

细胞培养说明书

Cat NO.: SC0720

细胞名称	小鼠中脑多巴胺能神经元细胞 MN9D	英文名称	MN9D
形态特性	上皮细胞样	生长特性	贴壁生长
种属	小鼠		
组织疾病	脑组织/杂交细胞系		
完全培养基配制	RPMI160+10% FBS+1% P/S 气相：空气，95%；CO ₂ ，5%。温度：37℃		
传代比例/细胞消化	消化1-2分钟，建议第一次1:2传代。		
背景特性	通过融合来自14天龄C57BL/6J小鼠胚胎的嘴侧中脑神经元和N18TG2神经母细胞瘤细胞(一种A/Jax背景的正交神经系统癌症)产生了杂交的MN9D永生多巴胺能神经元细胞系。MN9D细胞产生多巴胺(DA)并表达酪氨酸羟化酶(TH)以及芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)。MN9D细胞容易彼此聚集或与其他胚胎脑细胞聚集，并且可以使用磷酸钙沉淀或脂质体转染未分化或分化的MN9D细胞被广泛用于模拟多巴胺能神经元，并测试与帕金森病中DA神经元缺失相关的机制和潜在疗法。先用丁酸或胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)再用丁酸分化，MN9D细胞仅部分再现了中脑DA神经元的电生理特性。由于能够表达酪氨酸羟化酶，并且能够合成、释放及吸收，因而被广泛应用于多巴胺能神经细胞损伤模型的研究。		
细菌真菌支原体检测	阴性		
冻存条件	90%FBS+10%DMSO，推荐使用无血清冻存液货号(CX001)。保存：-80/液氮		
保藏机构	Millipore		
产品使用	仅限于科学研究。		
备注			

二、细胞收到后处理

1.请显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各2-3张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

2.收到细胞回到自己的实验室后，先打开外包装，用75%酒精喷洒整个瓶消毒后放到超净台内，严格无菌操作，不开瓶盖放培养箱静置2-3小时稳定细胞状态后操作。镜下观察细胞：未超过80%汇合度时，可将瓶装的培养液离心去除，重新加入6ml新的完全培养基，放入37℃、5%CO₂培养箱培养；超过80%汇合度时，根据情况传代或者冻存。

3.悬浮细胞收到需离心收集处理。抽出瓶中的培养基和细胞1000rpm离心3-5分钟，弃去上清重悬后接种到新的培养瓶中（加入按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基）。（注意发货的是密封培养瓶的话，处理完后放入培养箱培养记得培养瓶盖拧松，初次传代最好使用T25培养瓶或6cm小皿1传2）

三、细胞培养步骤

1.复苏细胞：将含有1mL细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入5mL培养基混合均匀。在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加4-6mL完全培养基后吹匀。然后将所有细胞

悬液加入培养瓶中培养过夜（或将细胞悬液加入6cm皿中），培养过夜。第二天换液并检查细胞密度。

2.细胞传代：如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。

（一）对于贴壁细胞，传代可参考以下方法

1.弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1-2次。

2.加1-2ml消化液（0.25%Trypsin-0.53mMEDTA）于培养瓶中，置于37°C培养箱中消化1-2min，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加5ml以上含10%血清的完全培养基终止消化。

3.轻轻吹打细胞，完全脱落后吸出悬液至15ml离心管中，在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀。

4.将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含5-6ml培养液的新皿中或者瓶中。

（二）对于悬浮细胞，传代可参考以下方法

1.收集细胞，1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀，将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

2.较脆弱的悬浮细胞可选择半数换液方式将培养瓶竖置1-2小时待大部分细胞沉到底部后，弃去半数培养基后，将剩余细胞悬起，将细胞悬液按1：2到1：3的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

3.细胞冻存：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。贴壁细胞冻存时，弃去培养基后加入少量胰酶，细胞变圆脱落后，进行离心收集，1000RPM条件下离心3-5分钟，去除上清，按冻存数量加入血清及DMSO，冻存比例为90%FBS+10%DMSO。

四、特殊细胞收到注意事项

部分细胞由于贴壁不牢在运输过程中发生细胞脱落，这是正常现象正确处理后可以正常生长。

1.将培养瓶内所有培养基转入无菌离心管，离心收集细胞(1200rpm 3-5min)去除旧培养基；

2.用PBS重悬细胞，将所有细胞收集到一个离心管中，再次离(1200rpm 3-5min)去除PBS；

3.加入1ml左右0.25%胰酶重悬细胞，混匀即可，不能吹打太多次，放入培养箱消化，根据细胞特性决定消化时间（约1~2分钟）；

4.消化好后，用移液枪轻轻吹打细胞悬液，使细胞团分散，迅速加入3-5ml完全培养基混匀以终止消化，离心（1200rpm3-5min）去除胰酶；

5.加入5ml左右的细胞相应的完全培养基混匀，按比例接入无菌培养瓶/皿中；

6.显微镜下观察看细胞是否成均匀分散的单颗细胞，若有3-5个成团的小细胞团可不用重新消化，使之贴壁后待细胞生长稳定后再消散细胞。