

## hPSC 诱导分化中脑类器官试剂盒

Cat NO:IMV-M001

### 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化中脑类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到中脑类器官，该类器官的细胞组成和结构组织代表了发育中的人中脑，可稳定表达中脑神经元标记物，从而帮助客户实现神经元相关药物筛选，疾病模型构建及其他基础科学研究。

本试剂盒需要操作人员具有 hPSC 培养经验，对类器官具有一定了解。

### 规格数量

可获得生成超过 500 个类器官。

### 实验仪器、材料

仪器：生物安全柜、细胞培养箱、水平式离心机、倒置显微镜、低温冰箱

材料：离心管（规格为 15 mL 和 50 mL）、移液器（规格为 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1000  $\mu$ L 和多通道 100 $\mu$ L）、无菌吸头（规格为 10  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L）、移液管（规格为 10mL、50mL）、37  $\mu$ m 可逆细胞过滤器、200 $\mu$ L/1 mL 宽口移液器吸头、AggreWell™800 24 孔板、6 孔板（TC 处理/非低吸附）、6 孔超低吸附板

### 试剂盒内容

研究阶段	产品名称	产品规格	储存
中脑类器官形成阶段	基础培养基 1	20ml	-20°C，18 个月
	补充剂 A	1mg	-20°C，12 个月
	基础培养基 2	100ml	2-8°C，12 个月
中脑类器官扩增阶段	基础培养基 3	245ml	2-8°C，18 个月
	补充剂 B	5ml	-20°C，24 个月
	补充剂 C	500u1	-20°C，12 个月



	补充剂 D	500ul	-20℃, 12 个月
中脑类器官分化阶段	基础培养基 3	245ml	2-8℃, 18 个月
	补充剂 B	5ml	-20℃, 24 个月
	补充剂 E	250ul	-20℃, 18 个月
中脑类器官维持阶段	基础培养基 3	98ml	2-8℃, 18 个月
	补充剂 B	2ml	-20℃, 24 个月

### 其他相关试剂耗材

产品名称	来源	货号
hESC/iPSC 细胞培养试剂盒	IMMOCELL	IMC-014
干细胞基质胶	IMMOCELL	IMV-A026
DMEM/F-12	IMMOCELL	IMC-205
Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS), 不含钙、镁、酚红	IMMOCELL	IMC-409
AggreWell™800 24 孔板	-	-
6 孔板 (TC 处理/非低吸附)	-	-
抗黏附润洗液	IMMOCELL	IMV-A003
6 孔超低吸附板	-	-
Accutase	-	-
台盼蓝	-	-
37 μm 可逆细胞过滤器	STEMCELL	27215
200μL/1 mL 宽口移液器吸头	-	-

## 试剂盒使用流程

### hESC/iPSC 细胞准备

在 6 孔板 (TC 处理/非低吸附) 上使用 hESC/iPSC 细胞培养试剂盒将 hESC/iPSC 细胞培养至汇合度 70-80%。



## 中脑类器官形成（第 0-6 天）

### 细胞接种培养基制备

**细胞接种培养基**（2.5 mL）：使用前先恢复至室温，2.5mL 基础培养基 1+5  $\mu$ L 补充剂 A，现配现用。在室温（15 - 25° C）下解冻补充剂，彻底混合。注意：如果不混合补充剂，请将补充剂放入-20° C 保存。不要超过补充剂的保质期。解冻后立即使用。不要反复冻融。

### ①Day 0

1. 准备一个 AggreWell™800 24 孔板。如果使用其他培养器皿，后续实验请相应地调整规格。使用前将培养皿、培养基和试剂加热至室温（15 - 25° C）。
  - a. 在每个孔中加入 500 $\mu$ L 的抗黏附润洗液。
  - b. 在装有托盘的离心机上，以 1300 x g 离心板 5 分钟。注意：盘子必须配平。
  - c. 在显微镜下观察平板，确保微孔中的气泡已被去除。如果气泡仍然被困在微孔中，在 1300 x g 下再离心 5 分钟。
  - d. 从孔中吸弃抗黏附润洗液。
2. 在 AggreWell™800 24 孔板中加入 1mL **细胞接种培养基**。把盘子放在一边。
3. 拿出培养好的 hESC/iPSC 细胞，将 6 孔板中孔内的培养基吸取，加入 1 mL/孔的 DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃并吸取。注：4-6 孔的细胞密度是后续实验我们所需的体积。
4. 加入 1mL 的 Accutase，37° C 孵育 3 分钟。注意：当使用不同细胞系或其他非酶细胞解离试剂时，孵育时间可能会有所不同。
5. 使用 1mL 移液器，缓慢上下移液 3 - 5 次，轻轻重悬细胞。将细胞悬浮液转移到无菌 15ml 锥形管中。
6. 使用 1-2mL **基础培养基 2** 冲洗孔，并将此冲洗液加入含有细胞的管中。
7. 用台盼蓝和自动细胞计数器活细胞。计算得到  $4.5 \times 10^6$  个细胞总数所需的体积（这将在下一步稀释，以获得  $3 \times 10^6$  个细胞/mL 的最终浓度）。
8. 300 x g 离心细胞 5 分钟。
9. 仔细抽吸上清并将细胞重悬在 1 mL 的准备好的**细胞接种培养基**，以获得最终浓度为  $3 \times 10^6$  个细胞/mL。
10. 将这 1mL 单细胞悬液（即  $3 \times 10^6$  个细胞）加入到含有 1mL 细胞接种培养基（步骤 2 中



