UOXINTE

Neurosight®

产品说明书

目录

1. 产品信息 2
拆箱&管理 2
产品&描述 3
注意事项&用户须知 5
2. 介绍 6
3. 细胞培养前准备 7
所需材料设备和耗材 (未提供) 7
Neurosight®培养基制作 7
细胞培养皿准备 8
4. Neurosight®复苏与铺板 9
细胞复苏 9
细胞铺板 10
5. Neurosight® 维持 11

1. 产品信息

拆箱&管理

- 收到 Neurosight®产品后，请检查内容物是否均处于准确的冷冻状态。如果不是，请立即联系我们。
- 将产品迅速转移至适当的存储环境。
- 请检查产品目录号、批号和有效期。其中基础培养基的有效期最短 (有效期在标签上)，因此请合理安排实验计划。
- Neurosight®应由符合良好实验室规范和适用 MSDS (产品安全技术说明书)的技术合格人员进行操作。建议遵循产品说明书以获得最佳结果。
- Neurosight®仅供研究使用，不适用于动物和人类诊断或治疗用途。

产品&描述

产品	货号	运输温度
Neurosight®, hiPSC-人源神经细胞 (冻存管) > 2 × 10⁶ 细胞 > 4 × 10⁶ 细胞	 N-001 N-002	液氮
Neurosight®维持基础培养基 50 ml 100 ml	 NM-001 NM-002	-20°C
Neurosight®维持补充剂 0.5 ml 1.0 ml 0.15 ml 0.25 ml	 NS-001 NS-002 NS-013 NS-014	-20°C
Neurosight®EP 基础培养基 (MEA*) 50 ml 100 ml	 NM-003 NM-004	-20°C
Neurosight®EP 维持补充剂(50X) (MEA*) 1 ml 2 ml	 NS-003 NS-004	-20°C
Neurosight®铺板培养基 (MEA*) 20 ml	 NM-010	-20°C
Neurosight® 产品说明书 [1]		
Certificate of Analysis (CoA)		
MSDS[2]		

[1] 可在官网 www.nuoxinte.com 下载。

[2] 运输货件中附带。

- 如果您的货件中缺少上述任何产品，请联系我们，售后团队将提供必要的帮助。

Neurosight®, hiPSC-神经细胞

细胞类型	人源诱导多能干细胞(hiPSC)衍生的神经细胞
细胞系来源	hiPSC 细胞系由正常成纤维细胞系重编程获得
质量控制	请参阅 CoA 了解批次特定信息。可根据要求提供病毒清除和 STR 分析数据。

Neurosight®培养基& 补充剂

- Neurosight®维持基础培养基&补充剂需要混合制成最终培养基, 且应在 1 个月内使用。请勿冷冻，混合后分装储存，以获得最佳效果。
- 上述内容也适用于 Neurosight®EP 基础培养基和补充剂以及 Neurosight®铺板培养基。
- Neurosight®维持培养基不含血清。 有关培养基成分的更多信息，请联系我们的技术团队。
- Neurosight®维持培养基不含抗生素和抗真菌剂。只要保持适当的条件，不需要这些试剂。NUOXINTE 不建议使用此类试剂来获得实验结果，但如果无法实现无菌细胞培养条件，则应使用。

注意事项 & 用户须知

生物安全等级: 1

仅供研究使用，不适用于动物或人类诊断或治疗用途。本产品应始终采用适当的安全程序。详细说明请参考 MSDS。

用户须知 & 限制:

- 用户可以使用产品 (Neurosight®) 进行内部研究，包括但不限于筛选潜在药物的功效和安全性，以及向第三方提供此类服务。 未向用户授予任何其他权利，无论是明示、暗示、禁止反言或其他方式。特别是，购买本产品不包括也不附带任何使用、开发或以其他方式商业利用本产品的权利或许可，并且不向用户转让将本产品用于任何其他目的的权利。
- 用户同意按照所有适用的法律和法规使用本产品，但不得将本产品用于人的任何管理或应用。 此外，用户同意不会将本产品用于人类临床治疗、诊断和预防，或兽医用途的动物中用于治疗、诊断和预防，包括但不限于临床应用、细胞治疗、移植和没有适当许可的再生医学。
- 如果用户将产品转让给第三方，应将本协议规定的用户须知&限制一起传达。

