

B-27 Plus神经元培养体系可实现卓越的原代神经元培养

提高存活率、成熟度和神经网络活性

25年来，经典Gibco™ B-27™添加剂和Gibco™ Neurobasal™培养基已成为神经元细胞培养的“金标准”。Gibco™ B-27™ Plus神经元培养体系包括Gibco™ B-27™ Plus添加剂（货号A3582801）和Gibco™ Neurobasal™ Plus培养基（货号A3582901），通过原材料和制造升级以及轻微配方修改，使经典培养环境得到优化。这些微小的变化产生了巨大的性能提升。

改善神经元健康

更好的长期培养

长期培养（3周及以上）原代啮齿动物神经元并保持其健康状态，极具挑战性，因为这些细胞非常敏感，并且将随时间的推移而逐步死亡。图1突出显示了使用B-27 Plus体系培养小鼠皮层神经元细胞的优势。注意，使用B-27 Plus体系可显著提高细胞数量和MAP2染色程度。

改善神经突生长

一个在神经元接种后不久即可体现的神经元培养质量早期指征就是神经突生长。神经突从神经元向外延伸的过程（轴突和树突的发育）发生在神经元成熟期间。图2显示了使用B-27 Plus体系培养1周即察到的神经突生长改善。

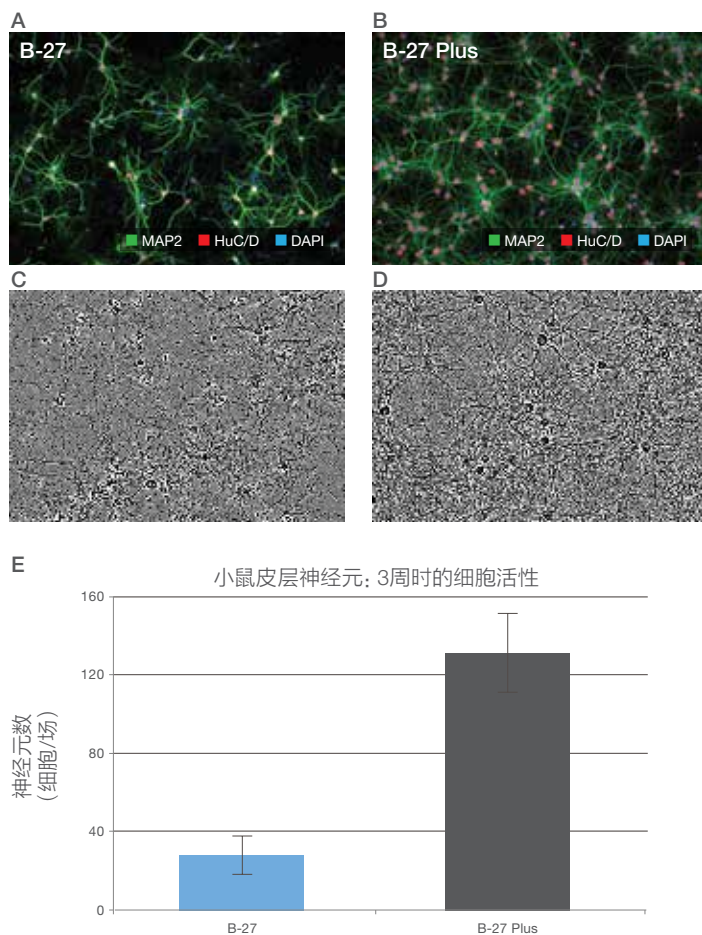


图1. 使用B-27 Plus体系后，小鼠皮层神经元的存活率和成熟度得到改善。将冷冻保存的细胞以60,000个细胞/cm²的密度进行接种，并在经典B-27添加剂和Neurobasal培养基（A和C）或B-27 Plus神经元培养体系（B-27 Plus添加剂和Neurobasal Plus培养基；B和D）中培养。通过Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5高内涵筛选（HCS）平台上的自动图像捕获和分析功能确定神经元的数量（E，n = 4）。神经元用MAP2（绿色）和HuC/D（红色）染色，细胞核用DAPI（蓝色）标记。

