

NeuroCortex Inducer Kit

NeuroCortex series 皮质脑类器官诱导试剂盒

Kit Art.No: ML-0827N01



- ◇ 产品是无菌的，产品外包装是非无菌的，请在使用前对产品外包装充分消毒。
- ◇ 产品一经拆封，应妥善存放以确保产品的无菌性。
- ◇ 对要进行诱导的 PSC 进行干性检测，如 SSEA-3/4+OCT4，对神经上皮诱导的 2D 细胞也可进行表征 IF 鉴定验证神经上皮分化，如 SOX2+ OCT4+ Nestin+ Nanog-。

1、产品描述

NeuroCortex 系列皮质脑类器官诱导试剂盒是模基生物自主研发的前脑腹侧化信号通路调控技术，专为模拟人脑皮质发育及功能研究设计的标准化培养体系。该体系通过时序激活 Wnt/ β -catenin 及梯度抑制 BMP/Smad 信号，驱动人源多能干细胞 (PSC) 定向分化为高纯度谷氨酸能神经元 (VGLUT1/2 阳性率 >85%)，并同步诱导放射状胶质细胞 (Pax6+/BLBP+) 形成仿生脑室区结构。可在 60 天内稳定生成直径 1.5-2.0 mm 的层状皮质类器官，其特征性表达深层皮质标志物 TBR1 (第 V - VI 层) 及表层 SATB2+ 神经元 (第 II - IV 层)，并伴随 MBP+/MOG+ 少突胶质细胞介导的致密髓鞘化 (LFB 染色阳性率 >70%)。该体系通过三维旋转生物反应器或超低粘附孔板中 (3D-RBC, 氧梯度维持在 8-12%) 实现高通量培养 (单批次 \geq 96 个类器官)。本模型适用于神经退行性疾病 (如阿尔茨海默症 tau 蛋白病理建模)、精神分裂症 NMDA 受体功能解析及自闭症谱系障碍突触可塑性研究，同时兼容单细胞测序和钙成像动态追踪技术。

2、产品信息

产品名称	产品货号	试剂盒组分	规格	试剂盒组分货号	存储/运输	保质期
NeuroCortex series 皮质脑类器官诱导试剂盒	ML-0827N01	NeuroEpithelial Induction Medium 神经上皮诱导培养基	100mL	ML-0827N01A	-20°C	24 个月
		Neurosphere Formation Medium 神经球形成培养基	100mL	ML-0827N01B		
		Neural Rosette Expansion Medium 神经莲座扩张培养基	100mL *2	ML-0827N01C		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
干细胞金牌基质胶	082777
NeuroCortex series 皮质脑成熟培养基	ML-0827N02
StemGrowth series 水解酶温和消化液	ML-0827S03
StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基	ML-0827S04
StemGrowth series 抗胁迫补充剂 1000x	ML-0827S10
StemGrowth series 消化液	ML-0827S08
超低黏附 96 孔 u 底板	ML-0827P12
超低黏附 6 孔培养皿	ML-0827P13
8-12 通道排枪	-

4、模基生物推荐用细胞系

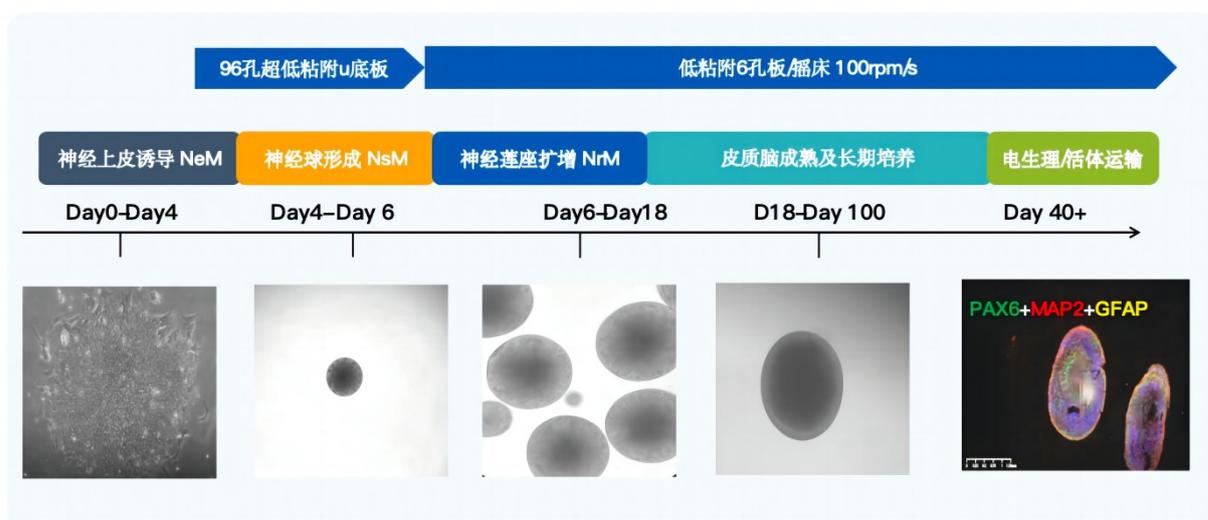
H1、H9、HN4、iPSCs 帕金森患者来源 DY043、iPSC-EGFP 等

