

## hPSC 诱导分化全脑类器官试剂盒

Cat NO: IMV-W001

### 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化全脑类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到全脑类器官，该试剂盒通过四种组分完成经典的脑类器官分化流程即：神经外胚层分化、神经上皮出芽及神经管形成、神经扩张、脑成熟。诱导过程需要植入 EB 球于低生长因子基质胶，诱导 38 天以上的全脑类器官表达 TUJ1、SOX2、Nestin、NeuN 等基础神经表征、FOGX1、CTIP2 等前脑、皮层表征，进入长期培养后  $\geq 80$  天可少量表达 GFAP、TH 等功能神经元及胶质细胞 Maker。

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

该试剂盒规格可获得生成超过 196 个脑类器官，建议每次诱导以 1/2 个六孔板启动分化流程，形成至少 98 均一大小 EB 球进行全脑诱导流程。

### 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）、10 $\mu$ L/100  $\mu$ L 宽口移液器吸头、6 孔板（TC 处理/非低吸附）、6 孔超低吸附板、超低吸附 96 孔 U 底板

### 试剂盒内容

研究阶段	产品名称	产品规格	储存
拟胚体形成阶段	基础培养基 1	200 mL	-20 $^{\circ}$ C，6 个月
	补充剂 A 500X	400 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C，6 个月



神经外胚层分化阶段	基础培养基 2	100 mL	-20℃, 24 个月
神经出芽分化阶段	基础培养基 3	200 mL	-20℃, 24 个月
神经成熟分化阶段	基础培养基 4	200 mL	-20℃, 24 个月
神经成熟维持阶段	基础培养基 5	200 mL	-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
低生长因子基质胶	IMMOCELL	IMV-A019
Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS), 不含钙、镁、酚红	IMMOCELL	IMC-409
酒精	-	-
6 孔板 (TC 处理/非低吸附)	-	-
6 孔超低吸附板	-	-
超低吸附 96 孔 U 底板	-	-
Accutase	-	-
10μL/100 μL 宽口移液器吸头	-	-
台盼蓝	-	-

### 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%。

#### 拟胚体(EBs)形成 (第 0-2 天)

##### 拟胚体形成培养基制备

拟胚体形成培养基 (12 mL/3 孔): 使用前先恢复至室温, 12 mL 基础培养基 1+1 x 24 μL 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：如果不立即使用的话，最多在 2 - 8° C 储存 2 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。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 Day 0-2

1. 使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。
2. 当 iPSC/hESC 生长至 70-80% 汇合度，镜下观察细胞状态良好。
3. 对于 3 孔/6 孔板 80% 密度的 iPSC/hESC 细胞，准备拟胚体形成培养基（12 mL/3 孔）。准备 3mL Accutase、50 mL DPBS 无菌不含钙镁，和 10 mL DMEM/F12 预热到室温。
4. 使用不含钙镁的室温 DPBS 洗涤六孔板的三个孔一遍，弃掉 DPBS，s 每孔加入 1mL 的 Accutase 37 度消化 3min。
5. 当看到克隆发白发亮，轻轻拍打板侧（每侧拍两下），把细胞拍下来，再在生物安全柜中，加入 1mL DMEM/F12 终止消化，吹打至细胞完全脱落且成单细胞型态，进行台盼蓝计数细胞活力高于 90% 即可进行下一步诱导。
6. 160g/ 5min 离心收集到的 6mL 细胞悬浮液，弃掉上清加入 12mL 的拟胚体形成培养基，再次检测细胞活力和细胞计数，最终每 mL 的细胞量在 50000-80000 之间最佳。
7. 准备一个超低吸附的 96 孔 U 底板，将 12mL 的细胞悬液（含补充剂 A）加入加样槽中，使用排枪/移液枪每孔加入 100uL 的细胞悬液。加样完成后将培养皿用封口膜封好使用水平板式离心机 1200rpm/3min 离心。
8. 撕掉封口膜放入细胞培养箱培养过夜、第二天每孔加入 100uL 基础培养基 1。
9. 48 小时后悬浮的细胞即可聚集成球，边缘光滑圆润的 EBs 状态最佳。后续进行下一个实验操作。