2. 介绍

诺欣特生物技术(苏州)有限公司致力于利用独有的分化方法提供人源诱导干细胞 (hiPSC) 衍生高质量神经细胞。Neurosight®是高纯度且具有电生理活性的细胞，适用于神经研究领域所有类型的实验。因此，NUOXINTE 希望 Neurosight®产品成为帮助推动组织特异性研究、毒性筛选、功效测试和药物发现方面的完美选择。

本产品说明书将帮助您以适当的密度接种 Neurosight®，创建由功能神经元组成的成熟神经元网络，可检测电生理相关的各种应用，包括细胞内钙流、MEA 检测以及神经突增生或变性。请记住，最好的结果是通过用户的密切观察、关心和优化来获得的。Neurosight®的形态示例图可参考下面 (图 1)。

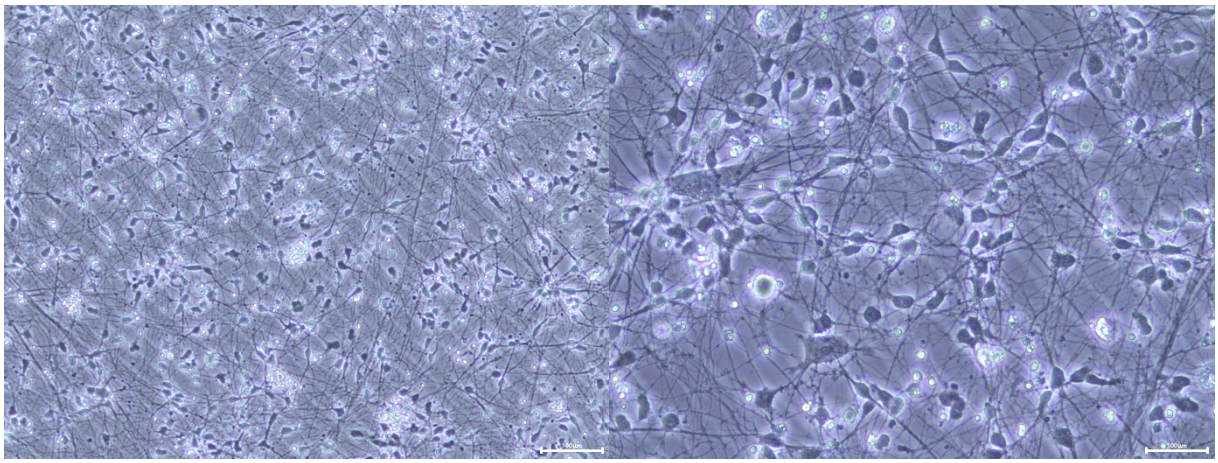

图 1. Neurosight®在培养第 14 天时的形态。 图像分别在 100 倍 (左) 和 200 倍 (右) 数下拍摄

3. 细胞培养前准备

所需材料设备和耗材 (未提供)

物品	货号	公司
包被溶液 Poly-D-Lysine Laminin	 A3890401 354232	 Gibco Corning
细胞培养设备 液氮罐 37°C水浴锅 离心机 生物安全柜 (带紫外线) 细胞计数器 显微镜 移液器 细胞培养箱		
细胞培养耗材 离心管 细胞培养皿 移液器吸头 台盼蓝 (Trypan Blue) PBS 缓冲液		

Neurosight®培养基制作

1. 请提前 24 小时置于 4°C 下解冻。
2. 在生物安全柜中，将维持补充剂添加到维持基础培养基中制成相应的 Neurosight®维持培养基。 补充剂添加后，可在 4°C 下保存长达 1 个月。请勿冷冻保存 Neurosight®维持培养基。

   为了避免由空气接触或反复加热/打开而导致培养基氧化，建议将培养基分装保存。

培养基种类	组成
Neurosight®维持培养基	Neurosight®维持基础培养基 Neurosight®维持补充剂
Neurosight®EP 维持培养基 (MEA*)	Neurosight®EP 维持基础培养基 Neurosight®EP 维持补充剂 Neurosight®维持补充剂
Neurosight®铺板培养基 (MEA*)	Neurosight® 铺板培养基

