

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

B-27 无血清添加剂 (50X, 去除维生素 A)

B-27 Supplement (50X), Serum-free, Minus Vitamin A

产品描述

TargetMol 的 B-27 无血清添加剂 (50X, 去除维生素 A) 是一种高性能细胞培养添加剂, 专为中枢神经系统 (CNS) 相关研究设计, 能够在无血清条件下有效支持神经元的生长、分化及功能维持。该产品适用于胚胎期、出生后及成体来源的海马神经元及其他 CNS 神经元的体外培养, 广泛用于贴壁单层或悬浮神经球等多种培养系统中, 是培养神经祖细胞和神经干细胞的理想选择, 且不会诱导其分化。本品为不含维生素 A 的 B-27 完全添加剂, 有效避免维生素 A 诱导干细胞分化为神经细胞, 适用于需维持干细胞未分化状态的培养体系。

B-27 添加剂以 50X 浓缩液形式提供, 推荐与 Neurobasal 或 Neurobasal-A 培养基联合使用, 可在无需星形胶质细胞滋养层的情况下, 显著提升神经元活性和长期存活率。此外, 该添加剂也适用于神经源性肿瘤细胞系的培养, 并已被广泛应用于乳腺癌、小肠、胃、肝脏等类器官模型的构建与维持, 展现出良好的多领域适用性。

产品特点

1. 无血清、成分优化, 提高实验稳定性。
2. 支持神经元及神经干/祖细胞长期培养。
3. 适用于贴壁或悬浮培养体系。
4. 无需星形胶质细胞滋养层。
5. 兼容类器官和神经源性肿瘤模型培养。

产品应用

大鼠海马及多种 CNS 神经元的培养与维持; 干细胞的扩增及神经方向分化; 神经源性肿瘤细胞系的活性维持; 胚胎和出生后神经元的长期存活优化; 胚胎干细胞向神经/星形胶质细胞的分化诱导; 肿瘤类器官的建立与培养。

使用说明

一、产品稀释与培养基配制

B-27 无血清添加剂 (50X) 为 50 倍浓缩液, 使用前需按 1:50 稀释至 1X 工作浓度。例如, 配制 50 mL 培养基时, 加入 1 mL B-27 添加剂至 49 mL 基础培养基 (如 Neurobasal 或 Neurobasal-A) 中, 混匀使用。

配制神经元完全培养基的步骤如下:

1. 将本产品于 4°C 条件下缓慢解冻。
2. 使用前在无菌条件下, 向神经元基础培养基中加入 2% B-27 添加剂及 0.5 M L-谷氨酰胺, 配制为神经元完全培养基。配制好的完全培养基可在 2-8°C 条件下避光储存一周。

注: a) L-谷氨酰胺在水溶液中不稳定, 其分解产物可能对细胞有毒, 因此需在配制时新鲜添加。

b) 对于原代海马神经元培养, 推荐在神经元完全培养基中额外补充 25 μ M L-谷氨酸; 自培养第 4 天起换液时不再添加。

c) 剩余未使用的添加剂建议按工作体积等分, 储存于 -20°C, 避免反复冻融。

二、神经元培养步骤 (以大鼠胎儿皮层神经元为例)

1. 培养基预处理:

- 1) 使用冷的无菌 0.05 mg/L 多聚赖氨酸水溶液包被培养表面 (如玻璃或细胞培养级塑料), 使用量为 0.15 mL/cm²; 37°C 放置过夜 (16 h)。
- 2) 去除包被液后, 用无菌蒸馏水冲洗两次, 彻底晾干后可使用或于 4°C 保存两周。

2. 细胞接种与培养：

- 1) 对分离的原代神经元或复苏的冻存神经元进行培养。
- 2) 将神经元完全培养基预热至 37℃；建议接种密度为 2×10^5 个细胞/孔（以 24 孔板为例），可根据实验需求调整。
- 3) 细胞接种后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。
- 4) 接种 16–24 h 后更换一半体积的新鲜完全培养基，之后每 2–3 天换液一次。

三、原代神经元的分离

适用于培养受精 18 天（E18）大鼠胚胎的海马神经元及大脑皮层神经元：

1. 从 E18 胚胎中分离大脑皮层和双侧海马组织。
2. 将所有组织转移至预先加入完全培养基的锥形管中，静置直至组织自然解体。
3. 组织沉降后，小心去除上清液，仅保留覆盖组织的最少量培养基。
4. 在不含钙的培养基中加入 2 mg/L 过滤灭菌的木瓜蛋白酶溶液，37℃ 下酶解约 30 min，每 5 min 轻轻摇动一次锥形管；每对海马组织使用 2 mL 酶液。
5. 加入两倍体积的完全培养基以恢复二价阳离子浓度，终止酶解反应。
6. 使未解离组织沉降约 2 min，然后将上清转移至 15 mL 离心管，离心 150×g，5 min。
7. 将沉淀物重悬于 1 mL 神经元完全培养基中，取 10 μL 进行细胞计数；后续操作参照“冻存神经元的复苏与培养”的步骤 8 进行。

四、冻存神经元的复苏与培养

冻存的原代神经元对操作条件高度敏感。细胞在复苏过程中极易受损，务必避免剧烈振荡或离心操作。建议仅解冻一管细胞，并尽量缩短从液氮转移到 37℃ 水浴解冻的时间。为提高细胞贴壁率与回收率，推荐在使用前用神经元完全培养基充分冲洗所有塑料或玻璃耗材内表面。

1. 使用神经元完全培养基冲洗无菌 15 mL 锥形管，在超净台中晾干备用。
2. 从液氮罐中取出细胞冻存管，轻拧管盖释放压力后重新拧紧。
3. 在 37℃ 水浴中轻柔晃动冻存管快速解冻（不超过 2 min）。当仅残留少量冰晶且管体仍感觉冰冷时取出。
4. 在洁净工作台上轻敲冻存管使细胞液沉降。使用预冲洗并干燥的 1 mL 无菌吸头，轻柔将细胞转移至准备好的 15 mL 锥形管中。
5. 用 1 mL 预热的神经元完全培养基冲洗冻存管，随后以每秒一滴的速度缓慢滴加至细胞悬液中。每滴加入后轻轻旋转锥形管，避免一次性加入全部培养基。
6. 再缓慢加入 2 mL 预热的完全培养基，使总体积达到 4 mL。使用 1 mL 吸头轻轻混匀，注意避免气泡产生。
7. 用事先冲洗干燥过的吸头取 10 μL 细胞悬液，与等体积 0.4% 台盼蓝混合，评估活细胞数。复苏后细胞活率应大于 50%。
8. 将细胞接种至预先经多聚赖氨酸包被的 24 孔板中，每孔接种约 2×10^5 个细胞（或根据实验需求调整）。加入预热的完全培养基稀释至每孔 500 μL。将培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

储存条件

-20℃，2 年。

注意事项

1. 使用前请将本产品置于 4℃ 条件下缓慢解冻（建议过夜）。
2. 加样前请充分混匀，确保成分均匀分布。
3. 使用时应注意无菌操作，防止样品污染。
4. 为确保产品性能，避免长时间置于室温或较高温度环境中。
5. 本品仅适用于专业科研用途，严禁用于临床诊断、治疗、食品或药品领域，且不得存放于住宅等非专业场所。
6. 为保障操作安全与人员健康，操作时请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。

