

细胞产品手册

OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞

产品货号：MUBNF-01001



产品介绍

神经干细胞是多能干细胞，可以分化为神经系统的多种细胞，包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等等。神经干细胞可以从哺乳动物大脑的不同区域和脊髓等神经系统中分离出来。神经干细胞有重建神经环路的能力，因此具有治疗脑组织损伤的潜能，从而在神经退行性疾病动物模型、遗传性中枢神经系统疾病、中风和脊髓损伤等方面有着广泛的研究价值。

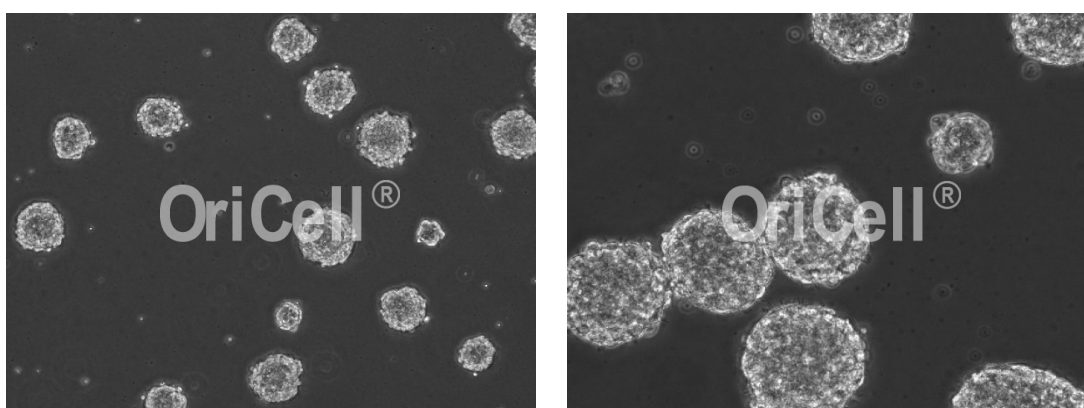
OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞来源于 12.5 天 C57BL/6 胎鼠的大脑海马组织，以悬浮的神经球形式培养，在低代次冻存。可作为细胞模型应用于增殖、衰老、免疫、分化和移植研究。

注意：本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

产品信息

产品名称	OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞
货号	MUBNF-01001
规格	1×10 ⁶ 个/管 或 1×10 ⁶ 个/瓶
冻存代次	P2
保存条件	液氮 (-196°C)

OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞在倒置相差显微镜下的形态



质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>50%。
- 通过细胞周期检测，倍增周期<72 h。
- 通过免疫荧光检测，表达 Nestin (> 75%)，不表达 GFAP，Tubulin (< 10%)。
- 具有良好的分化潜能，能向神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞分化等。

详情见《产品检测报告》。

处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。
4. 神经干细胞在体外增殖能力有限，且不能长期保持分化潜能。基于丰富的细胞培养经验和性能优异的培养体系，OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞可在体外传代 3 次以上依然保持各项指标合格。但我们始终建议尽可能使用较低代次细胞进行科研工作。
5. 通常 C57BL/6 小鼠神经干细胞接种密度为 $(1.5\sim3) \times 10^5$ 个活细胞/mL。该细胞的生长与供体自身特性和后续培养体系的关系极大。我们建议根据各批次、各代次实际生长情况按比例传代培养。

注意：本产品冻存液中含有 DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。

细胞的复苏和培养

所需材料

- OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞
- OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞完全培养基（货号：MUXNF-90011，以下简称完全培养基）

操作步骤

注意：收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80℃，让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37℃预热。
2. 完全培养基温浴到 37℃。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
4. 从-80℃冰箱中取出细胞，放入 37℃水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

注意：1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染；

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。

5. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
7. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
8. 细胞悬液以 $160 \times g$ 离心 5 min。

注意：请以公式 $a=\omega^2r$ (a :向心加速度； ω :旋转角速度， $\omega=\pi n/30$ ； r :转子半径) 计算相应转速。

9. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
10. 将细胞按 $(1.5\sim3) \times 10^5$ 个活细胞/mL 的密度接种到培养器皿中，加入足量的完全培养基，吹打混匀。
11. 将细胞放入 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中。

注意：接种 12 h 内不可移动、观察细胞。这会造成细胞在容器内分布不均匀，相互粘连，神经球大小不一、形状不圆等情况。

12. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

注意：神经干细胞对温度敏感，较低的室内温度和过长的观察时间会造成神经球相互粘连。

细胞的换液操作

所需材料

- OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞完全培养基（货号：MUXNF-90011，以下简称完全培养基）

