



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)

产品编号	产品名称	包装
C0349-10ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	10ml
C0349-50ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	50ml

### 产品简介:

- 碧云天生产的B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A), 即B27无血清添加剂(无维生素A), 也被称为B27 Supplement (without Vitamin A)、B-27 supplement (without Vitamin A)、B-27 Supplement without Vitamin A (50X)、B27添加剂(不含维生素A)、B27添加剂(去除维生素A)、B27无血清添加剂(不含维生素A), 是一种经优化的、在完整B27 Supplement的基础上去除维生素A的神经干细胞培养添加剂, 可广泛用于支持海马及其它中枢神经系统(CNS)神经干细胞的生长, 维持其短期或长期生存活性[1-4]。B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)是培养神经祖细胞和神经干细胞的理想选择, 无论是悬浮培养还是单层贴壁培养都不会诱导神经细胞的分化, 在研究神经发育/分化及干细胞在遗传/退行性疾病替代疗法中的作用方面具有广泛应用。
- B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)以50X液体形式提供, 可与Neurobasal、Neurobasal-A、DMEM/F12或DMEM(低糖)培养基配合使用进行神经干细胞的正常培养、生长, 无需星形胶质细胞滋养层[1]。
- 本产品B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)经严格的质量控制和过滤除菌处理, 不含血清, 由参与神经干存活、突触成熟、神经突起延伸的高品质抗氧化剂、多种细胞因子等组分配制而成, 不含维生素A, 具有极高品质, 可实现高效培养多种类型的神经干细胞, 并在长期培养条件下提高神经干细胞的生存活性[2,3]。
- 用途: 用于中枢神经系统(CNS)、周围神经系统(PNS)、胚胎/成体神经干细胞(NSC)或神经前体细胞的无血清生长和活力维持; 神经细胞基础培养基的添加剂; 干细胞增殖与分化; 维持神经细胞来源的肿瘤细胞系活性; 优化产前和胚胎神经干细胞的活性和长期存活率; 扩增来自小鼠胚胎纹状体和中脑的EGF响应性前体细胞; 胚胎干细胞分化为神经元谱系(神经元和星形胶质细胞); 胚胎大鼠纹状体、黑质、鼻中隔和皮质以及新生儿小脑(胎儿和成人)神经干细胞的存活; 添加β-FGF后可用于皮质神经干细胞的生长和维持。
- 碧云天B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)用于培养原代神经元细胞的实验流程请参考图1。

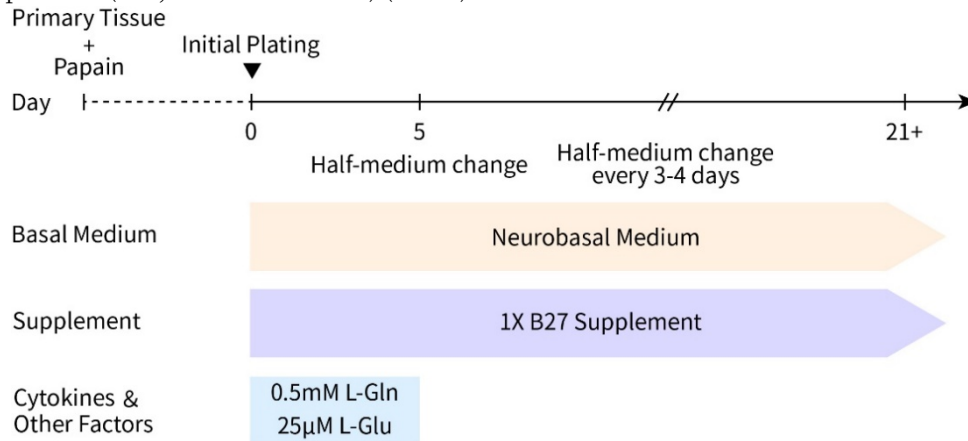


图1. 碧云天B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)用于培养原代神经元细胞的实验流程图。如图所示, 建议在含有1X B27 Supplement及L-谷氨酰胺的Neurobasal培养基中添加终浓度为25µM的L-谷氨酸, 用于原代神经元细胞的初始接种; 培养4天后, 需在不含L-谷氨酸的条件下进行培养基的更换和原代神经元细胞的长期培养。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0349-10ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	10ml
C0349-50ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	50ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 两年有效。

