

NeuroCortex Inducer Medium Kit

NeuroCortex series 皮质脑区类器官诱导试剂盒

Kit Art.No: ML-0827N01/ML-0827N02



- ◇ 建议使用 H9、H7、H4N、DY034A 等经过本实验室神经分化学验证的 PSC 株系
- ◇ 建议使用传代小于 100 代以内的 PSC 进行诱导

1、产品描述

模基生物推出 NeuroCortex series 皮质脑区类器官诱导试剂盒，提供了一种简单、可重复的三维培养方案，用于从人多能干细胞生成具有层状结构的人类皮质球体，使用本试剂盒可生成至少 96 个皮质球体且培养时间超过 200 天。该模型包含从深层到浅层的多种皮层神经元，其转录图谱高度模拟胎儿体内发育过程；所产生的神经元能够电生理成熟、展现自发活动，并被静息态星形胶质细胞包围，形成功能性突触。本试剂盒为研究正常与异常皮质发育、神经精神疾病机制及药物筛选提供了可靠、灵活的体外平台。

2、产品信息

以下组件作为试剂盒（货号：ML-0827N01/ML-0827N02）的一部分出售，无法单独购买

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
NeuroCortex series 皮质脑区类器官诱导试剂盒	ML-0827N01	NeuroCortex series Basal Medium 1	500 mL	ML-0827MB01A	4-8°C	12 个月
		NeuroCortex series Supplement A 20X	5 mL	ML-0827MB01B	-20°C	
		NeuroCortex series Supplement B 20X	10 mL	ML-0827MB01C		
		NeuroCortex series Supplement C 20X	10 mL	ML-0827MB01D		
		Entecashen Neuroprotective Supplement 1000X	100 µL	ML-0827MB01E		

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
NeuroCortex series 皮质脑区类器官长期培养试剂盒	ML-0827N02	NeuroCortex series Basal Medium 2	200 mL	ML-0827MB02A	4-8°C	
		NeuroCortex series Supplement D 20X	10 mL	ML-0827MB02B	-20°C	

*本产品含有溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中的成分, 如孕酮和皮质醇。DMSO 是一种强溶剂和皮肤穿透剂, 能将许多物质通过皮肤传输。DMSO 也能穿透一些防护手套材料, 包括乳胶和硅胶。在操作本产品时应格外小心。

3、其他自备试剂

产品名称	产品货号
StemGrowth series EBs 形成培养基	ML-0827S07
StemGrowth series 抗胁迫补充剂 1000x	ML-0827S10
超低黏附 96 孔 u 底板	ML-0827P12
超低黏附 6 孔培养皿	ML-0827P13
StemGrowth series 水解酶温和消化液	ML-0827S03

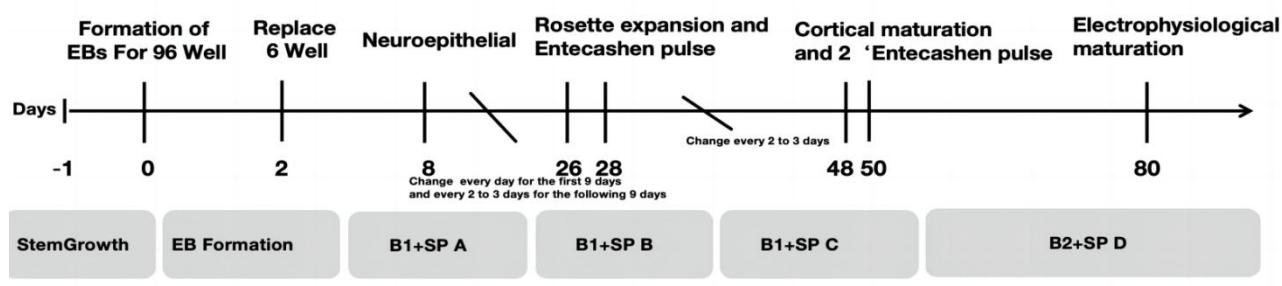
4、实验前建议

诱导前, 对使用的 PSC 株系进行多能性验证 (OCT4、Nanog、SSEA-3/4), IFA 或 IF 阳性率大于 90%后进行神经分化能力验证, 具体步骤如下: 将 PSC 传代于 12 孔板中的 4 个孔, 培养 4 天, 使其密度达到 70%后, 第一个孔 TRIzol 收集提取总 RNA 作为未分化对照, 配置 12 mL 的 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 600 μ L NeuroCortex series Supplement A 20X, 作为神经上皮分化完整培养基, 对剩余的三个孔每孔 1 mL 诱导 4 天, 每天换液。分化完成后, 使用 TRIzol 收集分化后的三个孔的细胞进行 qPCR 验证神经相关 mRNA 表达量, PAX6 和 SOX2 表达量高于对照(未分化的细胞) 200 倍, nestin 高于对照 50 倍以上说明此株系神经谱系分化正常, 验证引物如下:

