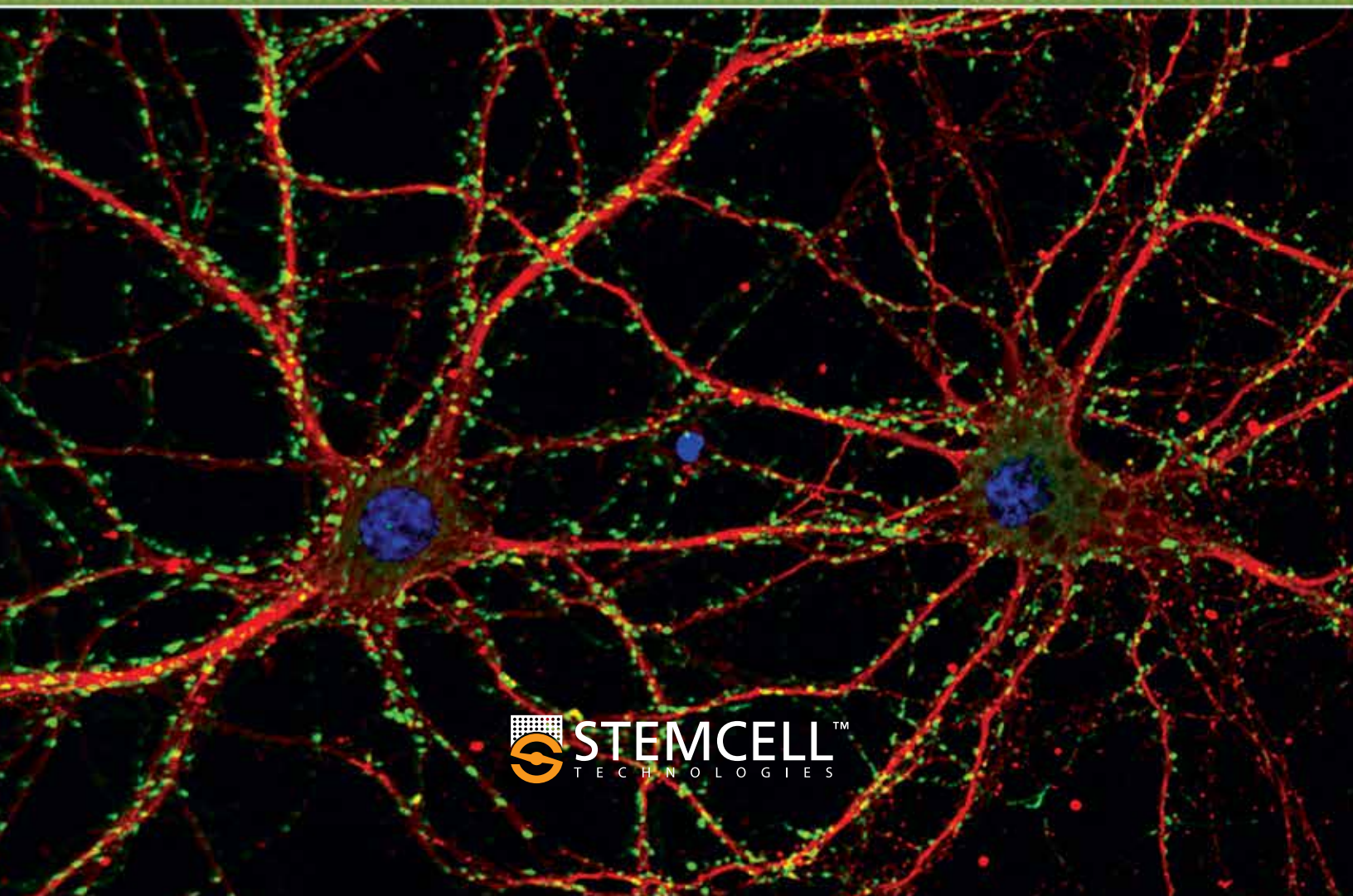


原代神经元培养

标准化的培养基和试剂



目录

- 3 使用标准化的NeuroCult™试剂进行品质优异的原代神经元培养
- 4 NeuroCult™ SM1: 对原代神经元进行长期培养时增加其存活率
- 8 NeuroCult™ SM2: 通过无需基质的神经元培养, 减少实验差异
- 10 用于神经元研究的辅助产品