操作步骤

注意：为避免反复温热培养基，如果在一次操作中无法用完整瓶培养基，建议分装到适当的无菌容器中。换液时只取当天所需培养基量进行预热。

1. 镜下观察细胞，如果有细胞出现贴壁，尽量不要拍打培养器皿，以免其脱落。
2. 用巴氏吸管将神经球悬液转移至离心管中。
3. 降低离心力为 $140\times g$ ，将神经球悬液离心 4 min 后，去除上清液。
4. 向细胞沉淀物加入 1 mL 神经干细胞完全培养基，轻轻重悬细胞，注意不要将小神经球吹散。
5. 将细胞悬液移入一个新的培养器皿中，加入足量的完全培养基，吹打混匀。。
6. 将细胞放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中。
7. 之后，视培养液情况和细胞的生长情况进行换液或传代。一般无大量死细胞、细胞碎片和细胞贴壁，则无需换液。

注意：当神经干细胞出现神经球较大（神经球中央暗淡）或部分神经球出现贴壁分化时需立即传代。一般情况下，C57BL/6小鼠神经干细胞2~3天传代一次。

细胞的传代

所需材料

- OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞完全培养基（货号：MUXNF-90011）
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS)（货号：PBS-10001，以下简称 PBS）

操作步骤

1. 将完全培养基预热至 37°C。
2. 镜下观察细胞，如果有细胞出现贴壁，尽量不要拍打培养器皿，以免其脱落。
3. 用巴氏吸管将神经球悬液转移至离心管。
4. 用 PBS 洗涤培养容器 1 次，注意动作轻柔，清洗全面，收集 PBS。
5. 降低离心力为 160×g，将神经球悬液离心 4 min 后，去除上清液。
6. 向细胞沉淀物加入 1 mL 神经干细胞完全培养基重悬细胞，将细胞悬液转移至 5 mL EP 管中，用 1 mL 枪头轻柔吹打细胞沉淀约 15~20 次，充分吹散，镜下观察见多数细胞是单个或两三个一团时，表明分散效果良好。（细胞量较多时可以将细胞悬液平均分到 2~3 个 EP 管中再吹打）。

注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，否则可能损伤和损失细胞。

7. 使 EP 管竖直静置 1~2 min。
8. 收集细胞，接种到 T25 培养瓶，轻轻吹打混匀，加入足量神经干细胞完全培养基，调整接种密度为 $(1.5\sim3) \times 10^5$ 个活细胞/mL。

注意：不要吸到 EP 管管底的细胞团，这部分细胞不建议使用。

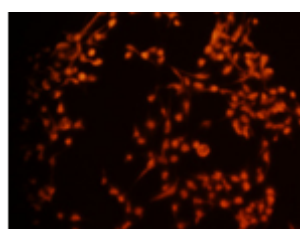
9. 摇匀细胞，放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中。
10. 传代次日，若出现大量死细胞、细胞碎片和细胞贴壁，则需更换培养基。

细胞的鉴定

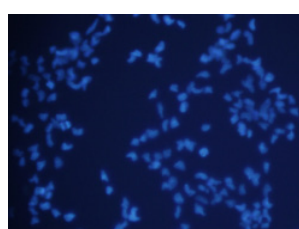
神经干细胞在含 EGF 和 FGF 的无血清培养基中培养，去除分裂原后，神经干细胞会自发向神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞分化。除了自发分化，神经干细胞可在特定培养条件下向所诱导方向分化。神经干细胞在含血清培养基中培养大概 7 天，会自发分化为神经元细胞（ $16 \pm 7\%$ ）、星形胶质细胞（ $75 \pm 7\%$ ）、少突胶质细胞（ $5 \pm 3\%$ ）。

神经干细胞纯度检测免疫荧光图片

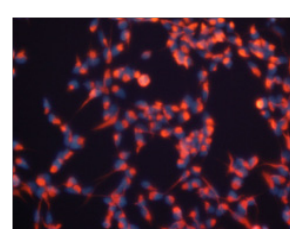
神经干细胞特异蛋白nestin（红色），星形胶质细胞特异蛋白GFAP（阴性），
神经元特异性蛋白Tubulin（阴性），hochest（蓝色）



