



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105062971 B

(45)授权公告日 2018.07.13

(21)申请号 201510450630.3

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2015.07.28

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105062971 A

Hoy J.等.SynCAM1 recruits NMDA receptors via protein 4.1B.《Mol Cell Neurosci》.2009,第42卷(第4期),第466-483页.

(43)申请公布日 2015.11.18

Yang X.F.等.Intercellular protein-protein interactions at synapses.《Protein&Cell》.2014,第5卷(第6期),420-444.

(73)专利权人 中南民族大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区民族大道708号

Sara Y.等.Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly.《J. Neurosci》.2005,第25卷(第1期),260-270.

(72)发明人 阳小飞 蒋伟 陈健 王明明

龚吉红 梅颖

庄培袁 等.NGF β /HIF-1 α 双重感染的骨髓间充质干细胞对神经元轴突再生的作用.《解放军医学院学报》.2014,第35卷(第11期),第1141-1146页.

(74)专利代理机构 武汉华旭知识产权事务所

42214

代理人 刘天钰

审查员 李宁

(51)Int.Cl.

C12N 5/0793(2010.01)

C12N 5/071(2010.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,包括以下步骤:将传代培养的非神经元细胞即HEK293 T细胞加入到体外环境中24孔原代培养的神经元细胞中,混合后培养24小时以上;采用PEI转染法,转染HEK293 T细胞,每个孔中所转染的外源基因均不相同,被转染后的HEK293 T细胞过表达外源基因,在此条件下进行共培养48小时以上;免疫染色突触前的标记蛋白synapsin,从而判断每一孔中是否形成突触结构。本发明所提供的共培养方法解决了现有技术中的不足,该方法操作简单、方便,成本相对较低,耗时短,可以很好的筛选基因及验证基因功能,可以广泛用于实验室。

1. 一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)、将传代培养的非神经元细胞即HEK293 T细胞加入到体外环境中24孔原代培养的非神经元细胞中,混合后培养24小时以上;

(2)、采用PEI转染法,转染HEK293 T细胞,每个孔中所转染的外源基因均不相同,每万个HEK293 T细胞中所添加的PEI为1 μ g,被转染后的HEK293 T细胞过表达外源基因,在此条件下进行共培养48小时以上;

(3)、免疫染色突触前的标记蛋白synapsin,从而判断每一孔中是否形成突触结构。

2. 根据权利要求1所述的用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,其特征在于:步骤(1)中,在每一孔中加入两万个HEK293 T细胞。

3. 根据权利要求1所述的用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,其特征在于:步骤(3)中的具体步骤为:培养箱中取出转染过后的24孔板,用移液器吸掉所有培养基,加入PBS溶液清洗,去掉PBS溶液,加入4%的多聚甲醛,室温固定后,去掉多聚甲醛,加入Triton-100打孔细胞,再去掉Triton-100,用PBS清洗;在每孔中加入牛血清白蛋白,室温放置30分钟后去掉牛血清白蛋白,再加入稀释在5%BSA中的synapsin一抗,常温下放置2小时,用PBS清洗;再加入稀释在5%BSA的带546荧光的驴抗兔的二抗,常温下放置30分钟,用PBS清洗;用尖镊子挑出载玻片,将有神经元细胞的一面用封片剂贴在载玻片上;用激光共聚焦显微镜成像。

一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法

技术领域

[0001] 本发明提供了一种细胞共培养方法,尤其提供了一种用于筛选参与中枢神经系统突触形成基因中的细胞共培养方法,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 突触是两个神经元之间相互接触的结构。筛选新的参与中枢神经系统突触形成基因的方法主要是用到传代培养的非神经元细胞与原代培养的神经元细胞共培养。

[0003] 正常生理下,传代培养的非神经元细胞与原代培养的神经元细胞共培养是不会形成突触,当传代培养的非神经元细胞中过表达参与突触形成的基因,然后与原代培养的神经细胞共培养就会形成突触结构。

[0004] 目前,常用的共培养的方法是,先将外源基因在24孔板传代培养的HEK293或者C0S7细胞中过表达,然后,再将消化下来,加入2万过表达外源基因的HEK293或者C0S7细胞到24孔板原代培养的神经元细胞中共培养,36小时后,免疫染色突触前的标记蛋白synapsin的共培养方法。

[0005] 此共培养方法在筛选基因时,如果一次性平行筛选几十个甚至上百个基因时,消化24孔板HEK293T细胞加入到24孔板神经元细胞这一步骤中,为保证彼此基因之间不能污染,操作时需要对每个孔的HEK293T细胞进行换枪头,操作复杂,耗时长,成本相对高。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,解决了上述背景技术中的不足,该方法操作简单、方便,成本相对较低,耗时短,可以很好的筛选基因及验证基因功能,可以广泛用于实验室。

[0007] 实现本发明上述目的所采用的技术方案为:

[0008] 一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法,包括以下步骤:(1)、将传代培养的非神经元细胞即HEK293T细胞加入到体外环境中24孔原代培养的神经元细胞中,混合后培养24小时以上;

[0009] (2)、采用PEI转染法,转染HEK293T细胞,每个孔中所转染的外源基因均不相同,被转染后的HEK293T细胞过表达外源基因,在此条件下进行共培养48小时以上;

[0010] (3)、免疫染色突触前的标记蛋白synapsin,从而判断每一孔中是否形成突触结构。

[0011] 步骤(1)中,在每一孔中加入两万个HEK293T细胞。

[0012] 步骤(2)中的具体步骤为:在超净工作台中,取一个无菌的离心管,加入无血清培养基Opti-MEM,再继续依次加入GFP质粒和NL2质粒,使GFP质粒和NL2质粒在Opti-MEM里面充分混匀,最后,加入聚乙烯亚胺,使PEI与两种质粒充分混匀,然后将离心管放在超净工作台上,静止;从恒温培养箱中取出加入了HEK293T细胞后的神经元细胞,然后用移液器将离心管里面的混合物,加入到24板的孔里面,轻轻摇晃,放回恒温培养箱,培养48小时。

