

## 小鼠神经干细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-703

产品规格：3Tests/10Tests

### 一、产品描述

小鼠神经干细胞分离培养试剂盒是专为提取原代小鼠神经干细胞开发的。经验证，按照本试剂盒方法标准操作，1 Tests 可获得一瓶细胞（T25 培养瓶），细胞数 $>1 \times 10^6$  cells，按照 1:2 比例传代，可传代次为 2-3 次，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（Nestin） $>90\%$ 。

### 二、适用范围

本产品适用于从 1-2 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的小鼠中提取神经干细胞。组织经分离、消化、接种纯化 48 h 后可获得神经干细胞 $>1 \times 10^6$  cells。

**备注：**提取 10 只小鼠的完整脑组织（20 个完整的大脑半球），可获得一个 T25 培养瓶的细胞，具体需要的小鼠数量可能因取材获得的脑组织大小和数量不同而有所变化。

### 三、试剂盒组成成分

本试剂盒组分如下表：

成分名称	产品规格	性状	储存条件
小鼠神经干细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Mouse Neural Stem Cells	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
小鼠神经干细胞专用消化液 Specialized Digestive Solution For Mouse Neural Stem Cells	3Tests (24 mL) 10Tests (80 mL)	无色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
小鼠神经干细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Mouse Neural Stem Cells	3Tests (50 mL) 10Tests (100 mL)	红色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
小鼠神经干细胞添加剂 Supplement For Mouse Neural Stem Cells	3Tests (5mL) 10Tests (10mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃， 有效期一年
小鼠神经干细胞消化终止液 Digestion Termination Solution For Mouse Neural Stem Cells	3Tests (75 mL) 10Tests (250 mL)	红色澄清液体	2-8℃， 有效期一年
70 μm 细胞滤网 70 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	橙色	常温， 有效期三年
100 μm 细胞滤网 100 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	绿色	常温， 有效期三年

**备注：**

- 各成分请根据试剂管上标签所示的温度进行保存。
- 消化液解冻后 4℃ 保存 30 天，若需长期保存，需按单次用量分装并于 -5~-20℃ 冻存，使用时再次解冻，避免反复冻融。



## 四、注意事项

1. 正式实验之前，推荐使用1-2只正常小鼠进行解剖模拟训练，以熟悉操作流程，提升组织分离速度。
2. 整个分离操作过程中，建议将装组织的小皿放在冰盘/冰盒上（2-8°C）保持低温，但注意不要使组织和液体因温度过低而结冰，以免冻伤组织，影响提取效果。
3. 试剂配制或分装需严格遵循无菌操作规范。分装后立即用封口膜封口，即取即用，避免反复冻融或污染。
4. 建议使用未TC处理的T25瓶或6 cm皿培养细胞。如果没有，也可使用TC处理过的T25瓶，若出现细胞贴壁的现象，属于正常情况，轻敲培养瓶使贴壁细胞脱落并进行消化即可。

## 五、操作流程

### （一）实验前准备：

1. 实验需自备试剂和耗材：EP管架2个、冰盘/冰盒1个、PBS、手术器械（至少包含3把眼科剪、1把直镊、2把弯镊、1把显微直镊、1把显微弯镊）、6 cm/10 cm培养皿、T25培养瓶、解剖板（可用泡沫板替代）以及若干个2 mL/15 mL/50 mL离心管、无菌/灭菌滤纸（自行选择）。
2. 试剂解冻与复温：
  - 1) 小鼠神经干细胞专用消化液、小鼠神经干细胞添加剂：4°C冰箱解冻，恢复至室温；
  - 2) 小鼠神经干细胞专用清洗液、小鼠神经干细胞基础培养基、小鼠神经干细胞消化终止液：恢复至室温。
3. 小鼠神经干细胞完全培养基配制：将5 mL小鼠神经干细胞添加剂加入50 mL小鼠神经干细胞基础培养基，混匀后待用。

