

B-27 添加剂 50×

#A503

产品概述

B-27添加剂是一种经过优化的无血清添加剂，用于支持胚胎、产后和成体的海马神经元和其他中枢神经系统（CNS）神经元的生长以及保持其短期或长期活性。

B-27添加剂以50×液体形式提供，加入到合适的神经元基础培养基后，一方面可用于基本单一化（<0.5%胶质细胞）的神经元培养，而无需使用星形胶质细胞饲养层，以获得优化的活性和长期的存活率；另一方面可用于培养神经来源的肿瘤细胞系，有效地保证其活性。

B-27添加剂适用于大多数神经细胞培养，无血清细胞培养，可用于神经细胞生长及维持、干细胞增殖与分化。

本产品供科学研究和生产使用，用于组织和细胞的体外培养。禁止临床使用。

产品/组分信息

| 组分名称 | A503-01 | A503-02 |
|--------------|---------|---------|
| B-27 添加剂 50× | 10mL | 100mL |

储存方式

-25 °C ~ -15 °C保存，2年有效。

使用说明

B-27细胞培养添加剂是50×浓度。使用前请用神经元基础培养基（Cat#B115）稀释到1×。如准备50 mL培养基：将1 mL的B-27细胞培养添加剂（50×）加入到49 mL的基础培养基中。配置好的培养基，可于2~8°C避光保存1周。

制备神经元完全培养基

1. 置于4°C过夜解冻B-27添加剂（50×）。
2. 在使用前无菌添加2%本产品 and 0.5 mM L-谷氨酰胺至神经元基础培养基，配制成神经元完全培养基。

【注】：

1. 后续说明书中出现的“神经元完全培养基”即指此种添加了B-27添加剂和L-谷氨酰胺的神经元基础培养基。
2. 剩余的B-27添加剂（50×）可等分成工作体积并保存在-25°C~-15°C。在以后的试验中根据需要解冻相应体积的本产品。避免反复冻融。
3. 对于原代大鼠海马神经元培养，神经元完全培养基需要额外补充25 μM L-谷氨酸，直至培养第4天。配制好的完全培养基可在2~8°C的黑暗环境中稳定保存长达1周。

细胞培养

本方法已在新鲜分离的18天妊娠大鼠海马和皮质神经元、原代大鼠皮层神经元、原代大鼠海马神经元和神经母细胞瘤细胞系中进行测试。

1. 多聚赖氨酸包被培养板

- 1.1使用无菌DPBS稀释多聚赖氨酸溶液，配制为50 μg/mL工作液。
- 1.2用无菌的冷的50 μg/mL多聚赖氨酸工作液包被培养板，每平方厘米表面使用0.15 mL。
- 1.3在室温下孵育1 h。
- 1.4去除多聚赖氨酸溶液，并用无菌蒸馏水冲洗2次（一定要彻底冲洗培养容器，因为过量的多聚赖氨酸可能对细胞有毒）。在超净工作台中打开培养板的盖子通风，直到每个孔都完全干燥。培养板干燥后可以立即使用或在4°C最多保存2周。

2. 培养细胞

2.1根据标准实验室程序或随细胞提供的说明分离大鼠原代神经元或解冻冷冻保存的大鼠原代神经元。

2.2细胞接种于预热至37°C的神经元完全培养基，建议密度为160 cells/mm²，或根据需要优化细胞密度。

【注】：对于海马神经元，培养基中须添加25 μM L-谷氨酸。

2.3将培养皿置于36~38°C, 5% CO₂的环境中培养（使用自然空气也是可接受的，但推荐使用含9% O₂和5% CO₂的气体环境）。

2.4培养4-24 h后，更换一半体积的新鲜培养基，继续在培养箱中培养。

2.5对海马神经元以外的细胞：在接种4天后，更换一半体积的新鲜的完全培养基，之后每三天重复一次。对海马神经元：接种三天后，用不含L-谷氨酸的新鲜培养基更换一半体积的培养基，之后每三天重复一次。