制备)的 AggreWell™800 板的孔中。这将产生 10000 个细胞/孔。

**注：通过上下轻轻移液数次，确保新接的细胞均匀地分散在整个孔表面。**

11. AggreWell™800 板在 100 x g 下离心 3 分钟，捕获微孔中的细胞。注意：盘子必须配平。

12. 在显微镜下检查 AggreWell™800 板，确保细胞均匀分布在微孔中。37° C，5% CO<sub>2</sub> 孵育。

## ②Day1-Day5

### 中脑类器官形成培养基制备

**中脑类器官形成培养基 (15mL)** :使用前先恢复至室温，即 15mL 基础培养基 1。注：如果不立即使用的话，最多在 2 - 8° C 储存 3 周，不要超过基础培养基的保质期，解冻后立即使用，不要反复冻融。

13. 小心地从培养箱中取出 AggreWell™800 板，注意不要干扰内容物。注意：必须小心处理板，以避免类器官从孔中出来，导致过早融合和降低产量。

14. 使用 1mL 移液器从孔中轻轻移出 2 x 750μL 培养基并丢弃。

**注：不要干扰类器官。移液时，将移液器尖端对准孔中培养基的上表面。**

15. 用 1mL 移液器向孔中缓慢加入 2 × 750μL 中脑类器官形成培养基。

**注：重要的是不要干扰类器官。不要将培养基直接添加到微孔的表面上。在孔内剩余培养基的表面，轻轻触碰孔的侧面来支撑移液器尖端。使培养基的释放更加可控。缓慢地将培养基释放到微孔中；培养基的快速释放会将类器官从孔中移除。**

16. 37°C，5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 小时。

17. 在第 2 - 5 天重复步骤 13 - 16。

18. 第六天，进行下一个实验操作。

## 中脑类器官扩增 (第 6 - 25 天)

使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温 (15 - 25° C)。

如果没有超低吸附板，可以使用组织培养处理过的培养皿，组织培养处理过的培养皿需要使用抗黏附润洗液处理，以防止细胞附着。每个孔中加入 1 毫升抗黏附润洗液，反复润洗后，将溶液从孔中取出并丢弃。

## ①Day 6



## 中脑类器官扩增培养基制备

**中脑类器官扩增培养基**（250 mL）：使用前先恢复至室温，245mL 基础培养基 3+5mL 补充剂 B+0.5mL 补充剂 C+0.5mL 补充剂 D，注意：如果不立即使用的话，最多在 2 - 8° C 储存 3 周，不要超过基础培养基和补充剂的保质期，解冻后立即使用，不要反复冻融。基础培养基 3 存在一定黏性是正常的，使用前摇匀缓慢移液以确保有效转移培养基。如果不混合补充剂，请将补充剂放入-20° C 保存。不要超过补充剂的保质期。解冻后立即使用。不要反复冻融。

1. 在 6 孔超低吸附板的每孔中加入 2mL 中脑类器官扩增培养基。

**注：**来自 AggreWell™800 24 孔板的一个孔的类器官可以均匀地分布到 6 孔板中。推荐的范围是每孔 25 - 40 个类器官。控制孔中类器官的数量对于避免过早融合事件造成产量损失至关重要。

2. 将 37μm 可逆过滤器置于 50ml 锥形管顶部。锥形管上标注废液。

**注：**可逆过滤器上的箭头应该指向上方。对每个 AggreWell™800 孔使用新的过滤器和新管进行收获。

3. 从含有类器官的孔中吸出上部分的培养基，并使用 1 mL 宽口移液器吸头将底物培养基牢牢地吸出孔。

4. 使用相同直径的宽口移液器吸头，抽吸悬浮液并通过 37 μ m 可逆细胞过滤器过滤。类器官将留在过滤器的顶部，单细胞流入废液管中。

5. 用相同直径的宽口移液器吸头取 1mL 的 DMEM/F-12，并将其牢固地排出到同一 AggreWell™800 孔中。当类器官处于悬浮液中时，迅速将悬浮液从步骤 4 转移到过滤器中。