Scientists Helping Scientists™

STEMCELL Technologies自1993年即已为细胞培养基和试剂设置了高品质标准。秉承科学家帮助科学家的理念, 我们已开发了超过1000个专业产品, 可用于源自各种组织的干细胞, 包括神经、造血、多能干细胞、间充质细胞和乳腺。NeuroCult™产品线包括用于哺乳动物原代神经干细胞的近30种不同的培养基产品、培养检测法和分化试剂盒, 以及用于原代神经元的培养基和添加物。请访问www.stemcell.com, 对NeuroCult™的实验流程、教学视频、网络研讨会和简短综述做进一步了解。

使用标准化的NeuroCult™试剂 进行品质优异的原代神经元培养

凭借长达20年为多种组织类型提供专业培养基的丰富经验，STEMCELL Technologies开发了NeuroCult™ SM (STEMCELL-改良) 添加物和培养基试剂盒，可用于需要基质和无需基质的原代神经元培养。NeuroCult™ SM1和NeuroCult™ SM2是根据已发表的B27配方^{1,2}开发设计的，且已经过优化，对于支持成熟神经元培养具有更出色的一致性。

标准化的神经元培养添加物(如: Brewer's B27)包含了多种复杂的成分¹⁻³。这些原料及相关制造过程的质量差异性都将导致该添加物品质的变化，已有报道表明该情况会对神经元培养构成负面影响^{3,4}。

NeuroCult™ SM神经元培养基添加物的设计和生产均为培养出可重复的、高品质的培养物做了充足的准备。在开发过程中，我们首先对已发表的添加物进行多因素实验^{1,2}，以确定NeuroCult™ SM的配方和原料的精确规格。精选的原料由可靠的供应商提供，并选用适当的重组或合成原料作为组分的替代物。随后，建立最佳的制造工艺来生产这些多组分添加物。最后，为减少由非标准或次优的实验流程所造成的差异性，创建了详尽且标准化的培养实验流程。新一代添加物 - NeuroCult™ SM2，无需使用基质即可培养神经元，从而排除了由培养基引起的差异性。这些添加物与NeuroCult™ 神经元基础培养基配合使用，使培养性能达到最佳效果。

与所有STEMCELL Technologies的产品一样，NeuroCult™ SM添加物符合我们有口皆碑的质量控制标准，包括对原料在使用前进行预筛选，以及在相关实验中对每批产品的性能测试。使用NeuroCult™，可使细胞培养获得高品质的培养物及可重复的实验结果。

NeuroCult™ SM神经元培养基添加物:

- 使神经元培养物的实验差异性最小
- 在长期培养过程中支持具功能活性的神经元的存活和成熟
- 以最少的成本实现培养流程的标准化
- 无需使用培养基质



NeuroCult™ SM1

对原代神经元进行长期培养时提高其存活率

NeuroCult™ SM1神经元培养基添加物是根据已发表的B27配方^{1,2}开发设计的，且已经过优化，对于支持成熟神经元的长期培养具有更出色的一致性。NeuroCult™ SM1可单独购买，也可与NeuroCult™神经元基础培养基一同购买。

NeuroCult™ SM1支持对具有功能性的成熟神经元进行长期培养，培养物批次间差异小、重复性高，且神经胶质细胞的污染极少 (< 1% GFAP)。与使用传统的无血清添加物培养的细胞相比，在NeuroCult™ SM1中培养的神经元在体外培养6天（即：6 DIV）后显示正常的形态，其中的细胞体和神经突聚集体明显更少（图1A-B）。在21 DIV时，神经元活性依然很高，且神经突形成错综复杂的神经网络形态，表明已形成健康、成熟的培养物（图1C）。

与传统无血清培养基相比，NeuroCult™ SM1中的培养物在7 DIV时所含神经元数量与前者相当（图2A）。然而，在21 DIV时使用NeuroCult™ SM1的培养物中含有具β-微管蛋白III免疫活性的神经元明显更多，这表明细胞存活率被显著提高（图2B）。不同批次的NeuroCult™ SM1对神经元的长期培养（21 DIV）以及保持其高存活率的效果均一致（数据未显示）。

与传统无血清培养基相比，NeuroCult™ SM1中的培养物在7 DIV与21 DIV时均显示神经突总生长量（图3）和神经突分支点总数（图4）明显增多。神经突的生长以及出现分支，是神经元成熟程度的指标。在第7天至第21天之间，可观察到神经突生长以及分支增加的趋势均十分稳健，也表明该培养条件可促进神经元在体外的成熟。

免疫染色证实，在体外培养21天时，培养于NeuroCult™ SM1中的神经元在形态上已经成熟，显示具有点状的突触前和突触后标志物表达（分别为突触蛋白和PSD-95，图5）；电生理实验表明，使用NeuroCult™ SM1培养的神经元在功能上也已成熟（图6），而我们已确知如果在传统无血清添加物时，所培养的神经元会出现无法达到功能的成熟的问题^{3,4}。

