hPSC 诱导分化神经干/祖细胞（NSPC）试剂盒使用说明

Cat NO: IMI-SP01

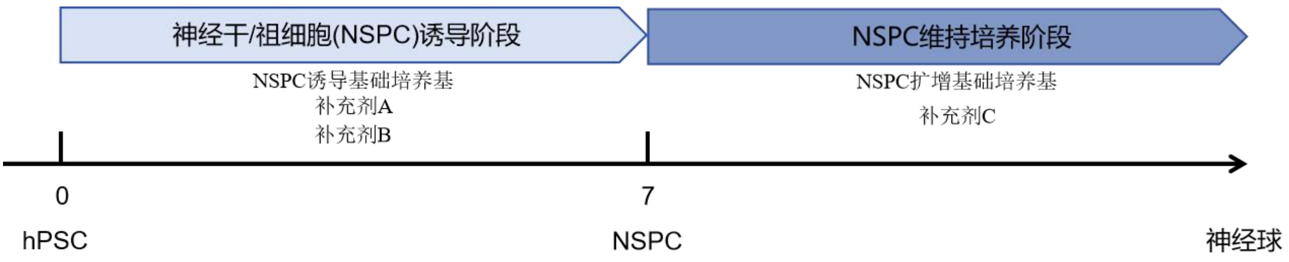
产品描述

本产品为人多能干细胞向神经干/祖细胞（NSPC）诱导分化试剂盒，分化获得的 NSPC 能表达神经干细胞或前体细胞的特异性标志物（如 SOX2、SOX1、Nestin 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，对多能干细胞 2D 诱导分化以及神经球培养具有一定了解。

以六孔板为例，本产品提供的规格可供 16 孔的 hPSC 诱导分化。

本产品分化流程图



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-SP01BM1	NSPC 诱导基础培养基	100 mL	2℃-8℃，12 个月
IMI-SP01BM2	NSPC 扩增基础培养基	200 mL	2℃-8℃，12 个月
IMI-SP01A	补充剂 A（50×）	2 mL	-20℃，6 个月
IMI-SP01B	补充剂 B（100×）	1 mL	-20℃，6 个月
IMI-SP01C	补充剂 C（25×）	8 mL	-20℃，6 个月
IMI-SP01D	NSPC 诱导包被液（250 U/mL）	1.3 mL	-20℃，6 个月

注：括号内容如 50×为母液浓度，使用时终浓度需为 1×。例如补充剂 A（50×）和补充剂 B (100×)需添加进 NSPC 诱导基础培养基使其分别稀释 50 倍以及 100 倍，使得补充剂终浓度为 1×，配成 NSPC 诱导培养基。NSPC 诱导包被液浓度 250 U/mL 表示每毫升有 250 个单位的包被蛋白。

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389
官网 公众号 视频号

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
神经细胞无血清冻存液	逸漠生物	IMC-704
PBS	逸漠生物	IMC-401
低吸附 6 孔细胞培养板	CORNING	3471
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

本产品仅供科研使用
厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

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
神经干/祖细胞(NSPC)诱导阶段	NSPC 诱导培养基	NSPC 诱导基础培养基
		补充剂 A（1×）
		补充剂 B（1×）
NSPC 维持培养阶段	NSPC 扩增培养基	NSPC 扩增基础培养基
		补充剂 C（1×）

(1) 在 4℃解冻 补充剂 A、B、C，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 NSPC 诱导培养基组成为 NSPC 诱导基础培养基、1×浓度的补充剂 A 和 1×浓度的补充剂 B，若用量为 50 mL，配制方法为 48.5mL NSPC 诱导基础培养基+1 mL 补充剂 A（50×）+500 μL 补充剂 B（100×）。

