内生长的营养环境，是提供细胞营养和促进细胞生长增殖的物质基础。

#### 1. 基础培养基

神经细胞培养中常用的基础培养基有 DMEM、DMEM/F12、Neurobasal。

(1) DMEM (Gibco 12100 - 046) 由 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基，其中含有 13 种必需氨基酸，8 种维生素。分低糖 (1000mg/L)、高糖 (4500mg/L) 两种。神经细胞培养时通常使用高糖 DMEM。

(2) DMEM/F12 (Gibco 12400 - 024) DMEM/F12 培养基含微量元素，可在血清含量低时用。DMEM/F12 是 DMEM 和 F12 细胞培养基按照 1:1 比例混合，营养成分更丰富，且可以使用较

少血清，或作为无血清培养基的基础培养基。

(3) Neurobasal 能够在无胶质细胞滋养层的情况下长时间维持神经元正常形态和生长的无血清培养基，从而保持神经元的纯度。使用时需要另外添加 B27 - supplement 或 N2 - supplement。Neurobasal 分为两种，即胚胎海马或其他中枢神经系统神经元长期生长的 Neurobasal™ Medium (Gibco 21103 - 049) 和新生、成年海马或皮质神经元的长期生长的 Neurobasal™ - A Medium (Gibco 10888 - 022)。

## 2. 平衡盐

平衡盐溶液的作用是维持细胞渗透压平衡，保持 pH 稳定及提供简单的营养，用于取材时组织块的漂洗、细胞的漂洗和配制其他试剂。平衡盐要在空气中，不需要 CO<sub>2</sub> 培养箱。基本平衡盐溶液都是基于细胞需要钠、钾、钙、镁和磷酸盐这 5 种离子开发而来，只是在离子浓度和盐的形式上有所区别。

常用的平衡盐有：①Dulbecco's 平衡盐 (D - PBS) 无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 离子，可用于配制胰酶溶液；②Hank's 平衡盐 (HBSS) 含碳酸氢钠少 (约 0.35mg/L)，适合于 5% CO<sub>2</sub> 的培养条件；③Earle's 平衡盐 (EBSS) 含碳酸氢钠多 (约 2.2mg/L)，不能用于 5% CO<sub>2</sub> 的环境，若放入 CO<sub>2</sub> 培养箱，溶液将迅速变酸，使用时应注意。

## 3. 血清

培养基中都要添加血清，终浓度为 5% ~ 20%。血清除了提供细胞生长所需基本营养物质，还能提供激素、各种生长因子、结合蛋白、细胞贴壁因子和扩散因子等。神经细胞培养中广泛使用的有胎牛血清 (Gibco 16000 - 044) 和马血清 (Gibco 16050 - 122)。胎牛血清中富含丝分裂因子，常选其做增殖细胞用的血清，而马血清常用来做神经元培养。另外，很多实验室也将胎牛血清用于神经元培养，或两种血清混用。

## 4. 无血清添加剂 (B27 - Supplement、N2 - Supplement、G5)

B - 27® Supplement Minus AO (50X), liquid (Gibco 10889 -

038) 是不含 5 种抗氧化剂 (维生素 E、乙酸维生素 E、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽) 的完全 B-27 添加剂, 在研究自由基对神经元的损害时, 这些抗氧化剂会产生干扰。

B-27<sup>®</sup> Serum-Free Supplement (50X), liquid (Gibco 17504-044) 添加剂是一种 50X 的血清替代品, 能够在无胶质细胞饲养层的情况下维持低密度或高密度神经元短期或长期的生长和活性。

B-27<sup>®</sup> Supplement Minus Vitamin A (50X), liquid (Gibco 12587-010) 是不含维生素 A 的完全 B-27 添加剂。在这种添加剂中去除维生素 A 可以防止干细胞的分化。

N-2 添加剂 (Gibco 17502-048) 用于有丝分裂后神经元和神经元表型肿瘤细胞的生长和表达。其工作基础是用合适的激素、营养物和促贴壁物质的组合置换培养基中的成分, 最后找到适合大多数细胞培养的试剂配方。它的基础培养基是 1:1 的 DMEM 与 H12 的混合液, 添加了胰岛素、转铁蛋白、黄体酮、腐胺和硒。胰岛素和胰岛素样生长因子对于大多数类型细胞的存活和生长有重要作用, 硒是谷胱甘肽产生的合作因子, 可能有助于过氧化物和超氧化物的水解, 有报道说还能防止细胞的光照损伤。