## 注意事项:

- 本产品已经过滤除菌处理, 使用时应注意无菌操作, 避免污染。
- 如果发现本产品出现浑浊、沉淀等现象, 则不能继续使用, 同时请检查使用或保存时是否有环节造成污染, 后续请注意避免。
- 根据实验需求, 建议对本产品进行适量分装冻存, 避免反复冻融, 以免影响使用效果。
- 本产品不含维生素A, 如果额外添加维生素A, 其使用效果与B27 Supplement (50X, Serum-free) (C0350)一致。
- L-Ala-Gln与L-Gln可以向碧云天采购: C0211 L-Ala-Gln (100X)、C0212 L-Glutamine (100X)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. 完全培养基的配制

- 收到本产品后请立即按照说明书推荐的条件进行保存。使用时需将本产品放置于4°C解冻, 并进行分装冻存, 避免反复冻融影响神经干细胞生长和活力维持的效果。
- 参考下表, 按比例配制完全培养基。

Reagent	Volume (ml)
B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	2
200mM L-Gln/L-Ala-Gln	0.25
Neurobasal Medium	97.75
Total Volume	100

**注1:** B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)与Neurobasal Medium配合使用, 适用于产前和胚胎神经细胞的生长和活力维持; B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)与Neurobasal-A Medium配合使用, 适用于新生和成年神经细胞的生长和活力维持; B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)与DMEM/F12配合使用, 可用于支持中枢神经系统(CNS)、周围神经系统(PNS)、胚胎和成体神经干细胞(NSC)或神经前体细胞的无血清生长。

**注2:** 请根据实际需求配制相应体积的完全培养基, 并尽快使用, 或放置于2-8°C避光保存使用2-4周; 剩余的完全培养基建议适当分装冻存于-20°C, 后续随取随用, 避免反复冻融。

**注3:** 用于原代海马神经元细胞初次接种时, 需在完全培养基中额外添加终浓度为25μM的L-谷氨酸; 培养至第4天, 需使用不添加L-谷氨酸的完全培养基用于后续原代海马神经元细胞的生长培养和活力维持。

**注4:** 推荐使用碧云天生产的L-Ala-Gln (100X) (C0211)或L-Glutamine (100X) (C0212)用于完全培养基的配制。

**注5:** 进行神经前体/干细胞(NSC)的培养过程中, 除了需添加B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A), 还需添加无菌的EGF和bFGF, 以防止NSC的自发分化。建议使用含0.1% BSA的PBS溶液将生长因子配制成浓度为500μg/ml的储存液, 并按需分装冻存于-20°C, 随取随用; 使用前快速解冻, 并按照终浓度10-20ng/ml加入到完全培养基中用于神经前体/干细胞(NSC)的培养。

### 2. 神经干细胞(NSC)的分离和培养

请参考以下步骤从E14-18 (妊娠第14-18天)的大鼠胚胎皮层、纹状体、中脑、丘脑、脊髓或海马组织中分离神经干细胞(NSC)。

- 在无菌条件下, 将所需区域的胚胎CNS或PNS组织收集到装有冷的不含钙和镁离子的Hanks平衡盐溶液(HBSS)的无菌10cm<sup>2</sup>培养皿中。

**注:** 推荐使用碧云天生产的Hanks' Balanced Salt Solution (with Ca<sup>2+</sup> & Mg<sup>2+</sup>) (C0219)及BeyoGold™系列细胞培养皿。

- 使用新的无菌硅化玻璃巴斯德移液管将每个组织分别转移到含有3ml生长培养基的无菌15ml离心管中。
- 轻轻研磨组织20-30次, 直至悬浮液浑浊并只剩下非常小的碎片, 以使组织充分解离。随后将试管直立放置1分钟, 让碎片缓慢沉降离心管底部。

**注:** 请勿用力或快速研磨, 以免起泡或损伤神经干细胞。

- 使用新的无菌硅化玻璃巴斯德移液器, 将悬浮液转移到新的无菌15ml离心管中。

**注:** 请不要吸取和转移已沉降到管底部的未解离碎片。

- 将细胞悬浮液100×g, 离心10分钟, 弃去上清液, 随后轻弹管底部以分散沉淀中的细胞。
- 将细胞重悬于1-2ml经预热的完全培养基中, 并吸取少量细胞重悬液用细胞计数仪测定活细胞的数量和密度。
- 使用预热的完全培养基, 按照2.5-5×10<sup>4</sup>个活细胞/cm<sup>2</sup> (单层贴壁培养)或1×10<sup>5</sup>个活细胞/ml (悬浮培养)的密度接种细胞。

