

## ECT-人源神经细胞的复苏与培养

包装清单及保存条件（附说明书一份，请仔细阅读并严格按本说明书操作）

- ECT-BFCN: 液氮罐气相层冻存/干冰运输
- ECT-Coating Reagent (ECT-CR) : 10 mL, -80°C保存, 有效期一年
- ECT-Seeding Reagent (ECT-SR) : 20  $\mu$ L, 1000X, -80°C保存, 有效期一年
- ECT-BFCN Neurotrophins (ECT-NTs) : 120  $\mu$ L, 1000X, 首次解冻后按需分装, -80°C保存, 有效期一年
- ECT-NM Supplement (ECT-NMS) : 10 mL, 12X, -80°C保存, 有效期一年
- ECT-BFCN Neuronal Medium (ECT-NM) : 110 mL, 4-8°C避光保存, 有效期一年

其它需自备的材料、试剂: 培养耗材 (ICC 实验推荐用未经 TC 预处理爬片), 青链双抗 (可选) 等。

操作步骤（请在洁净间/生物安全柜操作）

### Day 0

1. **解冻包被液及培养试剂:** 在 4°C 过夜解冻或室温水浴快速解冻, 用前混匀。ECT-NTs 可以在首次解冻后按每次预估用量分装冻存, 避免多次反复冻融。
2. **用 ECT-CR 包被培养板或细胞爬片:** 50  $\mu$ L/孔-96 孔培养板; 300  $\mu$ L/孔-24 孔培养板; 10 - 30  $\mu$ L/未经过 TC 处理的细胞爬片中央。小心平稳置于 37°C 细胞培养箱过夜, 保湿避免挥干, 用前吸去即可。

### Day 1

3. **配制神经细胞基础培养液:** ECT-NMS (12X, 10 mL) 室温平衡摇匀, 全部加入到 110 mL ECT-NM 中混匀即为基础培养液, 4°C 避光可保存 8 周。
4. **配制神经细胞接种液 (ECT-SM):** 移取适量基础培养液到 50 mL 离心管中室温平衡后, 按 1000 倍稀释量分别加入 ECT-NTs 及 ECT-SR, 涡旋混匀即为 ECT-SM 接种液, 用于稀释、重悬、接种准备复苏的神经细胞。
5. **神经细胞复苏:** 从液氮罐气相层或干冰中取出神经细胞冻存管, 在 37°C 水浴中轻缓摇晃, 至还余一点点冰未化时取出。快速用酒精纸棉擦拭冻存管外壁后转入生物安全柜中预冷冰盒上操作。取 1 mL 室温平衡的 ECT-SM 缓慢滴入冻存管内, 转移到 15 mL 离心管中, 再用 1 mL ECT-SM 洗涤冻存管, 合并后在室温 400  $\times$  g 离心约 5 分钟, 小心吸去上清液后, 按标示细胞数加入适量 ECT-SM 至细胞密度约为 1000 个/ $\mu$ L, 用 1 mL 移液枪轻柔吹打 5 次, 取 7-10  $\mu$ L 细胞悬液, 与等体积台盼蓝溶液混合后计数, 计算活细胞数及活率。
6. **神经细胞接种培养:**
  - A. **爬片接种培养:** 用移液枪小心吸弃爬片中央包被液, 然后将上述重悬细胞液轻柔吹打 3 次混匀, 立即加 15 - 30  $\mu$ L/片至爬片中央包被处;
  - B. **孔板接种培养:** 参见附表选择适当培养条件, 按所需接种密度在 15 mL 离心管中用接种液进一步适当稀释上述复苏细胞液。吸去孔板中包被液后, 轻柔混匀细胞, 适量接种在已包被好的孔板培养表面上;
  - C. 将 A 及 B 培养板平稳转移到 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 在 37°C 下 20 分钟左右活细胞基本贴壁。在爬片培养孔中需要缓缓补加适量 ECT-SM 至 1 mL/孔-24 孔板。A 与 B 均继续培养 3-5 天。

### Day 5 and Onward

7. **神经细胞换液培养:** 每 5 天左右取适量基础培养液在培养箱内平衡 30 分钟后, 按 1000 倍稀释量加入 ECT-NTs 混匀, 逐孔进行半换液培养, 培养 10-20 天后进行各项检测分析。
8. **显微镜观察:** 表达 GFP 的 ECT-N 可以用荧光显微镜更清楚地观察形态变化, 但应避免频繁观察引起光毒性, 导致细胞死亡 (推荐在接种时预留额外的孔, 专门用于显微镜观察)。