细胞培养皿准备

1. 请参考以下表格，计算所需包被溶液的体积。

细胞培养皿	6-well (9.6 cm^2)	12-well (3.8 cm^2)	24-well (1.9 cm^2)	48-well (1.0 cm^2)	96-well (0.33 cm^2)	**MEA 48-well Plate**
包被体积 (1well)	1 ml	500 µl	300 µl	100 µl	50 µl	**50 µl**

2. 将适量的 Poly-D-Lysine 溶液移至每个孔中。轻轻旋转培养皿并检查是否完全覆盖。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，请勿旋转。
3. 将培养皿方放置 37°C 培养箱中孵育过夜。
4. 第二天，吸走孔中的 Poly-D-Lysine 溶液。
5. 利用 PBS 冲洗两次。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，请放置在生物安全柜中完全干燥（2 小时以上）。
6. 请参考以下表格，将包被溶液 Laminin 稀释成工作浓度。稀释后请立即使用，或可放 4°C 下储存一段时间，但不建议。

包被溶液种类	**保存浓度**	**工作浓度**
Laminin	检查标签上的浓度	5 µg/ml

7. 将稀释好的包被溶液 Laminin 按规定体积添加到要使用的培养皿中。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，我们建议将 5 µl Laminin 溶液添加到电极顶部。
8. 轻轻旋转培养皿并检查包被溶液是否完全覆盖。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，请勿旋转。
9. 37°C 培养箱中孵育至少一小时。
   - NUOXINTE 复苏细胞前平均孵育 4 小时。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，包被溶液也需要孵育一小时。更多详细信息请参阅“Neurosight® Axion Maestro MEA 说明书”。

4. Neurosight®复苏与铺板

细胞复苏

Neurosight®可以使用传统的细胞复苏方案。在这里我们介绍 NUOXINTE 的优化方案，可最大限度提高细胞复苏率。 我们推荐每次解冻 1 管细胞，尽量减少细胞与 DMSO 的接触时间。.

1. 室温 (25°C)下放置 Neurosight®维持培养基至少 30 分钟。
2. 吸取 8 ml 培养基分装到 15 ml 离心管中。
3. 从液氮罐中小心地取出 Neurosight®。
4. 将 Neurosight®冻存管的 2/3 浸入到 37°C 水浴锅中。避免瓶口与水接触，并检查细胞解冻情况。待解冻到 80% (约 3 分钟) 的时候将冻存管取出，用 70% 酒精擦拭并放入生物安全柜中。 理想情况下，冻存管应该在开始第 5 步骤时完全解冻。
5. 打开冻存管，使用 1 ml 移液器将细胞 (约 1 ml) 逐滴转移至分装好的 8 ml Neurosight®维持培养基中，并轻轻旋转离心管。
   - 逐滴转移并旋转离心管的目的是最大限度地减少渗透冲击并确保细胞与液体充分融合，从而确保细胞活力。逐滴转移时需将移液器缓慢放到培养基上方约 1 厘米，慢慢滴入。
6. 加入 1 ml Neurosight®维持培养基到冻存管中，将剩余细胞一并转移至步骤 5 中的离心管中。
7. 将离心管在室温下以 180 x g 离心 3 分钟。.
8. 小心地吸走上清液。
9. 加入 1 ml Neurosight®维持培养基轻轻吹打，重悬细胞。利用细胞计数器和台盼蓝检查细胞的浓度。 立即进入下一步骤-细胞铺板。
   - 避免对细胞进行重复吹打降低其活力。可通过轻轻吹打 3~4 次实现细胞重悬。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，加入 1ml Neurosight®铺板培养基 (MEA*)。

细胞铺板

NUOXINTE 建议以约 100,000 个细胞/cm2 的密度接种 Neurosight®。可根据用户自己需求的优化，NUOXINTE 也将尽力提供更多的帮助。

