

Plurioid™ Human PSC-Derived Midbrain Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 中脑类器官试剂盒)

货号: HiMBO-K150

产品介绍

Plurioid™ hPSC中脑类器官试剂盒是一款专为诱导人多能干细胞 (hPSC) 定向分化为中脑类器官而开发的实验试剂。本试剂盒依托优化的分化体系与配方, 可支持在体外稳定、高效地构建结构完整的中脑类器官, 其细胞构成、组织形态及关键功能特性均与体内生理状态下的中脑高度近似。该模型能够真实模拟中脑微环境与神经元发育过程, 为神经退行性疾病机制研究、疾病模型构建、多巴胺能神经元功能解析以及中枢神经系统药物筛选、药效评价与安全性评估, 提供了高仿生、高稳定性的三维体外研究平台, 适用于基础科研与药物研发等场景。

本试剂盒规格为1 miniKit, 预计可生成50个中脑类器官, 需要操作人员具有hPSC培养经验, 并对类器官具有一定了解。

产品信息

| 产品组成 | 货号 | 规格 | 储存条件及周期 |
|--|------------|--------|-----------|
| Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium | HiMBO-K150 | 150 mL | 4°C, 6个月 |
| Supplement A (50×) | | 700 µL | -20°C, 1年 |
| Supplement B (100×) | | 350 µL | -20°C, 1年 |
| Supplement C (50×) | | 150 µL | -20°C, 1年 |
| Supplement D (50×) | | 200 µL | -20°C, 1年 |



| | | | |
|---------------------|--|----------|-----------|
| Supplement E (100×) | | 100 μL | -20°C, 1年 |
| Supplement F (50×) | | 300 μL | -20°C, 1年 |
| Supplement G (100×) | | 150 μL | -20°C, 1年 |
| Supplement H (50×) | | 900 μL×2 | -20°C, 1年 |
| Supplement I (100×) | | 900 μL | -20°C, 1年 |

其他需准备的试剂信息:

| 试剂名称 | 厂家 | 货号 |
|-------------|-------------------|----------|
| hPSC 完全培养基 | SHR Biotechnology | HPCM-100 |
| hPSC传代消化液 | SHR Biotechnology | HPPD-100 |
| 类器官专用基质胶 | SHR Biotechnology | OEM-10 |
| hPSC培养专用基质胶 | CORNING | 354277 |
| DPBS | - | - |

hPSC 中脑类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 中脑类器官完全培养基。以下是准备将 hPSC 诱导为中脑类器官的神经谱系诱导培养基 a、神经谱系诱导培养基 b、中脑类器官分化培养基 a，中脑类器官分化培养基 b，中脑类器官成熟培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1、冰上解冻 Supplement A (50×), Supplement B (100×), Supplement C (50×), Supplement D (50×), Supplement E (100×), Supplement F (50×), Supplement G (100×), Supplement H (50×), Supplement I (100×)。



注意: 解冻后, 建议将Supplement A (50×), Supplement B (100×), Supplement C (50×), Supplement D (50×), Supplement E (100×), Supplement F (50×), Supplement G (100×), Supplement H (50×), Supplement I (100×)按需分装后保存取用, 避免反复冻融。对于微量试剂组分建议离心5秒钟 (500-2000 rpm) 后, 再开盖使用, 以避免损失。

2、将20 μ L Supplement A (50×), 10 μ L Supplement B (100×) 和20 μ L Supplement C (50×)加至950 μ L Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium中, 充分混合, 配制成1 mL神经谱系诱导培养基a (仅第一天种96孔U底板时使用)。

3、将200 μ L Supplement A (50×) 和100 μ L Supplement B (100×) 加至9.7 mL Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium中, 充分混合, 配制成10 mL神经谱系诱导培养基b。

4、将200 μ L Supplement D (50×) 和100 μ L Supplement E (100×), 加至9.7 mL Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium中, 充分混合, 配制成10 mL中脑类器官分化培养基a。

5、将200 μ L Supplement F (50×)、100 μ L Supplement G (100×)和500 μ L类器官专用基质胶 (5%体积比) 加至9.2 mL Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium中, 充分混合, 配制成10 mL中脑类器官分化培养基b。

6、将200 μ L Supplement H (50×)、100 μ L Supplement I (100×)和100 μ L类器官专用基质胶 (1%体积比) 加至9.6 mL Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium中, 充分混合, 配制成10 mL中脑类器官成熟培养基。

注意: 配制好的各阶段培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存不超过3天, 建议现配现用。Human PSC-Derived Midbrain Organoid Differentiation Medium 内含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 中脑类器官的诱导培养

提前复苏 hPSC, 传代两代以后, 即可使用各种分化培养基依次进行诱导培养, 具体步骤如下:

1、神经谱系诱导

Day 1:

(1) 当 hPSC 的汇合度达到 75%-85%, 吸去培养基, 用 2 mL DPBS 室温清洗一次。

(2) 吸去上清, 加入 0.5 mL 预热至室温的 hPSC 传代消化液, 转移到 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1-2 min。

注意: 待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化。

(3) 吸去上清, 加入等体积的 hPSC 完全培养基, 并使用 P1000 吸头轻轻上下吹打细胞, 制成单细胞悬液, 经台盼蓝染色确定细胞活性并计数。

注意: 台盼蓝染色活细胞比例在90%以上。

(4) 将单细胞悬液收集到15 mL离心管中, 室温下300 g 离心5 min。

(5) 配制神经谱系诱导培养基a、b。



(6) 离心结束，充分去除上清，使用神经谱系诱导培养基a重悬细胞，稀释至 1×10^5 个/mL，按照10000个细胞/孔接种到96孔U底超低吸附板内，每孔加入100 μ L。