### 3. 单层贴壁培养

- 使用经预冷、无菌且终浓度为0.015mg/ml的多聚赖氨酸溶液(poly-D-lysine, MW30,000-70,000) (ST508)对培养表面(细胞培养级的玻璃片或培养皿表面)在37°C下放置过夜进行包被。

- 去除多聚赖氨酸溶液, 并用无菌的且不含钙或镁离子的D-PBS (C0221D)反复冲洗两次, 尽可能去除残留的多聚赖氨酸溶液。

**注1:** 由于多聚赖氨酸对细胞具有一定毒性, 因此需彻底去除。

**注2:** 每次洗涤可在37°C条件下孵育20分钟。

- 将溶解于不含钙或镁离子的D-PBS (C0221D)溶液中的1mg/ml的纤连蛋白加入到培养表面, 并放置于37°C孵育1-24小时。

- 吸出纤连蛋白溶液, 用不含钙或镁离子的D-PBS (C0221D)洗涤一次。

**注:** 培养皿可与不含钙或镁离子的D-PBS (C0221D)一起在37°C储存4天; 使用前需用完全培养基冲洗培养表面。

- 根据标准实验室操作流程从胚胎14-18天的大鼠中分离神经干细胞。

- f. 将配制好的完全培养基放置于37°C进行预热，并按照实验目的接种所需密度的神经干细胞。  
注：建议按照 $2.5-5 \times 10^4$ 个活细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种细胞；或自行优化细胞接种密度。
- g. 将接种了细胞的培养皿放置于37°C，5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。
- h. 当细胞培养覆盖度达到50-70%时需进行细胞传代。
- i. 用细胞铲(cell lifter)轻轻刮下细胞，并将细胞转移到无菌离心管中，进行100×g离心10分钟，弃去上清。  
注：推荐使用碧云天生产的BeyoGold™ 21cm细胞铲(独立纸塑包装，无菌)(FLFT021)进行培养表面细胞的刮取。
- j. 使用1-2ml经37°C预热的完全培养基将细胞沉淀轻轻重悬，并吸取少量细胞重悬液用细胞计数仪测定活细胞的数量和密度。
- k. 使用预热的完全培养基，按照合适的密度接种细胞，并将接种了细胞的培养皿放置于37°C，5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

#### 4. 神经球悬浮培养

- a. 当悬浮培养2-6天，神经球直径达到约100μm时，收集神经球并将其转移到新的无菌离心管中。
- b. 将收集的细胞液进行100×g，离心10分钟，弃去上清液。
- c. 将神经球重悬于1ml新鲜预热的完全培养基中，并使用小口径吸头移液器轻轻反复吹打重悬液，以使神经球机械解离。  
注：请勿用力或快速吹打，以免起泡或损伤神经球。
- d. 吸取少量细胞重悬液用细胞计数仪测定神经球的数量和密度。
- e. 使用新鲜预热的完全培养基，按照 $1 \times 10^5$ 个活细胞/ml的密度进行细胞接种。
- f. 将接种的细胞放置于37°C，5% CO<sub>2</sub>的恒温摇床中培养。

#### 5. 神经干细胞(NSC)的分化

使用去除生长因子、添加了完整B27 Supplement (50X, Serum-free) (C0350)和200mM L-Gln/L-Ala-Gln的Neurobasal培养基，替换上述连续培养所用的完全培养基，并将神经干细胞接种到强粘附基质的培养表面，可实现神经干细胞到神经元的自发分化。

### 常见问题：

#### 1. 几种配方的B27无血清添加剂有什么区别？

B27 Supplement (50X, Serum-free) (C0350)是用于多种类型神经元细胞长期生长和活性维持的完整配方；B27 Supplement (50X, Minus Antioxidants) (C0347)去除了抗氧化剂成分，是用于研究氧化损伤，细胞凋亡，神经元自由基损伤的首要选择；B27 Supplement (50X, Minus Insulin) (C0348)去除了胰岛素，是用于支持在额外添加胰岛素的情况下对海马和其他CNS神经元生长状态的研究；B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)去除了诱导神经元细胞分化的维生素A，是用于神经干细胞生长和增殖的理想选择[4]。