**备注：**小鼠神经干细胞完全培养基保存条件：2-8°C，有效期：3个月。配制完全培养基时可根据使用量进行配制，剩余添加剂需按照比例进行分装后，置于-5~20°C冰箱内保存，避免反复冻融。

### （二）解剖操作：

1. 动物消毒及处理：使用断头法处死动物后，喷洒75%医用酒精消毒。消毒完成后将动物头部转运至超净工作台内，进行后续操作。
2. 解剖取材步骤：
  - 1) 准备工作：将剪刀器械按照使用顺序从左向右依次排列在两个已消毒的EP管架上方：眼科剪1和直镊1，眼科剪2和弯镊2、眼科剪3和弯镊3。  
**备注：**将眼科剪和镊子成对放置，这些工具的前端约三分之一部位悬空放置，以避免与EP管架接触造成污染。每次使用后将剪镊放回原有位置，并确保它们之间不相互触碰，防止交叉污染。
  - 2) 取材操作：
    - ① 将剪下的头部放于一个新的无菌的培养皿内，向另一干净培养皿内加入10 mL小鼠神经干细胞专用清洗液，置于冰盒上。



- ② 使用直镊1以垂直方向夹住小鼠嘴部固定，用眼科剪1沿头骨中线剪开皮肤至鼻子；两侧向下剪至下颌处，将头部皮肤向两侧翻开，使头骨完全暴露。

**注：暴露出眼球。**

- ③ 使用直镊1以垂直方向夹住小鼠嘴部固定，换眼科剪2，将剪刀下侧刀刃从颈部脊椎处插入，上半刀刃在头盖骨上方，沿颅骨中缝剪开头盖骨。

**注：头部内侧的剪刀不要太深，应轻挑向上向前剪，不要离头盖骨过远，防止剪碎头盖骨下方的脑组织。**

- ④ 使用直镊1以垂直方向夹住小鼠嘴部固定，将眼科剪2与鼠平行放置，在颅底一侧刀刃沿颈部切面插入，一侧刀刃在头盖骨外，将两侧头盖骨与颅底连接处剪断，用弯镊2向两侧撕开头盖骨。

**注：镊子尽量只夹头盖骨，避免夹到脑组织，防止脑组织被夹碎或受到污染。**

- ⑤ 使用直镊1以垂直方向夹住小鼠嘴部固定，使用弯镊3轻轻挑起脑组织（需小心操作，脑组织脆弱，易夹碎、不完整），分离出完整脑组织，放在含10 mL小鼠神经干细胞专用清洗液培养皿内（如图1）。然后，将整个培养皿放在冰盘/冰盒上以保持低温环境。

**备注：在整个取材操作过程中，仅有第一套剪刀和镊子可以接触小鼠外部皮肤，其他器械严禁触碰外部皮肤及毛发，若有触碰，需更换无菌器械，以防污染。若操作时间较长，需不时观察并轻轻摇晃培养皿，防止组织和清洗液由于长时间接触冰盘/冰盒而结冰，冻伤组织，影响提取效果。**

### （三）组织处理及消化

#### 1. 组织处理：

- 1) 将显微直镊与显微弯镊放在超净台内的EP管架上方，前端悬空；
- 2) 用这套新的显微镊子，对脑组织进行操作：左手用显微直镊辅助固定脑组织，右手用显微弯镊两脚分别沿着三条黑色实线所示处夹紧显微镊，分离左右大脑与小脑（如图2）。
- 3) 翻转左右大脑（如图3），可见皮质与实质有明显分界线，清除大脑髓质（如图4），保留大脑皮层，放入另一含有10 mL小鼠神经干细胞专用清洗液的培养皿内。

- 4) 方案一：再次翻转左右大脑，将脑膜面朝上（如图5），用显微弯镊撕开一部分脑膜（如图6），夹住撕开的脑膜，左手适当辅助固定，向另一方向拉扯以撕下脑膜（如图7），留取纯净皮层组织。

**备注：撕脑膜时可以选择在大脑皮层血管较多处，右手用显微弯镊轻轻夹住并提起以撕开部分脑膜。此步不易操作，需要耐心观察，小心撕下。需将脑膜组织完全清除，否则影响细胞纯度。**

方案二：将灭菌后的滤纸铺在培养皿，用显微镊将大脑皮层组织转移至滤纸上，使用显微镊在滤纸上翻滚皮层组织，1-2圈后即可看到红色脑膜部分从皮层组织上分离开，剩下组织即为纯净皮层组织。

