

NouvNeu™科研级人源神经干细胞（hNSC）细胞株使用说明

一、产品介绍

iRegene Therapeutics 生产的 NouvNeu™ 科研级人源神经干细胞细胞株是由人类成体细胞通过非整合重编程技术制备获得，并在无血清、无动物源性蛋白，化学成分明确的 NouvNeu™ hNSC 神经干细胞培养基中培养。经过长期传代测试，NouvNeu™ 科研级人源神经干细胞细胞株具有分化形成多种神经细胞的潜能。同时，经过质检保证细胞具有核型稳定、无外源基因插入、具有分化潜能等特点。iRegene Therapeutics 提供的 NouvNeu™ 科研级人源神经干细胞细胞株适用于神经毒性测试，药物筛选，药物验证以及代谢研究和电生理应用。

二、产品信息

产品信息	货号	规格	来源
NouvNeu™ 科研级 hNSC 细胞株	RJC02001	>1x10 ⁶	Human iPSC
NouvNeu™ 科研级 hNSC 细胞株信息			
标志物检测	QRT-PCR 检测, Sox1+/Sox2+/Pax6+/Nestin+		
微生物检测	无细菌、真菌、支原体		
内毒素检测	<2.5 EU/mL		
运输条件	干冰		
保存条件	-196℃		

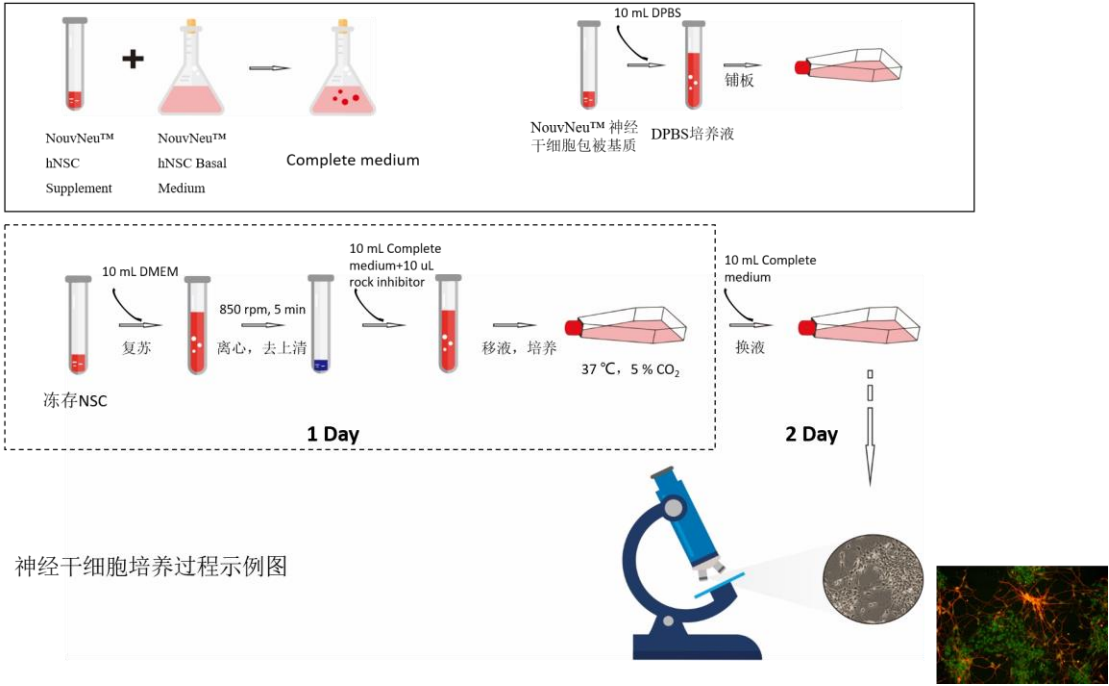
Tips: 本产品细胞株仅供科研使用，不可适用于诊断和治疗等医疗应用。

三、试剂材料

试剂&材料	推荐品牌	货号
-------	------	----

NouvNeu™ hNSC 神经干细胞培养试剂盒	iRegene	
NouvNeu™ 神经干细胞包被基质	iRegene	RJS04001
NouvNeu™ 神经干细胞消化液	iRegene	RJS04002
NouvNeu™ 神经干细胞冻存液	iRegene	RJS04003
Rock Inhibitor (Y-27632)	Stem Cell Technologies	72302
DMEM 培养基	Gibco	1897388
T25 培养瓶	Corning	430639
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL 移液管	Corning	NA
15 mL/50 mL 离心管	Corning	NA
1.5 mL/2 mL 冻存管	Corning	NA
10 uL/200 uL/1000 uL 枪头	Axygen	NA

四 实验流程



五 试剂准备

5.1 NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养液配置

- 1、在 4 °C 条件下，将 NouvNeu™ hNSC Supplement 解冻。
- 2、在超净台中，使用无菌移液管将下列两种试剂均匀混合制成 NSC 完全培养基。

NouvNeu™ hNSC Basal Medium: 400 mL

NouvNeu™ hNSC Supplement 1: 880 uL

NouvNeu™ hNSC Supplement 2: 480 uL

- 3、NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养基可置于 4 °C 储存，2 周内使用。

Tpis: 建议在配置完全培养液时，可根据实际需要量进行分装配置使用。NouvNeu™ hNSC Supplement 按比例分装保存，不宜多次冻融。

5.2 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质培养瓶包被（以包被 T25 培养瓶为例，操作程序同样适用于其他培养器皿）

