

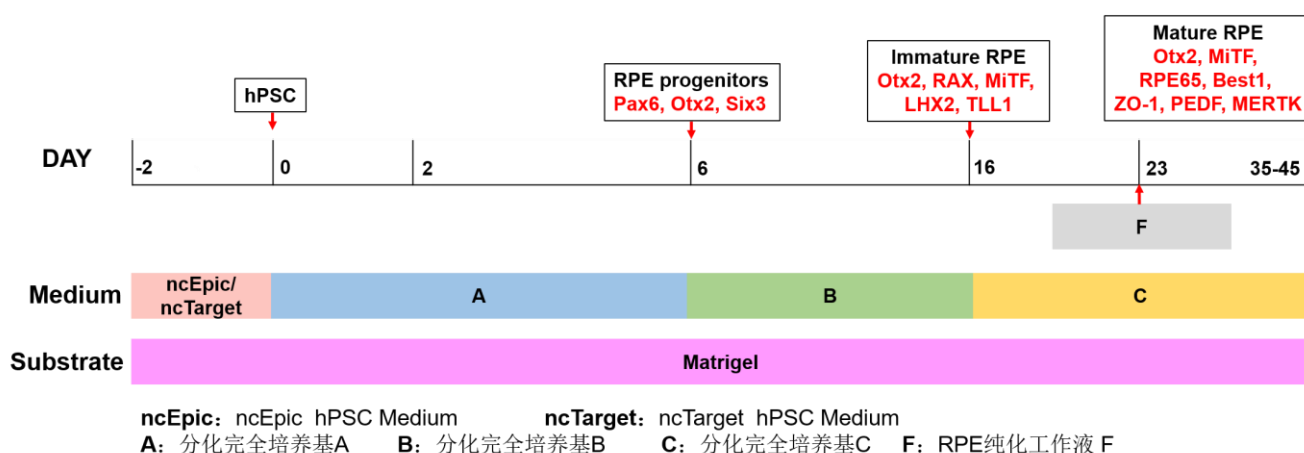
hPSC-RPE 分化试剂盒

使用说明书 V3

一、产品简介

1.1、产品说明

hPSC-RPE 分化试剂盒是一种适用于人类多能干细胞 (hPSC) 分化为人类视网膜色素上皮细胞 (RPE) 的产品。该产品具体包括分化培养基、RPE 纯化工作液和冻存保护液。应用 hPSC-RPE 分化试剂盒可以由 hPSC 获得较高纯度的 RPE (> 95% MiTF+/ ZO-1+), hPSC 来源的 RPE 可应用于相关的科学研究, 药物筛选, 以及疾病模型动物细胞移植治疗试验。



1.2、产品信息

表 1: hPSC-RPE 分化系列产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-RPE分化试剂盒*	RP01016	1 Kit	基础液 2°C ~ 8°C 添加剂 -20°C ~ -80°C
hPSC-RPE前体细胞成熟培养基*	RP01016-H	1 Kit	
hPSC-RPE细胞 (Day25) **	RC01007	3×10 ⁶	液氮保存

*每个试剂盒最终可获得约 1×10⁷ 的成熟 RPE 细胞。

*将基础液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。

** hPSC-RPE 分化至 DAY 25 的 RPE 细胞。

1.3、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
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP01003
Solase细胞消化液	首宁生物	RP01021
0.25%胰蛋白酶消化液	首宁生物	RP02011
胰蛋白酶抑制剂	首宁生物	RP02012
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
6/12/24孔板	Thermo Sci.	140685
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
10 μL/200 μL/1000 μL吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

二、hPSC-RPE 分化

2.1、试剂的准备

表 3: hPSC-RPE 分化试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-RPE分化试剂盒*包含:	RP01016	1 Kit	
RPE Differentiation Supplement A (50×)	RP01016-A	800 μL	-20°C或-80°C
RPE Differentiation Supplement B (50×)	RP01016-B	1.2 mL	-20°C或-80°C
RPE Differentiation Supplement C (50×)	RP01016-C	2 mL	-20°C或-80°C
RPE Differentiation Basal Medium D	RP01016-D	100 mL	2°C~8°C
RPE Differentiation Basal Medium E	RP01016-E	100 mL	2°C~8°C
RPE纯化工作液 F	RP01016-F	10 mL	2°C~8°C
RPE冻存液 G	RP01016-G	10 mL	2°C~8°C