5、新手须知

NeuroCortex series 脑类器官诱导试剂盒理论上可以形成至少 100 个脑类器官，但是建议第一次诱导以 1 个六孔板启动分化形成至少 60-100 个均一大小神经上皮球（理想形成率 60%）。

注意事项：在使用时应始终穿戴防护服，在处理诸如人体细胞或其他生物及有害物质时应遵循安全的实验室规程。

仅用于科学研究。



6、使用说明

a) 实验用品

基质胶、干细胞完全培养基、皮质脑类器官诱导培养基、超低黏附 u 底板/超低黏附 6 孔培养皿 6 孔培养皿 其他类器官培养所需试剂、耗材；)

b) 使用程序：

b.1、PSC 细胞培养及神经上皮干细胞 NESc 的二维诱导

1、 根据不同 PSC 细胞系的特性从 ESC < 60P、iPSC < 50P 中复苏一支细胞、经过两次高质量传代记作复苏后 P3 (干细胞培养操作见 StemGrowth series / StemGrowth UniMediX GoldenHold Medium 培养 SOP)

2、 PSC 传代后两天进行神经上皮诱导，观测细胞形态成小岛状克隆，细胞克隆密度低于 30%、无单细胞胁迫生长样及应激态球状克隆团即可进行诱导。弃去干细胞培养基使用 DMEM/F12 润洗两次细胞去除漂浮细胞后每孔加入 2mL 神经上皮诱导培养基，每 2 天换液一次，直到细胞克隆密度达到 80%，10x 显微镜下观测克隆边缘圆润光滑、细胞核缩小且变多，诱导时间计 3-4 天。

注意！PSC 克隆出现问题、自分化及漂浮的情况应再启动复苏扩增一株，不可直接用于分化

b.1.1、从 EB 球直接神经上皮诱导 (新手建议此方法进行分化)

1、 根据不同 PSC 细胞系的特性从 ESC / < 60P、iPSCs < 50P 中复苏一支细胞、经过两次高质量传代记作复苏后 P3 (干细胞培养操作见 StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基提供的 PSC 培养 SOP)。

2、 将 PSC 细胞培养至 80% 的克隆密度、克隆边界清晰圆润、细胞核质比正常即可进行 EB 诱导，DPBS 洗涤细胞两遍后使每孔用 500 μ L 的 StemGrowth series 水解酶温和消化液或 StemGrowth series 消化液，消化 6-10 分钟，观测克隆变圆皱缩变亮、摇晃可见少量细胞脱离基质即可终止消化。

3、 吸弃消化液，如若使用水解酶消化导致细胞大量漂浮则不吸弃，使用等量的 StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基终止消化。而无酶体系的 StemGrowth series 消化液则吸弃后直接每孔加入 500 μ L StemGrowth series EBs 形成培养基重悬细胞后收集于 15mL 或 50mL 离心管中 (根据消化液种类灵活选择)。

4、 水解酶消化后的细胞 120g 离心 5 分钟弃除上清后，加入按消化的孔数*500 μ L 的体积加入 EBs 形成培养基重悬并补充 1000x 到 1x 的 StemGrowth series 抗胁迫补充剂，而无酶体系的 StemGrowth series 消化液 消化后的细胞直接加入原重悬体系的 (消化孔数*500 μ L) 的体积的 EBs 培养基后补充 1x 的 StemGrowth series 抗胁迫补充剂。

