

# SH-SY5Y 诱导分化神经元试剂盒

Cat NO: IMI-N01

## 产品描述

本产品为神经母细胞瘤细胞向神经元诱导分化试剂盒，分化获得的神经元能表达特异性标志物（如 MAP2、 $\beta$  III-tubulin 等），适用于体外研究。

本产品需要操作人员具有 SH-SY5Y 细胞培养经验，对该细胞具有一定了解。

以六孔板为例，本产品提供的规格可供 2.7 个 6 孔板的 SH-SY5Y 分化。

## 本产品分化流程图



## 产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IMI-N01BM1	基础培养基 1	100 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-N01BM2	基础培养基 2	100 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-N01A	补充剂 A (25×)	4 mL	-20°C, 6 个月
IMI-N01B	补充剂 B (200×)	500 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
IMI-N01C	补充剂 C (25×)	4 mL	-20°C, 12 个月

注：括号内容如 25× 为母液浓度，使用时终浓度需为 1×。例如补充剂 A (25×) 和补充剂 B (200×) 需添加进基础培养基 1 使其分别稀释 25 倍以及 200 倍，使得补充剂终浓度为 1×，配成分化培养基 1。



## 实验试剂与材料

表 2. 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞 (STR 鉴定正确)	逸漠生物	IM-H227
SH-SY5Y 细胞专用培养基	逸漠生物	IM-H227-1
低生长因子基质胶 (GFR Matrigel )	Corning	356231
0.25%胰蛋白酶消化液(含 EDTA, 含酚红)	逸漠生物	IMC-501
PBS	逸漠生物	IMC-401
6 孔细胞培养板	硕华生物	N/A
15 mL/50 mL 离心管	硕华生物	N/A
10 $\mu$ L/200 $\mu$ L/1000 $\mu$ L 无菌吸头	佳顺生物	N/A
10mL/50mL 移液管	NEST	N/A

## 实验内容与方法 (以 6 孔板 1 个孔为例)

### 一、试剂准备

表 3. 各阶段培养基成分

研究阶段	培养基名称	各阶段培养基组成
第一阶段	分化培养基 1	基础培养基 1
		补充剂 A (1 $\times$ )
		补充剂 B (1 $\times$ )
第二阶段	分化培养基 2	基础培养基 2
		补充剂 C (1 $\times$ )

(1) 在 4 $^{\circ}$ C 解冻 补充剂 A、B、C，不要在 37 $^{\circ}$ C 条件下解冻。

(2) 在生物安全柜中，参考表 1 及表 3，按照比例使用无菌移液管及枪头混匀配制成分化各阶段培养基。例如分化培养基 1 组成为基础培养基 1、1 $\times$ 浓度的补充剂 A 和 1 $\times$ 浓度的补充剂 B，若用量为 40mL，配制方法为 38.2 mL 基础培养基 1+ 1.6 mL 补充剂 A (25 $\times$ ) + 200  $\mu$ L 补充剂 B (200 $\times$ )。

(3) 分化培养基建议现配现用，置于 4 $^{\circ}$ C 储存，2 周内使用。



注：补充剂 B 或含有补充剂 B 的分化培养基 1 使用时尽量避强光，且所有补充剂可根据使用量进行分装以避免反复冻融。

二、SH-SY5Y 培养和准备（详见 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞（STR 鉴定正确）使用说明）（<http://www.immocell.com/ryxbx/1529.html#section1>）

### 三、DAY 0-6: 第一阶段

(1) 低生长因子基质胶（GFR Matrigel）在 4℃ 下解冻，与 DMEM/F12 均匀混合（GFR Matrigel :DMEM/F12=1:100），铺板，备用。

(2) DAY 0: 当 SH-SY5Y 的汇合度达到 80% 以上时，吸去培养基，用 2mL 1× 室温 PBS（不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>）进行清洗，吸去 PBS。

(3) 加入 0.25% 胰蛋白酶消化液（含 EDTA，含酚红），置于 37℃ 培养箱中消化 1-3 min（视细胞情况而定），然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，加等量培养基（SH-SY5Y 细胞专用培养基或 DMEM 高糖培养基）终止消化。

(4) 使用 P-1000 吸头轻轻上下吹打细胞，制成单细胞悬液，将细胞单悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min。

(5) 离心结束，充分去除上清，将 1 mL 预热的 SH-SY5Y 细胞专用培养基重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。

(6) 使用自动细胞计数器计数细胞，使用台盼蓝排除死亡细胞，使用 SH-SY5Y 细胞专用培养基稀释细胞使得最终细胞浓度为  $0.5-1.5 \times 10^5$  个细胞/mL（或最终细胞密度为  $1-3.125 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup>）。

(7) 包被板恢复至室温后，从 GFR Matrigel 包被的板中小心地抽吸包被液而不损坏 GFR Matrigel 涂层表面。将细胞接种到 GFR Matrigel 包被的板上，在 6 孔板中每孔最终体积为 2 mL，将孔板转移到 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24h。

(8) DAY 1: 24h 后吸去培养基，并加入 2mL 分化培养基 1（成分为：基础培养基 1，1× 补充剂 A，1× 补充剂 B）。

(9) 隔天使用分化培养基 1 换液，直到第 6 天。



注：①GFR Matrigel 使用时需在冰上操作，所有与 GFR Matrigel 直接接触的物品需提前预冷，GFR Matrigel 超过 10℃ 将迅速凝固，导致包被失败。②GFR Matrigel 包被的板需在室温孵育 1 小时或培养箱孵育 30 分钟以上，使其恢复至室温，才能进行细胞接种。

#### 四、DAY 6-11:第二阶段

- (1) **DAY 6:** 第 6 天，从培养物中抽吸培养基，在 6 孔板中每孔用 2 mL 1×室温 PBS（不含  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ）清洗培养物，然后从孔中移除 PBS。
- (2) 每孔加入 2 mL 分化培养基 2（成分为：**基础培养基 2**，1×补充剂 C）。
- (3) 隔天使用分化培养基 1 换液，直到第 11 天。
- (4) 可取第 11 天的细胞进行免疫荧光染色检测神经元标志物 MAP2、 $\beta$  III-tubulin。