*每个试剂盒最终可获得约 1×10^7 的成熟 RPE 细胞。

*每个试剂盒可用于 12 孔板的 6 个孔，或者 6 孔板的 3 个孔的分化。

*将基础液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 RPE Differentiation Supplement A、B、C，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 (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 RPE Differentiation Supplement A/B/C 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 4: hPSC-RPE 分化试剂盒试剂配制说明

种类	组分	终浓度
分化完全培养基 <u>A/B (1×)</u>	RPE differentiation Supplement A (50×) / B (50×)	1×
	RPE differentiation Basal Medium D	
分化完全培养基 <u>C (1×)</u>	RPE differentiation Supplement C (50×)	1×
	RPE differentiation Basal Medium E	

2.2、hPSC-RPE 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-2**, 以 12 孔板操作为例, 当 hPSC 细胞汇合度达到 85% 时, 传代接种到新的孔中, hPSC 的接种密度为 1×10^5 /孔, 培养两天, 每天换液。

TIPS: 操作程序同样适用于其他培养容器: hPSC 的接种密度为 $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 。建议 hPSC 复苏后传代 5 次左右, 细胞状态良好时启动细胞分化。

- 2.2.3. **DAY 0**, 吸弃培养上清, 随后加入分化完全培养基 A, 每孔 1 mL, 每天更换培养基, 培养至 DAY 6 (DAY 0-5)。
- 2.2.4. **DAY 6**, 吸除分化完全培养基 A, 随后加入 1 mL/孔分化完全培养基 B, 每天更换培养基, 培养至 DAY 16 (DAY6-15)。
- 2.2.5. **DAY 16**, 吸除分化完全培养基 B, 随后加入 1 mL/孔分化完全培养基 C, 每天更换培养基, 培养至 DAY 23 (DAY16-23)。
- 2.2.6. **DAY 23**, 吸除分化完全培养基 C, 加入 1 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 次, 随后加入 1 mL RPE 纯化工作液 F, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 6-8 分钟, 使得杂细胞彻底脱离培养皿底部。
- TIPS:** 杂细胞成纤维丝状, 较易与 RPE 细胞分离。消化期间可将培养皿取出培养箱, 在显微镜下观察杂细胞的状态, 并可轻微地用手晃动培养皿以加速杂细胞的分离。
- 2.2.7. 杂细胞全部漂起后, 吸除上清, 随后加入 1 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 3 次, 以确保完全去除杂细胞。
- TIPS:** 该步骤基本可以去除所有的杂细胞。
- 2.2.8. 每孔加入 2 mL 分化完全培养基 C, 继续培养至 DAY35-45, 3-4 天更换培养基。DAY 35-45 天时获得的 RPE 细胞可用于各项科学研究试验。
- 2.2.9. **细胞冻存:** 根据实验需求, 可以将获得的 hPSC-RPE 进行冻存。吸除上清, 加入 1 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 次, 随后加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化液 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 3-5 分钟。当 RPE 细胞大部分变亮时, 吸弃消化液, 每孔加入 1 mL 胰蛋白酶抑制剂 轻柔吹打 3-5 次, 收集 RPE 细胞于 15 mL 离心管中, $180 \times g$ 离心 5 分钟。
- TIPS:** 消化时需注意观察细胞状态, 大部分细胞变亮即可终止消化, 此时大部分细胞未漂起, 吸弃胰酶后加入胰酶抑制剂轻柔吹打 3-5 次收集细胞, 如细胞大部分漂起, 则直接加入胰酶抑制剂轻柔吹打 3-5 次收集细胞。
- 2.2.10. 吸弃上清, 加入适量 RPE 冻存液 G 重悬 RPE 细胞并计数, 随后将细胞按一定密度 (如 $3 \times 10^6 / \text{管}$) 进行冻存。

三、hPSC-RPE 细胞复苏与成熟培养

3.1、试剂的准备

表 5: hPSC-RPE 细胞培养相关产品体系

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-RPE细胞	RC01007	3×10 ⁶	液氮保存
hPSC-RPE细胞成熟培养基包含	RP01016-H	1 Kit	
RPE Differentiation Supplement C (50×)	RP01016-C	2 mL	-20°C或-80°C
RPE Differentiation Basal Medium E	RP01016-E	100 mL	2°C~8°C

3.1.1. 在 4°C解冻 RPE Differentiation Supplement C, **不要在 37°C解冻。**

3.1.2. 在生物安全柜中, 参考表 4 配制成 **RPE 细胞成熟完全培养基 (1×)**。

RPE Differentiation Basal Medium E: 98 mL

RPE Differentiation Supplement C (50×): 2 mL

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 RPE differentiation Supplement C 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

