

试剂

培养基-1

DME基础培养基 (pH 7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES
10 mmol	HEPES
2 mmol	L-谷氨酰胺
100 µg/ml	链霉素
100 IU/ml	青霉素G
10%	小牛血清
10%	胎牛血清

增殖用培养基

DME基础培养基 (pH 7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES
10 mmol	HEPES
2 mmol	L-谷氨酰胺
100 µg/ml	链霉素
100 IU/ml	青霉素G
10%	小牛血清

培养基-2

DME基础培养基 (pH 7.4 ± 0.05)	
10 mmol	TES
10 mmol	HEPES
2 mmol	L-谷氨酰胺
20 µmol	L-阿拉伯糖苷
100 µg/ml	链霉素
100 IU/ml	青霉素G
10%	小牛血清

荧光试剂导入用缓冲液

Krebs-HEPES基础培养基 (pH 7.3 ± 0.05)	
20 mmol	HEPES
128 mmol	NaCl
2.5 mmol	KCl
2.7 mmol	CaCl ₂
1 mmol	MgSO ₄
16 mmol	葡萄糖
5 mmol	MQAE

标准曲线制备用缓冲液

Krebs-HEPES基础培养基 (pH 7.3 ± 0.05)	
20 mmol	HEPES
0 mmol	Na ⁺
135 mmol	K ⁺
1-135 mmol	Cl ⁻
135-1 mmol	NO ₃ ⁻
5 µmol	尼日利亚菌素
10 µmol	缬氨霉素
10 µmol	氯化三丁锡

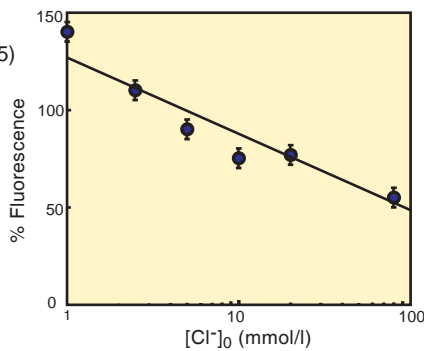


图1. MQAE荧光强度-Cl⁻浓度

洗涤、测定用缓冲液

Krebs-HEPES基础培养基 (pH 7.3 ± 0.05)	
20 mmol	HEPES
128 mmol	NaCl
2.5 mmol	KCl
2.7 mmol	CaCl ₂
1 mmol	MgSO ₄
16 mmol	葡萄糖

方法

1. 细胞内氯离子浓度的荧光测定法

1) 大鼠海马神经细胞的提取

按照Banker和Cowan的论文 (*Brain Res.*, 1977, 126, 397) 的方法, 从18日龄的Wistar 大鼠胚胎中提取。

2) 细胞培养

将用多聚赖氨酸处理过的盖玻片上的细胞, 接种在培养皿中, 加入培养基-1培养4天 (37 °C, 5% CO₂)。

3) 细胞培养

在增殖用培养基中培养7-14天 (37 °C, 5% CO₂)。培养到第4天时更换成培养基-2, 再培养24 h (37 °C, 5% CO₂)。然后在增殖用培养基中继续培养。

4) 用缓冲液清洗3次。

5) 荧光试剂导入细胞内

细胞在荧光试剂导入用缓冲液中培养1 h (37 °C)。

6) 用缓冲液反复清洗5次以上。

7) 荧光测定

在32 °C的测定用缓冲液中用荧光显微镜 (激发波长 360 nm, 发射波长510 nm) 测定荧光。

8) 荧光测定/刺激物质

例: 添加终浓度为0.3 mmol/l的 Ethacrynic Acid。

在32 °C的测定用缓冲液中用荧光显微镜 (激发波长 360 nm, 发射波长510 nm) 测定荧光。

2. 绘制标准曲线并定量细胞内的氯离子

1) 按照1.的第1) - 第7) 步步骤, 同样处理

2) 荧光测定

用培养基配制几种已知浓度的氯离子标准液 (作标准曲线用), 用荧光显微镜 (激发波长360 nm, 发射波长510 nm) 测定荧光。

3) 标准曲线

按照1.的第7)步测定标准曲线制备用缓冲液*中的各种已知浓度的氯离子的荧光强度对应氯离子浓度制成标准曲线, 用此标准曲线, 可以计算出32 °C时细胞内的氯离子浓度。

*标准曲线制备用缓冲液中的尼日利亚菌素和缬氨霉素可以强制性地促进氯离子进入细胞。