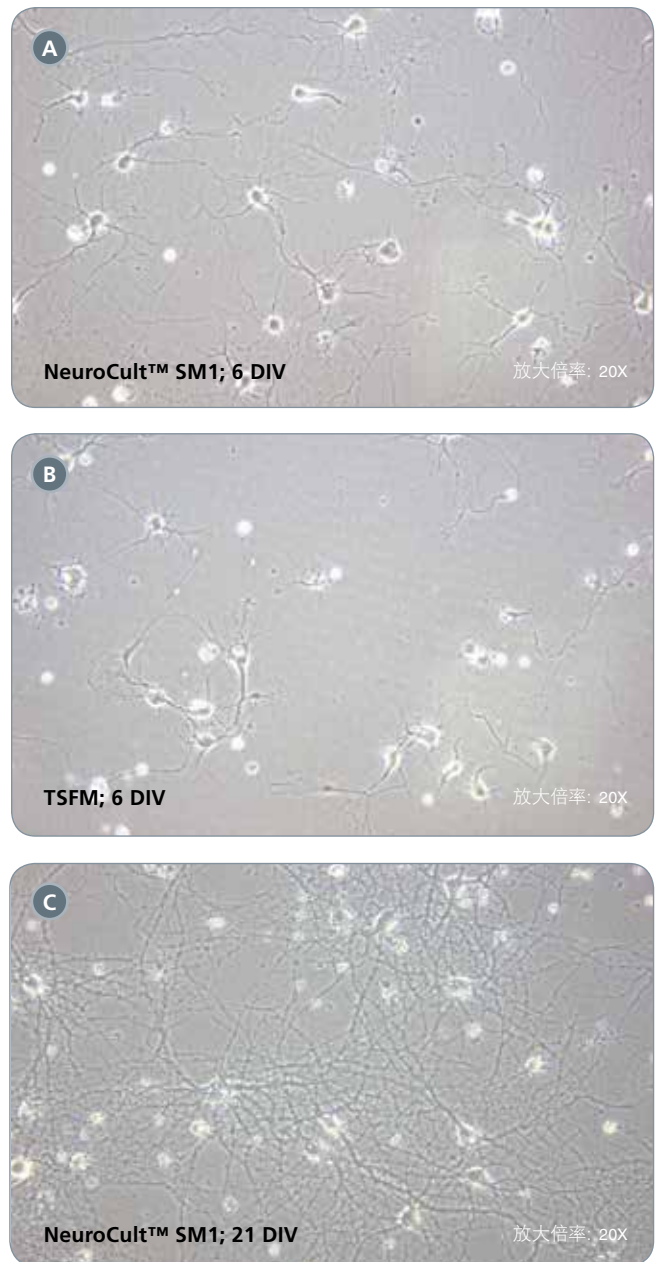


图1. 在NeuroCult™ SM1和在传统无血清培养基中的神经元培养物的形态比较。

(A-B) 6 DIV, 培养于NeuroCult™ SM1培养基中的神经元 (A), 与培养于传统无血清培养基中的神经元 (TSMF, B) 相比, 其中的细胞体和神经突聚集体更少。(C) 21 DIV, 在NeuroCult™ SM1中的培养物出现大量具树突棘 (Dendritic Arbor) 结构的活性神经元。将E18大鼠皮质神经元在聚-D-赖氨酸包被的盖玻片上体外培养6天或21天。接种密度: A-B, 160个细胞/mm²; C, 320个细胞/mm²。

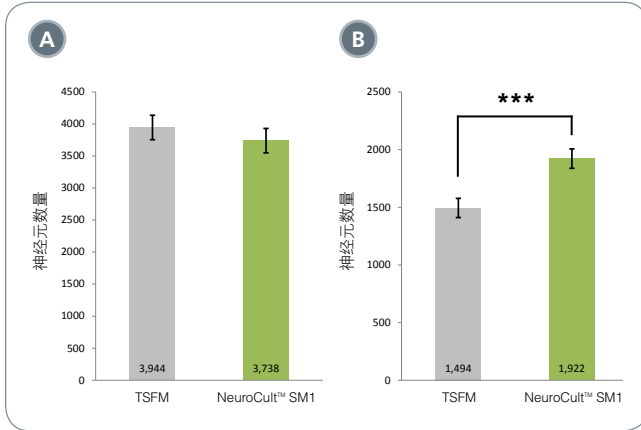


图2. 在NeuroCult™ SM1和TSM中体外培养7天和21天的神经元数量。

(A) 培养第7天时, 在NeuroCult™ SM1和TSM中获得的神经元数量相当 ($n = 25$, 平均值 \pm 95% CI, $p > 0.05$)。 (B) 培养第21天时, 与TSM相比, 在NeuroCult™ SM1中可获得明显更多的神经元 ($n = 25$, 平均值 \pm 95% CI, $***p < 0.001$)。

