

NeruoPrime Cerebral inducer Medium Kit

NeruoPrime series 全脑类器官诱导试剂盒

Kit Art.No: ML-0827N05



- ◇ 产品是无菌的，产品外包装是非无菌的，请在使用前对产品外包装充分消毒。
- ◇ 产品一经拆封，应妥善存放以确保产品的无菌性。

1、产品描述

NeruoPrime series 全脑类器官诱导试剂盒是模基生物以神经外胚层自分化体系为研发基础的一款脑区不定向分化试剂盒，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 球于低生子因子基质胶(货号：082703)，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 ≥ 80 天可少量表达 GFAP、TH 等功能神经元及胶质细胞 Marker。

2、产品信息

产品名称	产品货号	试剂盒组分	规格	试剂盒组分货号	存储/运输	保质期
NeruoPrime series 全脑类器官诱导试剂盒	ML-0827N05	神经外胚层诱导培养基 (Neuroectodermal induction Medium)	50 mL	ML-0827N05A	-20°C	24 个月
		神经出芽诱导培养基 (NeuroBud Induction Medium)	100 mL	ML-0827N05B		
		神经成熟培养基 (NeuroMaturation Medium)	100 mL	ML-0827N05C		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
低生长因子金牌无酚红基质胶	082703
NeruoPrime series 脑类器官长期培养试剂盒	ML-0827N06
StemGrowth series EBs 形成培养基	ML-0827S07

产品名称	产品货号
StemGrowth series 水解酶温和消化液	ML-0827S03
StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基	ML-0827S04
StemGrowth series 抗胁迫补充剂 1000x	ML-0827S10
StemGrowth series 消化液	ML-0827S08
超低黏附 96 孔 u 底板	ML-0827P12
超低黏附 6 孔培养皿	ML-0827P13
8-12 通道排枪	-
水平板式离心机	-

4、模基生物推荐用细胞系

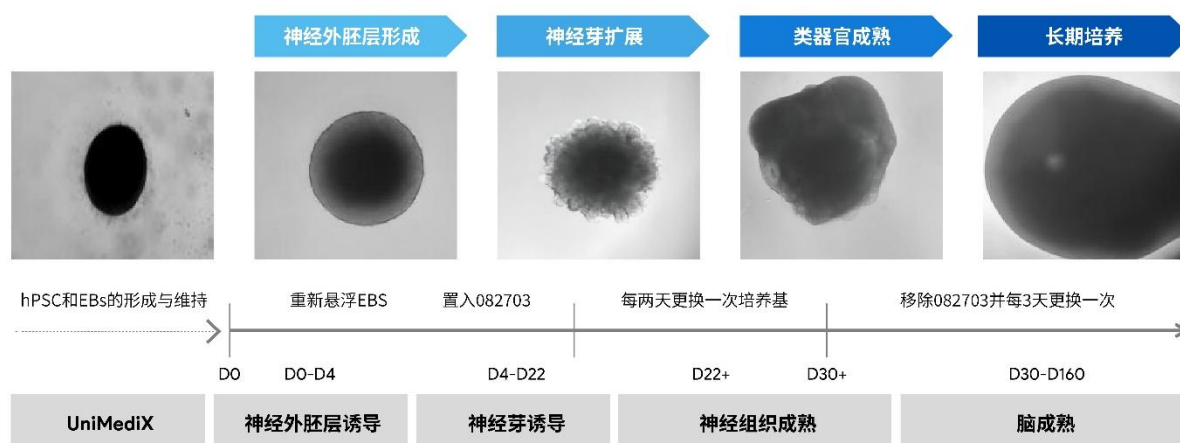
H1、H9、HN4、iPSCs 帕金森患者来源 DY043、iPSC-EGFP 等

5、新手须知

NeruoPrime series 脑类器官诱导试剂盒理论上可以形成至少 96 个脑类器官，但是建议每次诱导以 1/2 个六孔板启动分化流程，形成至少 96 个均一大小 EB 球进行全脑诱导流程。