(7) 在水平孔板离心机内300 *g*离心5 min，然后将孔板转移到37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中孵育24 h。

注意：建议接种至孔板中心的50个孔中，并在周围孔中补加DPBS，以减少培养基蒸发。每个孔内接种细胞可发育为一个中脑类器官。

Day 2-8:

(8) 第2天，将培养基换为神经谱系诱导培养基b，按每孔100 μ L的体积加入孔中。之后每天换液持续培养至第9天。

2、中脑类器官分化

Day 9-10:

(1) 第9天，配制中脑类器官分化培养基a。

(2) 将神经谱系诱导培养基b更换为中脑类器官分化培养基a，按每孔100 μ L的体积加入孔中，并将培养板继续放入37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养48h，每天更换一次培养基。

Day 11-13:

(3) 第11天，配制中脑类器官分化培养基b。

(4) 将中脑类器官分化培养基a更换为中脑类器官分化培养基b，按每孔100 μ L的体积加入孔中。将培养板继续放入37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养72 h，每天更换一次培养基。

3、中脑类器官成熟

Day 14-45:

(1) 第14天，配制中脑类器官成熟培养基。

(2) 使用剪去针尖的P1000枪头，将培养的中脑类器官吸出放入超低吸附6孔板内，一般一个孔内放15-20个类器官。

(3) 加入2 mL中脑类器官成熟培养基，每2-3天更换一次，持续培养至第45天或更久，即可获得成熟中脑类器官。

注意：此阶段采用摇床培养有助于提升类器官的活性，建议80转/分钟。

注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。

论文发表规范引用参考



Human midbrain organoids were prepared from hPSCs with Plurioid™ Human PSC-Derived Midbrain Organoid Kit (HiMBO-K150 , SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



附录1 hPSC中脑类器官构建流程

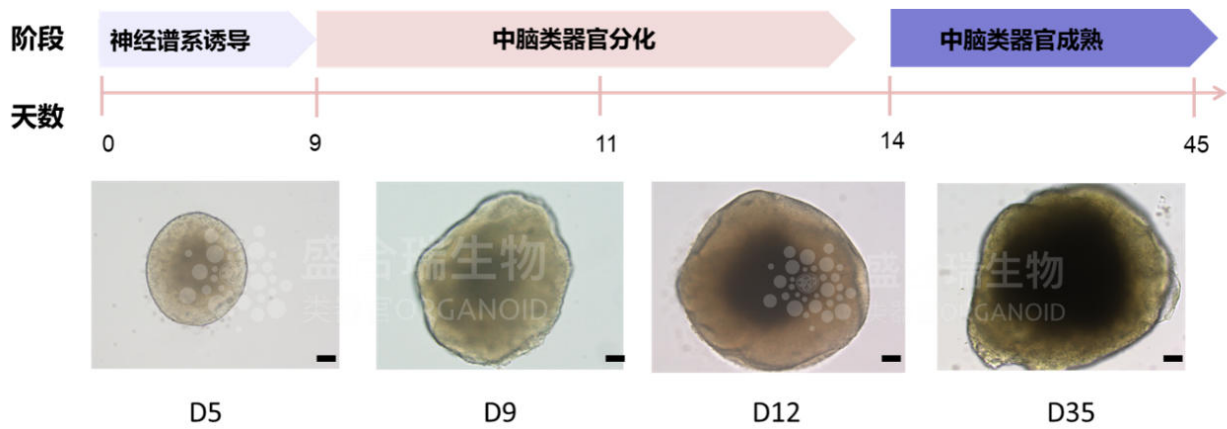


图1 hPSC中脑类器官构建流程图。比例尺：100 μ m。

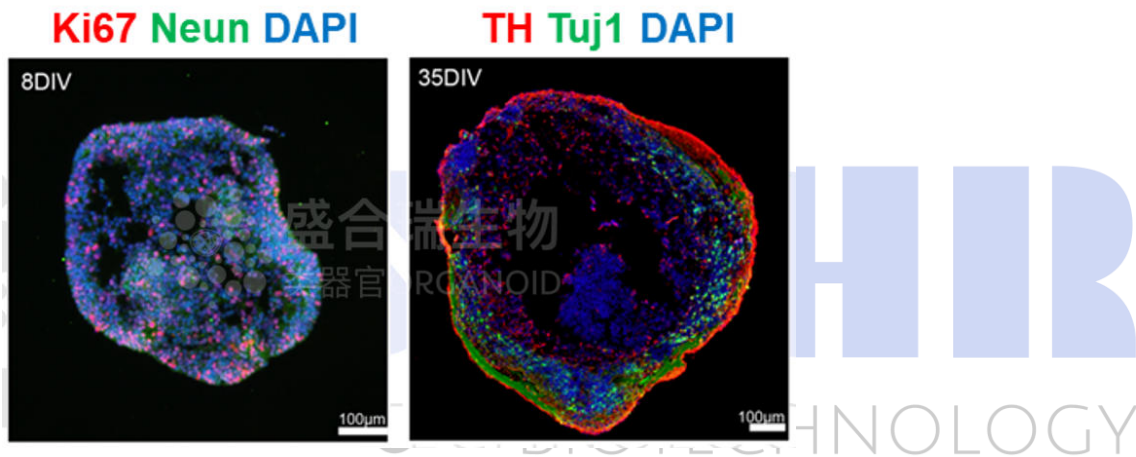


图2 hPSC中脑类器官免疫荧光染色鉴定

分别对D 8、D 35的中脑类器官进行免疫荧光染色。Ki67：增殖活性标志物；Neun、Tuj1：泛神经元标志物；TH：多巴胺能神经元标志物。比例尺：100 μ m。