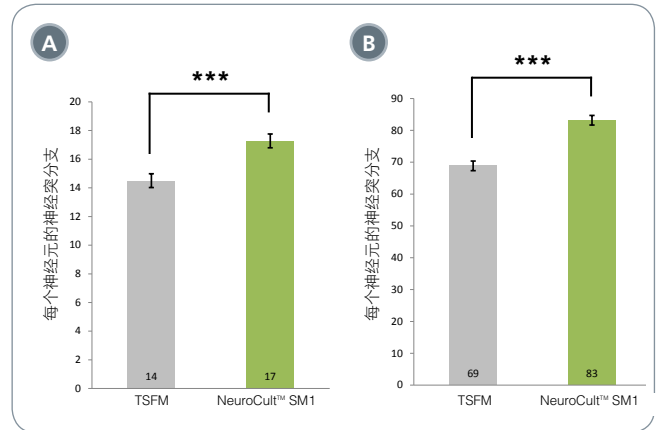


图4. 原代神经元在NeuroCult™ SM1和TSM中体外培养7天和21天生长的神经突分支情况。

与TSM相比, 在NeuroCult™ SM1中培养7天 (A) 和21天 (B) 的细胞均可观察到明显更多的神经突分支 ($n = 240$ 个独立检测, 平均值 \pm 95% CI, $***p < 0.001$)。

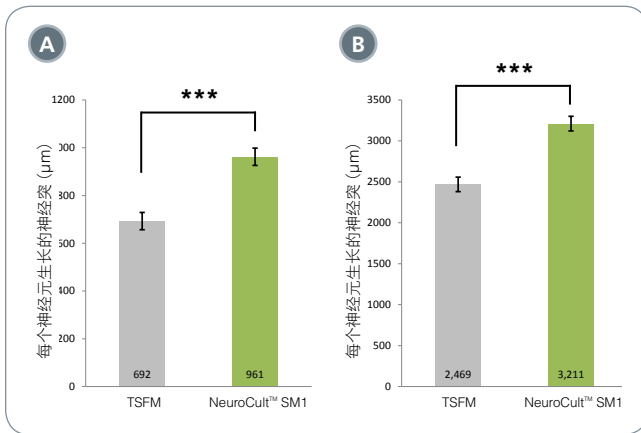


图3. 原代神经元在NeuroCult™ SM1和TSM中体外培养7天和21天的神经突生长情况。

与TSM相比, 在NeuroCult™ SM1中培养7天 (A) 和21天 (B) 的细胞均可观察到明显更多的神经突分支 ($n = 240$ 个独立检测, 平均值 \pm 95% CI, $***p < 0.001$)。

