

大鼠下丘脑神经干细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-RK006

产品描述

下丘脑神经干细胞（hypothalamic neural stem cell,htNSC）是下丘脑中存在的一类控制神经发生的干细胞，下丘脑神经干细胞具有多方面的功能，例如：具有成体神经发生的作用、感受机体代谢状态并作出反应等。体外培养的下丘脑神经干细胞是研究下丘脑针对神经退行性疾病的治疗、机体代谢的良好模型。试剂盒采用酶消化法，取下丘脑组织消化，专用完全培养基培养纯化得到下丘脑神经干细胞。使用本试剂盒提取所得的下丘脑神经干细胞纯度>90%，可直接进行后续实验。

适用范围

该试剂盒适用于 Sprague-Dawley、Wistar-Imamichi 等不同品系的新生 0-3 天大鼠原代下丘脑神经干细胞提取试剂盒。

规格

本试剂盒规格为 10 次（以2 只大鼠下丘脑为 1 次计）

运输和存储条件

2-8℃保存与运输，保质期为参考下表。所有组分开封后，有效期为 6-8 周，建议尽快使用。

配套培养基信息

表 1. 分离培养试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMP-RK006A	大鼠下丘脑神经干细胞组织专用消化液	20 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
IMP-RK006B	大鼠下丘脑神经干细胞组织处理缓冲液	500 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
IMP-RK006C	大鼠下丘脑神经干细胞传代专用消化液	20mL	-20℃，避光保存，3 个月

IMP-RK00601	大鼠下丘脑神经干细胞专用完全培养基	500 mL	2-8℃，避光保存，3 个月
-------------	-------------------	--------	----------------

分离步骤

实验前准备：大鼠下丘脑神经干专用消化液、组织处理缓冲液、大鼠下丘脑神经干专用完全培养基；实验需自备 PBS、40 μ m 细胞筛、手术器械、6cm/10cm培养皿、超低吸附培养皿、离心管若干。

一、大鼠下丘脑神经干细胞提取：下面以 Sprague-Dawley大鼠为例。

1. 将 1-2 只新生大鼠放到 10 cm细胞培养皿盖上，喷酒精后放置超净工作台。
2. 在 10 cm培养皿中入2-3 mL 组织处理缓冲液（不用复温，冰的使用效果更佳）。
3. 将 2 只新生大鼠的头直接剪下来，放入组织处理缓冲液中漂洗掉血渍。
4. 在 6 cm 细胞培养皿中加入 500-1000uL 组织处理缓冲液。

5. 取脑：用微型剪刀将脑沿中缝剪开脑皮和脑壳沿着开口起始处和终点处两边横向各剪一刀，用剪刀将嗅球连接处挑断，把整个脑取出放入刚刚倒好的组织处理缓冲液中。

6. 取大鼠下丘脑神经干细胞:将整脑翻面，腹面朝上，大鼠下丘脑在整脑中间腹面突出部，沿着一条脑缝切三刀，边缘修整一下后，用镊子夹断2/3处，取上方（即腹面）2/3 的脑。

7. 在 6cm盘中加入 500uL 大鼠下丘脑神经干细胞专用消化液，将取好的大鼠下丘脑组织块放入其中，用镊子夹住刀片，切碎脑组织，直到没有大的组织块出现即可。

8. 补 1500uL 的大鼠下丘脑神经干细胞专用消化液，将 6cm盘盖上盖子放入培养箱中（37℃）消化 15-25min，具体消化时间以镜下观察有大量单细胞。

9. 消化结束后加入 PBS 稀释消化液，转移到 15mL 管中，最终 PBS 体积为消化液体积的3 倍即可。

10. 吹打混匀后，4℃离心,1500rpm,10min。

11. 弃掉上清，尽量吸干净，加入恢复至室温的大鼠下丘脑神经干细胞专用完全培养基（不建议水浴锅或 37℃培养箱复温），种板参考密度 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。

12. 吹打混匀后，用 40um过滤筛过滤入 6 孔板中，补 2mL 专用完全培养基即可（一般一周后分细胞）。

二、大鼠下丘脑神经干细胞传代：

悬浮细胞(6cm 培养皿)

1. 将上清吸入 15 mL 管中。
2. 用 1ml PBS 润洗 2 次，加入 15 mL 管中。
3. 2000rpm，离心 5min (水平离心机)。
4. 吸去上清，加入 500 uL 传代专用消化液，放入培养箱中横放 10-15min（消化好后，会变成絮状，轻轻吹打则变透明）。
5. 加入 1500 uL 大鼠下丘脑神经干细胞专用完全培养基稀释终止传代专用消化液，吹打几次，使细胞解离成小团块或单细胞。
6. 1500rpm，离心 5min。
7. 吸去上清，用新鲜专用完全培养基重悬，分皿种板。

贴壁细胞（根据细胞量以及状态选择是否进行这一步操作）

1. 吸去上清，加入 1 mL PBS 润洗。
2. 吸去 PBS，加入 500 uL 传代专用消化液，放入细胞培养箱中 5-10 min 消化。
3. 消化过程中在显微镜下观察细胞形态若细胞突触收缩，漂浮则消化已好，若细胞贴壁很牢，则细胞状态不佳。
4. 加入 1500 uL 大鼠下丘脑神经干细胞专用完全培养基稀释传代专用消化液。(先加 500 uL，吹打板面，让细胞从培养皿上脱落，并将成团的细胞吹散，再加 1000 uL 将板内残留的细胞洗涤)并转移到 EP 管中。
5. 1500rpm，离心 2min 。
6. 吸去上清，用新鲜专用完全培养基重悬，种板。

注意事项

1. 大鼠下丘脑离体后建议在冰上操作，分离大鼠下丘脑神经干细胞时应避免过度消化、过度重悬等操作导致细胞损伤。
2. 一个 6cm 培养皿可接种 5×10^5 个细胞，3 天细胞数目可见长 4-5 倍。
3. 大鼠下丘脑神经干细胞传代时使用神经干细胞传代专用消化液。
4. 大鼠下丘脑神经干细胞培养需使用**超低吸附培养皿**培养。
5. 大鼠下丘脑神经干细胞专用消化液、培养基中含有微生物生长所需的营养成分，请在超净工作台内打开，按照所需要量分装，并且用封口膜封住瓶口，即取即用，以避免污染。