#### 2. B27无血清添加剂与N-2无血清添加剂有什么区别？

B27添加剂主要用于神经干细胞及各类型神经元细胞的生长和活性维持；N-2添加剂主要用于培养神经母细胞瘤或来自PNS/CNS的有丝分裂后的神经元细胞。且与ITS或N-2添加剂相比，B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A) (C0349)可促进神经前体/干细胞(NSC)的生长，并替代ITS和N-2添加剂用于将ES细胞分化为巢蛋白阳性神经前体细胞(nestin-positive neural precursor cells)的培养。

#### 3. 添加了B27添加剂的神经元细胞培养基，可保存多久？

由于B27添加剂中含有多种细胞因子及抗氧化剂等成分，因此将B27添加到培养基中后，需尽快在2-4周内使用，否则会影响B27添加剂维持神经元细胞生长的效果。

#### 4. 可以在37°C水浴或者培养箱中解冻B27添加剂吗？

不建议在37°C条件下解冻B27添加剂，推荐使用2-8°C过夜或室温2小时解冻，以保证B27添加剂的最佳使用效果。

### 参考文献：

1. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. J Neurosci Res. 1993. 35(5):567-76.
2. Roth S, Zhang S, Chiu J, Wirth EK, Schweizer U. J Trace Elem Med Biol. 2010. 24(2):130-7.
3. Brewer GJ, Cotman CW. Brain Res. 1989. 494(1):65-74.
4. Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, et al. J Neurosci Methods. 2008. 171(2):239-47.

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0211	L-Ala-Gln (100X)	100ml
C0212	L-Glutamine (100X)	100ml
C0215-100ml	HEPES Solution (1M, pH7.3, 细胞培养用)	100ml
C0215-500ml	HEPES Solution (1M, pH7.3, 细胞培养用)	500ml
C0216-500ml	细胞外液(Extracellular Solution)	500ml
C0218	Hanks' Balanced Salt Solution	500ml
C0219	Hanks' Balanced Salt Solution (with Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup> )	500ml
C0220	7.5% NaHCO <sub>3</sub> 溶液	100ml
C0221A	PBS	500ml
C0221B	PBS (pH7.4, Low Endotoxin, Cell Culture Grade)	500ml

C0221D	D-PBS	500ml
C0221G	D-PBS (with Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup> )	500ml
C0222	青霉素-链霉素溶液(100X)	100ml
C0223-100ml	青霉素-链霉素-庆大霉素溶液(100X)	100ml
C0224-100ml	青霉素-链霉素-两性霉素B溶液(100X)	100ml
C0331-100ml	Sodium Pyruvate (100X)	100ml
C0332-100ml	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	100ml
C0335-5ml	N-2 Supplement (100X)	5ml
C0335-25ml	N-2 Supplement (100X)	25ml
C0341-10ml	ITS Media Supplement (100X)	10ml
C0343-10ml	ITS-A Media Supplement (100X)	10ml
C0345-10ml	ITS-X Media Supplement (100X)	10ml
C0347-10ml	B27 Supplement (50X, Minus Antioxidants)	10ml
C0347-50ml	B27 Supplement (50X, Minus Antioxidants)	50ml
C0348-10ml	B27 Supplement (50X, Minus Insulin)	10ml
C0348-50ml	B27 Supplement (50X, Minus Insulin)	50ml
C0349-10ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	10ml
C0349-50ml	B27 Supplement (50X, Minus Vitamin A)	50ml
C0350-10ml	B27 Supplement (50X, Serum-free)	10ml
C0350-50ml	B27 Supplement (50X, Serum-free)	50ml
C0901-500ml	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0901-1L	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
P3378-20mg	Recombinant Human Insulin (Powder)	20mg
P3378-100mg	Recombinant Human Insulin (Powder)	100mg
P3378-500mg	Recombinant Human Insulin (Powder)	500mg
ST2041-5g	L-丙胺酰-谷氨酰胺(≥99.5%, BioReagent)	5g
ST2041-25g	L-丙胺酰-谷氨酰胺(≥99.5%, BioReagent)	25g
ST2041-100g	L-丙胺酰-谷氨酰胺(≥99.5%, BioReagent)	100g
ST508	Poly-D-lysine/多聚赖氨酸	10mg

Version 2024.07.15