- 5) 将组织转移至2-3个2 mL离心管内，分别加入0.5 mL小鼠皮层神经干细胞专用清洗液，使用眼科剪3将皮层组织快速剪碎至1 mm<sup>3</sup>碎块（此过程大约需要剪200次），用5 mL移液枪或巴氏吸管将组织转移至15 mL离心管内，加入10 mL小鼠神经干细胞专用清洗液重悬沉淀，将离心管置于离心机（常



温)中,经1200 rpm,离心1 min,丢弃上清,保留沉淀。

## 2. 组织消化:

- 1) 向离心管内加入8 mL小鼠神经干细胞专用消化液,轻柔混匀后将离心管管口缠上封口膜,将离心管放入37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱内消化5 min。
- 2) 消化结束后取出离心管,放入37°C水浴摇床内150 rpm消化15 min。
- 3) 预先准备好一个新的50 mL离心管,加入20 mL小鼠神经干细胞消化终止液,上一步消化15 min结束后,用5 mL移液枪或巴氏吸管将消化好的组织与消化液轻轻吹打10次,吸取至预先准备好的有20 mL小鼠神经干细胞消化终止液的50 mL的离心管中,轻柔吹打20次,可见液体中无明显组织块。

**备注:**第一次吹打时组织液体非常黏稠,不易吸出,吹打数次后黏稠度会减弱。

- 4) 将**100 μm细胞滤网**、**70 μm细胞滤网**放置在两个全新的50 mL离心管管口,使用**小鼠神经干细胞专用清洗液**润洗100 μm细胞滤网、70 μm细胞滤网。
- 5) 用5 mL移液枪或巴氏吸管小心吸取上一步中的组织消化悬液,分别通过100 μm细胞滤网和70 μm细胞滤网进行过滤,过滤完成后,可用干净枪头向滤网上方缓慢加入3-5 mL小鼠脑微血管内皮细胞专用清洗液来收集滤网上的组织消化悬液,收集滤液于50 mL离心管内。

**备注:**过滤标准:悬液容易通过筛网,无大量胶状物质。若在此步骤中遇到悬液过滤缓慢或无法过滤的情况,可能是由于细胞筛与离心管管口贴合太紧,此时可以尝试将细胞筛稍微倾斜放置在50 mL离心管上,以改善这一现象。

- 6) 将上一步的50 mL离心管410 g离心5 min;弃上清,加入10 mL**小鼠神经干细胞专用清洗液**重悬沉淀,将细胞悬液转移至另一干净的15 mL离心管内,230 g离心5 min,弃上清,保留沉淀。

## (四) 细胞培养:

1. 细胞接种:取出T25瓶,用5 mL小鼠神经干细胞完全培养基重悬离心管内沉淀,接种于T25细胞培养瓶,于37°C, 5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中静置培养48 h以上。48 h后收集上清内的神经干细胞,纯度经本实验室验证可以达到90%以上。
2. 细胞换液:每2-3天对细胞进行换液。吸取培养瓶内上清于15 mL离心管内,1200 rpm离心3 min,弃上清,用新的完全培养基重悬细胞后,转移至培养瓶内。
3. 细胞传代:待神经干细胞球中心开始颜色变暗后可以传代。具体传代操作如下:
  - 1) 收集T25瓶内的细胞悬液至15 mL无菌离心管内,1200 rpm,离心3 min,弃上清;
  - 2) 加入2 mL PBS重悬一次,进行清洗,1200 rpm,离心3 min,弃上清,收集沉淀;
  - 3) 向离心管内添加1 mL Accutase消化液,用移液枪枪头轻轻吹打重悬后,置于4°C冰箱消化15-20 min;
  - 4) 15-20 min后,往里面加入5 mL PBS终止消化,用移液枪轻轻吹打,分散神经干细胞球;
  - 5) 将吹散后的细胞悬液1200 rpm离心5 min,弃上清,收集细胞沉淀;
  - 6) 加入5 mL完全培养基重悬,按照所需比例进行传代接种,然后补充完全培养基至5 mL。置于37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱内进行培养。



