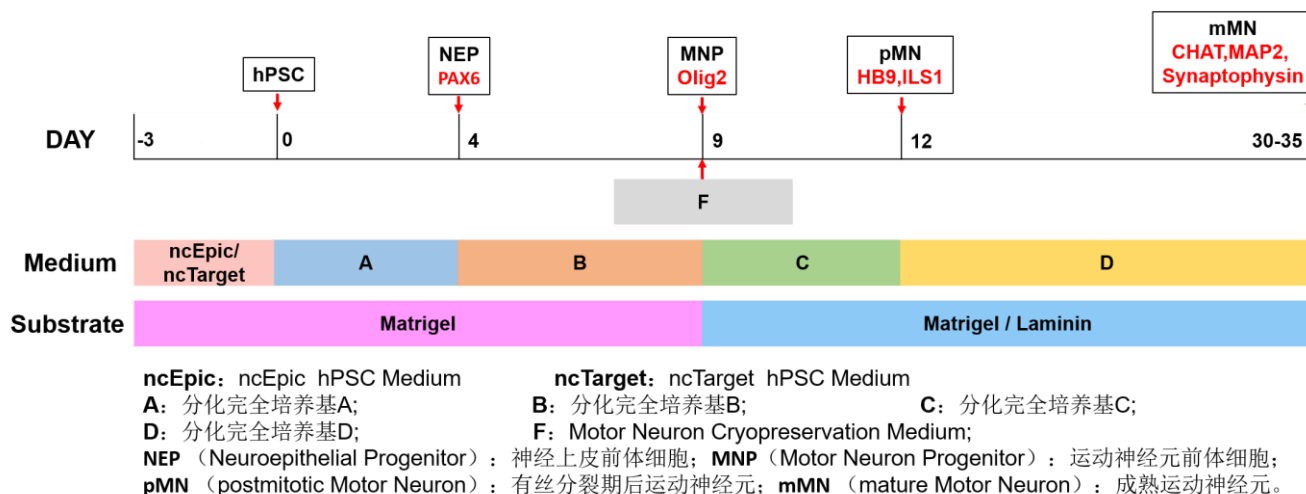


# hPSC-运动神经元分化试剂盒

## 使用说明 V3

### 一、产品简介

hPSC-运动神经元分化试剂盒具有高效运动神经元定向分化能力，可用于人多能干细胞向运动神经元诱导分化。分化获得的运动神经元能表达运动神经元的特异性 Marker（如 CHAT, MAP2, Synapophysin 等），同时具有运动神经元的电生理活性，适用于体外研究和疾病模型动物的细胞移植研究等。



### 二、产品信息

表 1: hPSC-运动神经元分化产品体系

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-运动神经元分化试剂盒*	RP01018	1 Kit	基础液 2°C ~ 8°C
运动神经元成熟培养基	RP01018-G	1 Kit	添加剂 -20°C ~ -80°C
hPSC-运动神经元前体细胞**	RC01009	1×10 <sup>6</sup>	液氮保存

\*每个试剂盒可分化获得 1×10<sup>7</sup> 运动神经元前体细胞 (DAY9, MNP)。

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

\*\*hPSC-运动神经元分化至 DAY 9 的运动神经元前体细胞 (MNP)。

### 三、试剂材料

表 2: 推荐试剂&材料&设备

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
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
Solase细胞消化液	首宁生物	RP01021
ncLaminin511	首宁生物	RP01025
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
Poly-L-ornithine	Sigma	P3655
Laminin	Sigma	L2020
TrypLE	Gibco	12604013
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
12孔板	Thermo Sci.	150628
T25 培养瓶	Thermo Sci.	156367
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-运动神经元分化

### 2.1、试剂的准备

表 3: hPSC-运动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-运动神经元分化试剂盒*包含:	RP01018	1 Kit	
Motor Neuron differentiation Supplement A (20×)	RP01018-A	1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Supplement B (25×)	RP01018-B	1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Supplement C (50×)	RP01018-C	1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Supplement D (50×)	RP01018-D	3×1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Basal Medium E	RP01018-E	250 mL	2°C~8°C
Motor Neuron Cryopreservation Medium F	RP01018-F	20 mL	2°C~8°C