5.2.1 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质分装

- 1、从 -80 °C 冰箱中取出 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质置于冰上，并于 4 °C 放置过夜，以便包被基质低温液化。
- 2、-20 °C 预冷 EP 管，并将包被基质分装到预冷的 EP 管中。注：维持操作过程中的局部低温环境，于冰上操作最佳。如果温度超过 5 °C，基质会发生不可逆凝胶化，则不可再用于培养瓶包被。
- 3、分装好的包被基质储存于 -80 °C 环境。

5.2.2 铺板

- 1、取 10 mL DPBS 培养液加入到 15 mL 离心管中，从 4 °C 冰箱中取出分装好的 POLY 基质胶，用枪头吸取 20 uL 体积溶于 10ml 的 DPBS 中，混匀。
- 2、将上述混匀的液体加入 T25 培养瓶中，放置与 37 °C，5% CO2 培养箱中，水平静置 3 h。
- 3、3 h 后，弃掉培养瓶中的液体，并就加入 10 mL DPBS 冲洗，弃掉 DPBS，并立即铺第二层 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质。
- 4、从 -80 °C 冰箱中取出保存分装好的 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质置于冰上备用。
- 5、取 10mL DMEM 加入 15ml 离心管中，从中取 1 mL DMEM 加入基质胶中，用枪头轻轻吹融混匀 NouvNeu™ 神经干细胞包被基质，直至完全融化，将融化后的基质胶全部加入 DMEM 中，混匀。
- 6、用移液器将混匀的基质胶/DMEM 沿培养瓶底面全部打入 T25 培养瓶中，静置 2 min。
- 7、将铺好基质胶的 T25 培养瓶置于 37 °C，5% CO2 培养箱中水平放置，一小时后即可使用。建议 48 小时以内用完。

六、复苏

- 1、在细胞操作间超净台上准备 10 mL 的 DMEM 于 15ml 离心管中备用。
- 2、从液氮中取出冻存的神经干细胞，置于冰上，传至细胞操作间。
- 3、将冻存管迅速放入 37 °C 水浴锅中一边摇匀一边快速解冻，至冻存管残留少量冰晶时，取出。
- 4、用 75%酒精对冻存管消毒，放于超净台中，用移液枪将解冻后的细胞悬液转移至准备好的 10mL DMEM 中，并取 1 mL DMEM 冲洗冻存管中残留的细胞，一并转移至离心管中。
- 5、离心收集细胞，离心条件 850 rpm，离心 5 min。
- 6、去上清。用 1 mL NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养液重悬细胞后，加入 9 mL NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养液于离心管中，并加入 10 uL Rock Inhibitor，混匀（培养液和 Rock Inhibitor 按体积比 v:v=1:1000 的比例配制）。
- 7、将上述细胞悬液置于新铺好的培养瓶上，于 37 °C，5 % CO₂ 培养箱中进行培养。
- 8、次日更换新的神经干细胞培养基以去除 Rock Inhibitor，之后每天进行换液继续培养至下次传代。

七、传代培养

- 1、当神经干细胞汇合度达到 70-80 %时，进行传代使用，一般传代比例为 1:4。
- 2、在超净台中吸除培养瓶中的废液，并加入 10 mL 的 DPBS 缓冲液进行清洗，注意不要使细胞脱壁。
- 3、吸除 DPBS，加入 1 mL NouvNeu™ 神经干细胞消化液，NouvNeu™ hNSC 神经干细胞消化液的量以覆盖细胞为宜。放入 37 °C，5 % CO₂ 培养箱中消化 2 分钟。
- 4、待大部分细胞脱落后，用移液枪轻轻吹打，使细胞全部脱落。加入 10 mL DMEM 终止消化。
- 5、将消化好的细胞移至 15 mL 离心管中，850 rpm，离心 5 min，收集细胞。
- 6、去上清。用 1 mL NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养液重悬细胞后，加入 9 mL NouvNeu™ hNSC 神经干细胞完全培养液于离心管中，并加入 10 uL 10mM Rock Inhibitor，混匀（培养液和 Rock Inhibitor 按体积比 v:v=1:1000 的比例配制）。
- 7、用移液管将重悬好的细胞混合液转移至 T25 培养瓶中，于 37 °C，5 % CO₂ 培养箱中培

养即可。

- 8、次日更换新的神经干细胞完全培养基以去除 Rock Inhibitor，之后每天进行换液继续培养至下次传代。

八、冻存

- 1、当细胞回合度达到 80 %时，即可对培养的细胞进行收集冻存。
- 2、配置 20%的 NouvNeu™ 神经干细胞冻存液，若配置 5ml 20%冻存液，先取 4 mL 的神经干细胞培养于离心管中，再取 1 mL DMSO 一滴一滴的缓慢的加入神经干细胞培养基中，放入冰箱预冷。（可按 1:4 的比例配置相应体积的冻存液）
- 3、按照神经干细胞传代的操作步骤把神经干细胞消化下来，进行离心收集细胞，离心条件 850 rpm，离心 5 min。
- 4、去上清，用神经干细胞培养基重悬细胞，并保持细胞密度为 2×10^6 / mL。逐步滴加等量体积的 NouvNeu™ 神经干细胞冻存液于离心管中，混匀，将细胞混合液分装到标记好的冻存管中。

Tips: NouvNeu™ 神经干细胞冻存液含有二甲基亚砜（DMSO）成分，DMSO 对人体皮肤有渗透性，对眼睛有刺激作用，也可以渗透一些防护手套材料，包括乳胶和硅胶。处理本产品时应小心。

- 5、将分装好的冻存管放入梯度程序降温盒中。及时将冻存盒置于-80 °C环境下保存 24-48 h 后，将细胞转至液氮中长期保存（温度不要高与-135 °C）。