G-5 Supplement (Gibco 17504-044) 是一种化学合成的无血清添加剂, 是用于原代培养的神经胶质细胞 (星形胶质细胞) 或肿瘤细胞系 (神经胶质瘤) 的生长和星形细胞的形态。

### 5. 神经营养因子

是一类由神经所支配的组织 (如肌肉) 和星形胶质细胞产生的, 且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子。绝大多数哺乳类胚胎神经元有严格的营养要求, 若不能提供适宜的生长因子或合适的因子组分, 将会使绝大多数神经元在体外培养的数天中死亡。解决这一问题有两条思路, 一是让培养细胞提供自己的营养因子, 二是在培养基中加入纯的生长因子。通常用于细胞培养的通用因子是神经生长因子 NGF (Gibco 13257019)。随着无血清培养神经元等技术的应用, 在许多组织液和细胞外基质中陆续发现

一些新的特异蛋白质分子，也能促进神经元的增殖、分化和存活。如睫状神经营养因子（CNTF）能促进受损伤的和胚胎的脊髓神经元存活。胶质细胞源神经营养因子（GDNF）在离体实验中能支持中脑多巴胺能神经元的生存。此外，促进神经元生长的还有脑源神经营养因子（BDNF）、白血病抑制因子（LIF）、胰岛素样生长因子 I（IGF - I）、转化生长因子（TGF）、表皮生长因子（EGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）和血小板源生长因子（PDGF）等。

### 6. 谷氨酰胺

L-谷氨酰胺（Gibco 21051-024）可作为培养细胞的能量来源参与蛋白质的合成和核酸代谢。谷氨酰胺缺乏将导致细胞生长不良甚至死亡，因此在配制各种培养液中都应该补加一定量的谷氨酰胺。由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定，加有谷氨酰胺的培养液在 4℃ 冰箱中储存 2 周以上时，应按培养液的量重新补充谷氨酰胺。一般培养液中 L-谷氨酰胺的含量为 1 ~ 4mmol/L，可以配制成 200mmol/L（100 ×）谷氨酰胺母液，置于 -20℃ 冰箱中保存，用前补加入培养液。也可使用 Invitrogen 公司的 Glutamax（35050-061），这是一种呈稳定的二肽形式的谷氨酰胺。L-丙氨酰-L-谷氨酰胺在水溶液中极其稳定，在贮存或孵育时不会像 L-谷氨酰胺那样降解成氨，能通过细胞代谢从培养基中去除，消除了与自然分解相关的有毒代谢物累积。

### 7. 抗生素

在细胞培养中最常用的抗生素是青霉素（常用浓度是 25 ~ 100U/ml）与链霉素（25 ~ 100μg/ml）。这两种抗生素常混合使用，俗称“双抗溶液”（Gibco 15140122）。一般配制成 100 倍浓缩液，可用 PBS 或培养基配制。青霉素主要是对革兰阳性菌有效，链霉素主要对革兰阴性菌有效。加入这两种抗生素可预防绝大多数细菌污染。在一些实验室里，均会常规加入所有的培养基中。

庆大霉素（10 ~ 100μg/ml）通常有广谱抗菌效应，并具有溶液稳定性，故也被一些实验室使用，特别是当有低水平的污染存在

时更是这样。

以上这些试剂对霉菌与酵母菌的污染均无效，对霉菌或真菌需用两性霉素 B ( $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或制霉菌素 ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

### 8. 丙酮酸钠

丙酮酸钠 (Gibco 11360) 可以作为细胞培养中的替代碳源，尽管细胞更倾向于以葡萄糖作为碳源，但是，如果没有葡萄糖的话，细胞也可以代谢丙酮酸钠。

### 9. 抗有丝分裂剂

神经元原代培养通常混合有非神经元细胞，如胶质细胞和纤维细胞等增殖能力都很强，因而有时需要在非神经元细胞增殖高峰期加入一定量的 DNA 合成抑制剂，以抑制其过度增殖（有血清培养的条件下）。常使用浓度为  $5\sim 50\mu\text{M}$  的阿糖胞苷 (Sigma 30399)，一般在培养第 3 天或首次换液时作用 24h。另外，有两种抗有丝分裂剂常用于神经元的培养：① Fluorodeoxyuridine 是胸苷合成酶抑制剂，一般使用浓度为  $10\mu\text{M}$ ；② 尿苷 使用浓度为  $10\mu\text{M}$ 。