6. 重复步骤 5，直到所有类器官都从孔中取出。一次或两次重复应该足以清除所有类器官。在显微镜下检查孔，确保所有类器官已被移出。

7. 将可逆细胞过滤器倒置在一个新的 50ml 锥形管上，并在可逆细胞过滤器上加入 2mL 中脑类器官扩增培养基，收集吸附在过滤器上的所有类器官。

**注：**中脑类器官扩增培养基是存在一定黏性的，可能需要很高的吸液力才能有效地从过滤器中收集有机物。

8. 轻轻摇匀锥形管以产生类器官悬液，并使用 1 mL 宽口移液器吸头将类器官转移到 6 孔板中。

6 孔板每孔不超过 40 个类器官。



9. 轻轻地摇动板子，十字摇匀，使类器官平均分布在孔中。显微镜观察板，确保类器官之间的接触最小。

10. 小心地将板放在 37° C， 5% CO<sub>2</sub> 培养箱的水平表面上。 孵育 2 天。

## ②Day8-Day25

使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。

11. 轻轻倾斜 6 孔板，等待类器官沉到孔底（约 15 - 30 秒）。

12. 小心地将平板调平，用 1mL 移液器从每个孔的顶部移去培养基。

13. 每孔加入新鲜中脑类器官扩增培养基 2mL。 在孵育之前，轻轻摇动培养皿，十字摇动，使类器官分布在孔中。显微镜观察板，确保类器官之间的接触最小。小心地将板放在 37° C， 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中的水平表面上，确保板不受干扰。

14. 在第 8 天至第 25 天，每两天进行一次换液（步骤 11 - 13）。

15. 第 25 天，进行下一个实验操作。

## 中脑类器官分化（第 25 - 43 天）

### ①Day 25-43

#### 中脑类器官分化培养基制备

中脑类器官分化培养基（250 mL）：使用前先恢复至室温，245mL 基础培养基 3+5mL 补充剂 B+0.25mL 补充剂 E，注意：如果不立即使用的话，最多在 2 - 8° C 储存 3 周，不要超过基础培养基和补充剂的保质期，解冻后立即使用，不要反复冻融。基础培养基 3 存在一定黏性是正常的，使用前摇匀缓慢移液以确保有效转移培养基。如果不混合补充剂，请将补充剂放入 -20° C 保存。不要超过补充剂的保质期。 解冻后立即使用。不要反复冻融。

使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。

1. 轻轻倾斜 6 孔板，等待类器官沉到孔底（约 15 - 30 秒）。

2. 小心地将平板调平，用 1mL 移液器从每个孔的顶部移去培养基。

3. 每孔加入新鲜中脑类器官分化培养基 2mL，37° C， 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。

4. 在第 27 天至第 43 天，每两天进行一次换液（步骤 1 - 3）。

15. 第 43 天，进行下一个实验操作。



## 中脑类器官维持（第 43+天）

### ①Day 43+

#### 中脑类器官维持培养基制备

**中脑类器官维持培养基** (100mL): 使用前先恢复至室温, 98mL 基础培养基 3+2mL 补充剂 B , 注意: 如果不立即使用的话, 最多在 2 - 8° C 储存 3 周, 不要超过基础培养基和补充剂的保质期, 解冻后立即使用, 不要反复冻融。基础培养基 3 存在一定黏性是正常的, 使用前摇匀缓慢移液以确保有效转移培养基。如果不混合补充剂, 请将补充剂放入 -20° C 保存。不要超过补充剂的保质期。 解冻后立即使用。不要反复冻融。

**使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温 (15 - 25° C) 。**

1. 轻轻倾斜 6 孔板, 等待类器官沉到孔底 (约 15 - 30 秒) 。
2. 小心地将平板调平, 用 1mL 移液器从每个孔的顶部移去培养基。
3. 每孔加入新鲜**中脑类器官维持培养基** 2mL。
4. 每 2-3 天换液。

注: 一旦类器官变大 (即第 50 天以上), 将中脑类器官维持培养基增加到每孔 3mL, 以确保类器官都被培养基覆盖。

5. 第 50 天, 可对中脑类器官进行免疫荧光染色, 可以在中脑类器官外周区域检测到中脑相关细胞表型特异性标志物, 包括 FOXA2+/LMX1A+中脑祖细胞标志物, TH+/GIRK2+多巴胺能神经元标志物。可以使用**中脑类器官维持培养基** 50 天以上。

