

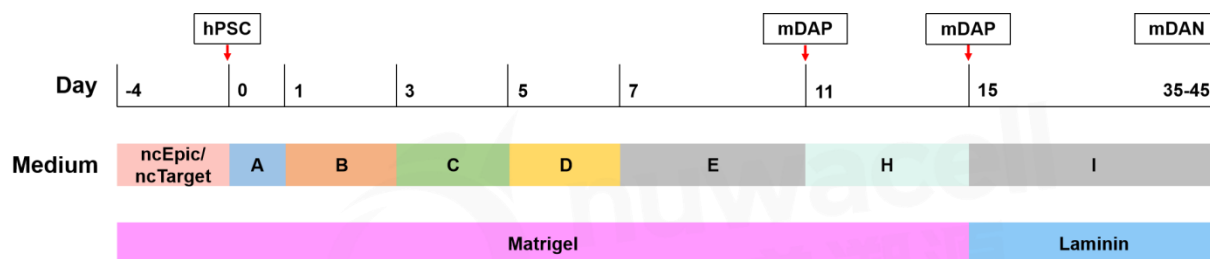
hPSC-多巴胺能神经元分化试剂盒

使用说明书 V3

一、产品简介

1.1、产品说明

hPSC-多巴胺能神经元分化试剂盒适用于人类多能干细胞 (hPSC) 分化为成熟多巴胺能神经元 (mDAN, midbrain Dopaminergic Neuron) 的产品。该试剂盒包含前体细胞分化试剂盒、前体细胞维持培养基和神经元成熟分化培养基, 可根据具体需求灵活选择。应用 hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒可以由 hPSC 获得高纯度的 mDAP (> 90% Lmx1a+/ Foxa2+/ En1+); 多巴胺能神经元成熟分化培养基可以将 mDAP 分化为成熟的 mDAN (TH+/Nurr1+)。分化获得的人多巴胺能神经前体细胞和人多巴胺能神经元可应用于神经退行性疾病的科学研究, 药物筛选, 以及帕金森疾病模型的细胞移植。



ncEpic: ncEpic hPSC Medium ncTarget: ncTarget hPSC Medium
 A: 分化完全培养基A; B: 分化完全培养基B; C: 分化完全培养基C; D: 分化完全培养基D;
 E: 分化完全培养基E; H: 人多巴胺能神经前体细胞维持培养基; I: 人多巴胺能神经元成熟分化培养基;
 mDAP: (midbrain Dopaminergic Progenitor) 中脑多巴胺能神经前体细胞;
 mDAN: (midbrain Dopaminergic Neuron) 中脑多巴胺能神经元。

1.2、产品信息

表 1: hPSC-多巴胺能神经元分化试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒*	RP01017	1 Kit	基础液 2-8°C
人多巴胺能神经前体细胞维持培养基	RP01017-H	100 mL	添加剂-20 至-
人多巴胺能神经元成熟分化培养基	RP01017-I	50 mL	80°C
hPSC-多巴胺能神经前体细胞	RC01008	1×10 ⁶	液氮保存

*每个试剂盒可获得超过 1×10⁷ 的多巴胺能神经前体细胞 (mDAP, DAY11)。

*将基础培养基和添加物混匀配置成分化完全培养基, 可在 2°C~8°C 中存储, 2 周内用完。

1.3、试剂材料推荐

表 2: 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
ncEpic hPSC Medium	首宁生物	RP01001
ncTarget hPSC Medium	首宁生物	RP01020
Vitronectin	首宁生物	RP01002
科研级hiPSC细胞株	首宁生物	RC01001
hPSC Dissociation buffer	首宁生物	RP01007
Blebbistatin	首宁生物	RP01008
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP01003
Solase细胞消化液	首宁生物	RP01021
ncLaminin511	首宁生物	RP01025
TrypLE	Gibco	12604013
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
6孔板	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL冻存管	Thermo Sci.	N/A
1.5 mL EP管	Axygene	N/A
10 µl/200 µl/1000 µl吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

二、hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化

2.1、试剂的准备

表 3: hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒产品信息

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒*包含:	RP01017	1 Kit	
mDAP Differentiation Supplement A (100×)	RP01017-A	100 μL	-20°C或-80°C
mDAP Differentiation Supplement B (100×)	RP01017-B	200 μL	-20°C或-80°C
mDAP Differentiation Supplement C (100×)	RP01017-C	200 μL	-20°C或-80°C
mDAP Differentiation Supplement D (100×)	RP01017-D	200 μL	-20°C或-80°C
mDAP Differentiation Supplement E (100×)	RP01017-E	600 μL	-20°C或-80°C
mDAP Differentiation Basal Medium F	RP01017-F	120 mL	2°C~8°C
mDAP Cryopreservation Medium G	RP01017-G	50 mL	2°C~8°C