(3) 分化培养基建议现配现用，置于 4℃储存，2 周内使用，或于-20℃可储存 2-3 个月。

注：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 操作说明书）

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

三、DAY 0-6: hESC 分化为神经干/祖细胞（NSPC）

(1) NSPC 诱导包被液在 4℃下解冻，与 DMEM/F12 均匀混合，稀释成合适的浓度，按 **2 U/cm^2** 的包被密度铺板，备用。

(2) **DAY 0**: 当 hESC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2mL 1x 室温 PBS（不含 Ca^{2+}/Mg^{2+}）清洗 hESC，吸去 PBS。

本产品仅供科研使用
厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

(3) 加入 1mL 含 **Y-27632（10 μM）**的室温 **Accutase**，转移到 37℃ 5% 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，将单细胞悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min。

(5) 从步骤（1）包被的板中小心地抽吸包被液而不损坏涂层表面。

(6) 离心结束，充分去除上清，将 1 mL 预热的 NSPC 诱导培养基（成分为：**NSPC 诱导基础培养基，1×补充剂 A，1×补充剂 B**）（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 制备的包被板上使得最终密度为 **6.0 -8.0× 10^4 个细胞/cm^2**，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%CO_2 细胞培养箱中孵育 48 h（若 24 h 后培养基变黄则及时用含 10 μM Y-27632 的 NSPC 诱导培养基换液）。

(8) **DAY 2**: 48h 后吸去培养基，并加入不含 2mL Y-27632 的 NSPC 诱导培养基，隔天换液直到第 7 天。

(9) 可取第 7 天的细胞进行免疫荧光染色检测 NSPC 标志物如 SOX2、SOX1、Nestin。

注：包被液使用时需在冰上操作，所有与包被液直接接触的物品需提前预冷。

四、NSPC 维持培养阶段

(1) **DAY 7**： 第 7 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 Ca2+/Mg2+)清洗培养物，然后从孔中移除 PBS。

(2) 加入 1mL 含 **Y-27632（10 μM）**的室温 **Accutase**，转移到 37℃ 5% CO_2 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 μM 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) 离心结束，充分去除上清，将 1 mL 预热的 NSPC 扩增培养基（成分为：**NSPC 扩增基础培养基，1×补充剂 C**）（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。

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

(5) 使用自动细胞计数器计数细胞，使用台盼蓝排除死亡细胞，使用 NSPC 扩增培养基稀释细胞，将细胞以 **5×10⁵/mL** 接种到低吸附六孔板中，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%CO_2 细胞培养箱中孵育 24h。

(6) 24h 后，100g 离心弃去上清，换成不含 **Y-27632 的** NSPC 扩增培养基，视培养基颜色或隔 2 天**半量换液**。

(7) 当 NSPC 长成 **100-150 μm** 直径的神经球时，建议进行传代。

注：①当形成肉眼可见的神经球时，可将神经球摇晃至中心，缓慢倾斜一定角度，沿着液面缓慢弃去培养基，在不吸到神经球的情况下尽量将培养基吸尽，进行换液，尽量避免离心。②NSPC 可使用**逸漠生物神经细胞无血清冻存液**在液氮中冷冻。

五、NSPC 传代

(1) 将神经球摇晃至中心，吸取中间神经球于 15mL 离心管，100g 离心 5 min。

(2) 弃去上清后加入 1mL 含 **Y-27632（10 μM）**的室温 **Accutase**，将离心管置于 37℃水浴消化 10-15 min。

(3) 10-15 min 后每孔加入 **1mL NSPC 扩增培养基（含 10 μM Y-27632）**，轻轻吹打细胞，使细胞解离成小团块或单细胞。

(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 NSPC 扩增培养基重悬细胞，轻轻地上下移液以确保细胞溶液均匀。

(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，使用 NSPC 扩增培养基稀释细胞，将细胞以 **5×10⁵/mL** 接种到低吸附六孔板中。

注：仅分化结束收获细胞时第一天必须添加 10 μM Y-27632，后续传代第一天不需要添加 10 μM Y-27632。

本产品仅供科研使用
厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389
官网 公众号 视频号