

## Neuron Dissociation Solutions S

Neuron Dissociation Solutions S are appropriate for dissociating and isolating neurons from rat or mouse central nervous system tissue. This product consists of three kinds of solutions (Enzyme Solution, Dispersion Solution, and Isolation Solution). You can easily isolate neurons in high cell viability with this product.

### [Kit components]

Component	Size
Enzyme Solution	2.5 mL × 10
Dispersion Solution	2.5 mL × 10
Isolation Solution	2.5 mL × 10

### [Reagent volume]

Experiment condition	Component	Volume
In the case of dissociating many tissues ("many tissues" means about 1~3 cerebral hemispheres from fetal mouse or rat)	Enzyme Solution	5.0 mL
	Dispersion Solution	3.0 mL
	Isolation Solution	5.0 mL
In the case of dissociating a few tissues ("few tissues" means about 1~8 hippocampuses from fetal mouse or rat)	Enzyme Solution	2.5 mL
	Dispersion Solution	2.5 mL
	Isolation Solution	2.5 mL

### [Procedure]

#### 〈Thawing and Washing〉

In case of using dissecting tissue

1. Thaw Neuron Dissociation Solutions S at room temperature or in a 37°C water bath and return it to a room temperature. If you need to excise the tissues in a short time, you can keep this product in a 37°C water bath.
2. Cut the tissues finely after removing meninges and transfer it to a 15 mL centrifuge tube.  
(We recommend that you cut the tissues in a Leibovitz's L-15 Medium or HBSS (+).)  
("cut finely" means that the section size should be about 1 ~ 4 mm<sup>2</sup>, but it is not necessary to rigidly observe this size.)

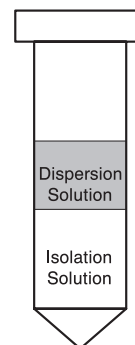
In case of using freezing nerve-cells (refer to Related Reagents)

1. Thaw Neuron Dissociation Solutions S at room temperature or in a 37°C water bath and return it to a room temperature.
2. Remove the cryotube from the liquid nitrogen storage container.
3. Thaw at room temperature. If the thawing time is shorter than 30 min, neurons can't thaw enough.
4. Remove the cryopreservation medium from the cryotube about 0.8 mL.

5. Add 1 mL of Washing Solution (Leibovitz's L-15 Medium or HBSS (+)) to the cryotube, then transfer to a transparent 15 mL centrifuge tube with the thawed tissues.
6. Add extra 4 mL of Washing Solution to the centrifuge tube.
7. Leave at room temperature for 5 min, and centrifuge at 300 rpm at room temperature for 1 min.
8. Remove the supernatant, and add 5 mL of Washing Solution.
9. Leave at room temperature for 5 min, and centrifuge at 300 rpm at room temperature for 1 min.

### 〈Dispersion〉

1. Remove the supernatant after the tissues sinking, and add Enzyme Solution, and incubate at 37°C for 30 min in a water bath. (In case of freezing neurons, the incubation time is 20 min.)
2. Suspend the tissues by pipetting in all Enzyme Solution, and disperse the tissues. The appearance remains unchanged in 30 min, but the enzyme reaction proceeds well. Suspend the tissues by pipetting repeatedly without bubbles. Suspend the tissues by pipetting again in procedure 4 after this procedure.
3. Centrifuge at 900~1,000 rpm at room temperature for 4 min.
4. Remove the supernatant, and add Dispersion Solution. Then suspend the tissues.  
In the case of dissociating a few tissues : Dispersion Solution 2.5 mL  
In the case of dissociating many tissues : Dispersion Solution 3.0 mL
5. Add all Isolation Solution to the centrifuge tube bottom quietly. This makes two separate solution layers. Turbulence of liquid surface does not affect the dissociation. (upper layer : Dispersion Solution, lower layer : Isolation Solution) (refer to the figure on the right)
6. Spin at 800 ~ 900 rpm at room temperature for 5 min.
7. Centrifuge the supernatant, and suspend the tissues with Neuron Culture Medium (Code No. 148-09671), etc., and culture onto the Poly-Lysine coated culture substratum. Add Ara-C (Day 3-5 : 5-10 μmol/L) when grial cells grow well.



### [Storage]

- Store at -80°C.
- Avoid repeating freeze-thaw.
- After opening, use as soon as possible.
- Avoid storing in environments with carbon dioxide such as dry ice.
- After opening, it may be affected by carbon dioxide in the storage environment. It is recommended to block the outside air with a clip with excellent airtightness.