\*每个试剂盒可分化获得  $1 \times 10^7$  运动神经元前体细胞 (DAY9, MNP)。

\*每个试剂盒可用于 12 孔板 4 个孔或 6 孔板 2 个孔的 MNP 分化 (DAY0-DAY9), 以及 12 孔板 10 个孔或者 24 孔板 20 个孔的 MNP 成熟 (DAY9-DAY30)。

2.1.1. 在 4°C 解冻 Motor Neuron Differentiation Supplement A、B、C、D, 不要在 37°C 条件下解冻。

2.1.2. 在生物安全柜中, 参考表 3, 按照比例使用无菌移液管及枪头混匀配制成 分化完全培养基 A/B/C/D (1×)。

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 Motor Neuron Differentiation Supplement A/B/C/D 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 4: 人类运动神经元分化试剂盒完全培养基配置说明

种类	组分	终体积
分化完全培养基 A/B/C/D (1×)	Motor Neuron Differentiation Supplement A (20×) /B (25×) /C (50×) /D (50×)	1×
	Motor Neuron Differentiation Basal Medium E	

## 2.2、人类多能干细胞来源运动神经元分化

### 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 0~4: Neuroepithelial Progenitor (NEP) 分化

2.2.2.1. DAY 0, 当 hPSC 在培养皿中的汇合度达到 80~90%时, 将hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) 吸除, 加入 2 mL/孔的 DPBS (不含钙镁), 轻轻摇晃并吸弃。

2.2.2.2. 1mL/孔加入预温的 **Solase 消化液**使溶液完全覆盖孔底, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 5-7 min, 轻轻晃动孔板使细胞完全脱离基质。

2.2.2.3. 细胞悬液转入 1.5 mL 离心管中, 掌上离心机离心 10~15 s。

2.2.2.4. 吸弃上清液, 加入 1 mL 人运动神经元**分化完全培养基 A** 重悬细胞, 轻柔吹打 1-2 次使细胞尽量分散成单细胞, 并进行计数。

2.2.2.5. 3~5×10<sup>5</sup> cells/孔接种到 Matrigel 包被好的 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 人运动神经元**分化完全培养基 A** (含 10 μM 的 **Blebbistatin**)。

2.2.2.6. 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 水平十字摇匀 3 次, 培养。

2.2.2.7. 细胞培养 22~24 h 后, 吸弃细胞培养基, 每孔加入 2 mL 人运动神经元**分化完全培养基 A**, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱继续培养, 每天换液。

**TIPS: DAY 1 及之后换液时, 分化完全培养基 A 中不加 Blebbistatin。**

### 2.2.3. DAY 4~9: Motor neuron Progenitor (MNP) 分化

2.2.3.1. DAY 4, 吸弃培养基, 每孔加入 2 mL 人运动神经元**分化完全培养基 B**, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中继续培养, 每天换液 (DAY4-9)。

### 2.2.4. DAY 9~12: Post-mitotic motor neuron 分化

2.2.4.1. DAY 9, 吸弃培养基, 2 mL/孔加入 DPBS (不含钙镁), 轻轻摇晃并吸弃。

2.2.4.2. 加入 1 mL/孔预温的 **Solase 消化液**使溶液完全覆盖孔底, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 8-12 min, 轻轻晃动孔板使细胞完全脱离。

**Tips: 若细胞 12 min 没有完全脱离基质, 可适当延长时间到 18~20 min, 最长不可超过 20 min。**

2.2.4.3. 将细胞悬液转入 1.5 mL 离心管中, 掌上离心机离心 10~15 s。

2.2.4.4. 吸弃上清, 加入 1 mL **分化完全培养基 C** 重悬细胞, 轻柔吹打 1~2 次使细胞尽量分散成单细胞, 并进行细胞计数。

**TIPS: 此处获得的 MNP 可冻存, 加入 1mL 的 Motor Neuron**

**Crypreservation Medium F 冻存细胞, 细胞数建议 2×10<sup>6</sup> cells/管。**

2.2.4.5. 按照 2~6×10<sup>5</sup> cells/ 孔 的 密度 接种 到 **Matrigel ( 2 × )** 或者 **Laminin** 包 被 的 12孔板中, 加入 1 mL/孔 **分化完全培养基 C** (含 10 μM 的**Blebbistatin**)。