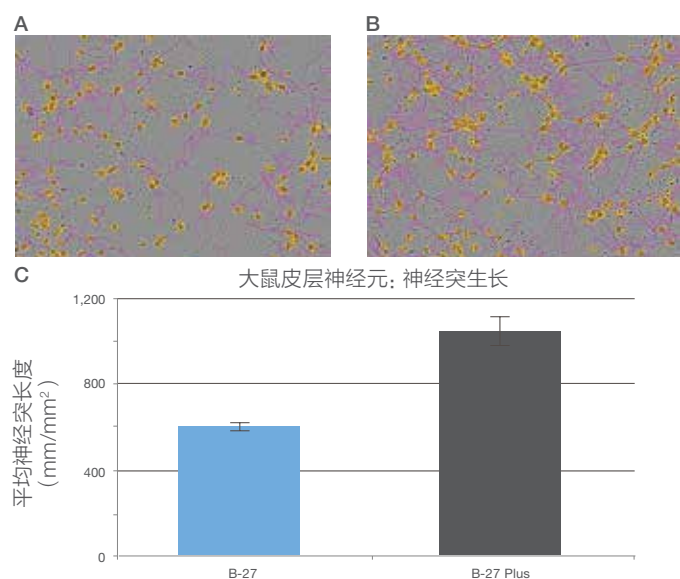


图2. 大鼠皮层神经元中神经突生长的形态定量分析。将冷冻保存的细胞以 5×10^4 个细胞/cm²的密度进行接种，并分别在(A)经典B-27添加剂和Neurobasal培养基或(B) B-27 Plus神经元培养体系(B-27 Plus添加剂和Neurobasal Plus培养基)中培养。接种后六天，使用Essen BioScience IncuCyte™ Zoom体系进行活细胞成像，并计算神经突长度。(C)相对于细胞体(黄色)的神经突长度(在显微镜图像中以紫色线表示)。

突触复杂性增加

在神经元成熟期间会发生许多变化，其中两个标志性变化是轴突生长和突触形成，使神经网络的密度和复杂性增加。一种常见的突触前标记是参与突触释放神经递质的突触蛋白家族。突触后结构通常可使用突触后密度蛋白95 (PSD-95)显示，该蛋白是一种膜相关性鸟苷酸激酶，在突触后功能调控中发挥多重作用，包括与神经递质受体和钾通道的直接相互作用。突触蛋白和PSD-95的存在表明存在功能上成熟的突触连接。我们在此表明，使用Gibco™ B-27 Plus体系培养的原代大鼠皮层神经元(RCN,货号A10840)，其突触蛋白和PSD-95的表达明显比经典B-27和Neurobasal培养基中的细胞更加广泛(图3)。

对神经元亚型的影响

取材自啮齿动物大脑的神经元，往往含有不同类型的细胞，包括兴奋性(谷氨酸能)和抑制性(GABA能)神经元，以及小清蛋白(PV)阳性的GABA能中间神经元。在体条件下，兴奋性神经元和抑制性神经元的数量受到严格调控，它们之间的相互作用是神经网络调节的基础。此外，PV阳性的中间神

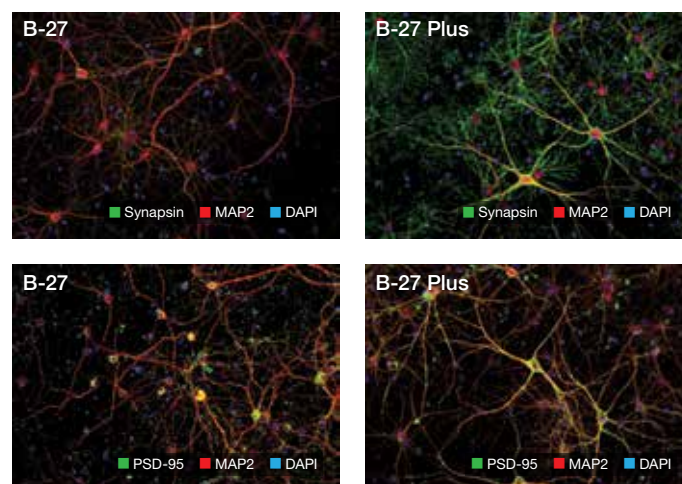


图3. 在B-27 Plus体系中成熟大鼠皮质神经元(RCN)突触前和突触后标记的增强表达。如文中所述，对RCN进行28天的培养，然后分别对MAP2(红色)、突触蛋白(绿色)和PSD-95(绿色)进行免疫染色。细胞核用DAPI标记(蓝色)。

