吉替科生物 B-27™ 添加剂（50X，去除维生素 A）使用说明书

一、产品概述

1.1 产品信息

- **产品名称**：吉替科生物 B-27™ 添加剂（50X，去除维生素 A）
- **浓度规格**：50X 浓缩液，需稀释为 1X 工作液后使用
- **核心特性**：不含维生素 A，含 EDTA、氨基酸复合物等核心营养因子，适配无血清细胞培养体系，可维持神经干细胞、ES/iPS 细胞等敏感细胞的未分化状态，保障细胞存活与功能稳定性

1.2 适用范围

- **适用细胞类型**：神经干细胞（NSCs）、胚胎干细胞（ES 细胞）、诱导多能干细胞（iPS 细胞）、对维生素 A 敏感的原代细胞（如海马神经元、皮层神经元）及特殊肿瘤细胞系（如低分化神经内分泌肿瘤细胞）
- **适配培养基**：无血清基础培养基，如 DMEM/F12 培养基、Neurobasal™培养基、IMDM 培养基（不可与含血清培养基混合使用）
- **应用场景**：细胞长期体外培养、干细胞未分化状态维持、神经发育机制研究、干细胞定向诱导分化前期培养、药物筛选实验中的细胞培养支持

二、使用前准备

2.1 耗材与试剂准备

- **必备耗材**：无菌无酶移液器吸头（建议 100 μL、1 mL 规格）、无菌无酶离心管（15 mL 或 50 mL）、无菌细胞培养皿 / 板、无菌瓶口过滤膜（可选，用于疑似污染时过滤工作液）
- **配套试剂**：对应无血清基础培养基（如 DMEM/F12，需提前平衡至室温）、无菌超纯水（用于清洗耗材，不可直接稀释添加剂）

2.2 环境与设备要求

- **操作环境**：生物安全柜内（洁净度 Class II 级及以上），操作前需用 75% 乙醇擦拭生物安全柜台面及耗材表面，紫外线照射消毒 30 分钟
- **设备要求**：移液器（精度需符合 ±1% 误差范围）、37℃恒温水浴锅（可选，用于快速解冻产品）、CO_2 培养箱（设定温度 37℃，CO_2 浓度 5%）、-5℃至 - 20℃冷冻冰箱（未开封产品储存）、4℃冷藏冰箱（开封后短期储存）

2.3 产品解冻

- **未开封产品解冻**：从 - 5℃至 - 20℃冷冻冰箱取出后，可选择两种解冻方式：① 室温自然解冻（约 30-60 分钟）；② 37℃恒温水浴锅快速解冻（约 5-10 分钟，需不断轻轻摇晃瓶身，避免局部过热），解冻过程中禁止反复颠倒或剧烈振荡
- **解冻后检查**：解冻后观察液体状态，应为澄清淡黄色透明液体，无浑浊、沉淀、絮状物或颜色异常（如变深、发黑），若出现异常则禁止使用

三、操作步骤

3.1 工作液配制（1X）

1. **确定用量**：根据所需 1X 工作液总量计算添加剂用量，计算公式为：**添加剂体积 = 1X 工作液总量 ÷ 50**；例如：配制 50 mL 1X 工作液，需添加 1 mL 50X 浓缩液（50 mL ÷ 50 = 1 mL）
2. **稀释操作**：

- 取无菌离心管，先加入计算量的无血清基础培养基（如配制 50 mL 工作液，先加入 49 mL DMEM/F12）
- 用无菌移液器吸取对应体积的 50X 浓缩液（如 1 mL），缓慢加入基础培养基中，边加边轻轻颠倒离心管混匀（避免剧烈振荡，防止气泡产生）
- 混匀后，可取样检测工作液 pH（正常范围 7.2-7.4），若 pH 偏离，可用无菌 1 M HCl 或 1 M NaOH 微调（微调量不超过工作液总量的 0.1%）

3.2 细胞培养操作

1. **细胞准备**：将待培养细胞从 CO_2 培养箱取出，用无菌 PBS 缓冲液清洗 2 次，去除原有培养基残留（若为冻存复苏细胞，需先离心（1000 rpm，5 分钟）去除复苏液，再用 PBS 清洗）
2. **工作液添加**：按常规细胞培养密度，将 1X 工作液加入细胞培养皿 / 板中（如 6 孔板每孔加入 2-3 mL），确保工作液完全覆盖细胞表面
3. **培养条件**：将细胞培养皿 / 板放入 CO_2 培养箱，设定温度 37℃、CO_2 浓度 5%，培养期间根据细胞生长情况更换工作液（通常每 2-3 天更换一次，神经干细胞建议每 48 小时更换）