【Related Reagents】

Code No.	Product Name
291-78001	Neuron Dissociation Solutions
148-09671	Neuron Culture Medium
128-06075	Leibovitz's L-15 Medium with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate
082-09365	HBSS(+) with Phenol Red
082-10291	Hippocampus, from Mouse (embryonic day 16)
033-24871	Cerebral Cortex, from Rat (embryonic day 17)
036-24861	Cerebral Striatum, from Rat (embryonic day 17)
085-10301	Hippocampus, from Rat (embryonic day 19)
030-24881	Cerebral Cortex, from Mouse (embryonic day 15)

**FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation**

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : + 81-6-6203-3741  
Facsimile : + 81-6-6201-5964  
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

**FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation**

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.  
Telephone : +1-804-271-7677  
Facsimile : +1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

**FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**

Fuggenstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : + 49-2131-3111-0  
Facsimile : + 49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>

コードNo. 297-78101 (10セット)

**神経細胞用分散液 S**

本品は、ラット、マウスの中枢神経組織から神経細胞を分散、単離することが出来る試薬です。3種類の溶液（酵素液、分散液、除去液）で構成されています。本品を使用することで高い生存率を保持したまま簡単に神経細胞を単離することが出来ます。

【キット内容】

内 容	容 量
酵素液	2.5mL×10 本
分散液	2.5mL×10 本
除去液	2.5mL×10 本

【試薬量】

実験条件	内 容	使用量
分散する組織量が多い場合 (マウス or ラット胎児 大脳半球 1 ～ 3 個程度)	酵素液	5.0mL
	分散液	3.0mL
	除去液	5.0mL
分散する組織量が少ない場合 (マウス or ラット胎児 海馬 1 ～ 8 個程度)	酵素液	2.5mL
	分散液	2.5mL
	除去液	2.5mL

【操 作】

〈組織（細胞）、試薬の準備〉

解剖した組織を用いる場合

1. 神経細胞用分散液 S をあらかじめ、室温もしくは 37℃ のウォーターバスにて解凍し、室温に戻しておく。  
(組織の切り取りが短時間であれば、37℃ のウォーターバス中で加温したままでも良い。)
2. 脳膜を取り除いた組織を細切してから、15mL の透明遠沈管に移す。  
(ライボピッツ L-15 培地や HBSS(+) 推奨。)  
(細切は、1 ～ 2mm 角程度を目安にハサミを入れる。厳密である必要はなく、おおまかでよい。)

凍結神経細胞を用いる場合 (関連製品参照)

1. 神経細胞用分散液 S をあらかじめ室温、もしくは 37℃ のウォーターバスにて解凍し、室温に戻しておく。
2. 液体窒素保管容器から凍結神経細胞を取り出す。
3. 室温で 30 分間解凍する。この時間が短いと細胞が十分に解凍されない。
4. クライオチューブから凍結保存溶液を 0.8mL 取り除く。
5. 洗浄溶液 (ライボピッツ L-15 培地もしくは HBSS (+)) を先ほどのクライオチューブに 1mL 加え、15mL 遠沈管に組織片とともに静かに移す。
6. 先ほどの 15mL 遠沈管にさらに 4mL の洗浄溶液を加える。
7. 室温で 5 分間静置し、300rpm、1 分間、遠心分離する。
8. 上澄みを除き、洗浄溶液を 5mL 加える。
9. 室温で 5 分間静置し、300rpm、1 分間、遠心分離する。

#### 〈分 散〉

1. 組織が沈んだら、上澄みを除き、酵素液（Enzyme Solution）を全量加え、37℃のウォーターバス中で30分間静置。  
（凍結神経細胞分散時は37℃のウォーターバス中で20分間静置。）
2. 酵素液中でピペッティングし、組織を分散する。  
30分後も外観上の変化はないが、酵素反応は十分に進んでいる。  
泡立てないように、丁寧に繰り返しピペッティングする。ここで組織が残った場合、手順4で再度行う。
3. 900～1,000rpm、4分間、遠心分離する。
4. 上澄みを除き、分散液（Dispersion Solution）を加え、分散する。  
分散する組織量が少ない場合：分散液 2.5mL  
分散する組織量が多い場合：分散液 3.0mL
5. 除去液（Isolation Solution）を全量、分散液の下方に静かに加え、細胞分散液（上層）、除去液（下層）の分離した2液層を作る（右図参照）。  
（液層間が乱れても影響はありません。）
6. 800～900rpm、5分間、遠心分離する。
7. 上清を除いた後、神経細胞用培地（Code No. 148-09671）等で再分散し、ポリリジンコート培養器などで培養する。グリア細胞の増殖が多い場合にはAra-Cを添加する（Day 3-5：5-10  $\mu$ mol/L）。



#### 【貯 法】

- ・－80℃保存。
- ・凍結融解は繰り返さないで下さい。
- ・開封後はなるべく早くご使用下さい。
- ・ドライアイス等の二酸化炭素がある環境下を避けて保存して下さい。
- ・開封後に長期保管する場合は、外気中の二酸化炭素の影響を受ける可能性があるため、密閉性に優れたクリップ等で外気を遮断しての保管をお勧めします。

#### 【関連製品】

Code No.	品 名
291-78001	神経細胞用分散液
148-09671	神経細胞用培地
128-06075	ライボピッツ L-15 培地 (L-グルタミン、フェノールレッド、 ビルビン酸ナトリウム含有)
082-09365	HBSS（＋）（フェノールレッド含有）
082-10291	海馬、マウス（胎生16日）由来
033-24871	大脳皮質、ラット（胎生17日）由来
036-24861	大脳線条体、ラット（胎生17日）由来
085-10301	海馬、ラット（胎生19日）由来
030-24881	大脳皮質、マウス（胎生15日）由来

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel：06-6203-3741