

# hPSC 诱导分化皮质脑类器官试剂盒

Cat NO: IMV-C003

## 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化皮质脑类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到皮质脑类器官，该试剂盒通过前脑腹侧化信号通路调控技术，专为模拟人脑皮质发育及功能研究设计的标准化培养体系。该体系通过时序激活 Wnt/β-catenin 及梯度抑制 BMP/Smad 信号，驱动人源多能干细胞 (PSC) 定向分化为高纯度谷氨酸能神经元 (VGLUT1/2 阳性率>85%)，并同步诱导放射状胶质细胞 (Pax6+/BLBP+) 形成仿生脑室区结构。可在 60 天内稳定生成直径 1.5-2.0 mm 的层状皮质类器官，其特征性表达深层皮质标志物 TBR1 (第 V-VI 层) 及表层 SATB2+ 神经元 (第 II-IV 层)，并伴随 MBP+/MOG+ 少突胶质细胞介导的致密髓鞘化 (LFB 染色阳性率>70%)。该体系通过三维旋转生物反应器或超低粘附孔板中 (3DRBC, 氧梯度维持在 8-12%) 实现高通量培养 (单批次≥96 个类器官)。本模型适用于神经退行性疾病 (如阿尔茨海默症 tau 蛋白病理建模)、精神分裂症 NMDA 受体功能解析及自闭症谱系障碍突触可塑性研究，同时兼容单细胞测序和钙成像动态追踪技术。

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 200 个脑类器官，建议每次诱导以 1 个六孔板启动分化流程，形成至少 60-100 个均一大小神经上皮球 (理想形成率 60%)。

## 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 μL、100 μL、1000 μL 和多通道 100μL)、无菌吸头 (规格为 10 μL、200 μL 和 1000 μL)、移液管 (规格为 10mL、50mL)、1mL/200 μL 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
神经上皮分化阶段	基础培养基 1	200 mL	-20℃, 24 个月
	基础培养基 2	100 mL	-20℃, 6 个月
	补充剂 A 500X	400 uL	-20℃, 6 个月
神经球形成阶段	基础培养基 3	200 mL	-20℃, 24 个月
神经莲座扩张阶段	基础培养基 4	400 mL	-20℃, 24 个月
皮质脑成熟阶段	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
Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS), 不含钙、镁、酚红	IMMOCELL	IMC-409
hESC/iPSC 传代工作液 (无酶)	IMMOCELL	IMC-014-E2
6 孔板 (TC 处理/非低吸附)	-	-
超低吸附 96 孔 U 底板	-	-
6 孔超低吸附板	-	-
Accutase	-	-
台盼蓝	-	-
200 $\mu$ L / 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%。

## 神经上皮分化（两种分化方式）

### ①神经上皮干细胞 NESc 的二维诱导

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 传代后两天直接进行神经上皮诱导，观测细胞形态成小岛状克隆，细胞克隆密度低于 30%、无单细胞胁迫生长样及应激态球状克隆团即可进行诱导。弃去 hESC/iPSC 细胞培养试剂盒使用 DMEM/F12 润洗两次细胞去除漂浮细胞后每孔加入 2 mL 基础培养基 1，每 2 天换液一次，直到细胞克隆密度达到 80%，10x 显微镜下观测克隆边缘圆润光滑、细胞核缩小且变多，诱导时间计 3-4 天。

注：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。

### ②. 从 EB 球直接神经上皮诱导（新手建议此方法进行分化）

1. 使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。
2. 将 iPSC/hESC 细胞培养至 80% 的克隆密度、克隆边界清晰圆润、细胞核质比正常即可进行 EB 诱导，DPBS 洗涤细胞两遍后使每孔用 500 μL 的 Accutase 或者 hESC/iPSC 传代工作液（无酶），消化 6-10 分钟，观测克隆变圆皱缩变亮、摇晃可见少量细胞脱离基质即可终止消化。
3. 吸弃消化液，如若使用 Accutase 消化导致细胞大量漂浮则不吸弃，使用等量的 DMEM/F12 终止消化。而 hESC/iPSC 传代工作液（无酶）消化则吸弃后直接每孔加入 500 μL 基础培养基 2 重悬细胞后收集于 15mL 或 50mL 离心管中（根据消化液种类灵活选择）。
4. Accutase 消化后的细胞 120g 离心 5 分钟弃除上清后，加入按消化的孔数\*500 μL 的体积加入基础培养基 2 重悬并补充 1X 补充剂 A，而 hESC/iPSC 传代工作液（无酶）消化后的细胞直接加入原重悬体系的（消化孔数\*500 μL）的体积的基础培养基 2 后补充 1x 补充剂 A。
5. 将细胞悬浮液+ 1x 补充剂 A 加入加样槽中或 10cm 细胞培养皿，使用排枪每孔 100 μL 加入超低吸附 96 孔 u 底培养皿中，封口膜包好后水平甩板机 1500rpm 离心 5 分钟，37 度细胞培养箱培养过夜，第二天每孔加入 100 μL 基础培养基 2 (不含补充剂 A)，EB 形成总时间约 48 小时。
6. 第三天完全吸弃培养基，每孔加入 200 μL 基础培养基 1 培养三天，第二天吸弃 100 μL