[0013] 步骤(3)中的具体步骤为:培养箱中取出转染过后的24孔板,用移液器吸掉所有培养基,加入PBS溶液清洗,去掉PBS溶液,加入4%的多聚甲醛,室温固定后,去掉多聚甲醛,加入Triton-100打孔细胞,再去掉Triton-100,用PBS清洗;在每孔中加入牛血清白蛋白,室温放置30分钟后去掉牛血清白蛋白,再加入稀释在5%BSA中的synapsin一抗500uL,常温下放置2小时,用PBS清洗;再加入稀释在5%BSA的带546荧光的驴抗兔的二抗,常温下放置30分钟,用PBS清洗;用尖镊子挑出载玻片,将有神经元细胞的一面用封片剂贴在载玻片上;用激光共聚焦显微镜成像,同时成像488nm波长和546nm波长的两个通道,HEK293T细胞是绿色的GFP标记,神经元细胞突触前是红色的synapsin点标记。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:由于在本发明中,不需要先转染筛选的基因到HEK293T细胞,然后消化下来后又将转染每个基因的HEK293T细胞加入2万到神经元细胞中共培养。因此也就避免了这一步骤中需要对每个孔的HEK293T细胞进行换枪头的工序,从而解决了操作复杂,耗时长,成本相对高的问题。在本申请中,先将HEK293T细胞加入到原代培养的神经元细胞中,然后采用PEI转染法,转染HEK293T细胞,由于传代培养的神经元细胞是高度分化的细胞,体外用PEI转染法是转染不上的。因此在本发明中,先在所有的孔加入HEK293T细胞,然后对每个孔进行转染不同的筛选基因即可,操作方便、简单。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体实施例对本发明做详细具体的说明,但是本发明的保护范围并不局限于以下实施例。

[0016] 本实施例中的具体操作方法如下:

[0017] (1)、在24孔板里培养至第8天小鼠海马神经元细胞,在每个孔加入传代培养的HEK293T细胞2万个,轻轻摇晃,放回恒温培养箱培养24小时。

[0018] (2)、在超净工作台中,取一个无菌的1.5mL EP管,加入100uL无血清培养基Opti-MEM,再继续依次加入0.15ug GFP质粒和0.5ug Neuroligin2 (NL2) 质粒,用手指弹离心管壁5-6下,使GFP质粒和NL2质粒在Opti-MEM里面充分混匀。最后,加入2ug聚乙烯亚胺(PEI),用手指弹离心管壁5-6下,使PEI与两种质粒充分混匀,然后将离心管放在超净工作台上,静止30分钟。

[0019] (3)、从恒温培养箱中取出加入了2万个HEK293T细胞后的神经元细胞,然后用移液器将1.5mL EP管里面的混合物,加入到24板的孔里面,轻轻摇晃,放回恒温培养箱,转染完毕。

[0020] (4)、过48小时后,培养箱中取出转染过后的24孔板,用移液器吸掉所有培养基,加入500uL的PBS溶液清洗一遍,清洗时间为1分钟。去掉PBS溶液,加入500uL 4%的多聚甲醛(4%PFA),室温固定12分钟,去掉4%PFA,加入500uL 0.2%的Triton-100打孔细胞5分钟,去掉0.2%的Triton-100,用500uL/孔PBS清洗3次,每次5分钟。

[0021] (5)、每孔加入5%的牛血清白蛋白(5%BSA),室温放置30分钟。然后去掉5%BSA,加入1:20000稀释在5%BSA中的synapsin(神经元细胞突触前标记蛋白)一抗500uL,常温2小时,用500uL/孔PBS清洗3次,每次5分钟。加入1:500稀释在5%BSA的带546荧光的驴抗兔的二抗,常温30分钟,500uL/孔PBS清洗6次,每次5分钟。用尖镊子挑出载玻片,将有神经元细胞的一面用封片剂贴在载玻片上。

[0022] (6)、用激光共聚焦显微镜成像,同时成像488nm波长和546nm波长的两个通道。HEK293T细胞是绿色的GFP标记,神经元细胞突触前是红色的synapsin点标记。

专利名称(译)	一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法		
公开(公告)号	CN105062971B	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201510450630.3	申请日	2015-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	中南民族大学		
申请(专利权)人(译)	中南民族大学		
当前申请(专利权)人(译)	中南民族大学		
[标]发明人	阳小飞 蒋伟 陈健 王明明 龚吉红 梅颖		
发明人	阳小飞 蒋伟 陈健 王明明 龚吉红 梅颖		
IPC分类号	C12N5/0793 C12N5/071 G01N33/533		
审查员(译)	李宁		
其他公开文献	CN105062971A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于神经突触形成分析中的细胞共培养方法，包括以下步骤：将传代培养的非神经元细胞即HEK293 T细胞加入到体外环境中24孔原代培养的神经元细胞中，混合后培养24小时以上；采用PEI转染法，转染HEK293 T细胞，每个孔中所转染的外源基因均不相同，被转染后的HEK293 T细胞过表达外源基因，在此条件下进行共培养48小时以上；免疫染色突触前的标记蛋白synapsin，从而判断每一孔中是否形成突触结构。本发明所提供的共培养方法解决了现有技术中的不足，该方法操作简单、方便，成本相对较低，耗时短，可以很好的筛选基因及验证基因功能，可以广泛用于实验室。