注：

- ①、PSC 克隆出现问题、自分化及漂浮的情况应再启动复苏扩增一株，不可直接用于诱导。

## 神经外胚层分化（第 2 - 6 天）

使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。



### ①Day 2-6

1. 将诱导好的 EBs 转移到超低吸附 6 孔板里，每孔加入 10 个 EBs 后使用 DPBS 洗涤一次清除上个阶段的培养基残留，吸弃 DPBS 后每孔加入 2ml 的基础培养基 2，每天 2 天换液一次，诱导共 4 天。
2. 出现神经外胚层扩张的 EB 边缘变的透亮，直径 >400um，内部致密无空腔，整体呈现类似小鼠原代神经球的型态。

## 神经出芽（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）。

### ①Day 6-25

1. 当 EBs 直径达到相关标准时 400-600um 即可进行基质胶包埋，4 度化冻分装的低生长因子基质胶 2ml。
2. 准备一张长宽均 10cm 的封口膜，在 200ul 枪头盒上按压出凹点，放置于 10cm 皿，使用酒精浸泡 30 秒后置于安全柜紫外烘干 30min 以上即可使用。
3. 使用宽口 10-100  $\mu$ L 移液枪头(量程 50  $\mu$ l)吸取神经外胚层分化结束的 EB 与按压的凹点上，一次建议操作 10 个为佳。之后使用移液枪小心的吸弃凹点内的培养基残留后，每个凹点及 EBs 加入 30  $\mu$ L 的低生长因子基质胶小心包埋 EBs，如若 EBs 在胶体边缘则使用 10  $\mu$ L 小枪头轻轻挑弄 EBs 周围的胶体让其置于中央部位。(注意不要形成气泡)。
4. 将包埋好的 EBs 盖好，放于 37 度凝胶 15min 后使用无菌的镊子夹起封口膜，用 1 mL 的**基础培养基 3** 将每排的 EBs 胶体贴着凹点的底部吹到超低吸附 6 孔板中，每孔最多放置 10 个类器官，每孔培养基体积不能大于 3mL。
5. 如若一次性制作太多 EBs，也可以直接将预冷 30min 以上的 12 mL 的**基础培养基 3** 补充 10% 的低生长因子基质胶，（也就是 1.2 mL 的胶体）漩涡混匀后。吸弃原孔板中的**基础培养基 2**，每孔补充 3 mL **基础培养基 3+低生长因子基质胶**，诱导 48 小时后吸弃培养基，使用 DPBS 洗涤两次，再次加入 3 mL 每孔不含基质胶的**基础培养基 3** 进行第 6 步操作。
6. 将超低六孔板放置于水平摇床(80rpm/s)里 37 度培养 18 天完成神经上皮的扩张，每两天换液一次。EBs 一般在神经上皮扩张第 4 天的时候出现早期 VZ、SVZ 样的结构、12 天后芽点



慢慢汇合变黑。

## 神经及脑成熟（第 25 天后）

使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。

### ①Day 25+

1. 当 EBs 中心致密、外层形成疏松的上皮结构且直径大于 1mm 说明神经扩张到成熟阶段，完全弃去**基础培养基 3**，每孔加入 3 mL 的**基础培养基 4**持续培养至 38 天后(每两天换液一次/80rpm/s)，EBs 的直径大于 2mm 时内部会出现营养无法渗入的情况，需要使用 1mL 注射器将 EBs 周围的胶体小心的去掉后每孔加入 3mL **基础培养基 5**(每天换液)，并提高摇床转速至 120rpm/s 改善营养循环状态，让脑类器官可以长期培养 >100 天。