**注:** 二氧化碳培养箱湿度应 >90%; 避免培养箱内置风扇持续气流或频繁过久打开培养箱引起边缘效应; 在细胞培养期间进行病毒感染或药物处理等测试应经过预试验以确定合适的时间、剂量等条件。

## 神经细胞常见实验用途、培养方式、推荐用量及培养时间：

神经细胞常见实验用途*	实验方法实例	培养材料	包被条件	细胞用量 (万/孔)	培养时间
正常、患者细胞存活率分析	ATP, MTT, CCK-8 等或 显微镜计数法	96 孔板	ECT-CR	1-4 或 0.01-0.1	3-7 天
药物药效、毒性测试					3-7 天
化学诱导建模测试 (MPP+, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , A $\beta$ 等)					3-7 天
长期培养存活率测定	ATP, MTT, CCK-8 等	96 孔板	ECT-CR	1-4	1-3 月
	GFP/特征蛋白染色计数	96 孔板	Astrocyte	0.01-0.1	1-3 月
基因表达、敲除分析	WB, RNA-seq, RT-PCR 等	24/12 孔板	ECT-CR	20-50	1 天-3 月
	ICC/共聚焦	细胞爬片	ECT-CR	1-4	1 天-3 月
蛋白相互作用	BioID2 等	24/12 孔板	ECT-CR	20-50	1 天-3 月
细胞蛋白表达定位、定量	ICC/共聚焦	细胞爬片	ECT-CR	1-4	1 天-3 月
ROS 检测	化学发光法	96 孔板	ECT-CR	1-4	3-7 天
	8-OHdG, DHE, MitoSox 等	细胞爬片	ECT-CR	1-4	1 天-3 月
电生理测试	膜片钳	细胞爬片	ECT-CR	1-4	2-4 周
钙信号检测	AAV-GCaMP/活细胞成像	96 孔板	ECT-CR	1-4	1-3 月
		细胞爬片	ECT-CR	1-4	2-4 周
神经递质水平检测	活细胞成像	96 孔板	ECT-CR	1-4	1-3 月
	ICC/共聚焦、活细胞成像	细胞爬片	ECT-CR	1-4	1 天-3 月
神经肌肉调控	活细胞成像	96 孔板	Astrocyte	0.01-0.1	1-3 月
	ICC/共聚焦、活细胞成像	细胞爬片	Astrocyte	0.1-1	1 天-3 月
细胞形态学分析	Sholl Analysis, ImageJ 等	96 孔板	Astrocyte	0.01-0.1	1 天-3 月
		细胞爬片	Astrocyte	0.1-1	1 天-3 月

\* 本产品仅限于专业人员科学研究实验用途，不得用于临床诊断、治疗、食品或药品，不可存放于普通住宅内。其它未提及用途及其使用方法欢迎电话或微信咨询。

## 神经细胞爬片包被培养小贴士：

- ✚ 24 孔板匹配爬片可选直径 12 mm 或 14 mm (在普通载玻片上分别可以封片 8 块或 3 块相应细胞爬片)，重点还要考虑光洁度、灭菌方式、TC 处理与否、包被方式及面积大小、接种细胞量以及是否共培养等因素；
- ✚ TC 处理的爬片表面液体容易扩散，需要覆盖更多的包被液以及接种更多的细胞悬液，此外，细胞贴壁前会漂移到爬片外，导致明显损失及无法准确控制每张爬片表面的细胞数量，可能引起显著的片间结果差异；
- ✚ 高光洁度、辐照灭菌、未 TC 处理过的细胞爬片，只需用 10 - 30  $\mu$ L ECT-CR 包被中央局部区域，接种约 15 -30  $\mu$ L 含 1 - 4 万神经细胞悬液，15 分钟内快速贴壁后再补加足量培养液。优点在于既能节省珍贵的神经细胞和包被液，又能减小片间差异，还利于细胞存活与成熟，适于 ICC 分析及电生理检测等广泛应用场景；
- ✚ 可以在同一爬片共培养多种细胞，如 DRGN/皮肤细胞，MN/肌肉细胞，iN/iAS/iMG 等，ECT-CR 包被可以兼用于这些不同类型细胞。

咨询电话：0574-56266216



技术售后



公众号