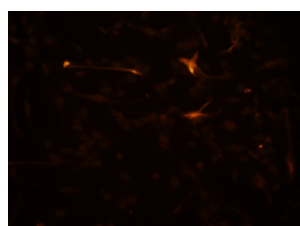
P4-nestin-400×



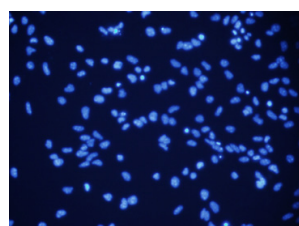
P4-hohest-400×



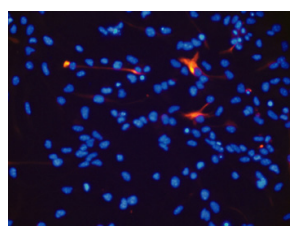
P4-merge-400×



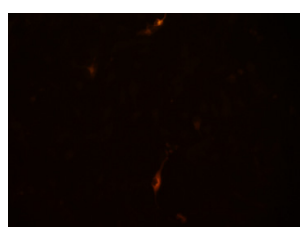
P4-GFAP-400×



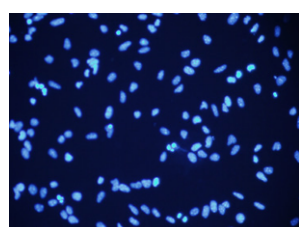
P4-hohest-400×



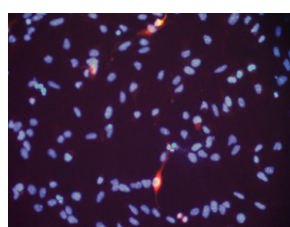
P4-merge-400×



P4-Tubulin-400×



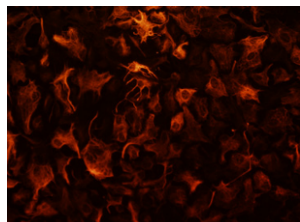
P4-hohest-400×



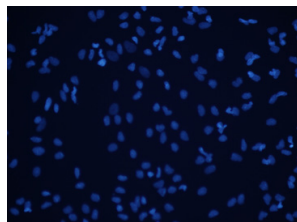
P4-merge-400×

神经干细胞诱导分化免疫荧光图片

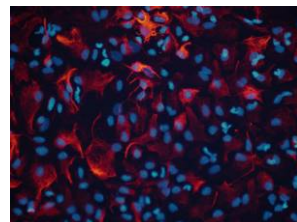
星形胶质细胞特异性蛋白GFAP（红色），神经元特异性蛋白Tubulin（红色）
hochest（蓝色）



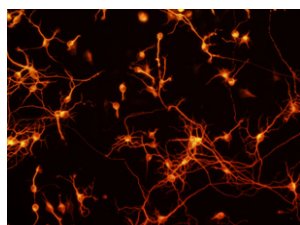
P4-GFAP-400×



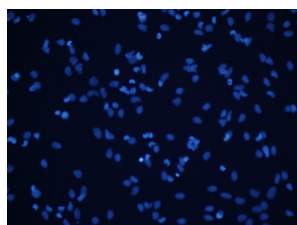
P4-hoechst-400×



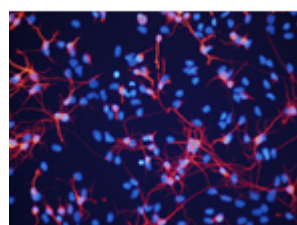
P4-merge-400×



P4-Tubulin-400×



P4-hoechst-400×



P4-merge-400×

细胞的冻存

所需材料

- OriCell®神经干无蛋白程序冻存液（货号：GUXNX-07031）
- OriCell®神经干无蛋白非程序冻存液（货号：GUXNX-07021）

注意： OriCell®神经干无蛋白非程序冻存液是专用于神经干细胞的无蛋白冻存液，是一种化学成分明确的即用型冻存液，可直接放入-80℃冰箱冻存，不需要分步慢冻。

操作步骤

1. 细胞的收集请参考 OriCell® C57BL/6 小鼠神经干细胞的传代操作中 1~6 步骤。
2. 细胞收集后，取少量细胞悬液用血细胞计数板计数，计算细胞总数。
3. 细胞悬液经 $160\times g$ 离心 4 min 后，吸去上清液。
4. 用冻存液重悬细胞，调整细胞密度为 1×10^6 个活细胞/mL（或希望达到的细胞密度）。
5. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

注意： 在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4℃冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。

6. 若选用 OriCell®神经干无蛋白程序冻存液，将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入-80℃冰箱中。若选用 OriCell®神经干无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入-80℃冰箱中。

注意： 细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4 h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。

7. 24 h 后将细胞转移到液氮进行长期保存。

注意： 细胞不可长期保存在-80℃冰箱中。我们建议在-80℃冰箱中的保存时间不要超过 48 h。

赛业（广州）生物科技有限公司保留OriCell®细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，
不得改编或转载用作其他商业用途。