

hPSC 诱导分化内耳类器官试剂盒

Cat NO: IMV-IE001

产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化内耳类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到内耳类器官，该类器官具类似内耳的细胞组成，生长过程中有分化出耳泡结构及毛细胞。

本试剂盒需要操作人员具有 hPSC 培养经验，对类器官具有一定了解。

实验仪器、材料

仪器：生物安全柜、细胞培养箱、水平式离心机、倒置显微镜、低温冰箱

材料：6 孔细胞培养板、超低吸附 96 孔板、离心管（规格为 15 mL 和 50 mL）、移液器（规格为 10 μ L、100 μ L、1000 μ L 和多通道 100 μ L）、无菌吸头（规格为 10 μ L、200 μ L 和 1000 μ L）、移液管（规格为 10mL、50mL）

试剂盒内容

研究阶段	产品货号	产品名称	产品规格	储存
EB 诱导阶段	IMV-IE01	EB 形成培养基	30ml	-20 $^{\circ}$ C，12 个月
EB 分化阶段	IMV-IE02	基础培养基 1	20ml	-20 $^{\circ}$ C，12 个月
	IMV-IE02-A	补充剂 A	250ul	-20 $^{\circ}$ C，6 个月
	IMV-IE02-B	补充剂 B	70ul	-20 $^{\circ}$ C，6 个月
	IMV-IE02-C	补充剂 C	50ul	-20 $^{\circ}$ C，6 个月
耳泡形成阶段	IMV-IE03	基础培养基 2	50ml	-20 $^{\circ}$ C，12 个月
	IMV-IE03-D	补充剂 D	1.2ml	-20 $^{\circ}$ C，6 个月
内耳类器官成熟阶段	IMV-IE04	成熟培养基	200 ml	-20 $^{\circ}$ C，12 个月
		Matrigel	500ul	-20 $^{\circ}$ C，6 个月

试剂盒使用流程



①EB 形成（2 天）

- 1.hPSC 于 VTN 包被的六孔板的一个孔生长至 70-80%汇合度。
- 2.吸去培养基。
- 3.孔中加入 1mL PBS（无钙镁离子）洗，吸去。
- 4.孔中加入 1mL Tryple express，37℃消化 5min。
- 5.于两只 15mL 离心管中分别加入 10mL EB 形成培养基，并补充 10μM Y27632。（**注意：所用培养基均应提前在工作台放置 30min 以恢复室温，后面操作同理。**）
- 6.消化完成后于显微镜下可看到克隆发白发亮。
- 7.吸去 Tryple express，每孔加入 1mL EB 形成培养基终止消化。
- 8.轻轻吹打孔内细胞 2-3 次，将细胞悬液移至有 9mL EB 形成培养基的 15mL 离心管中。
- 9.100g 离心 5min，吸弃上清。
- 10.向细胞沉淀加入 10mL 步骤 5 获得含 10μM Y27632 的 EB 形成培养基，重新制成细胞悬液。
- 11.将细胞悬液移至加样槽，使用多通道移液器种到超低吸附 96 板中，每孔 100μL，接种 96 个孔，普通 96 孔板每孔加 100μL PBS，96 孔作为配平。
- 12.于低速水平离心机，850rpm/120g 离心 3min，将板放入 37℃，5%CO₂ 的培养箱，记为 D-2。
- 13.第 2 天(D-1) 可以看到形成大小均一的 EB。每孔补充 100μL 不含 Y27632 的 EB 形成培养基，放入 37℃，5%CO₂ 的培养箱。
（注意：补充 EB 形成培养基后，可将多通道移液器枪头置于液面下轻轻吹打，在不影响到 EB 的情况下混匀培养基。）

②EB 分化阶段（12 天）

14. D0，解冻补充剂 A，吸弃培养基，9.6mL 预冷的基础培养基 1 与补充剂 A、200μL Matrigel 混合均匀，恢复至室温后，按每孔 100μL，加到 96 孔板中，诱导 EB 分化，用多通道移液器轻轻吹打，使 EB 悬浮。在 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养 4 天。
15. D4，解冻补充剂 B，2.5mL 基础培养基 1+补充剂 B 混合均匀，按每孔 25μL，加到 96 孔板中，并轻轻移液 8-10 次混匀，使每孔培养基的终体积为 125μL，将 96 孔板放回培养箱，37℃，5%CO₂ 培养 4 天。



16.D8, 解冻补充剂 C, 2.5mL 基础培养基 1+补充剂 C 混合均匀, 按每孔 25 μ L, 加到 96 孔板中, 并轻轻移液 8-10 次混匀, 使每孔培养基的终体积为 150 μ L, 将 96 孔板放回培养箱, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养 4 天。

③耳泡形成阶段 (6 天)

17.D12, EB 诱导结束, 准备好基础培养基 2 (提前在冰上冷藏至少 30min); 或者, 在 d11 上使基础培养基 2 存储在 4 $^{\circ}$ C 过夜。Matrigel 提前与补充剂 D 于 4 $^{\circ}$ C 解冻, 冷的基础培养基 2 与补充剂 D 混合均匀。将 200 μ L Matrigel 加入 20mL 冷的混合培养基中, 反复吹打溶解 20 次, 复温到室温。将 96 孔板中的聚集物转移到两个 100mm 培养皿中, 每个培养皿中有 48 个聚集体。用 1-2mL 的 DPBS 洗涤聚集体 2 次, 再用 1mL 不含 Matrigel 的混合培养基洗涤 1 次, 然后分别加入 10mL 含 Matrigel 的混合培养基, 将培养皿放入培养箱中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养 3 天; D15 吸掉培养皿中的培养基, 重新加入不含 Matrigel 的混合培养基, 继续培养 3 天, 诱导耳泡形成;

(注意: 10mm 皿一般换液需要 10ml 培养基)

④内耳类器官成熟阶段 (42 天)

18.D18-60, 内耳类器官逐渐成熟, 将培养基换成成熟培养基, 开始长期培养, 每 5 天换一次液, 到 60 天左右获得具有感觉毛细细胞的成熟内耳类器官。

