

Plurioid™ Human PSC-Derived Whole Brain Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 全脑类器官试剂盒)

货号: HiWBO-K100

产品介绍

Plurioid™ hPSC全脑类器官试剂盒是一款专为诱导人诱导多能干细胞 (hPSC) 定向分化为全脑类器官而开发的实验试剂, 可高效生成高度仿生的三维全脑类器官。成熟的全脑类器官包含端脑、间脑、中脑等关键脑区结构, 并富集多巴胺能神经元、谷氨酸能神经元、星形胶质细胞等多种中枢神经细胞, 其细胞组成、空间架构与电生理功能高度复刻体内人脑特征, 为阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病建模、中枢神经药物筛选与毒性评价、脑发育机制研究提供了可靠的体外研究平台。

本试剂盒规格为1 miniKit, 预计可生成50个全脑类器官, 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
Embryoid Body Induction formation Medium	HiWBO-K100	25 mL	4°C, 6个月
Supplement A (5×)		3 mL	-20°C, 1年
Supplement B (5×)		2 mL	-20°C, 1年
Human PSC-Derived Neural lineage Induction Medium		15 mL	4°C, 6个月
Supplement C (100×)		150 µL	-20°C, 1年



Human PSC-Derived Whole Brain organoid differentiation culture Medium	60 mL	4°C, 6个月
Supplement D (50×)	300 μL	-20°C, 1年
Supplement E (50×)	900 μL	-20°C, 1年

其他需准备的试剂信息

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

hPSC 全脑类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 全脑类器官完全培养基。以下是准备将 hPSC 诱导为全脑类器官的各种培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1、冰上解冻 Supplement A (5×), Supplement B (5×), Supplement C (100×), Supplement D (50×), Supplement E (50×)。

注意: 初次解冻后，建议将 Supplement A (5×), Supplement B (5×), Supplement C (100×), Supplement D (50×), Supplement E (50×) 按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于所有微量试剂组分建议解冻后瞬时离心5秒钟 (500-2000 rpm)，再开盖使用，以避免损失。

2、将1 mL Supplement A (5×) 加至4 mL Embryoid Body Induction formation Medium中，充分混合，配制成5 mL 拟胚体诱导完全培养基a。

3、将1 mL Supplement B (5×) 加至4 mL Embryoid Body Induction formation Medium中，充分混合，配制成5 mL 拟胚体诱导完全培养基b。



4、将50 μL Supplement C (100 \times)加至4.95 mL Embryoid Human PSC-Derived Neural lineage Induction Medium中，充分混合，配制成5 mL神经诱导完全培养基c。

5、将100 μL Supplement D (50 \times)加至4.9 mL Human PSC-Derived Whole Brain organoid differentiation culture Medium中，充分混合，配制成5 mL全脑类器官分化完全培养基d。

5、将100 μL Supplement E (50 \times)加至4.9 mL Human PSC-Derived Whole Brain organoid differentiation culture Medium中，充分混合，配制成5 mL全脑类器官分化完全培养基e。

注意：配制好的培养基可在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过3天，建议现配现用。Embryoid Body Induction formation Medium、Human PSC-Derived Neural lineage Induction Medium和 Human PSC-Derived Whole Brain organoid differentiation culture Medium 内含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 全脑类器官的诱导培养

提前复苏 hPSC，传代两代以后，即可使用各阶段培养基进行诱导培养，具体步骤如下：

1、拟胚体 (EB) 形成

Day 0-3:

(1) 当 hPSC 的汇合度达到 60%-80%时，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 的已放置室温的 hPSC 传代消化液，转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中 1-2 min。

(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：待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化，台盼蓝染色活细胞比例建议在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) 配制拟胚体诱导完全培养基a。

(6) 离心结束，充分去除上清，使用拟胚体诱导完全培养基a重悬细胞，调整至最终浓度为 5,000 个活细胞 /100 μL ，按照5000个细胞/孔接种到96孔U底超低吸附板内，每孔加入100 μL 。

(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 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养3天，每日半量换液拟胚体诱导完全培养基a。

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

Day 4-6:

(8) 配制拟胚体诱导完全培养基b。

(9) 第4天，全部更换为拟胚体诱导完全培养基b，继续每日半量换液，培养至第6天，此阶段EB继续生长至 350-600 μm 。

2、原始神经上皮诱导



Day 6-10:

- (1) 配制神经诱导完全培养基c。
- (2) 第6天，使用剪去尖端的枪头（枪头用润洗液润洗）将每个 EB 轻柔转移至超低吸附六孔板的一个孔中（25个EB/孔）。每孔加入2 mL神经诱导完全培养基c。
- (3) 分别于第8天和第10天，半量换液新鲜的神经诱导完全培养基c。

3、将类器官包埋入类器官专用基质胶液滴中 (D11)

Day 11:

- (1) 制备带凹坑的 Parafilm 基底
 - a. 使用保存在洁净环境中的 Parafilm。操作前，用70% 乙醇喷洒手套和 Parafilm 表面进行消毒。
 - b. 戴手套后，将Parafilm 覆盖在空的 200 μ L 吸头盒上（图1A）。
 - c. 用手指在每个吸头孔正上方的 Parafilm 上轻轻按压，形成小凹坑，用于承载类器官专用基质胶液滴（图1A-B）。
 - d. 在 Parafilm 上制作一个 4 \times 4 的凹坑阵列（共16个）。用无菌剪刀将该区域裁剪成一个小方块，放入一个 60 mm 组织培养皿中（图1C-D）。

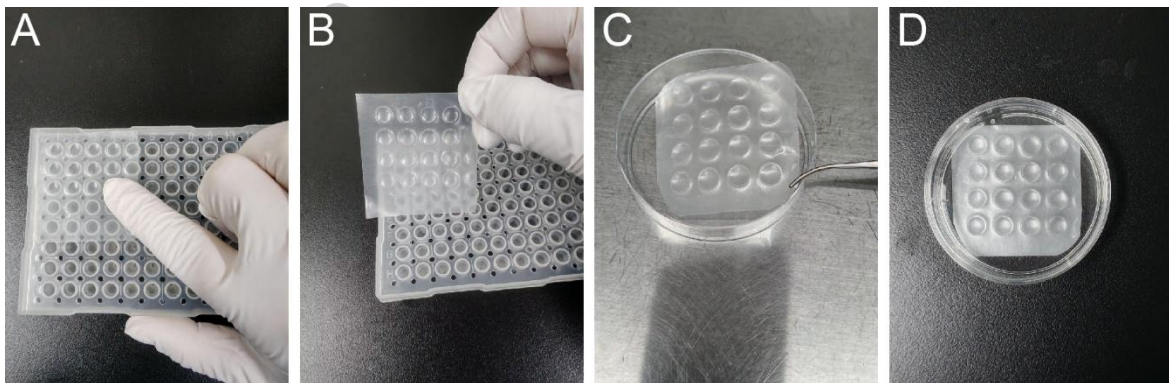


图1、制备带凹坑的 Parafilm 基底

(2) 转移类器官至凹坑

- a. 使用剪口的 200 μ L 吸头，将类器官逐个转移至 Parafilm 上的每个凹坑中。
- b. 吸除多余培养基。用未剪口的标准 200 μ L 吸头，小心吸走每个类器官周围的多余液体。吸液时，避免将球体吸入吸头造成损伤。

(3) 加入类器官专用基质胶液滴

立即向每个类器官滴加约 30 μ L 类器官专用基质胶，使其充满整个 Parafilm 凹坑。

(4) 将类器官居中定位

用 10 μ L 吸头轻柔推动组织，使其位于类器官专用基质胶液滴中央。

(5) 聚合类器官专用基质胶

将含 Parafilm 的 60 mm 培养皿放回 37 $^{\circ}$ C 培养箱，孵育 20–30 分钟，使类器官专用基质胶完全聚合固化。

(6) 配制全脑类器官分化完全培养基d

向上步基质胶聚合固化好的超低吸附六孔板中加入 2mL全脑类器官分化完全培养基d



(7) 从 Parafilm 上回收类器官专用基质胶液滴

用无菌镊子夹住 Parafilm 薄膜，翻转过来，轻轻晃动培养皿，使类器官专用基质胶液滴自然脱落。若仍有液滴附着，可在培养基中更用力地抖动 Parafilm，促使其全部脱落。随后将含有组织的类器官专用基质胶液滴继续置于 CO₂ 培养箱中培养。

注意：每次最多处理 16 个类器官或更少，避免干燥或类器官专用基质胶提前凝固。

Day 12-14:

(8) 包埋后24 h (D 12) 全量换液脑类器官分化培养基d，并继续培养至D 14。

4、脑类器官成熟

Day 15-40+ :

(1) 配制全脑类器官分化完全培养基e。

(2) 第15天，全部更换为3 mL脑类器官分化培养基e。置于轨道摇床，按照 80 rpm 转速持续振荡培养。

(3) 每3-4 d完全更换一次全脑类器官分化完全培养基e。避免类器官过密，以防融合。

注意：在培养过程中定期在显微镜下监测类器官形态。在此期间脑类器官可显著增大，至D40天后逐渐展现类似大脑皮层的多层结构，类器官直径可达到mm级，此时肉眼观察可见白色聚集体。

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 whole brain organoids were prepared from hPSCs with Plurioid™ Human PSC-Derived Whole Brain Organoid Kit (HiWBO-K100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