## 三、消化液

取材进行原代培养时常常需要将组织块消化解离形成细胞悬液，传代培养时也需要将贴壁细胞从瓶壁上消化下来，用蛋白消化酶解离细胞是体外培养动物细胞时分散组织的基本方法。能用于体外解离组织细胞的蛋白消化酶有多种，如胰蛋白酶 (trypsin)、胶原酶 (collagenase)、链霉菌蛋白酶 (pronase)、透明质酸酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶以及弹性蛋白酶等。最常用的消化液是胰酶溶液和 EDTA 溶液，有时也用胶原酶溶液。

### 1. 胰酶溶液

胰蛋白酶 (Sigma T-4799) 是从动物胰脏分离的一种水解酶，主要用于消化细胞间质。根据使用温度的不同，用胰蛋白酶解离细胞可分为热处理和冷处理两种方法。热处理法是指消化温

度为 $37^{\circ}\text{C}$ ，冷处理法是指消化温度为 $4^{\circ}\text{C}$ 。因冷处理法时间较长，不适合神经系统细胞的消化，故实验室以热处理法最为常用。胰酶溶液一般用不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 及血清的平衡盐溶液配制成2.5%的母液，工作浓度为0.1%~0.25%。

## 2. EDTA 溶液

EDTA (Sigma E-6635) 溶液也常用来解离细胞，它的作用机制是破坏细胞间的连接。对于一些贴壁特别牢固的细胞，还可用EDTA和胰酶的混合液进行消化。EDTA溶液的使用浓度为0.02%，配制时应加碱助溶，配制后可过滤除菌，也可高温消毒灭菌。

## 3. 胶原酶溶液 (Sigma 或 Gibco 均可)

胶原酶有很多型，而胶原酶IV包含至少7中蛋白酶成分，分子量从68~130u不等，它能消化多种组织，常用于神经系统组织的消化。胶原酶主要用于水解结缔组织中的胶原蛋白成分以释放细胞。当拟消化的组织较硬，内含较多结缔组织或者说胶原成分时，用胰蛋白酶解离细胞的效果较差，这时可以采用胶原酶解离细胞法。其消化过程与胰蛋白酶消化法相似，且不容易损伤细胞。胶原酶的使用浓度为0.1~0.3mg/L或200kU/L，作用的最佳pH为6.5。胶原酶不受 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 及血清的抑制。

现有一种Accutase (Sigma A6364) 细胞分离溶液，属一种胶原酶制备物，几分钟内即可完成黏附细胞的分离，作用温和，可以获得最大的细胞活力，不需要任何添加血清失活操作，特别适合干细胞的分离。

## 4. 链霉蛋白酶 (Sigma P0652)

这是一种近年来才有较多应用的消化酶，适应范围广，分散效果也好。有学者认为，链霉蛋白酶对人胚胎的某些二倍体细胞的解离比胰蛋白酶更快、效果更好。但该酶作用不受血清成分的影响，故使用它消化细胞后，应充分洗涤除去残余酶成分。

## 5. 木瓜蛋白酶 (Sigma 9001-73-4)

木瓜酶的特点是不会消化过度，非常温和。

## 6. DNA 酶

DNA 酶的作用是消化掉破裂细胞的 DNA，避免了释放的 DNA 和蛋白缠结在组织块表面而阻碍进一步消化。DNA 酶由于各个公司的活性不一样，很难有标准浓度，需要摸索、总结条件，不过不是很严格，只要能防止 DNA 缠结就好。

### 四、培养基质的预处理

几乎所有神经细胞的培养必须有大分子物质作为生长基质，细胞黏附其上才能生长。常用的有多聚赖氨酸（polylysine）和多聚鸟氨酸（polyornithine）。此外还有一些细胞外基质（ECM）成分，如层黏连蛋白（laminin）、纤连蛋白（fibronectin）、胶原（collagen）等。

#### 1. 多聚赖氨酸和多聚鸟氨酸

多聚赖氨酸和多聚鸟氨酸是两种最常用的促进细胞贴壁生长的大分子。Polylysine 或 polyornithine 均可从各种试剂公司订购，我室常用的是 Poly-L-lysine hydrobromide（Sigma P6282），用 pH 值 8.4 的硼酸缓冲液或 pH 值 7.4 的 PBS 配成 100 $\mu$ g/ml，过滤分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。

包被培养板时，我们一般选用 25 $\mu$ g/ml 的浓度进行包被，37 $^{\circ}$ C 4h 或过夜，然后无菌水洗 3 遍（一定要将未结合的大分子洗去，因为他们都有细胞毒性），超净台中晾干。