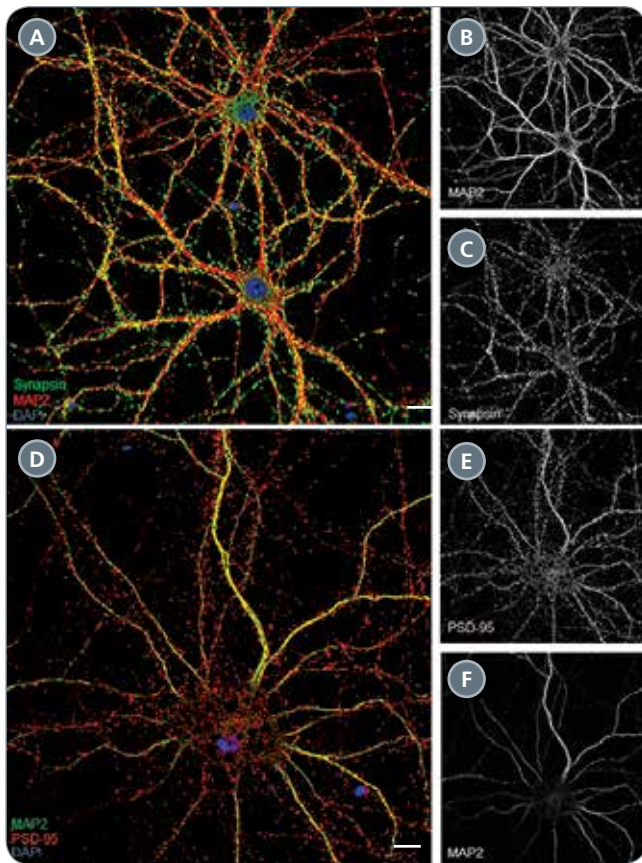


图5. 使用NeuroCult™ SM1培养21天的神经元中突触前和突触后标志物的表达。

在NeuroCult™ SM1中培养21天的培养物中含有大量的树突棘结构，以及突触前标志物（突触蛋白）和突触后标志物（PSD-95）的适当表达和正确定位，表明此时的神经元已达到形态成熟状态。（A-C）突触蛋白（绿色）的免疫标记呈离散点状沿体细胞和树突（MAP2阳性，红色）分布。（D-F）观察到MAP2的树突状免疫标记，以及突触后标志物PSD-95的点状染色。以DAPI复染细胞核。比例尺：10 μm。

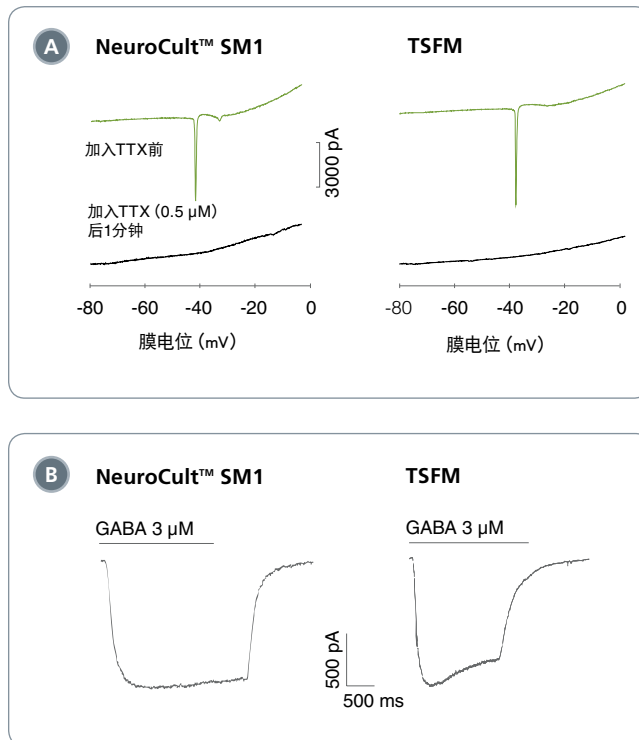


图6. 在NeuroCult™ SM1中培养的神经元的电生理学特征图示。

在NeuroCult™ SM1中培养的神经元具功能活性，当使用河豚毒素（TTX）时，能够可逆性阻断其产生的动作电位，并显示典型的配体诱导的GABA_A受体电流特征。（A）当在全细胞模式下进行检测时，使用NeuroCult™ SM1与使用传统无血清培养基（TSFM）培养的神经元的电压门控钠电流是相当的。由斜坡试验（去极化细胞）记录200毫秒内从-80到0 mV的钠电流，电流用0.5 μM TTX进行阻断。

（B）在NeuroCult™ SM1中培养的神经元，其配体诱导的GABA_A受体电流正常，且与TSFM培养的神经元相当。通过直接将3 μM GABA快速对测试细胞作用2秒钟以诱发电流。使用添加NeuroCult™ SM1的NeuroCult™神经元基础培养基，和由聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养板，将E14小鼠皮质神经元培养14天。

NeuroCult™ SM1神经元培养试剂盒的优势:

- **专业:** NeuroCult™ SM1的配方可支持在原代神经元的长期培养中提高细胞存活率。
- **优化:** 培养物的神经突生长及分支数量均显著增加。
- **可靠:** 产品都要通过严格的质量控制测试。

产品名称	规格	产品号 #
NeuroCult™ SM1神经元培养基添加物 (50X)	10 mL	05711
NeuroCult™ SM1神经元培养试剂盒	500 mL*	05712

*试剂盒包含1瓶NeuroCult™ SM1神经元培养基添加物, 和5瓶NeuroCult™神经元基础培养基 (100 mL)。



技术公告

NeuroCult™ SM1, 用于原代神经元的长期培养

www.stemcell.com/sm1longtermtb

NeuroCult™ SM2

通过无需基质的神经元培养，减少实验中的差异性

NeuroCult™ SM2神经元培养基添加物是新一代神经元培养添加物，它可在无培养基质（如：聚-D-赖氨酸或层粘连蛋白）的支持下培养原代神经元。培养基质的质量、制备方法和包被流程的不一致都将显著影响神经元的培养。例如，低质量的基质可导致神经元存活率下降或细胞聚集体增加，若包被于组织培养皿上的基质不均匀，则会导致细胞的分布不均。NeuroCult™ SM2可消除由基质和培养基造成的差异性，并且采用与NeuroCult™ SM1相同的质量管理工艺流程。