【注】：在完全培养基中添加25 μM 2-巯基乙醇，可改善海马神经元的长期存活率。

分离原代大鼠胚胎神经元

本方法推荐用于培养受精18天的大鼠胚胎海马神经元和大脑皮层神经元。

1. 从受精18天的大鼠胚胎中分离大脑皮层和双侧海马。

2. 在预置了完全培养基的锥形管中收集所有组织。放置，直到所有的组织都已解体。

3. 使组织沉积在管底部，然后小心地去除上清液，只留下刚好可覆盖组织的最少量培养基。

4. 在不含钙离子的培养基中，使用2 mg/mL过滤灭菌的木瓜蛋白酶溶液，在30°C酶解组织大约30 min，其间每5 min轻摇锥形管以帮助降解。每对海马组织使用2 mL酶溶液。

5. 加入2倍体积的完全培养基以恢复二价阳离子的浓度，停止酶解。

6. 使未解离的组织沉降至管底（约2 min），然后把上清液转移到15 mL离心管中，以150×g离心5 min。

7. 使用1 mL神经元完全培养基重悬沉淀物，取一小份（例如10 μL）进行细胞计数。后续的操作按照“复苏和培养冻存的神经元”的第8-10步骤进行。

复苏和培养冻存的神经元

【注】：

原代神经元细胞将会贴附在裸露的塑料或玻璃表面，建议事先用神经元完全培养基冲洗所有的塑料和玻璃器皿的内表面，以获得最高的回收率和产量。由于细胞从冻存状态复苏时极其脆弱，请在整个操作过程中不要震荡或离心细胞。建议每次只解冻一管细胞。务必减少从液氮中转移冻存管到37°C水浴中的操作时间。细胞从液氮罐到水浴的运输过程中，可在冰桶中放少量液氮，将细胞置于这个冰桶中进行。

1. 在解冻细胞之前，用神经元完全培养基冲洗无菌的15 mL锥形管，然后在超净工作台中通风晾干。

2. 从液氮中取出冻存管时可稍微拧松管帽以释放压力，然后再拧紧。

3. 在37°C水浴中轻柔搅拌冻存管以快速解冻细胞（小于2 min）。当观察到冻存管中只有很少量的冰晶存在时（触摸冻存管仍然感觉是冷的）从水浴中取出。

4. 在超净工作台中用70%的异丙醇消毒冻存管。在工作台台面上轻敲冻存管以使管内液体沉降到管底。

5. 使用事先用神经元完全培养基冲洗并干燥过的1 mL吸头极其轻柔地将细胞转移到事先冲洗并干燥的15 mL锥形管中。

6. 用1 mL预热的神经元完全培养基冲洗冻存管，以每秒一滴的速度极其缓慢地加入到15 mL锥形管中的细胞里。每加一滴都轻柔地转动锥形管一次。不要一次性把全部培养基加到锥形管中。

7. 慢慢地逐滴加入另外2 mL预热的完全培养基，使管内的液体体积为4 mL。用1 mL吸头轻柔地混合液体，注意不要产生任何气泡。

8. 用一个事先冲洗干燥过的吸头吸取10 μL细胞悬液加入到含有10 μL 0.4%台盼蓝的微量离心管中，轻敲管壁以混匀溶液。使用手动的细胞计数方法测定活细胞密度。解冻的细胞的活率应超过50%。

9. 在已经事先用多聚赖氨酸包被（参见“细胞培养步骤”）的48孔板中每孔接种大约1×10⁵个细胞或按所需的细胞密度接种。加入预热的神经元完全培养基将细胞悬液稀释到每孔500 μL。

10. 按照“细胞培养”步骤进行神经元的培养。在36~38°C，含5% CO₂的潮湿环境中培养（使用自然空气也是可接受的，但推荐使用含9% O₂和5% CO₂的气体环境）。