元在调制神经网络的同步活动发挥着关键作用。体外条件下，神经元的存活和稳健成熟对于原代皮层和海马神经元培养中的神经元亚群维持、网络形成以及同步活动至关重要。

图4通过比较使用经典B-27和Neurobasal培养基与B-27 Plus体系培养28天后的培养物，显示了培养条件对RCN中兴奋性和抑制性神经元亚群的影响。根据HuC/D阳性细胞测定神经元总数，并将这些细胞进一步量化为谷氨酸能神经元(VGLUT2阳性)、GABA能神经元(GABA阳性)和PV阳性中间神经元的神经元亚群。定量图像分析显示，B-27 Plus体系中的HuC/D阳性细胞数量比经典B-27体系大约多出50%：经典B-27体系中，90%的神经元对VGLUT2染色呈阳性，而在B-27 Plus体系中则为81%；经典B-27体系中的培养物包含12%的GABA阳性神经元，而B-27 Plus体系中的培养物则为14%。令人震惊的是，经典B-27体系中的PV中间神经元百分比低于1%，而在B-27 Plus体系中则为7%。这些结果与在体条件，皮层神经元中80%谷氨酸能和20% GABA能的比例估值相符。MAP2、GABA和PV染色的定性分析表明B-27 Plus体系中的神经突染色更加显著，表明神经元及其亚群的成熟度增强。总之，这些数据表明B-27 Plus体系中神经元亚群的维持和成熟度显著提高。

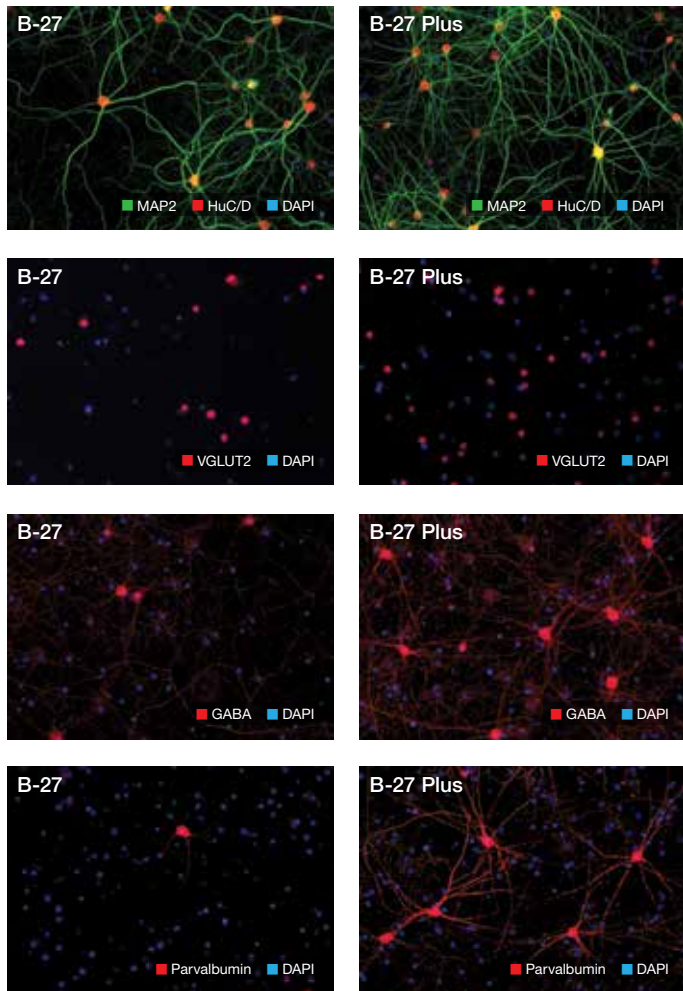


图4. 确定原代大鼠神经元培养物中的神经亚型。将RCN在经典B-27体系 (左列) 或B-27 Plus体系 (右列) 中培养28天, 然后分别对MAP2 (绿色) 和HuC/D (红色)、VGLUT2 (红色)、GABA (红色) 或小白蛋白 (红色) 进行免疫染色。细胞核用DAPI标记 (蓝色)。