再补液 100  $\mu$  L 去除培养代谢废物。

## 神经球形成（直接从 EB 诱导神经上皮的方法不参考 2-4，直接看 5）

1. 使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。
2. 将 6mL Accutase 预热至室温后，放入生物安全柜，每孔使用 1mL 的 DPBS 洗涤诱导的神经上皮干细胞两次，每孔加入 800  $\mu$  L-1000  $\mu$  L 的 Accutase，放入培养箱消化 5-8 分钟，每 4 分钟观测一次细胞状态，细胞克隆边缘卷起、细胞间隙变亮且有少量细胞漂浮于消化液中即可终止消化。
3. 从侧壁处吸弃消化液，每孔加入 1mL 的**基础培养基 3** 重悬细胞后定容于 12mL 的**基础培养基 3**+12  $\mu$  L 的**1x 补充剂 A**，如若细胞消化过度大部分完全飘起则使用每孔 1mL 的 DMEM/F12 终止消化后 120g/3min 离心收集细胞后定容于 12 mL 的**基础培养基 3**+12  $\mu$  L **1x 补充剂 A**，注意：定容前台盼蓝染色检测细胞活性高于 80%即可进行下一步操作。出现神经外胚层扩张的 EB 边缘变的透亮，直径>400 $\mu$ m，内部致密无空腔，整体呈现类似小鼠原代神经球的形态。
4. 离心结束细胞应聚集于孔的一侧，放入培养箱中培养 24h 后每孔再次加入 100  $\mu$  L 的**基础培养基 3** 不含**补充剂 A**，神经球形成诱导时间计 2 天。
5. 对于直接形成 EB 后诱导神经上皮的体系，完成 3 天的诱导后完全吸弃**基础培养基 1** 每孔加入 250  $\mu$  L **基础培养基 3** 诱导 2 天。

## 神经莲座扩张(两种方案一致)

1. 使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。
2. 当神经球直径达到相关标准时（200-600  $\mu$  m），使用宽口 200  $\mu$  L 移液枪头吸出神经球于超低吸附 6 孔板中，每个孔最多容纳 10 个神经球，所以最少准备 2 个六孔板启动神经莲座扩张。
3. 神经球进入 6 孔板中后，轻柔的每孔加入 2mL **基础培养基 4** 后，放入十字/旋转摇床 80rpm/s 上培养 18 天，每 1-2 天换液一次/每孔换液 2mL。

## 皮质脑成熟



1. 使用前将培养皿、培养基和试剂恢复至室温（15 - 25° C）。
2. 当神经球中心和外侧出现黑色的斑点状结构说明神经莲座扩张到适合阶段，完全弃去培养基每孔加入 2mL 的**基础培养基 5** 放入十字/旋转摇床 80rpm/s 上培养 18-26 天/每 2-3 天换液一次即可用于鉴定和下游实验。成熟的脑类器官结构上 IF 染色可见 TUJ1/SOX2 标记的细胞形成 VZ 和 SVZ 样的结构，且高表达谷氨能相关基因，使用**基础培养基 5** 长期于摇床培养可以培养至 120 天中心细胞不出现凋亡。
3. 当皮质脑培养至直径大于 1mm 以上时，需对其进行切割减少内部细胞凋亡的情况。使用锋利无钝口的 2 号手术刀片将一个 1mm 以上的皮质脑类器官切割成 2-4 块，DPBS 洗涤一遍类器官后，使用宽口 1000  $\mu$  L 移液枪头转移至 15mL 离心管中自然沉降（约需要 5-8min），吸弃 DPBS 上清后，加入**基础培养基 4+1x 补充剂 A** 转移入超低粘附六孔板 80rpm/s 培养 4 天，每天换液。4 天后加入更换为**基础培养基 5** 120rpm/s 继续维持培养，可延长培养时间和类器官活性至 180 天。