3.2、hPSC-RPE 细胞复苏与成熟培养

3.2.1. 将水浴锅预热至 37°C。将 Matrigel 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 (15~30°C)。

3.2.2. 取 6 mL **RPE 细胞成熟完全培养基**, 按照 1:1000 比例加入 6 μL 的 **Blebbistatin** (10 mM), 恢复至室温 (15~30°C)。

3.2.3. 从液氮罐中取出 1 管冷冻的 **hPSC-RPE 细胞**, 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 10mL DMEM/F12, 逐滴加入冻存细胞悬液, 过程中轻柔晃动混匀细胞, 180 ×g 离心 5 分钟。

3.2.5. 弃去上清, 轻弹管底的细胞, 加入预温的 6 mL **Blebbistatin + RPE 细胞成熟完全培养基**混匀细胞, 尽量避免吹打。

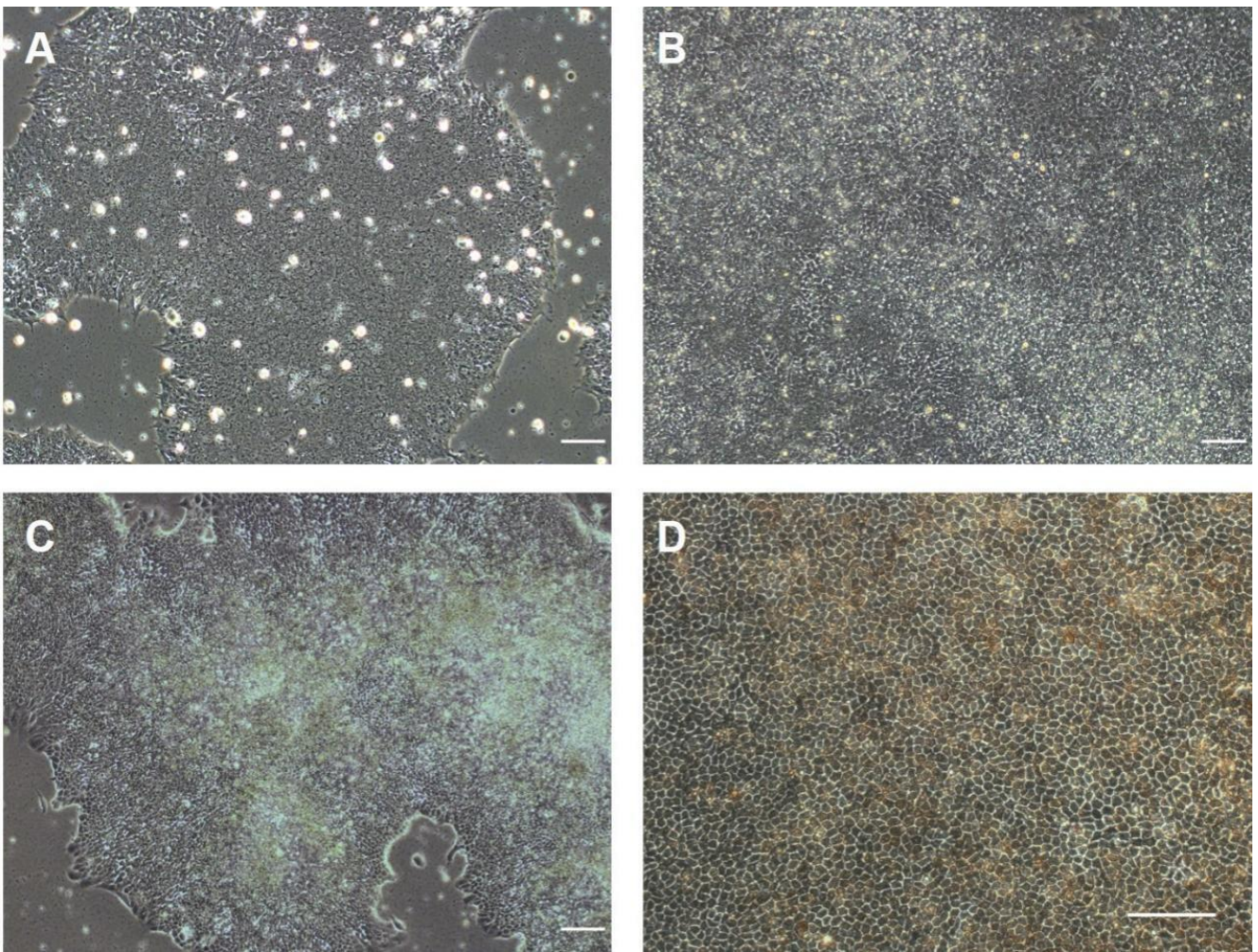
TIPS: RPE 细胞建议接种密度 1-2×10⁵/cm², 接种时注意充分混匀。

