

# hPSC 诱导分化运动神经元试剂盒使用说明

Cat NO: IMI-MN01

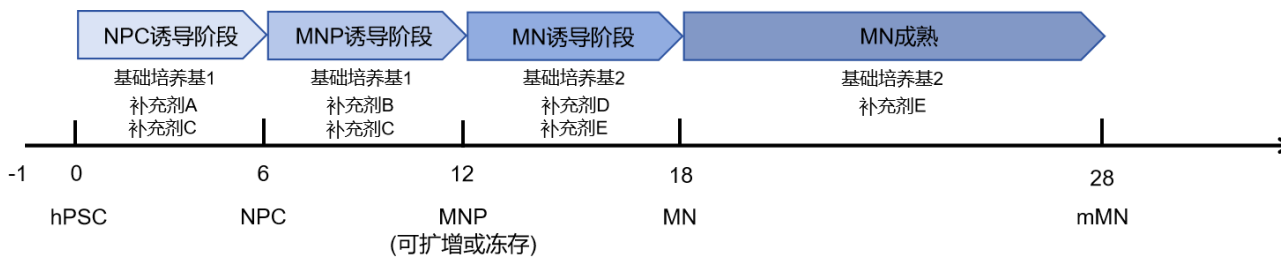
## 产品描述

本产品为人多能干细胞向运动神经元诱导分化试剂盒，可用于分化获得的运动神经元能表达运动神经元的特异性标志物（如 CHAT 等），适用于体外研究。

本产品需要操作人员具有细胞培养经验，对神经元培养具有一定了解。

以六孔板为例，本产品提供的规格可供两个孔的 hPSC 诱导分化，最终可获得 6 个孔的成熟运动神经元（约  $1.2 \times 10^7$  个细胞），以及可供运动神经元祖细胞扩增一代（六孔板 1 孔传 6 孔）。

## 本产品分化流程图



hPSC: 人多能干细胞; NPC: 神经祖细胞; MNP: 运动神经元前体细胞; MN: 运动神经元; mMN: 成熟运动神经元

## 产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IMI-MN01BM1	基础培养基 1	110 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-MN01BM2	基础培养基 2	150 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-MN01A	补充剂 A (250×)	80 μL	-20°C, 6 个月
IMI-MN01B	补充剂 B (250×)	160 μL	-20°C, 6 个月
IMI-MN01C	补充剂 C (62.5×)	1.8 mL	-20°C, 12 个月
IMI-MN01D	补充剂 D (2000×)	20 μL	-20°C, 6 个月
IMI-MN01E	补充剂 E (50×)	3 mL	-20°C, 6 个月
IMI-MN01F	补充剂 F (200×)	250 μL	-20°C, 6 个月



注：括号内容如 250× 为母液浓度，使用时终浓度需为 1×。例如补充剂 A (250×) 和补充剂 C (62.5×) 需添加进基础培养基 1 使其分别稀释 250 倍以及 62.5 倍，使得补充剂终浓度为 1×，配成 NPC 诱导培养基。

## 实验试剂与材料

表 2. 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
hESC/iPSC 细胞培养试剂盒	逸漠生物	IMC-014
hESC (H1)	逸漠生物	IM-H522
hESC/iPSC 传代工作液	逸漠生物	IMC-014-E
Y-27632	逸漠生物	IMC-014-Y
DMEM/F12 培养基	逸漠生物	IMC-205
Matrigel	Corning	354277
Accutase	STEMCELL	07920
无血清细胞冻存液	逸漠生物	IMC-701
PBS	逸漠生物	IMC-401
6 孔细胞培养板	硕华生物	N/A
15 mL/50 mL 离心管	硕华生物	N/A
10 μL/200 μL/1000 μL 无菌吸头	佳顺生物	N/A
10mL/50mL 移液管	NEST	N/A



## 实验内容与方法（以 hESC H1 及 6 孔板 1 个孔为例）

### 一、试剂准备

表 3. 各阶段培养基成分

研究阶段	培养基名称	各阶段培养基组成
神经祖细胞(NPC)阶段	NPC 诱导培养基	基础培养基 1
		补充剂 A (1×)
		补充剂 C (1×)
运动神经元祖细胞(MNP)阶段	MNP 诱导培养基	基础培养基 1
		补充剂 B (1×)
		补充剂 C (1×)
运动神经元(MN)阶段	MN 诱导培养基	基础培养基 2
		补充剂 D (1×)
		补充剂 E (1×)
运动神经元成熟	MN 成熟培养基	基础培养基 2
		补充剂 E (1×)
运动神经元祖细胞扩增	MNP 扩增培养基	基础培养基 1
		补充剂 F (1×)
		补充剂 C (1×)