附录1 hPSC脑类器官构建流程

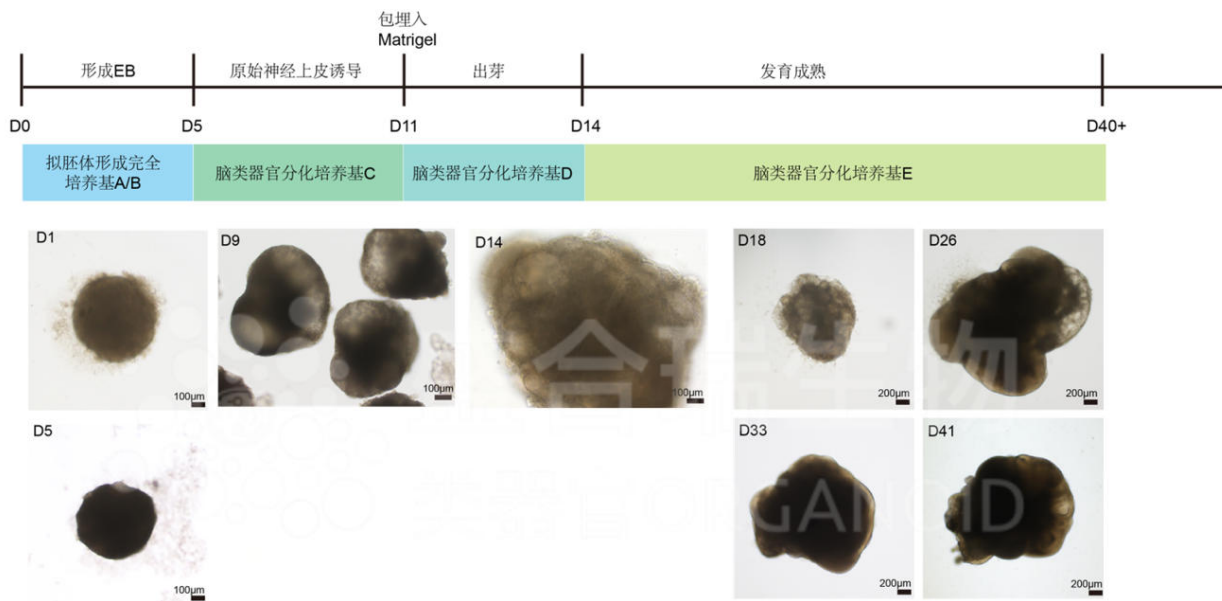


图2 hPSC脑类器官构建流程图。比例尺：200 μm 。

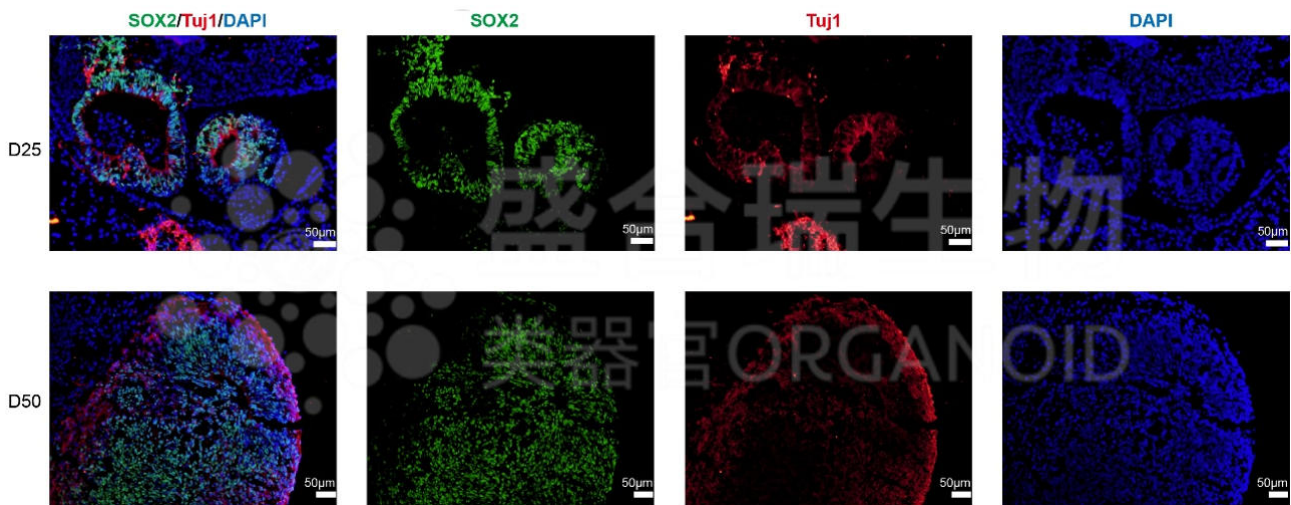


图3 hPSC脑类器官免疫荧光染色鉴定

对D 25（发育期）阶段和D 50（成熟期）的脑类器官进行Tuj1和SOX2的检测。SOX2表征神经前体细胞，Tuj1表征早期神经元细胞。比例尺：50 μm 。