3.2.6. 吸去 6 孔板中的 2 孔 Matrigel 溶液, 并按 3 mL/孔逐滴将细胞接种到板中。

3.2.7. 按“十”字方向水平均匀晃动培养板, 确保细胞均匀分布。

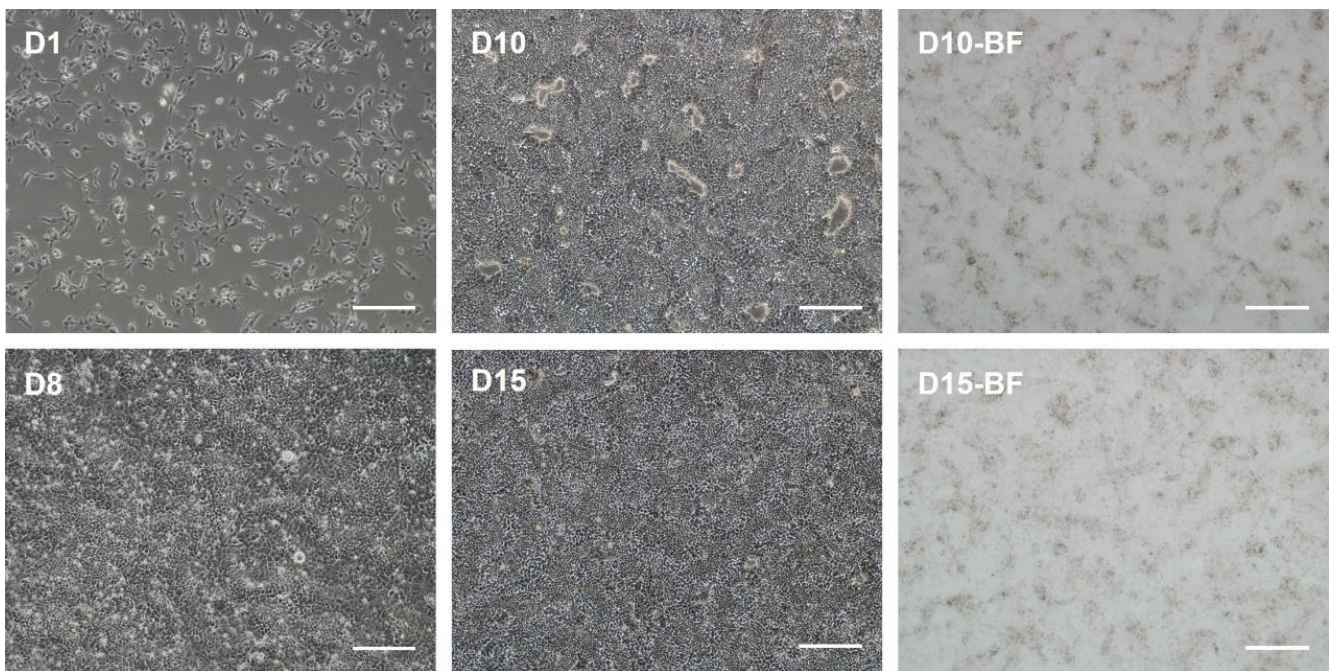
3.2.8. 标记 6 孔板: 细胞来源、代数、RPE 培养天数、日期、操作人 ID, 将培养板置于 37°C, 5%CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 再次水平十字摇匀三次, 培养。

3.2.9. 18-24 小时后更换一次 **RPE 细胞成熟完全培养基**, 之后每两天更换一次培养基,每次 3 mL/孔。DAY8 时可见典型 RPE 细胞形态, DAY10 开始可见明显黑色素分泌。



hPSC-RPE 分化试剂盒分化过程中细胞形态图示。标尺：200 μm 。

A: DAY 0 (hPSC); B: DAY 6 (RPE progenitors); C: DAY 16 (Immature RPE);
D: DAY45 (Mature RPE)。



hPSC-RPE 细胞复苏后 DAY1-DAY15 细胞形态图示。标尺：200 μm 。

DAY8 时可见典型 RPE 细胞形态，DAY10 开始可见明显黑色素分泌。