*每个试剂盒可获得超过 1×10^7 的多巴胺能神经前体细胞 (mDAP, DAY11)。

*每个试剂盒可用于 12 孔板的 8 个孔或 6 孔板的 4 个孔的分化。

*将基础培养基和添加物混匀配置成分化完全培养基, 可在 2°C~8°C 中存储, 2 周内用完。

2.1.1. 在 4°C 解冻 mDAP Differentiation Supplement A、B、C、D、E, 以及 Differentiation Basal Medium F, 不要在 37°C 条件下解冻。

2.1.2. 在生物安全柜中, 参照表 4 配制成分化完全培养基 A/B/C/D/E (1×)。

表 4: hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒分化试剂盒完全培养基配置说明

种类	组分	终浓度
分化完全培养基 <u>A/B/C/D/E (1×)</u>	mDAP Differentiation Supplement A/B/C/D/E (100×)	1×
	mDAP Differentiation Basal Medium F	

2.1.3. 分化培养基建议现配现用, 置于 4°C 储存, 2 周内使用。

TIPS: 可根据实际用量将 Supplement A/B/C/D/E 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

2.2、人类多巴胺能神经前体细胞分化

2.2.1. hPSC 的培养和准备: 详见 hPSC 培养基使用说明书 (<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=20> 操作说明书) (<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=21> 操作视频教程)

2.2.2. **DAY 0**, 以 6 孔板操作为例, 当 hPSC 细胞汇合度达到 85% 时, 吸弃培养基, 加入 2mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 遍。随后加入 2mL/孔的 **Solase 细胞消化液**, 置于 37°C, 5%CO₂ 浓度, 饱和湿度培养箱中孵育 5-8 min, 轻轻晃动孔板使细胞完全脱离基质。

- 2.2.3. 细胞悬液转入 1.5 mL 离心管中，掌上离心机离心 10~15 s。随后吸弃上清，收集细胞计数，并取 2×10^6 hPSC 加入预温的 8 mL **分化完全培养基 A** 中，并按照 1:1000 比例加入 8 μ l 的 **Blebbistatin (10 mM)**。2 mL/孔将细胞悬液加入 Matrigel 包被 6 孔板的 4 个孔中。
- TIPS: 以 6 孔板操作为例，hPSC 的接种密度为 5×10^5 /孔。操作程序同样适用于其他培养容器，hPSC 的接种密度为 5×10^4 /cm²。**
- 2.2.4. **DAY 1**，吸除**分化完全培养基 A**，随后加入 2 mL/孔**分化完全培养基 B**，每天更换培养基，培养至 DAY 3 (DAY1-3)。
- 2.2.5. **DAY 3**，吸除**分化完全培养基 B**，随后加入 2 mL/孔**分化完全培养基 C**，每天更换培养基，培养至 DAY 5 (DAY3-5)。
- 2.2.6. **DAY 5**，吸除**分化完全培养基 C**，随后加入 2 mL/孔**分化完全培养基 D**，每天更换培养基，培养至 DAY 7 (DAY5-7)。
- 2.2.7. **DAY 7**，吸除**分化完全培养基 D**，随后加入 2 mL/孔**分化完全培养基 E**，每天更换培养基，培养至 DAY 11 (DAY7-11)。
- 2.2.8. **DAY 11**，吸除**分化完全培养基 E**，加入 2 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 次，随后加入 1 mL/孔 **Solase 细胞消化液**，置于 37°C，5%CO₂ 浓度，饱和湿度培养箱中孵育 8-10 min。当细胞脱离培养皿底时，加入 1 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 重悬收集细胞，178 \times g 离心 5 分钟，弃上清，所得细胞即为多巴胺能神经前体细胞。获得的前体细胞可继续成熟分化，也可冻存。
- 2.2.9. 如需冻存，加入 1 mL **mDAP Cryopreservation Medium G** 重悬细胞并计数，将细胞密度调整成 5×10^6 cells/mL，1 mL/管分装入冻存管中，做好标记。将冻存管转移至梯度冻存盒中，放置于-80°C冰箱中。第 2 天转移至液氮罐中长期保存。多巴胺能神经前体细胞的成熟请参考下一节 (**三：hPSC-多巴胺能神经元的成熟**)。