相比在需要基质的条件下使用传统无血清培养基，添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基可支持培养数量相当的具活性神经元（图7），且从每个细胞上延伸出的神经突数量也相近（图8）。在无基质条件下使用NeuroCult™ SM2培养的神经元也具有相近的神经突平均长度（图9）和分支点平均数（图10）。

NeuroCult™ SM2培养的神经元产生的动作电位可由TTX可逆性阻断，并显示典型的配体诱导的GABAA受体电流特征（图11），都证明在该系统中培养的神经元功能成熟。

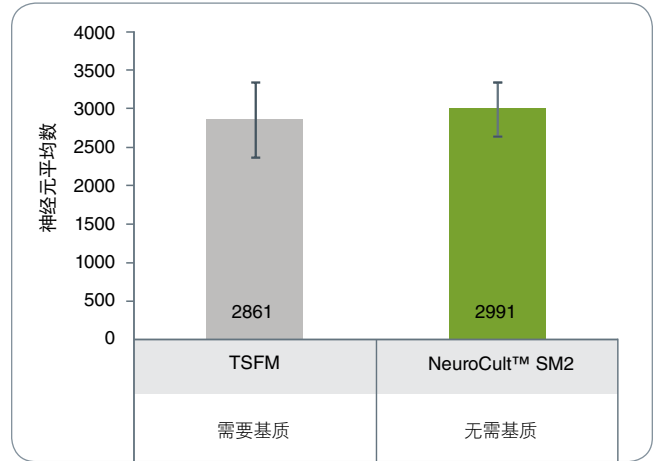


图7. NeuroCult™ SM2完全培养基可有效支持无需基质的神经元培养。

使用添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基和未经包被的组织培养板（无需基质），或使用传统无血清培养基（TFSM）和由聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养板（需要基质），分别将E14小鼠皮质神经元培养6天。用小鼠单克隆β-微管蛋白III抗体检测神经元，用DAPI染色检测细胞体（n = 9, 平均值 ± 标准误）。

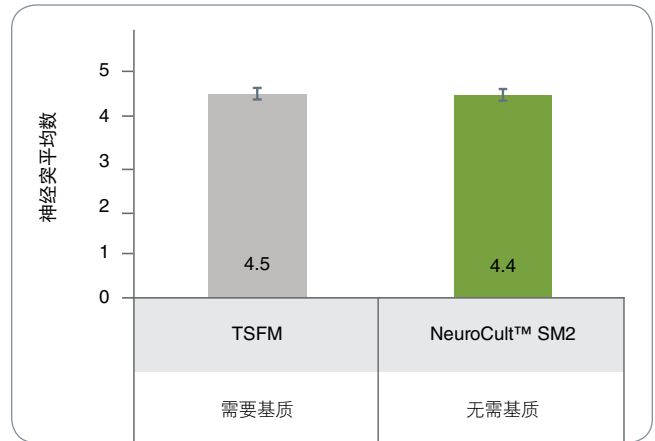


图8. 以NeuroCult™ SM2完全培养基无需基质培养的神经元，与以TFSM需要基质培养的神经元延伸出的神经突数量相当。

使用添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基、在未包被的组织培养板（无需基质）中，或使用传统无血清培养基（TFSM）、在由聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养板（需要基质）中，分别将E14小鼠皮质神经元培养6天。用小鼠单克隆β-微管蛋白III抗体检测神经元，用DAPI染色检测细胞体（n = 3, 平均值 ± 标准误）。