包被好的培养板和细胞瓶可在 4 $^{\circ}$ C 保存 2~4 周，多聚赖氨酸可回收重复使用 1~2 次。

#### 2. 细胞外基质成分（ECM components）

细胞外基质成分是体内细胞间粘连和接触的最重要的参与物质，细胞外基质成分与细胞表面受体结合不仅调节细胞黏附，还直接调节细胞代谢、分化和基因表达。适用于在神经元培养尤其是外周神经系统神经元的培养。

胶原是动物体内最为丰富的蛋白，I 型纤维胶原很早就用于

神经系统的组织培养，现在在外周神经系统的神经元和神经系统细胞系的培养中依然很常用。I型纤维胶原可以自己从鼠尾提取，现在也有很多商品化的产品可以购买。胶原包被时只需用少量的溶液覆盖培养基质，放置于超净台中让水分自然挥发，自然凝固即可。

纤连蛋白和层黏连蛋白是胶原之后另两种被用于神经细胞体外培养的两细胞外基质成分。不同类型细胞对两种蛋白的敏感度不同，神经元大都在层黏连蛋白包被的基质上生长得更好。包被浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 的层黏连蛋白（Sigma L2020）和 $20\mu\text{g/ml}$ 的纤连蛋白（Sigma F0635）。

### 3. 神经干细胞的贴壁生长

神经干细胞一般呈球形悬浮生长，如要贴壁培养，可预先采用0.001%多聚鸟氨酸和0.2%明胶包被新的培养瓶，鸟氨酸包被过夜，明胶包被4~5h，用时将明胶吸出，将神经球加进去，第2天就可以观察到成球生长的神经干细胞已经单层生长。

## 五、细胞爬片的制备

通常需要将细胞接种在玻璃片上，进行下一步的免疫细胞化学染色实验（参考第二章）。这里介绍与染色相关的一些操作步骤。

### 1. 爬片的准备

(1) 可根据经费状况选择购买国产或者进口的玻璃细胞爬片。进口的玻片一般不需要清洁处理，国产的玻片需要进行清洗处理。

(2) 将玻片铺在大的玻璃平皿中，清洗、过铬酸洗液（重铬酸钾:水:硫酸=1:2:20）；第2天，大量清水冲洗爬片，再置于无水酒精中浸泡6h或过夜，用三蒸水和超纯水冲洗3遍放在玻璃培养皿或其他容器中烘干后进行高压消毒。

(3) 高压后取出放入烤箱中烤干，备用。

(4) 原代培养前预先用试剂包被爬片。多聚赖氨酸包被玻璃爬片的话，最好使用浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 或是 $100\mu\text{g/ml}$ 的多聚赖氨酸



酸，因为细胞在玻璃上生长不如在塑料上生长得好。

## 2. 细胞接种

(1) 先在培养皿里准备放爬片的位置加少量培养基 ( $5\mu\text{l}$ )，目的是使玻片与培养皿粘合到一起，然后放玻片，防止加细胞悬液时玻片漂起，造成双层细胞贴片。

(2) 根据自己的需要选择合适的细胞密度种入培养板内即可。

(3) 待细胞贴壁后，可根据实验设计做各种处理。

(4) 取玻片。取玻片时由于玻片与培养皿底结合较紧，可将注射器针头针尖向背面弯成小钩，将爬片轻轻勾起，用小镊子取出就可以了。

## 3. 细胞爬片的固定和免疫组化染色

细胞爬片取出后，一般用 PBS 洗 1 遍，然后再做固定。常用的固定液有多聚甲醛、冷丙酮、冰 95% 乙醇等。具体染色步骤参考本书相关章节。

(1) 我室最常用的是多聚甲醛 (常用 4%)，室温固定 15min 后，PBS 洗 3 遍 (此时爬片可在 PBS 中  $4^{\circ}\text{C}$  保存 1 周)。细胞免疫组化染色过程可参考第二章，因为此组织切片薄抗体孵育时间可以缩短，一抗室温 2~4h，或是  $4^{\circ}\text{C}$  过夜，二抗室温 1h 即可。

(2) 冷丙酮可用于一般的免疫组化染色。细胞爬片取出后，PBS 洗 1 遍，便可加入预冷丙酮于  $-20^{\circ}\text{C}$  固定 10min (丙酮有很强的挥发性，注意将含有丙酮和爬片的器皿盖严，防止其挥发)，取出后 PBS 洗 3 遍。

(3) 95% 乙醇室温固定 15min。

## 4. 封片

需要封片观察照相时，在载玻片上滴 1 滴 30% 甘油，将爬片取出来，细胞面贴在载玻片上。可以立即采图，也可将片子贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。