三、hPSC-多巴胺能神经元的成熟

3.1、hPSC-多巴胺能神经元成熟的培养板包被 (以 24 孔板为例)

3.1.1. Poly- L-ornithine/ Laminin (PO/Laminin)的包被

3.1.1.1. 试剂的准备: **PO/Laminin** 包被培养板用于 mDAP 的成熟培养。

产品信息	品牌	货号	浓度
Poly-L-ornithine	Sigma	P3655	10 mg/ mL
Laminin	Sigma	L2020	1 mg/ mL

- 3.1.1.2. 准备 12 mL 预冷的无菌水于 15 mL 离心管内，加入 4.8 μ l **Poly-L-ornithine** (10 mg/mL)，充分混匀，并快速滴加于 24 孔板内，每孔 500 μ l，置于 4°C 保存；
- 3.1.1.3. 第二天将包被有 Poly-L-ornithine 的 24 孔板从 4°C 中取出，恢复至室温，弃去 Poly-L-ornithine，用 1x DPBS 洗一次；
- 3.1.1.4. 准备 12 mL 预冷的无菌 1x DPBS 于 15 mL 离心管内，加入 48 μ l **Laminin** (1 mg/ mL)，充分混匀，并

快速滴加于 24 孔板内，每孔 500 μ l，置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

3.1.2. ncLaminin511 的包被

3.1.2.1. 试剂的准备：ncLaminin511 包被培养板用于 mDAP 的成熟培养。

产品信息	品牌	货号	浓度
ncLaminin511	首宁生物	RP01025	100 μ g/ mL

3.1.2.2. 准备 12 mL 预冷的无菌 1x DPBS 于 15 mL 离心管内，加入 240 μ l **ncLaminin511** (100 μ g/ mL)，充分混匀，并快速滴加于 24 孔板内，每孔 500 μ l，置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

3.2. 多巴胺能神经前体细胞 (hPSC-mDAP) 的维持培养

3.2.1. 多巴胺能神经前体细胞维持培养基的配制

3.2.1.1. 在 4 $^{\circ}$ C 解冻 **mDAP Maintenance Supplement (100 \times)**。

3.2.1.2. 在生物安全柜中，参照以下列表配制成**多巴胺能神经前体细胞维持培养基**。

mDAP Maintenance Basal Medium: 99 mL

mDAP Maintenance Supplement (100 \times): 1 mL

3.2.1.3. 分化培养基建议**现配现用**，置于 4 $^{\circ}$ C 储存，2 周内使用。可根据实际用量将 Supplement 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 5: 多巴胺能神经前体细胞 (mDAP) 维持培养基产品详情

产品信息	货号	规格	储存条件
多巴胺能神经前体细胞 (mDAP) 维持培养基:	RP01017-H	100 mL	
mDAP Maintenance Basal Medium		99 mL	2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C
mDAP Maintenance Supplement (100 \times)		1 mL	-20 $^{\circ}$ C ~ -80 $^{\circ}$ C
hPSC-多巴胺能神经前体细胞	RC01008	1\times106	液氮保存

3.2.2. 多巴胺能神经前体细胞复苏

3.2.2.1. 将水浴锅预热至 37 $^{\circ}$ C。将 Matrigel 或者 ncLaminin511 包被的 6 孔板，提前放置生物安全柜中约 30 分钟恢复至室温。

3.2.2.2. 取适量**多巴胺能神经前体细胞维持培养基**，按照 1:2000 比例加入 **Blebbistatin** (终浓度 5 μ M)，恢复至室温。

3.2.2.3. 从液氮罐中取出 1 管冻存的 **hPSC-多巴胺能神经前体细胞**，干冰转移至细胞间，立即放置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中手持轻轻摇晃，1 分钟内解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失时取出。

3.2.2.4. 75%酒精无尘纸擦拭冻存管表面，转入生物安全柜中；将细胞悬液移到事先准备好的 15 mL 离心管中，移液管吸取 10 mL DMEM/F12，逐滴加入冻存细胞悬液，过程中轻柔晃动混匀细胞，178 \times g 离心 5 分钟。

3.2.2.5. 弃去上清，加入预温的 1 mL **多巴胺能神经前体细胞维持完全培养基 (+ Blebbistatin)** 混匀细胞，尽

量避免吹打，取适量细胞计数。

3.2.2.6. 吸去 6 孔板中的包被液，将细胞按照 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度， $0.2 \text{ mL}/\text{cm}^2$ 培养基接种到相应的孔中。水平十字摇匀 3 次，并做好标记。置于 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀 3 次，培养。