注意事项：在使用时应始终穿戴防护服，在处理诸如人体细胞或其他生物及有害物质时应遵循安全的实验室规程。

仅用于科学研究。



6、使用说明

a) 实验用品

低生长因子基质胶、StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基、StemGrowth series EBs 形成培养基、全脑类器官诱导试剂盒、超低黏附 96 孔 u 底板/超低黏附 6 孔培养皿

b) 使用程序:

b.1、PSC 细胞培养及 EB 球诱导

1、 根据不同 PSC 细胞系的特性从 ESC < 60P、iPSC < 50P 中复苏一支细胞、经过两次高质量传代记作复苏后 P3 (干细胞培养操作见 StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基 /StemGrowth UniMediX GoldenHold Medium 培养 SOP)

2、 PSC 传代后细胞克隆密度达到 80%，10x 显微镜下观测克隆边缘圆润光滑、干性维持良好即可进行 EBs 诱导，诱导克隆汇合时间计 4-7 天。

3、 对于 6 孔板中的 3 孔，80%密度的 PSC，准备 12 mL 的 StemGrowth serie EBs 形成培养基补充 12 μ L 的 StemGrowth serie 抗胁迫补充剂。准备 3 mL StemGrowth serie 水解酶温和消化液添加 3 μ L StemGrowth serie 抗胁迫补充剂、准备 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，每孔加入 1 mL 的 StemGrowth serie 水解酶温和消化液 37 $^{\circ}$ C 消化 7-10 min。

5、 镜下观察细胞的消化情况、直到细胞边缘变的透亮且连片飘起即可终止消化，每孔加入 1 mL 的 DMEM/F12 中和消化液，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、 130 g/3 min 离心收集到的 6 mL 细胞悬浮液，弃掉上清加入 12 mL 的 StemGrowth series EBs 形成培养基 1xStemGrowth series 抗胁迫补充剂,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、 准备一个超低黏附的 96 孔 u 底板，将 12 mL 的细胞悬液 (含 1xStemGrowth series 抗胁迫补充剂)加入加样槽中，使用排枪/移液枪每孔加入 100 μ L 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 1200 rpm/3 min 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 100 μ L StemGrowth series EBs 形成培养基不含 StemGrowth series 抗胁迫补充剂。

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。

注意！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

b.2、神经外胚层诱导

1、 将诱导 48 小时的 EBs 转移到超低黏附 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 2 mL 的神经外胚层诱导培养基, 将超低六孔板放置于水平摇床(80 rpm/min)里 37 度培养, 每 2 天换液一次, 诱导共 4 天。

注意! EBs 形成后的全部阶段都要上摇床!

2、 出现神经外胚层扩张的 EB 边缘变的透亮, 直径 > 400 μm , 内部致密无空腔, 整体呈现类似小鼠原代神经球的型态。

b.3、神经出芽

1、 当 EBs 直径达到相关标准时 400-600 μm 即可进行基质胶包埋, 4 度化冻分装的低生长因子基质胶(082703) 2 mL。

2、 准备一张长宽均 10 cm 的封口膜, 用离心管底部在 200 μL 枪头盒的支撑架上按压出凹点, 按着枪头孔一个一个轻轻压, 放置于 10 cm 皿, 使用酒精浸泡 2-5 分钟, 拿出来后放干净的 10 cm 皿里, 风干后置于安全柜紫外烘干 30 min 以上即可使用。

3、 使用宽口 10-100 μL 移液枪头(量程 50 μL)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 μL 的低生长因子胶小心包埋 EBs, 如若 EBs 在胶体边缘则使用 10 μL 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 15 min 后使用无菌的镊子夹起封口膜, 用 1 mL 的神经出芽培养基将每排的 EBs 胶体贴着凹点的底部吹到超低黏附六孔板中, 每孔最多放置 10 个类器官, 每孔培养基体积不能大于 3 mL。

5、 如若一次性制作太多 EBs, 也可以直接将预冷 30 min 以上的 12 mL 的神经出芽培养基补充 10%的低生长因子基质胶(货号: 082703), 即 1.2 mL 的胶体, 漩涡混匀后。吸弃原孔板中的神经外胚层诱导培养基, 每孔补充 3mL 神经出芽培养基+基质胶, 放置于水平摇床(80 rpm/min)里 37 度诱导 48 小时后吸弃培养基, 使用 DPBS 洗涤两次, 再次加入 3 mL 每孔不含基质胶的神经出芽培养基进行第 6 步操作。

6、 将超低六孔板放置于水平摇床(80 rpm/min)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。

b.4、神经及脑成熟

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