(1) 在 4℃解冻 补充剂 A、B、C、D、E、F，不要在 37℃条件下解冻。

(2) 在生物安全柜中，参考表 1 及表 3，按照比例使用无菌移液管及枪头混匀配制成分化各阶段培养基。例如 NPC 诱导培养基组成为基础培养基 1、1×浓度的补充剂 A 和 1×浓度的补充剂 C，若用量为 20mL，配制方法为 19600 μL 基础培养基 1+80 μL 补充剂 A (250×)+320 μL 补充剂 C (62.5×)。

(3) 分化培养基建议现配现用，置于 4℃储存，2 周内使用。

**注：补充剂 B、D、F 使用时尽量避光，且所有补充剂可根据使用量进行分装以避免反复冻融。**



## 二、hESC 培养和准备（详见 hESC/iPSC 细胞培养试剂盒使用说明书）

（[http://www.immocell.com/xiazai/hESC\(H1\)%E5%9F%B9%E5%85%BB%E8%AF%B4%E6%98%8E%E4%B9%A6.pdf](http://www.immocell.com/xiazai/hESC(H1)%E5%9F%B9%E5%85%BB%E8%AF%B4%E6%98%8E%E4%B9%A6.pdf) 操作说明书）

（<http://www.immocell.com/xbpyvideo/4240.html> 操作视频教程）

## 三、DAY 0-6: hESC 分化为神经祖细胞（NPC）

- (1) 基质胶在 4℃ 下解冻，与 DMEM/F12 均匀混合（**基质胶:DMEM/F12=1:100**），铺板，备用。
- (2) **DAY -1**: 当 hESC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2mL 1x 室温 PBS（不含  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ）清洗 hESC，吸去 PBS。
- (3) 加入 1mL 含 **Y-27632 (10 μM)** 的室温 **Accutase**，转移到 37℃ 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 3-5min，使其解离成单细胞。
- (4) 3-5min 后，将干细胞传代培养基以等体积直接加入 **Accutase** 中，并使用 P-1000 吸头轻轻上下吹打细胞，制成单细胞悬液，将细胞单悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min。
- (5) 从基质胶包被的板中小心地抽吸包被液而不损坏基质胶涂层表面。
- (6) 离心结束，充分去除上清，将 1 mL 预热的 hESC/iPSC 完全培养基（含 **10 μM Y-27632**）重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。
- (7) 使用自动细胞计数器计数细胞，使用台盼蓝排除死亡细胞，将细胞接种到步骤 1 制备的 6 孔基质胶包被的板上使得最终密度为  **$3.0 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup>**，在 6 孔板中每孔最终体积为 2 mL（含 **10 μM Y-27632**），将孔板转移到 37℃、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中孵育 24h。
- (8) **DAY 0**: 24h 后吸去培养基，并加入 2mL NPC 诱导培养基（成分为：**基础培养基 1**，**1× 补充剂 A**，**1× 补充剂 C**）。
- (9) 隔天使用 NPC 诱导培养基换液，直到第 6 天。
- (10) 可取第 6 天的细胞进行免疫荧光染色检测 NPC 标志物如 SOX2、SOX1、Nestin。

**注：基质胶使用时需在冰上操作，所有与基质胶直接接触的物品需提前预冷，基质胶超过 10℃ 将迅速凝固，导致铺板失败。**

## 四、DAY 6-12: NPC 诱导分化为运动神经元祖细胞(MNP)



(1) **DAY 6:** 第 6 天, 从培养物中抽吸培养基, 在 6 孔板中每孔用 2 mL 1×室温 PBS (不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)清洗培养物, 然后从孔中移除 PBS。

(2) 加入 1mL 含 **Y-27632 (10 μ M)** 的室温 **Accutase**, 转移到 37°C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 3-5min, 使其解离成单细胞。