2.2.4.6. 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 水平十字摇匀 3 次, 培养。



2.2.4.7. 培养 22~24 h 之后，吸弃细胞培养基，加入 1 mL/孔分化完全培养基 C，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 浓度，饱和湿度的培养箱中培养，每天换液（DAY9-12）。

**TIPS: Motor Neuron 贴壁较松，建议使用 2×浓度的 Matrigel 包被培养板，且 Day 10 及之后换液时要特别轻柔，并去除 Blebbistatin。**

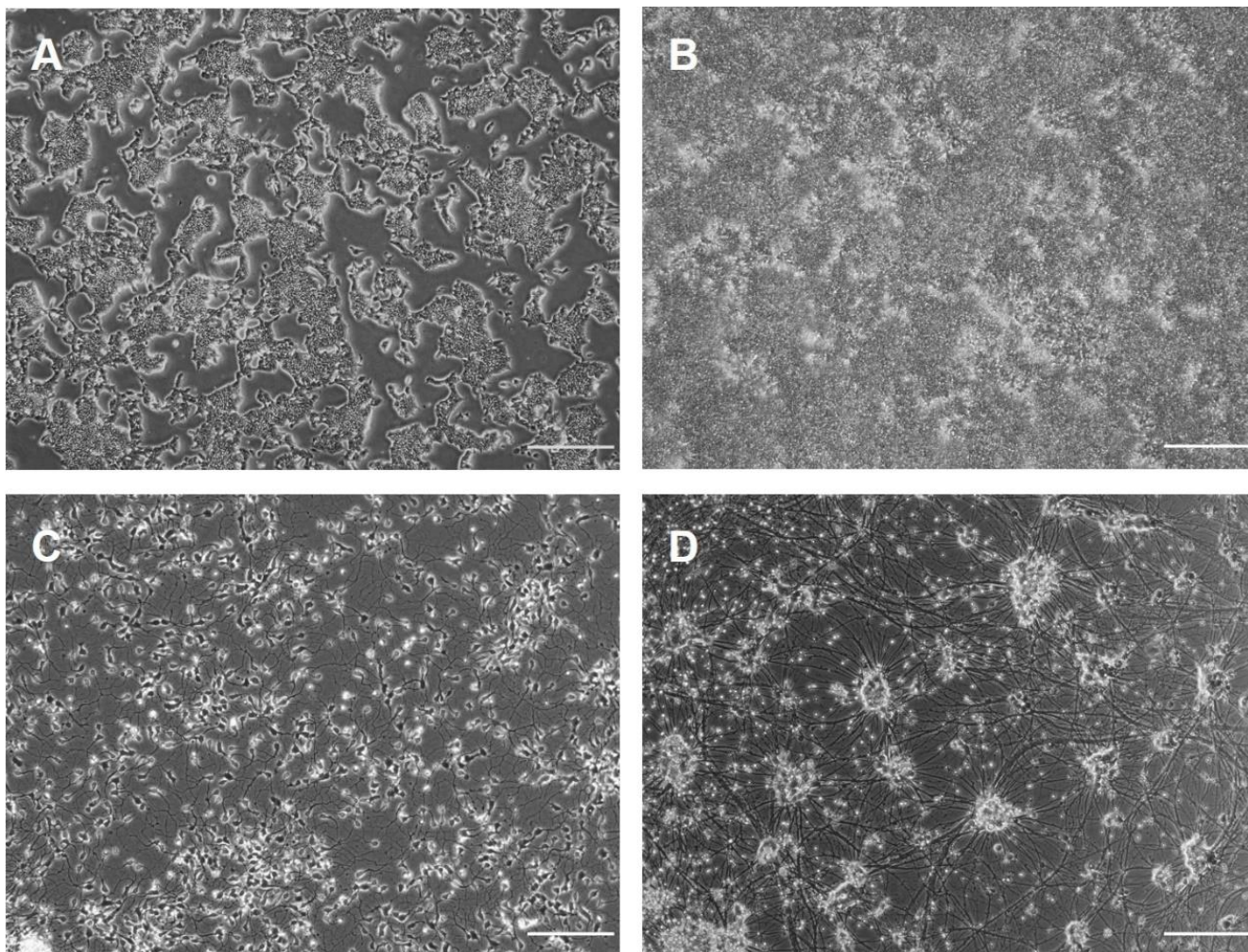
### 2.2.5. DAY 12~35: Motor neuron 成熟

2.2.5.1. DAY 12 吸弃细胞培养基，加入 1 mL/孔分化完全培养基 D，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 浓度，饱和湿度的培养箱中，隔天换液。

**TIPS: Motor Neuron 贴壁较松，换液时要特别轻柔。**

2.2.5.2. 培养到 DAY 30~35 时可获得成熟的 Motor Neuron。可进行相关鉴定。

2.2.5.3. 电生理鉴定：电生理检测时需要提前使用运动神经元电生理专用培养基 (RP01018-H) 培养 3 天。



hPSC-运动神经元分化试剂盒分化过程中细胞形态图示。标尺：200 μm。

图 A、B、C、D 分别为分化第 4、9、12、30 天时的细胞形态图示。

### 三、hPSC-运动神经元前体细胞复苏与成熟培养

#### 3.1、试剂的准备

表 5: hPSC-运动神经元前体细胞培养相关产品体系

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-运动神经元前体细胞	RC01009	1×10 <sup>6</sup>	液氮保存
运动神经元成熟培养基*包含	RP01018-G	1 Kit	
Motor Neuron differentiation Supplement C (50×)	RP01018-C	1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Supplement D (50×)	RP01018-D	3×1 mL	-20°C或-80°C