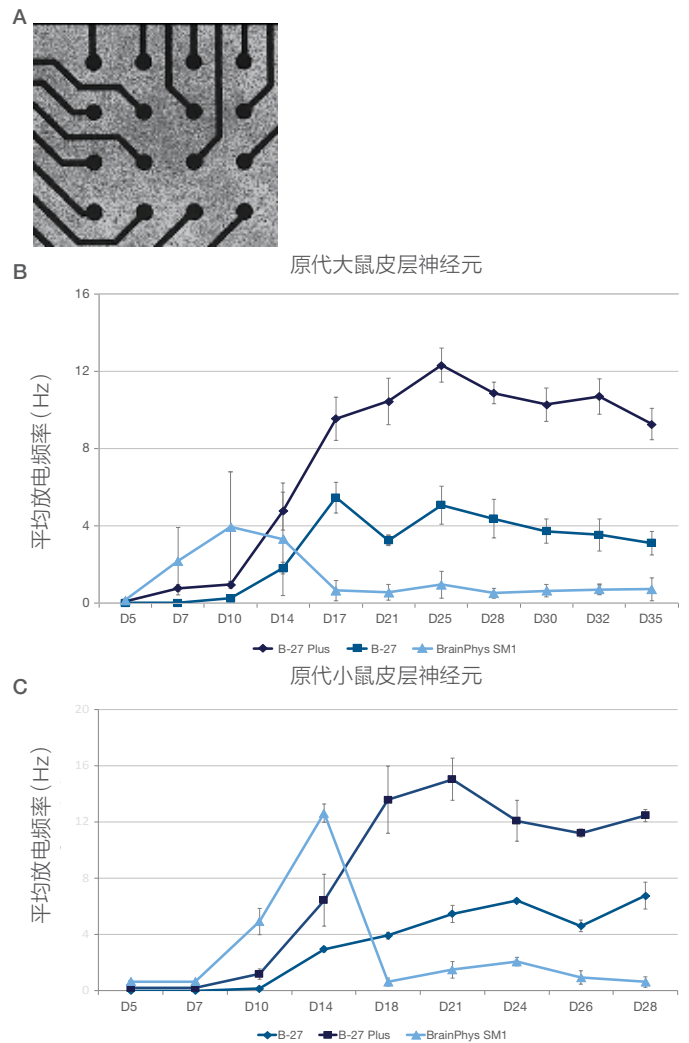


图5. B-27 Plus体系改善了原代啮齿动物神经元的电生理活性。(A) 在MEA网格上培养22天时的原代小鼠神经元显微照片。将大鼠 (B) 或小鼠 (C) 皮质神经元以高密度液滴形式接种至24孔MEA板上, 并在经典B-27、B-27 Plus或BrainPhys™神经元培养基和SM1试剂盒培养基体系中培养35天。采用Axion BioSystems Maestro Pro™ MEA平台定期测量自发电活动, 记录为平均放电频率。

改善电生理活动

神经成熟度的另一个测量指标是电压门控离子通道的表达和活性, 它是单个神经元动作电位产生的基础, 也是神经网络活性的基础。多电极阵列 (MEA) 体系可利用专门的培养器具, 通过在感应电极附近培养神经元, 以非侵入方式直接测量一组细胞的电活动 (图 5A)。使用此方法, 测量大鼠和小鼠皮质神经元随时间推移进行的自发性活动 (通过平均放电频率测量), 结果表明与经典B-27体系或其他供应商培

