



Getico B-27-无血清添加剂使用说明书

前言

本说明书旨在为吉替科生物 B-27-无血清神经元培养系统的使用提供详细指导。B-27-无血清添加剂（50X）是神经元细胞培养的必备产品，可分别支持原代神经元（Primary Neuron）和多能干细胞衍生神经元（PSC-Derived Neuron）的体外存活、成熟与功能维持。

一、产品基本信息

1.1 产品组成

系统包含以下核心组分：

- B-27-无血清添加剂（50X）：10 mL /瓶

1.2 储存条件与保质期

组分	储存条件	保质期
Neurobasal Plus 培养基(另购)	2°C 至 8°C，避光保存	自生产日起 12 个月
B-27-无血清添加剂（50X）	-20°C 至 -5°C，避光保存	自生产日起计算（详见产品包装）

1.3 安全提示

- 使用前必须阅读安全数据表（SDS）并遵循操作说明，操作时需佩戴防护眼镜、专用实验服和手套。
- 安全数据表可通过吉替科生物官方渠道获取。
- 本产品仅用于科研，不可用于诊断或临床用途。

二、Primary Neuron Applications (原代神经元应用)

2.1 适用范围

适用于原代大鼠、小鼠神经元（如皮质、海马神经元）的体外培养，包括新鲜分离的胚胎 / 新生鼠神经元及冷冻保存的原代神经元。

2.2 完全培养基制备 (原代神经元专用)

2.2.1 试剂准备

需额外准备：GlutaMAX I 补充剂 (100X)。

2.2.2 配制步骤

1. 解冻 B-27-无血清添加剂：4°C 过夜解冻（避免 37°C 加热）。
2. 无菌条件下，向 500 mL Neurobasal Plus 培养基中加入：
 - B-27-无血清添加剂 (50X)：10 mL (终浓度 2%)
 - GlutaMAX I 补充剂 (100X)：12.5 mL (终浓度 0.5 mM，可根据需求增至 2 mM)。
3. 混匀后，4°C 避光储存，有效期不超过 2 周。
4. 使用前，37°C 水浴预热培养基 5-10 分钟。

注：未用完的 B-27-无血清添加剂可分装为 1-2 mL / 管，-20°C 至 -5°C 保存，避免反复冻融（最多冻融 2 次）；解冻后 4°C 存放不超过 2 周。

2.3 培养板包被 (原代神经元专用)

仅需多聚 -D- 赖氨酸包被，步骤如下：

1. 配制多聚 -D- 赖氨酸工作液：用无菌 DPBS 稀释至 50 µg/mL。
2. 包被培养容器：向培养板 / 皿中加入工作液（如 96 孔板每孔 50 µL），确保覆盖整个表面。
3. 室温孵育 1 小时。
4. 移除工作液，用无菌蒸馏水冲洗 3 次（如 96 孔板每孔 100 µL），彻底冲洗以避免残留毒性。
5. 超净台内敞口晾干 2 小时，可立即使用或 4°C 密封保存（Parafilm 膜包裹，1 周内使用）。

2.4 原代神经元培养流程

2.4.1 新鲜分离的原代神经元接种

1. 按标准实验室方法分离原代神经元（如大鼠 / 小鼠皮质或海马组织）。
2. 用预热的完全培养基重悬细胞，调整密度后接种至包被好的培养板，推荐密度如下：

物种	低密度 (cells/cm ²)	中密度 (cells/cm ²)	高密度 (MEA 应用, cells/cm ²)
大鼠	20,000	60,000	80,000
小鼠	30,000	60,000	60,000

1. 37°C、5% CO₂培养箱中孵育。
2. 接种后第 4 天首次换液：移除一半旧培养基，加入等量预热的新鲜培养基；此后每 2-3 天换液一次（低密度每周 1-2 次，高密度每 2-3 天一次）。

2.4.2 冷冻保存神经元的复苏与培养

1. 预处理：无菌 15 mL 离心管用完全培养基预冲洗，备用。
2. 解冻：从液氮中取出冻存管，37°C 水浴快速解冻（<2 分钟），保留少量冰晶时取出。
3. 消毒：冻存管表面用 70% 异丙醇消毒，超净台内收集液体至管底。
4. 转移：用预冲洗的 1 mL 移液枪轻柔转移细胞至 15 mL 管中。
5. 稀释：用 1 mL 预热培养基冲洗冻存管，逐滴加入离心管（1 滴 / 秒），轻柔混匀；再逐滴加入 2 mL 培养基（总容积 4 mL），避免气泡。
6. 计数：取 10 μL 细胞悬液与 10 μL 0.4% 台盼蓝混合，计数活细胞（存活率应 >50%）。
7. 接种：按表 2 密度接种至包被板，37°C、5% CO₂孵育。
8. 换液：接种后 4-24 小时，更换一半培养基；此后每 2-3 天换液一次。

2.5 原代神经元培养常见问题与解决

观察现象	可能原因	推荐措施
胶质细胞过多	分离时动物年龄、技术或接种密度导致混合培养	接种时加入 1X CultureOne 补充剂抑制胶质细胞；或延迟至第 2/4/6/8 天添加，调控胶质细胞比例
细胞贴壁少	包被不均、板陈旧、密度过低、未包被或震动影响	确保包被均匀，使用新鲜包被板；提高接种密度；避免培养箱附近震动（如离心机）
培养基变黄	细胞存活好导致消耗增加；添加了血清 / 生长因子	增加换液频率；降低接种密度；禁止添加血清（系统已优化，无需额外添加）
神经元聚集	包被不均	检查包被均匀性，确保多聚 -D- 赖氨酸工作液覆盖完全
培养 5 天后神经元突然死亡	成熟神经元易受兴奋性毒性影响	仅添加 GlutaMAX I 补充剂，避免使用谷氨酰胺或非必需氨基酸