Motor Neuron differentiation Basal Medium E	RP01018-E	200 mL	2°C~8°C

3.1.1. 在 4°C解冻 Motor Neuron Differentiation Supplement C、D, **不要在 37°C条件下解冻。**

3.1.2. 在生物安全柜中, 参考表 4 配制成**分化完全培养基 C/D (1×)**。

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。

**TIPS: 可根据实际用量将 Motor Neruon Differentiation Supplement**

**C/D 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。**

#### 3.2、hPSC-运动神经元前体细胞复苏与成熟培养

3.2.1 将水浴锅预热至 37°C。将 **Matrigel** 或者 **Laminin** 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 取适量**分化完全培养基 C**, 按照 1:1000 比例加入 **Blebbistatin** (终浓度 10 μM), 恢复至室温。

3.2.3 从液氮罐中取出 1 管冻存的 **hPSC-运动神经元前体细胞**, 干冰转移至细胞间, 立即放置于 37°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。

3.2.4 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×g 离心 5 分钟。

3.2.5 弃去上清, 加入预温的 1 mL **分化完全培养基 C** 混匀细胞, 尽量避免吹打, 取适量细胞计数。按照 **2~6×10<sup>5</sup> cells/孔**的密度接种到 **Matrigel** 或者 **Laminin** 包被的 12 孔板中。置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱, 水平十字摇匀 3 次, 培养。

3.2.6 培养 22~24 h 之后, 吸弃细胞培养基, 加入 1 mL/孔**分化完全培养基 C**, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中培养, 培养 3 天, 此时可参照 **2.2.4 培养步骤**进行操作。