3.2.2.7. 18-24 小时后更换新鲜的多巴胺能神经前体细胞维持完全培养基，3 mL/孔，随后每 2 天换液。第 4-5 天收集细胞并计数（Solase 细胞消化液，5-8 min），用于后期的成熟分化。

TIPS: 本说明以 6 孔板复苏 mDAP 为例，同样适用于其他培养容器。当 hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化 Day11 时，如选择连续成熟分化 (2.2.8)，则按照 3.2.2.6 同样的接种密度进行 mDAP 的传代即可。

3.3、多巴胺能神经元的成熟

表 6: 多巴胺能神经元成熟分化培养基产品详情

产品信息	货号	规格	储存条件
多巴胺能神经元成熟分化培养基包含:	RP01017-I	50 mL	
mDAN Maturation Basal Medium		50 mL	$2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$
mDAN Maturation Supplement (100×)		0.5 mL	$-20^\circ\text{C} \sim -80^\circ\text{C}$

3.3.1. 多巴胺能神经元成熟分化培养基的配制

3.3.1.1. 在 4°C 解冻 mDAN Maturation Supplement (100×)。

3.3.1.2. 在生物安全柜中，参照以下列表配制成多巴胺能神经元成熟分化培养基。

mDAN Maturation Basal Medium: 49.5 mL

mDAN Maturation Supplement (100×): 0.5 mL

3.3.1.3. 分化培养基建议现配现用，置于 4°C 储存，2 周内使用。可根据实际用量将 Supplement 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

3.3.2. 多巴胺能神经元成熟培养

3.3.2.1. PO/Laminin 或者 ncLaminin511 包被的 24 孔板，提前放置生物安全柜中约 30 分钟恢复至室温。

3.3.2.2. 取适量多巴胺能神经前体细胞维持培养基，按照 1:2000 比例加入 Blebbistatin (终浓度 $5 \mu\text{M}$)，恢复至室温。

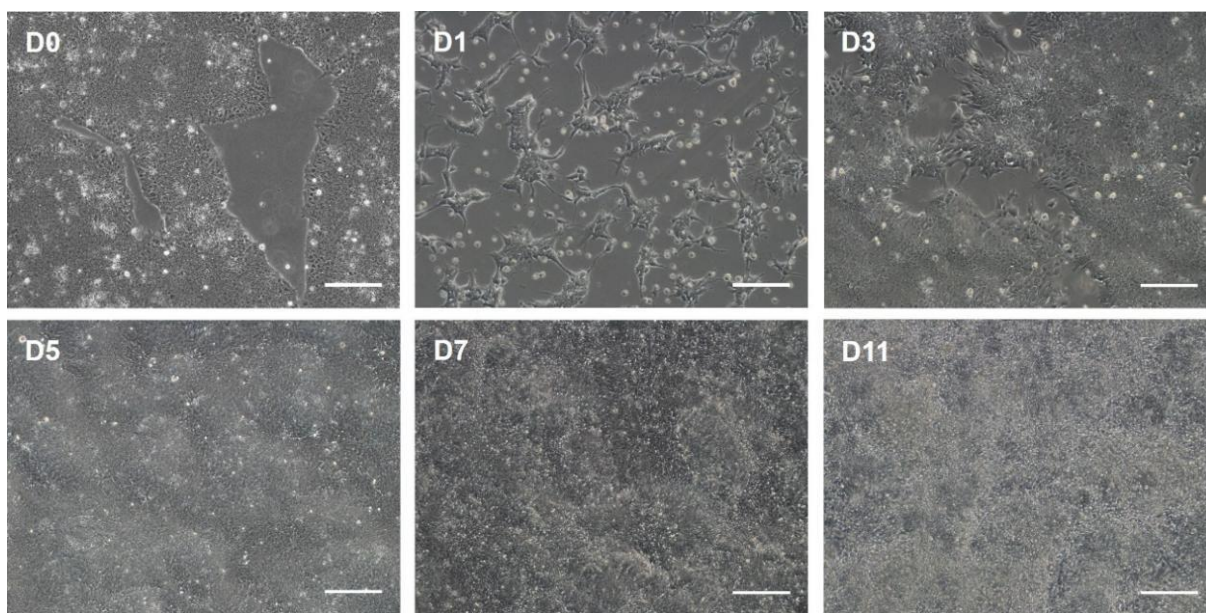
3.3.2.3. 取步骤 3.2.2.7 第 4-5 天收集的多巴胺能神经前体细胞，使用多巴胺能神经前体细胞维持培养基重悬细胞，按照 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种到 Laminin 包被的 24 孔板中，做好标记，水平十字摇匀 3 次，置于 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ 浓度，饱和湿度的培养箱中培养。