技术公告

对使用NeuroCult™ SM培养的神经元进行半自动神经突分析

www.stemcell.com/neuritetb

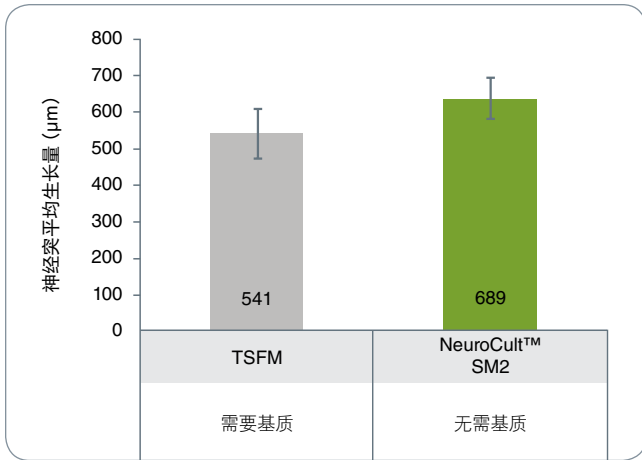


图9. 以NeuroCult™ SM2完全培养基无需基质培养的神经元, 与以TFSM需要基质培养的神经元上神经突的生长量相当。

使用添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基、在未经包被的组织培养板(无需基质)中, 或使用传统无血清培养基(TFSM)、在由聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养板中(需要基质), 分别将E14小鼠皮质神经元培养6天。用小鼠单克隆β-微管蛋白III抗体检测神经元, 用DAPI染色检测细胞体(n = 9, 平均值 ± 标准误)。

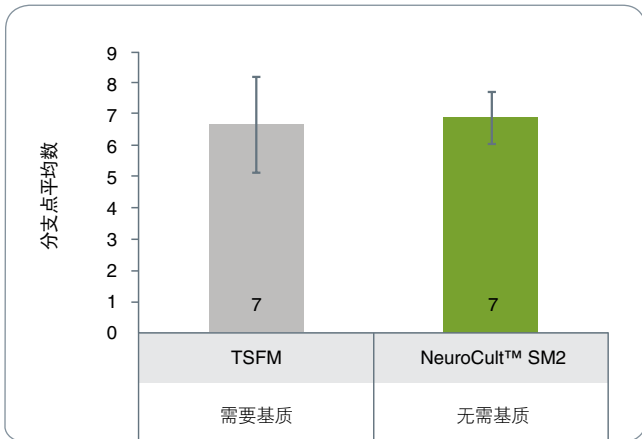


图10. 以NeuroCult™ SM2完全培养基无需基质培养的神经元, 与以TFSM需要基质培养的神经元上神经突分支点的数量相当。

使用添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基、在未经包被的组织培养板中(无需基质), 或使用传统无血清培养基(TFSM)、在由聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养板中(需要基质), 分别将E14小鼠皮质神经元培养6天。用小鼠单克隆β-微管蛋白III抗体检测神经元, 用DAPI染色检测细胞体(n = 9, 平均值 ± 标准误)。

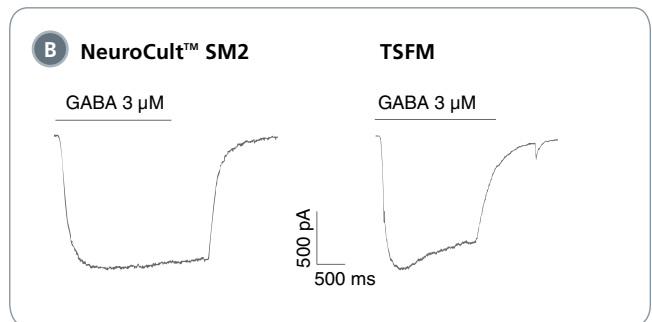
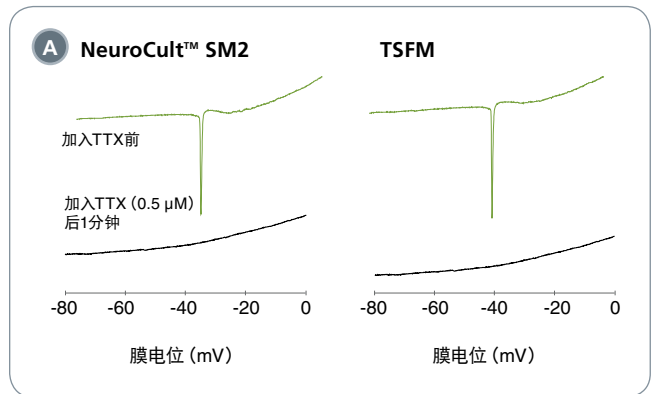


图11. 在NeuroCult™ SM2中培养的神经元的电生理学特征图示。

在NeuroCult™ SM2完全培养基中培养的神经元具功能活性, 当使用0.5 μM TTX时, 能够可逆性阻断其产生的动作电位, 并显示典型的配体诱导的GABA_A受体电流特征。(A) 当在全细胞模式下进行检测时, 使用NeuroCult™ SM1与使用传统无血清培养基(TFSM)培养的神经元的电压门控钠电流是相当的。由斜坡试验(去极化细胞)记录200毫秒内从-80到0 mV的钠电流, 电流用0.5 μM TTX进行阻断。(B) 在NeuroCult™ SM2中培养的神经元, 其配体诱导的GABA_A受体电流正常, 且与TFSM培养的神经元相当。通过直接将3 μM GABA快速对测试细胞作用2秒钟以诱发电流。在未经包被的盖玻片(置于24孔板中)上应用添加NeuroCult™ SM2的NeuroCult™神经元基础培养基, 将E18小鼠皮质神经元培养14天。