(3) 3-5min 后, 将 DMEM/F12 (含 **10 μ M Y-27632**) 以等体积直接加入 **Accutase** 中, 并使用 P-1000 吸头轻轻上下吹打细胞, 制成单细胞悬液, 将细胞单悬液收集到 15mL 离心管中, 室温下 300 g 离心 5 min。

(4) 从基质胶包被的板中小心地抽吸包被液而不损坏基质胶涂层表面。

(5) 离心结束, 充分去除上清, 将 6 mL 预热的 MNP 诱导培养基 (成分为: **基础培养基 1**, **1×补充剂 B**, **1×补充剂 C**) (含 **10 μ M Y-27632**) 重悬细胞, 轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。按 1:3 比例接种在基质胶包被的板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24h 。

(6) **DAY 7:** 第 7 天开始隔天更换一次 MNP 诱导培养基, 直到第 12 天。

(7) 可取第 12 天的细胞进行免疫荧光染色检测 MNP 标志物 Olig2。

**注: MNP 可用常规冷冻培养基(DMEM/F12、10%胎牛血清和 10% DMSO)或逸漠生物无血清细胞冻存液 (推荐使用) 在液氮中冷冻, 解冻后可在 MNP 扩增培养基中再次培养, 培养方法见补充部分。**

## 五、DAY 12-18: MNP 诱导分化为运动神经元(MN)

(1) **DAY 12:** 第 12 天, 从培养物中抽吸培养基, 在 6 孔板中每孔用 2 mL 1×室温 PBS (不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)清洗培养物, 吸去 PBS。

(2) 每孔加入 1mL 含 **Y-27632 (10 μ M)** 的室温 **Accutase**, 将培养物置于 37°C 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 3-5 min。

(3) 3-5min 后每孔加入 **1mL DMEM/F12 (含 10 μ M Y-27632)**, 轻轻吹打细胞, 使细胞脱离孔底。

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

(5) 仔细抽吸上清液, 不干扰细胞, 用 1mL 恢复室温的 MN 诱导培养基 (成分为: **基础培养基 2**, **1×补充剂 D**, **1×补充剂 E**) (含 **10 μ 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，将细胞接种到提前制备的基质胶包被的 6 孔板上使得密度为  $5.0 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup>。

(7) **DAY 13:** 更换为不含 Y-27632 的 MN 诱导培养基。每隔一天更换培养基，直到第 18 天。

(8) 第 18 天可检测到神经元标志物 (TuJ1)，运动神经元标志物 (PHOX2B、PRPH、ISL1、ISL2) 的表达

**注: Motor Neuron 贴壁较松，换液时要特别轻柔。**

## 六、DAY 18-28: MN 成熟阶段

(1) **DAY 18:** 第 18 天，吸去培养基，每孔加入 2mL MN 成熟培养基 (成分为: **基础培养基 2, 1×补充剂 E**)。

(2) 隔天换液，直到第 28 天获得成熟 MN (mMN)。

(3) mMN 可用 MN 成熟培养基继续维持培养。

(4) 这一阶段可检测到 CHAT 的表达。

**注: Motor Neuron 贴壁较松，换液时要特别轻柔。**

## 补充:DAY 12: MNP 扩增

第 12 天获得的 MNP 可扩增至少 5 代，5 代内可维持 Olig2 高表达。

扩增方法如下:

(1) **DAY 12:** 第 12 天，从培养物中抽吸培养基，在 6 孔板中每孔用 2 mL 1×室温 PBS (不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) 清洗培养物，吸去 PBS。

(2) 每孔加入 1mL 含 **Y-27632 (10 μM)** 的室温 Accutase，将培养物置于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 3-5 min。

(3) 3-5min 后每孔加入 **1mL DMEM/F12 (含 10 μM Y-27632)**，轻轻吹打细胞，使细胞脱离孔底。

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

(5) 仔细抽吸上清液，不干扰细胞，用 1mL 恢复室温的 MNP 扩增培养基 (成分为: **基础培养基 1, 1×补充剂 C, 1×补充剂 F**) (含 **10 μM Y-27632**) 重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。



(6) 按 1:6 比例接种在基质胶包被的板中，每孔加入 2 mL 细胞悬液于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24h 。

(7) 第 2 天更换不含 Y-27632 的 MNP 扩增培养基。每周可传一次代。