1. 不同培养皿所需的细胞数量如下表格所示，请根据活细胞的数量计算计算每个孔要添加细胞重悬液体积。

细胞培养皿	6-well (9.6 cm^2)	12-well (3.8 cm^2)	24-well (1.9 cm^2)	48-well (1.0 cm^2)	96-well (0.33 cm^2)	**MEA 48-well Plate**
铺板容量/well	2 ml	1 ml	500 µl	300 µl	200 µl	300 µl
细胞数/well	960,000	380,000	190,000	100,000	33,000	100,000

- Ex) 活细胞数为 4.0×10^6 个细胞/瓶

  如果是 6 孔版，则 $0.96\times1000\div4 = 240$ (µl)，因此每个孔添加 240 µl 细胞重悬液。
- 不同供应商之间培养皿的面积 (cm^2) 有所不同，请咨询您的供应商以获取准确数据。

2. 首先，除去培养皿中的包被溶液，尽可能避免变干。
3. 将 Laminin 与相应铺板容量的 Neurosight®维持培养基混合制成 1 µg/ml 浓度，并添加到培养皿中。
4. 按照计算好的体积，将细胞重悬液加入至培养皿中 (铺板体积减去细胞重悬液体积)。
   - 避免时间过长导致细胞沉淀，导致铺板不均匀。可轻轻摇晃离心管使细胞维持悬浮。
5. 将培养皿转移到 37°C 培养箱中，垂直左右摇动，使细胞均匀分布在每个孔中。
6. 第二天，用 Neurosight®维持培养基进行第一次换液 (Neurosight®维持步骤)。

***对于 MEA 48 孔培养皿，请按照以下铺板方案。**

1. 计算接种所需的细胞数。

2. 将细胞重悬在 Neurosight®铺板培养基 (MEA*)，最终浓度为每 1.0 x 10^5 个细胞 / 5 µl。

3. 小心地除去 Laminin 包被溶液，并立即将 5 µl 细胞悬浮液添加到包被区域。

4. 每个孔添加完后，MEA 48 孔培养皿在生物安全柜中室温孵育至少 30 分钟。

5. 待细胞贴壁，小心添加 300 µl Neurosight®铺板培养基 (MEA*)。

6. 将培养皿放入培养箱中。

5. Neurosight®维持

细胞种铺板后 24 小时后进行第一次换液，此后细胞每 48 小时换一次液。 当对细胞进行电生理检测时，我们建议在实验当天早上进行换液，确保细胞有足够的营养维持高药物反应性。

1. 将适当的 Neurosight®维持培养基在 37°C 水浴或室温下加热至少 30 分钟。
2. 在更换培养基之前，添加 Laminin 到 Neurosight®维持培养基至最终浓度为 1 µg/ml。
3. 在生物安全柜中进行细胞换液。将移液吸头贴到培养皿壁上，轻轻加入 Neurosight®维持培养基，避免对细胞造成任何损伤。
   - 半量换液对于神经元细胞培养至关重要, 可以防止细胞暴露在空气中损害神经元。如果细胞暴露在空气中，几天内就会看到细胞死亡。其次，半量换液可以防止细胞分泌的因子被清除，可以提高细胞质量。半量换液示例：每个孔 1 ml 培养基，取出 400 µl 并添加 500 µl。
   - 在执行半量换液时，保持培养皿平坦至关重要。 在换液过程中倾斜培养皿可能会导致细胞向倾斜方向聚集。
   - 对于 MEA 48 孔培养皿，请在铺板 24 小时后用 EP 维持培养 (MEA*)基进行全量换液。请使用移液器吸出液体，不要倾斜培养板。请留下少量培养基，以免细胞与空气接触。然后轻轻添加 EP 维持培养基 (MEA*)。 全量换液以后每隔 48 小时执行半量换液。
4. 将培养皿放回培养箱中。
5. 每隔 48 小时重复步骤 1-3。

我们建议从维持第 14 天起利用 Neurosight®进行检测实验。超过 28 天后的长期培养，可能导致细胞聚集或脱落。建议维持细胞时请仔细观察。我们不建议对神经元细胞进行传代，因为成熟的神经元非常脆弱，可能导致细胞死亡。