产品名称	规格	产品号 #
NeuroCult™ SM2神经元培养基添加物(50X)	2 mL	05721
NeuroCult™ SM2无需基质神经元培养试剂盒	100 mL	05722

*试剂盒包含1瓶NeuroCult™ SM2神经元培养基添加物, 和1瓶NeuroCult™神经元基础培养基(100 mL)。

其它产品

用于神经元研究的辅助产品

抗体

靶抗原	克隆	同型抗体	应用	类别	规格	产品号 #
神经标志物						
微管结合蛋白2 (MAP2)	AP20	小鼠IgG ₁	IF	纯化	200 µg	01410
神经类III β-微管蛋白	TUJ1	小鼠IgG _{2a}	IF	纯化	250 µL	01409
酪氨酸羟化酶	TH2	小鼠IgG ₁	IF	腹水	200 µL	01412
神经标志标志物						
胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)	-	兔多抗	IH、IF	纯化	200 µL	01415
	2E1.E9	小鼠IgG _{2a}	FC、IC、IF、WB	纯化	100 µg	60048
					25 µg	60048.1
少突胶质细胞标记物O4	O4	小鼠IgM	IH、IF	纯化	50 µg	01416
中枢/外周神经系统						
NGF受体, p75 (CD271)	MLR-2	小鼠IgG _{2a}	IH、WB	纯化	100 µg	01463
	MLR-2	小鼠IgG _{2a} , 荧光标记	IH、FC	纯化	50 µg	10428
	MC192	小鼠IgG ₁	IH	纯化	100 µg	01464
巢蛋白	Rat401	小鼠IgG ₁	IH、IF、IC、WB	纯化	100 µg	60051
					25 µg	60051.1
Sox-2	Poly6519	兔多抗	FC、IC、IF、WB	纯化	200 µL	60055
					50 µL	60055.1
神经干细胞标志物						
巢蛋白	Rat401	小鼠IgG ₁	IH、IF、IC、WB	纯化	100 µg	60051
					25 µg	60051.1
Sox-2	Poly6519	兔多抗	FC、IC、IF、WB	纯化	200 µL	60055
					50 µL	60055.1

*缩写: FC - 流式细胞术、IC - 免疫细胞化学、IF - 免疫荧光显微镜、IH - 免疫组织化学、WB - Western blotting、FITC - 异硫氰酸荧光素。

用于成人CNS组织的NeuroCult™酶解试剂盒

使用成人CNS组织的NeuroCult™酶解试剂盒，快速、可靠地获得功能和活性俱佳的神经元单细胞悬液。使用NeuroCult™对组织解离进行标准化，可以在进行检测或数据分析时，避免由细胞聚集成团、组织解离不完全或细胞活性低所引发的问题。

产品名称	规格	产品号 #
用于成年CNS组织的NeuroCult™酶解试剂盒 (小鼠和大鼠)	1试剂盒	05715

细胞因子

细胞因子	规格	产品号 #
Carrier-Free rh EGF	200 µg	02653
rh EPO	500 U	02625
Carrier-Free rh bFGF	25 µg	02654
rh bFGF	25 µg	02634
rh IGF-2	50 µg	02636
rh IL-6	10 µg 50 µg	02506 02606
rh IL-11	5 µg 25 µg	02511 02611
rh LIF*	10 µg	02642
rh OSM	10 µg 50 µg	02644 02844
rh TGF-β1	2 µg 10 µg	02647 02847

*LIF由Chemicon International Inc.制造。LIF受美国专利号5,187,077、5,427,925、5,443,825、5,750,654和6,261,548，欧洲专利号0285 448，以及其它国家相关专利的保护，不可转售。

参考文献

1. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serumfree medium combination. J Neurosci Res. 35: 567-576, 1993
2. Brewer GJ, Co™an CW. Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. Brain Res. 494(1):65-74, 1989
3. Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, Hell JW. NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. J Neurosci Methods 171(2):239-47, 2008
4. Cressey D. Neuroscientists claim growing pains. Nature 459: 19,

Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

中国上海市黄浦区南昌路45号城汇大厦17楼B单元，邮编200020

电话: 400 885 9050 • E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

欲了解全球联系方式，请访问公司网站。

STEMCELL Technologies Inc.的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用。

除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

文档号 #29898CN 版本 3.0.1 2016年7月