## 六、常见问题

问题	可能原因	解决方法
细胞得量少	消化不充分	检查消化液保存条件，确保4°C存放时间没有超过30天
		确保组织量和试剂盒要求一致
		确保组织轻柔吹打充分
	消化过度	严格控制两步消化时间
组织不够新鲜	组织取材速度加快，防止组织放置过久	
	确保取材后组织一直处于低温状态	
细胞增殖缓慢	培养基配置不当	确保完培配置比例正确，没有反复冻融 确保完培在有效期内，配置时间没有超过三个月
	小鼠日龄过大	确保小鼠日龄在1-2天，日龄过大容易出现细胞增殖速度慢、细胞传代次数减少的情况
	传代比例不当	1:2传代时确保是按照器皿底面积进行换算，保证细胞初始接种数量
	传代次数过多	确保细胞传代次数为2-3次，传代次数增加，细胞可能会增殖变慢

## 七、解剖图片



图1 分离的脑组织

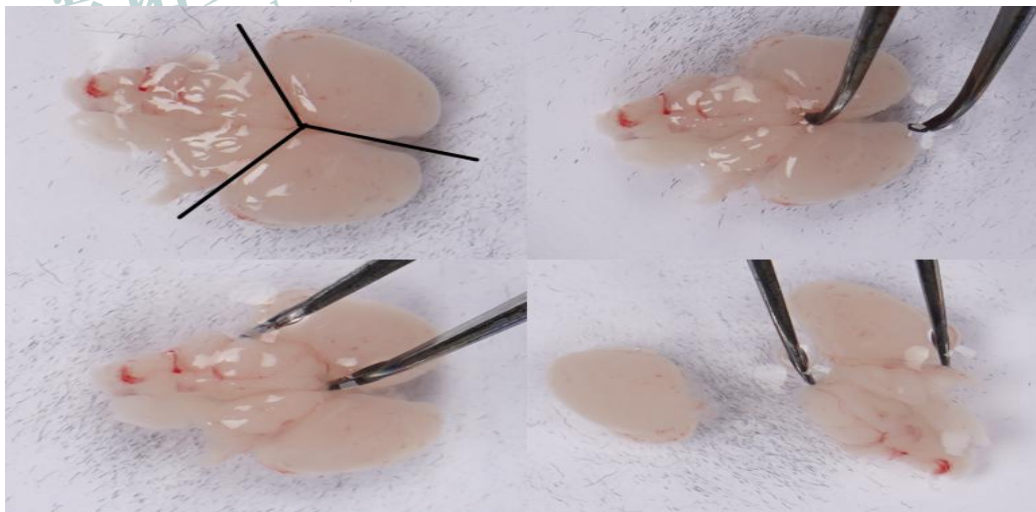


图 2 分离小脑与大脑





图 3 翻转左右大脑



图 4 分离实质，留取大脑皮层



图5、再次翻转左右大脑，皮层面朝上



图6、撕开部分脑膜

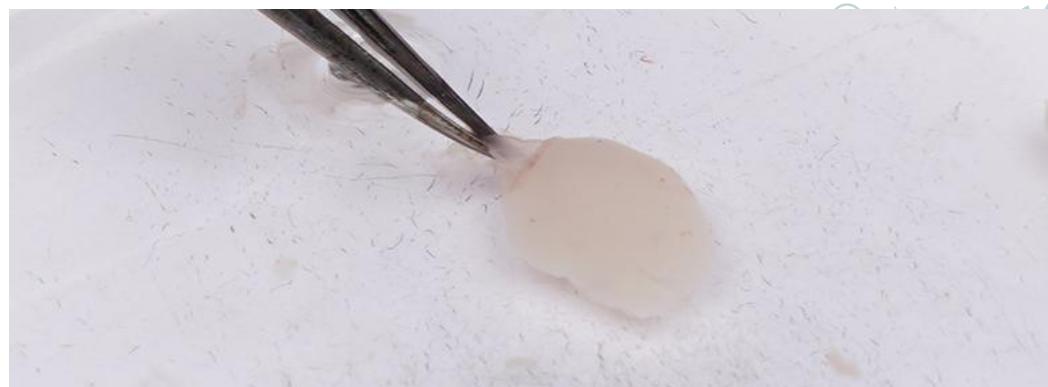


图7、左手辅助固定脑组织，右手使用解剖镊撕下脑膜