3.3.2.4. 18-24 小时后更换新鲜的多巴胺能神经元成熟分化培养基，0.5 mL/孔，前 7 天，每天换液，之后每 2 天换液，0.5 mL/孔。

3.3.3. 成熟多巴胺能神经元的鉴定

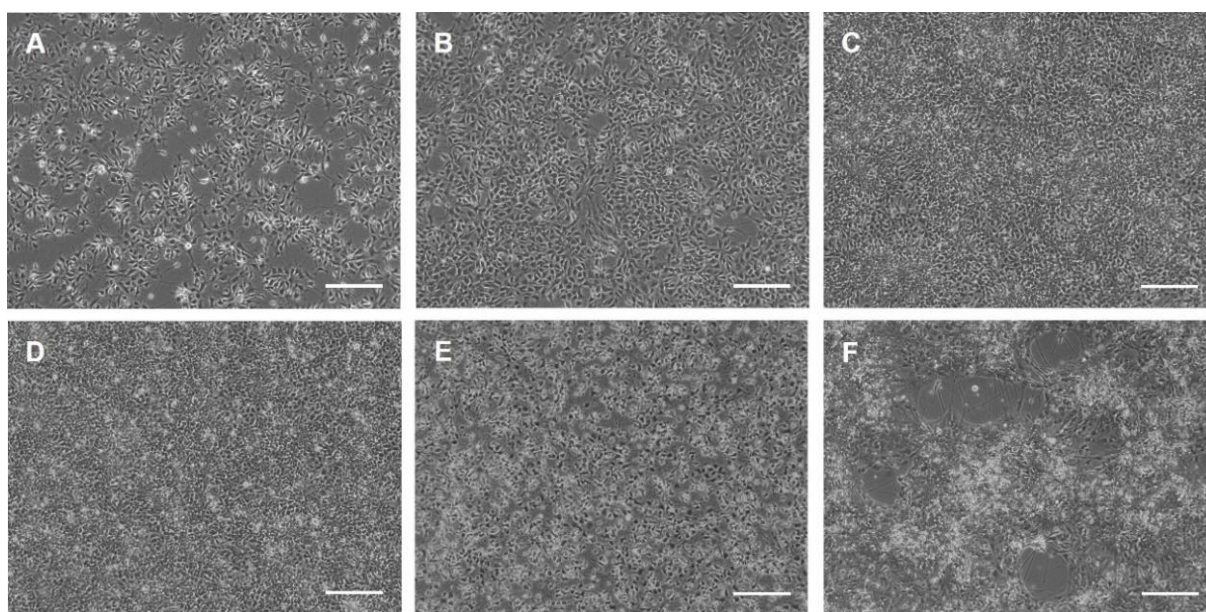
3.3.3.1. 将 PO/Laminin 或者 ncLaminin511 包被的 24 孔板，提前放置生物安全柜中 30 分钟恢复至室温。

- 3.3.3.2. 多巴胺能前体细胞在**多巴胺能神经元成熟分化培养基**中培养 20-30 天左右可进行多巴胺能神经元成熟指标的鉴定，使用 **TrypLE** 消化 (37°C, 10-15 min, 不要超过 15 min) 处理成单细胞，用于后续检测。
- 3.3.3.3. qPCR 鉴定：至少用 2×10^6 细胞抽提 RNA，随后进行相关鉴定。
- 3.3.3.4. 免疫荧光染色鉴定：将多巴胺能神经元按 $1-2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 Laminin 包被的培养板上，至少培养 3-5 天，等形态恢复后用于细胞免疫荧光染色试验。
- 3.3.3.5. 电生理鉴定：40-50 天的多巴胺能神经元可用于电生理实验，电生理检测时需提前使用 **多巴胺能神经元电生理专用培养基 (RP01017-J)** 培养 3 天。



hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化试剂盒分化过程细胞图示。标尺：200 μm 。

图示分别为 hPSC-多巴胺能神经前体细胞分化的 DAY 0、1、3、5、7、11 细胞形态图示。



hPSC-多巴胺能神经前体细胞复苏、维持培养与成熟分化形态图示。标尺：200 μm 。

图 A、B、C 分别为 hPSC-多巴胺能神经前体细胞 (mDAP) 复苏 DAY 1、2、4 细胞形态图示；

图 D、E、F 分别为 mDAP 分化为成熟多巴胺能神经元 (mDAN) 过程的 DAY 1、9、30 细胞形态图示。