

## hPSC 诱导分化体节类器官试剂盒

Cat NO: IMV-S003

### 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化体节类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到体节类器官，该成熟类器官轴向延伸、细胞分裂、上皮化，重现人类体节形成和轴向发育的各个方面。

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。

### 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：细胞培养板（规格为：96 孔）、离心管（规格为 15 mL、50 mL）、移液器（规格为 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1000  $\mu$ 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）

### 规格数量

使用 96 孔平底低附着板，可诱导 5 板体节类器官，体节类器官数量至少 480 个，诱导效率诱导效率在 70-80%。

### 实验试剂

研究阶段	产品名称	产品规格	储存
I 阶段 (D-1-0)	基础培养基 1	20mL	-20°C, 12 个月
	补充剂 A	50 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
	补充剂 B	50 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
II 阶段 (D1-3)	基础培养基 2	200mL	-20°C, 12 个月
	补充剂 C	200 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
	补充剂 D	200 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
III 阶段 (D4-9)	基础培养基 3	50mL	-20°C, 12 个月



	补充剂 E	5mL	-20℃, 6 个月
	补充剂 F	250μL	-20℃, 6 个月

## 其他相关试剂

### 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
<b>hESC/iPSC 细胞培养试剂盒</b>	逸漠生物	IMC-014
<b>hESC (H9)</b>	逸漠生物	IM-H522
<b>hESC/iPSC 传代工作液</b>	逸漠生物	IMC-014-E
<b>Y-27632</b>	逸漠生物	IMC-014-Y
<b>DMEM/F12 培养基</b>	逸漠生物	IMC-205
<b>Matrigel</b>	Corning	354277
<b>Accutase</b>	STEMCELL	07920
<b>DPBS</b>	逸漠生物	IMC-409
<b>6 孔细胞培养板</b>	硕华生物	N/A
<b>96 孔细胞培养板</b>	青岛金典生化器材有限公司	N/A
<b>15 mL/50 mL 离心管</b>	硕华生物	N/A
<b>10 μL/200 μL/1000 μL 无菌吸头</b>	佳顺生物	N/A
<b>10mL/50mL 移液管</b>	NEST	N/A

## 实验内容与方法

### 1、I 阶段 (D-1-0) (按 1 个六孔板, 每孔 2mL 算)

- (1) hPSC 于基质胶包被的六孔板的一个孔生长至 70-80%汇合度。
- (2) 吸去培养基。
- (3) 将 5mL 基础培养基 1、补充剂 A 和补充剂 B 充分混合 (可培养六孔板 2 孔), 按每孔 2mL 的体积接种到六孔板中, 然后将孔板转移到 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 1 天。



## 2、II阶段（D1-3）（按1个96孔板，每孔100 $\mu$ L算）

- （1）孵育24h后，吸去培养基。
- （2）孔中加入1mL PBS（无钙镁离子）洗，吸去。
- （3）孔中加入1mL Accutase，37 $^{\circ}$ C消化3min。
- （4）消化完成后于显微镜下可看到克隆发白发亮。轻拍孔板侧边几下，使细胞脱离板底，加入1mL 基础培养基1终止消化，并使用P-1000吸头将这2mL细胞单悬液收集到15mL离心管中，室温下300g离心5min。
- （5）离心结束，去除上清至剩20 $\mu$ L，轻弹管底3-4下，将1mL预热的的基础培养基1（含10 $\mu$ M Y-27632）重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。
- （6）使用自动细胞计数器计数细胞，使用台盼蓝排除死亡细胞，按每孔500个细胞的比例将所需细胞收集到离心管中，将10mL基础培养基2、补充剂C与补充剂D充分混合（可培养2个96孔板），将上面计数所得的细胞悬液加入5mL的含补充剂C/D的基础培养基2中，将细胞吹打均匀，然后按每孔50 $\mu$ L/500个细胞的体积将细胞悬液接种到96孔低吸附U形板中，1000rpm离心5min，然后将孔板转移到37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育24h。
- （7）24h后，每孔加入150 $\mu$ L基础培养基2，然后将孔板转移到37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育24h后，再次把培养基换成150 $\mu$ L基础培养基2，接着再孵育24h。

## 3、III阶段（D4-9）

- （1）等聚集体开始长出小的轴突体后，取出补充剂E置于4 $^{\circ}$ C解冻，将1mL补充剂E与50 $\mu$ L补充剂F加入10mL冷的基础培养基3中，反复吹打溶解20次。将培养基换成80 $\mu$ L/孔含补充剂E/F的基础培养基3，再将类器官和培养基转移到96孔平底低附着板中，将培养皿放入培养箱中，37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub>培养24-48h。