3.3 剩余产品处理

- **未用完的 50X 浓缩液**：开封后需立即拧紧瓶盖，放入 4℃冷藏冰箱避光储存，1 周内使用完毕，禁止再次冷冻
- **未用完的 1X 工作液**：建议现配现用，若需短期保存，需密封后放入 4℃冷藏冰箱，24 小时内使用完毕，使用前需在室温平衡 30 分钟，禁止冷冻

四、注意事项

4.1 储存注意事项

- **未开封产品**：严格在 - 5℃至 - 20℃冷冻冰箱避光储存，禁止室温放置超过 2 小时，禁止放入 - 80℃冰箱长期储存（短期 1 周内误存 - 80℃，解冻后无异常可使用）

- **开封后产品**：4℃冷藏储存，每次取用后需立即密封，避免瓶口接触生物安全柜内其他物品，防止交叉污染
- **批次管理**：不同批次产品不可混合使用，需在产品标签标注的有效期内使用，过期产品禁止使用

4.2 操作注意事项

- **稀释禁忌**：不可用普通蒸馏水或含血清培养基稀释 50X 浓缩液，蒸馏水会导致细胞渗透压失衡，血清成分会破坏添加剂中营养因子的稳定性
- **避免污染**：移液器吸头不可重复使用，离心管开封后需一次性使用，若工作液配制后发现浑浊或絮状物，不可用于细胞培养，需重新配制
- **浓度控制**：常规细胞按 1:49 比例（50X 浓缩液：基础培养基）稀释，特殊细胞（如低分化神经内分泌肿瘤细胞）需通过预实验（设置 1:45、1:49、1:53 梯度）确定最适浓度，禁止随意调整稀释比例

4.3 安全注意事项

- **操作防护**：佩戴无菌手套、口罩及护目镜，避免液体接触皮肤与黏膜，若不慎接触，需立即用大量无菌生理盐水冲洗，必要时就医
- **废弃物处理**：使用后的吸头、离心管等耗材需放入医疗废弃物专用垃圾桶，废弃工作液需经 121℃高压灭菌 30 分钟后排放，禁止直接倾倒
- **应急处理**：若发生试剂泄漏，需用吸水纸吸干泄漏液体，再用 75% 乙醇擦拭污染区域，紫外线消毒 30 分钟后再继续操作

五、质量控制与问题排查

5.1 质量控制标准

- **无菌检测**：产品出厂前经需氧菌、厌氧菌及真菌检测，均为阴性
- **内毒素检测**：内毒素含量 < 0.1 EU/mL，符合细胞培养试剂标准

- **性能验证**：神经干细胞培养 72 小时后，细胞存活率≥90%，未分化标志物（如 Nestin）表达阳性率≥85%

5.2 常见问题排查

问题现象	可能原因	解决方案
工作液浑浊、有沉淀	1. 添加剂反复冻融；2. 稀释时污染；3. 储存温度不当	1. 丢弃浑浊工作液，重新解冻新的浓缩液配制；2. 操作时加强无菌控制，必要时用 0.22 μm 过滤膜过滤工作液；3. 确认储存温度符合 - 5℃至 - 20℃（未开封）或 4℃（开封后）
细胞存活率低（＜70%）	1. 稀释比例错误（浓度过高或过低）；2. 培养基搭配错误；3. 细胞污染	1. 重新按 1:49 比例配制工作液，用标准细胞验证浓度；2. 确认使用无血清培养基，更换为 DMEM/F12 重试；3. 检测细胞是否存在细菌 / 真菌污染，污染细胞需丢弃，更换新细胞
细胞提前分化（未分化标志物表达下降）	1. 产品误混用含维生素 A 的 B-27™添加剂；2. 培养环境 CO_2 浓度异常	1. 更换为纯吉替科生物无维生素 A 添加剂，重新培养细胞；2. 校准 CO_2 培养箱，确保 CO_2 浓度稳定在 5%