三、PSC-Derived Neuron Applications (PSC 衍生神经元应用)

3.1 适用范围

适用于多能干细胞 (PSC) 衍生的神经元培养, 包括单层神经干细胞 (NSC)、玫瑰花结衍生 NSC 及因子诱导神经元 (iN 细胞) 的成熟与维持。

3.2 操作前试剂准备

3.2.1 200 mM 抗坏血酸溶液

1. 称取 1 g 抗坏血酸 2-磷酸酯倍半镁盐 hydrate, 溶解于 17.3 mL 蒸馏水中。
2. 0.22 μm 滤膜过滤除菌。
3. 分装为 100-200 μL / 管, -5°C 至 -20°C 避光保存, 有效期 6 个月。

3.2.2B-27-无血清神经元成熟培养基 (PSC 衍生专用)

1. 解冻 B-27-无血清添加剂: 室温 1 小时或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 过夜 (**严禁 37°C 解冻**)。
2. 混合以下组分:

试剂	体积
Neurobasal Plus 培养基	96 mL
B-27-无血清添加剂 (50X)	2 mL
GlutaMAX 补充剂	1 mL
CultureOne 补充剂 (100X)	1 mL
200 mM 抗坏血酸溶液	100 μL

1. 混匀后, $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光储存, 有效期 2 周; 使用前 37°C 预热 5-10 分钟。

注: CultureOne 补充剂可抑制 NSC 异常增殖, 建议必加; 添加剂解冻后可分装冻存 (-5 至 -20°C), 避免反复冻融, 4°C 存放不超过 2 周。

3.3 培养板包被 (PSC 衍生神经元专用)

需多聚 -D- 赖氨酸 + 层粘连蛋白双层包被, 步骤如下:

3.3.1 多聚 -D- 赖氨酸包被

同 2.3 节（原代神经元培养板包被步骤 1-5）。

3.3.2 层粘连蛋白包被（包被后立即使用）

1. 解冻层粘连蛋白：室温解冻，分装后 -80°C 保存（避免反复冻融）。
2. 配制工作液：用无菌蒸馏水稀释至 3 µg/mL。
3. 向多聚 -D- 赖氨酸包被的板中加入工作液，覆盖整个表面，37°C、5% CO₂ 孵育 1 小时。
4. 接种细胞前立即吸除层粘连蛋白溶液。

3.4 PSC 衍生神经元培养流程

3.4.1 NSC 分化与成熟阶段切换

1. 起始细胞：PSC 或 NSC 群体，先诱导向神经谱系分化。
2. 分化阶段：NSC 需在神经元分化培养基中培养 3-7 天（分化培养基配方见 3.5）。
3. 成熟阶段：当细胞呈现神经元形态（神经突延伸并接触邻近细胞），切换至 B-27-无血清成熟培养基：移除一半旧培养基，加入等量预热的成熟培养基。

3.4.2 成熟培养与换液

1. 换液频率：每 3-4 天更换一半培养基（高密度培养每 2-3 天一次）。
2. 操作注意：分化中的神经元易脱落，移液时避免吸头接触细胞，新鲜培养基沿板壁轻柔加入。
3. 培养时长：根据细胞系及实验需求，可维持 3-10 周或更长时间。

3.5 神经元分化培养基配方（针对不同 NSC 来源）

3.5.1 单层衍生 NSC 分化培养基

试剂	体积
Neurobasal 培养基	95.9 mL
B-27 补充剂	2 mL
GlutaMAX 补充剂	1 mL
CultureOne 补充剂（100X）	1 mL
200 mM 抗坏血酸溶液	100 µL

3.5.2 玫瑰花结衍生 NSC 分化培养基

试剂	体积
DMEM/F-12 培养基	86.9 mL
StemPro hESC 补充剂	2 mL

试剂	体积
BSA (25%)	7.2 mL
GlutaMAX 补充剂	2.5 mL
CultureOne 补充剂 (100X)	1 mL
GDNF 重组人蛋白 (20 μ g/mL)	100 μ L
BDNF 重组人蛋白 (20 μ g/mL)	100 μ L
dcAMP (500mM)	100 μ L
200 mM 抗坏血酸溶液	100 μ L

3.6 PSC 衍生神经元培养常见问题与解决

观察现象	可能原因	推荐措施
扁平细胞(非神经细胞)	起始 NSC 群体中含非神经细胞	检查 NSC 纯度 (>90% Sox1 + 可减少非神经细胞); 用抗有丝分裂化合物(如 FUDR) 处理
培养基变黄	细胞存活好导致消耗增加; 添加了血清	增加换液频率; 降低接种密度; 禁止添加血清(系统无需额外血清)
细胞聚集	底物包被问题	降低层粘连蛋白浓度 (1-3 μ g/mL); 降低接种密度; 检查多聚 -D- 赖氨酸包被质量; 培养 >2 周后补充层粘连蛋白
非神经细胞取代神经元	NSC 纯度不足或培养条件不当	提高 NSC 纯度; 增加 CultureOne 补充剂浓度

四、附录

4.1 注意事项

- 所有操作需严格无菌，避免污染。
- 不同细胞系可能需要微调培养条件（如密度、换液频率），建议根据预实验优化。

吉替科生物保留对本说明书的解释权，内容如有更新，以最新版本为准。