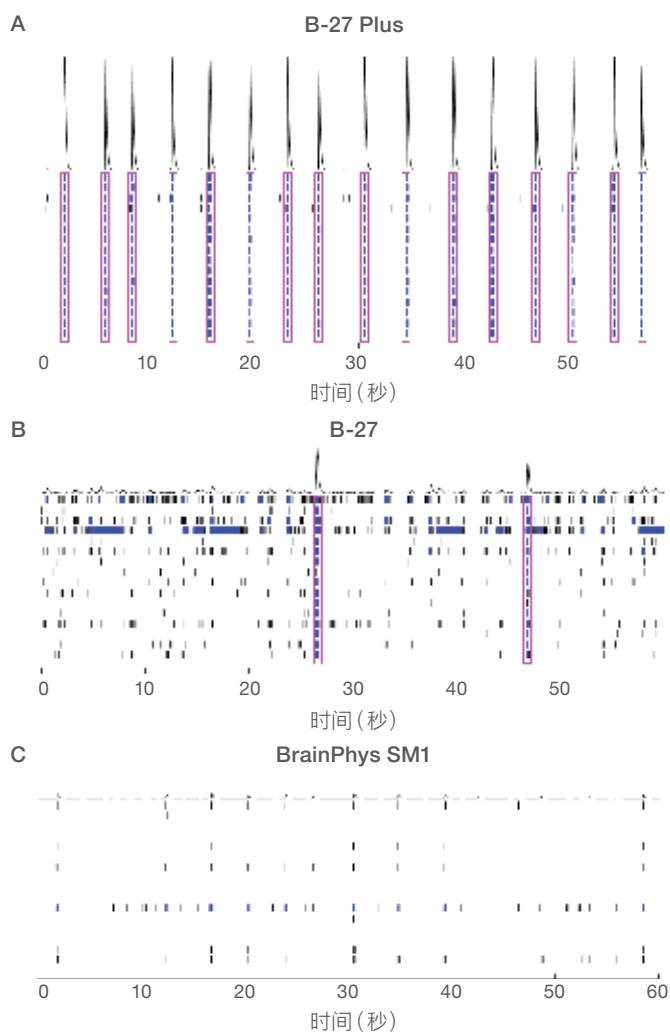


图6. 通过MEA分析网络活动。在(A) B-27 Plus体系、(B) 经典B-27体系或(C) 其他供应商体系中培养28天后, 显示RCN培养物同步簇放电的栅格图。尖峰部位表示根据每个传感电极上测量的同步电活动所计算的簇放电活动 (B-27 Plus体系中共有16次, 经典B-27体系中仅有2次, 另一家领先供应商的体系则没有。用紫色突出显示)。

培养基中的细胞相比, 在B-27 Plus体系中培养的细胞活性明显更高, 并且显示出持续的活性 (图 5B、C)。

详情请访问 thermofisher.com/b27plus



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC

可以从MEA记录中提取其他类型的数据, 包括神经网络活动和簇放电同步的计算, 其中包括同时查看来自每个单独电极的数据。此方法可估算网络连接, 并深入了解神经网络本身的质量。图6显示了培养28天后RCN的1分钟记录的代表性簇放电数据。

在B-27 Plus体系中, RCN培养物的簇放电数据显示出卓越的一致性和同步性, 并且簇放电间的噪音很少。簇放电受兴奋性和抑制性神经元的协调活动驱动。B-27 Plus体系能够产生稳定的神经网络同步“窗口”, 使研究人员可以查询此类复杂的神经相互作用。

结论

近三十年来, 经典B-27体系一直是神经生物学研究的中流砥柱。B-27 Plus体系以原始添加剂和基础培养基为基础, 并且可显著改善原代神经元的健康、成熟度和功能。这种新配方使研究人员能够提高其神经培养的质量, 从而改善所获得的数据类型。本文突出强调的示例包括对高质量原代啮齿动物神经元培养的全面维持, 从而为4周内的神经元活动提供了一个稳定的查询窗口。神经元活动的改善至少在一定程度上归因于B-27 Plus体系有助实现更加密集的轴突网络和密度更高的突触。总体而言, 这些数据突出了B-27 Plus和Neurobasal Plus培养体系的主要优势。

订购信息

产品	货号
B-27 Plus神经元培养体系	A3653401