QSOX2	
Forward Primer	CTCGTGCAGTTCTACTCGTCG
Reverse Primer	AGCTCTCGGTCAGGTCCTTT
Homo sapiens nestin	
Forward Primer	CTGCTACCCTTGAGACACCTG
Reverse Primer	GGGCTCTGATCTCTGCATCTAC

5、新手须知

对于没有多能干细胞培养和分化经验的同学们，建议使用模基生物经过神经分化验证的PSC株系，如iPSC-THY1和H4N等。



6、使用说明

1、PSC 细胞培养和 EBs 形成

1、 根据不同PSC细胞系的特性从ESC < 100P、iPSCs < 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Mogengel®多能干细胞金牌培养基系列提供的PSC培养SOP）。

2、 将PSC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的水解酶温和消化液/货号：ML-0827S03或StemGrowth series 消化液/货号：ML-0827S08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、 水解酶消化后的细胞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EBs形成培养基重悬并补充1x抗胁迫补充剂/货号：ML-0827S10，而StemGrowth series 消化液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EBs培养基后补充1x的抗胁迫补充剂。

4、 将细胞悬浮液+1x抗胁迫补充剂后，加入加样槽中或10cm细胞培养皿，使用排枪每孔100 μL加入超低粘附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 EBs形成培养基(不含抗胁迫补充剂)，EB形成总时间约48小时。

2、皮层神经上皮诱导及神经前体细胞扩张

1、 将形成的 EBs 使用宽口的移液枪吸头吸取到超低粘附 6 孔板中（10 个每孔），弃掉上清后使用 HBSS 洗涤两次，为了预防球体被吸走，建议将孔板 45 度向下倾斜使类器官聚集沉降于一侧后，使用 1000 μL 套取 200 μL /10 μL 移液枪吸头缓慢弃液。

2、 准备 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement A 20X，每孔 2 mL 加入超低粘附六孔板中，置于三维摇床 80 rpm/min 培养六天，每天换液一次，为了预防球体被吸走，建议将孔板 45 度向下倾斜使类器官聚集沉降于一侧后，使用 1000 μL 套取 200 μL /10 μL 移液枪吸头缓慢弃液。

3、 完成六天的皮层神经上皮诱导后，使用 HBSS 洗涤类器官一次，每孔加入 2 mL 的 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement B 20X 继续置于三维摇床 100 rpm/min 培养 18 天，前 9 天每天全换液，后 9 天每 2-3 天全换液一次，完成 18 天的诱导后，EBs 会形成典型的莲花座黑色点状结构。完成 6+18 天共计 24 天的诱导，类器官体积应大于 800 μm （平均 1.2 mm-1.5 mm），吸弃培养基后 HBSS 洗涤类器官一次，进行 Entecashen 脉冲。

4、 直径过大的类器官在后期的培养中容易因为缺氧出现变黑破裂的情况，使用神经保护剂 Entecashen 按 1000x 到 1x 加入 HBSS 洗涤后的类器官中，培养基为 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement B 20X 脉冲 48 小时，期间降低摇床至 60 rpm/min，使其渗入类器官内部，完成此步骤类器官活率可大幅度提高。

3、皮层成熟及长期培养

1、 完成共 24 天的神经诱导和扩张及 2 天的 Entecashen 脉冲，使用 HBSS 洗涤类器官一次，每孔加入 3 mL 的 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement C 20X 继续在 120 rpm/min 摇床上培养，每 3 天全换液一次，继续诱导 20 天使类器官出现透明圆润的外环结构后，完成皮质类脑球的诱导，共计 46 天。建议染色标志物为：PAX6/MAP2/TUJ1/SOX2/STAB2/FOXG1/NeuN/CTIP2 等。

2、 若要使皮质类脑球继续长期培养至 120-200 天，使其出现胶质细胞谱系。更换为长期培养体系前对成熟的皮质类脑球进行第二次 Entecashen 脉冲，Entecashen 按 1000x 到 1x 加入 HBSS 洗涤后的类器官中，培养基为 NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement C 20X 脉冲 48 小时后，吸弃脉冲培养基，更换为 NeuroCortex series Basal Medium 2 + NeuroCortex series Supplement D 20X，在 120 rpm/min 摇床上培养，每 2-3 天全换液一次。100 天以上的类脑球可表达胶质细胞谱系标志物如 GFAP、S100 β 、Oligo 等，其到 D80 左右电生理活性为最佳，为检测其电生理活性，无需更换 buffer 为人工脑脊液，可使用 NeuroCortex series Basal Medium 2 + 1x NeuroCortex series Supplement D 20X + 1x Entecashen 作为电生理检测 buffer。

3、 若类脑球体积过大，大于 3 mm，可通过切割预防缺氧凋亡。使用锋利的无菌柳叶刀片，在体式显微镜下精确快速的把类脑球一分为 2，每孔加入 3 mL NeuroCortex series Basal Medium 1 + 1x NeuroCortex series Supplement B 20X + 1x Entecashen 摇床上 40 rpm/min 适应 6 天后，更换为 NeuroCortex series Basal Medium 2 + 1x NeuroCortex series Supplement D 20X 120rpm/min 继续维持培养，每 2-3 天全换液。