5、 将细胞悬浮液+ 1x StemGrowth series 抗胁迫补充剂加入加样槽中或 10cm 细胞培养皿，使用排枪每孔 100 μ L 加入超低粘附 96 孔 u 底培养皿中，封口膜包好后水平甩板机 1500rpm 离心 5 分钟，37 度细胞培养箱培养过夜，第二天每孔加入 100 μ L EBs(不含 StemGrowth series 抗胁迫补充剂)形成培养基，EB 形成总时间约 48 小时。

6、 第三天完全吸弃 EBs 形成培养基，每孔加入 200 μ L 神经上皮诱导培养基培养三天，第二天吸弃 100 μ L 再补液 100 μ L 去除培养代谢废物。

b.2、神经球形成 (直接从 EB 诱导神经上皮的方法不参考此步骤)

1、 将 6mL StemGrowth series 水解酶温和消化液预热至室温后，放入生物安全柜，每孔使用 1mL 的 DPBS 洗涤诱导的神经上皮干细胞两次，每孔加入 800 μ L-1000 μ L 的 StemGrowth series 水解酶温和消化液，放入培养箱消化 5-8 分钟，每 4 分钟观测一次细胞状态，细胞克隆边缘卷起、细胞间隙变亮且有少量细胞漂浮于消化液中即可终止消化。

2、 从侧壁处吸弃消化液，每孔加入 1mL 的神经球形成培养基重悬细胞后定容于 12mL 的神经球形成培养基+12 μ L 的 StemGrowth series 抗胁迫补充剂，如若细胞消化过度大部分完全飘起则使用每孔 1mL 的 DMEM/F12 终止消化后 120g/3min 离心收集细胞后定容于 12 mL 的神经球形成培养基+12 μ L StemGrowth series 抗胁迫补充剂，注意:定容前台盼蓝染色检测细胞活性高于 80%即可进行下一步操作。

3、 准备 2 个超低黏附 96 孔 u 底板，使用排枪每孔 100 μ L 细胞悬液加入孔中，封口膜包好后 96 孔板水平离心机 1500rpm/5min 离心。

4、 离心结束细胞应聚集于孔的一侧，放入培养箱中培养 24h 后每孔再次加入 100 μ L 的神经球形成培养基不含 StemGrowth series 抗胁迫补充剂，神经球形成诱导时间计 2 天。

5、 对于直接形成 EB 后诱导神经上皮的体系，完成 3 天的诱导后完全吸弃神经上皮诱导培养基每孔加入 250 μ L 神经球形成培养基诱导 2 天。

b.3、神经莲座扩张(两种方案一致)

1、 当神经球直径达到相关标准时 (200-600 μ m)，使用宽口 200 μ L 移液枪头吸出神经球于超低吸附 6 孔板中，每个孔最多容纳 10 个神经球，所以最少准备 2 个六孔板启动神经莲座扩张。

2、 神经球进入 6 孔板中后，轻柔的每孔加入 2mL 神经莲座扩张培养基后，放入十字/旋转摇床 80rpm/s 上培养 18 天，每 1-2 天换液一次/每孔换液 2mL。

b.4、皮质脑成熟

当神经球中心和外侧出现黑色的斑点状结构说明神经莲座扩张到适合阶段，完全弃去神经莲座扩张培养基每孔加入 2mL 的皮质区脑成熟培养基放入十字/旋转摇床 80rpm/s 上培养 18-26 天/每 2-3 天换液一次即可用于鉴定和下游实验。成熟的脑类器官结构上 IF 染色可见 TUJ1/SOX2 标记的细胞形成 VZ 和 SVZ 样的结构，且高表达谷氨能相关基因，使用脑成熟培养基长期于摇床培养可以培养至 120 天中心细胞不出现凋亡。

当皮质脑培养至直径大于 1mm 以上时，需对其进行切割减少内部细胞凋亡的情况。使用锋利无钝口的 2 号手术刀片将一个 1mm 以上的皮质脑类器官切割成 2-4 块，DPBS 洗涤一遍类器官后，使用宽口 1000 μ L 移液枪头转移至 15mL 离心管中自然沉降 (约需要 5-8min)，吸弃 DPBS 上清后，加入神经莲座扩张培养基+1x StemGrowth series 抗胁迫补充剂转移入超低粘附六孔板 80rpm/s 培养 4 天，每天换液。4 天后加入更换为皮质区脑类器官成熟培养基 120rpm/s 继续维持培养，可延长培养时间和类器官活性至 180 天。