3.2.7 DAY 3 吸弃细胞培养基, 加入 1 mL/孔**分化完全培养基 D**, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 隔天换液。

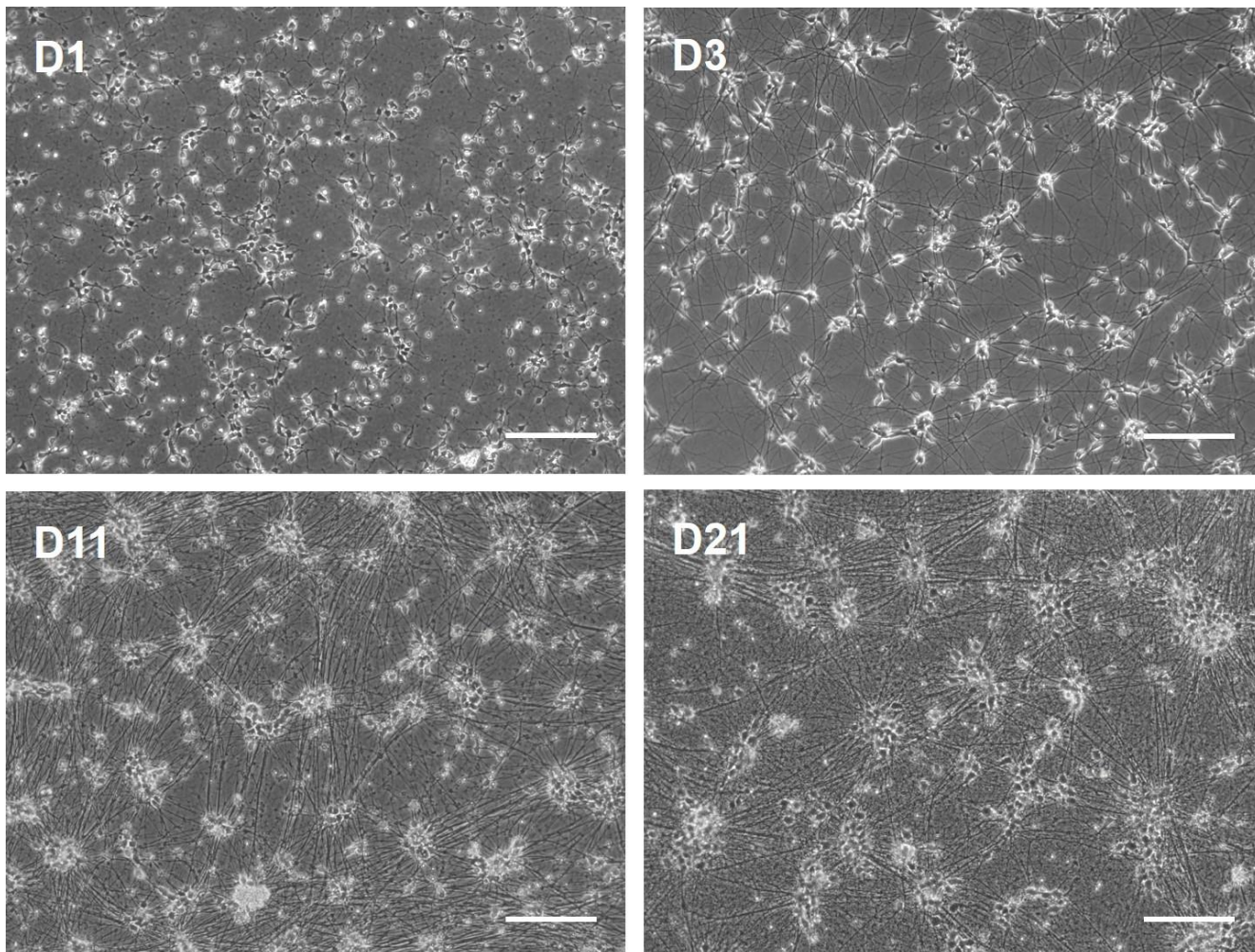
**TIPS: Motor Neuron 贴壁较松, 换液时要特别轻柔, 并去除 Blebbistatin。**



3.2.8 培养到 DAY 18~23 时可获得成熟的 Motor Neuron。可进行相关鉴定。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。

3.2.9 qPCR 鉴定: 至少用  $2 \times 10^6$  细胞抽提 RNA, 随后进行相关鉴定。

3.2.10 电生理鉴定: 电生理检测时需要提前使用运动神经元电生理专用培养基 (RP01018-H) 培养 3 天。



hPSC-运动神经元前体细胞复苏后 DAY1-DAY21 细胞形态图示。

标尺: 200  $\mu\text{m}$  。