

# Plurioid™ Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 内耳类器官试剂盒)

货号: HiIEO-K100

## 产品介绍

Plurioid™ hPSC 内耳类器官试剂盒是一款无血清培养系统, 通过精确调控 hPSC 分化路径, 可在 60 天左右将人多能干细胞 (hPSC) 高效诱导分化为具有 3D 结构的耳囊泡样类器官, 形成毛细胞、支持细胞及与之形成突触连接的感觉神经元的复合感觉上皮结构。本产品为内耳发育机制研究、听力相关疾病建模、药物筛选及再生疗法开发提供了高度仿生且可重复的体外实验平台。

本试剂盒规格为 1 miniKit, 预计可生成 30 个内耳类器官, 需要操作人员具有 hPSC 培养经验, 并对类器官具有一定了解。

## 产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Embryoid Body Induction formation Basic Medium	HiIEO-K100	8 mL	4°C, 6个月
Supplement A (5×)		2 mL	-20°C, 1年
Supplement B (100×)		50 µL	-20°C, 1年
Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium		25 mL	4°C, 6个月
Supplement C (20×)		0.5 mL	-20°C, 1年
Supplement D (20×)		0.5 mL	-20°C, 1年



Supplement E (20×)		50 μL	-20°C, 1年
Supplement F (20×)		50 μL	-20°C, 1年
Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Differentiation Basic Medium		65 mL	4°C, 6个月
Supplement G (20×)		1.7 mL×2	-20°C, 1年
Supplement H (500×)		0.1 mL	-20°C, 1年

## 其他需准备的试剂信息

试剂名称	厂家	货号
hPSC完全培养基	SHR Biotechnology	HPCM-100
hPSC传代消化液	SHR Biotechnology	HPPD-100
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
hPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

## hPSC 内耳类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 内耳类器官完全培养基。以下是准备拟胚体诱导培养基, 内耳类器官诱导培养基 A, 内耳类器官诱导培养基 B, 内耳类器官诱导培养基 C, 内耳类器官诱导培养基 D, 内耳类器官分化培养基 E, 内耳类器官分化培养基 F 的示例, 如所需量不同, 请进行相应用量调整。

- 1、冰上解冻 Supplement A (5×), Supplement B(100×), Supplement C (20×), Supplement D (20×), Supplement E (20×), Supplement F (20×), Supplement G (20×), Supplement H (20×), Supplement I (500×)。



**注意:** 解冻后, 建议将Supplement A (5×), Supplement B (100×), Supplement C (20×), Supplement D (20×), Supplement E (20×), Supplement F (20×), Supplement G (20×), Supplement H (20×), Supplement I (500×)按需分装后保存取用, 避免反复冻融。对于所有微量试剂组分建议解冻后瞬时离心5秒钟 (500-2000rpm), 再开盖使用, 以避免损失。

- 2、拟胚体诱导培养基a: 将200  $\mu$ L Supplement A (5×), 10  $\mu$ L Supplement B(100×) 加至790  $\mu$ L Embryoid Body Induction formation Basic Medium中, 充分混合, 配制成1 mL拟胚体诱导培养基a。
- 3、拟胚体诱导培养基b: 将200  $\mu$ L Supplement A (5×), 加至 800  $\mu$ L Embryoid Body Induction formation Basic Medium中, 充分混合, 配制成1 mL拟胚体诱导培养基b。
- 4、内耳类器官诱导培养基c: 将250  $\mu$ L Supplement C (20×), 加至4.75 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium 中, 充分混合, 配制成5 mL内耳类器官诱导培养基c。
- 5、内耳类器官诱导培养基d: 将250  $\mu$ L Supplement D (20×), 加至4.75 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium 中, 充分混合, 配制成5 mL内耳类器官诱导培养基d。
- 6、内耳类器官诱导培养基e: 将50  $\mu$ L Supplement E (20×), 加至0.95 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium 中, 充分混合, 配制成1 mL内耳类器官诱导培养基e。
- 7、内耳类器官诱导培养基f: 将50  $\mu$ L Supplement F (20×), 加至0.95 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium 中, 充分混合, 配制成1 mL内耳类器官诱导培养基f。
- 8、内耳类器官分化培养基g: 将250  $\mu$ L Supplement G (20×), 加至4.75 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Differentiation Basic Medium 中, 充分混合, 配制成5 mL内耳类器官分化培养基g。
- 9、内耳类器官分化培养基h: 将250  $\mu$ L Supplement G (20×), 10  $\mu$ L Supplement H (100×) 加至 4.74 mL Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Differentiation Basic Medium 中, 充分混合, 配制成5mL内耳类器官分化培养基h。

**注意:** 配制后的培养基可在2-8  $^{\circ}$ C储存不超过3天, 建议现配现用。Embryoid Body Induction formation Basic Medium, Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Induction Basic Medium, Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Differentiation Basic Medium 内含有细菌及真菌抗生素。

## hPSC 内耳类器官的诱导培养



提前复苏 hPSC，传代两代以后，即可使用不同阶段内耳类器官诱导培养基依次进行诱导培养，具体步骤如下：

### 1、拟胚体诱导（耗时 2 天）

Day -2:

(1) 当 hPSC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2 mL DPBS 室温清洗一次。

(2) 吸去上清，加入 0.5 mL 预热至室温的 hPSC 传代消化液，转移到 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 1 min 左右。

**注意：**待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化。

(3) 吸去上清，加入等体积的hPSC完全培养基，并使用P-1000吸头轻轻上下吹打细胞，制成单细胞悬液，经台盼蓝染色确定细胞活性并计数。

**注意：**台盼蓝染色活细胞比例在90%以上。

(4) 300 *g*离心3 min收集细胞后，加入拟胚体诱导培养基a重悬细胞至浓度为 $5 \times 10^4$ 个/mL，接种至96孔U底超低吸附板内（5000个细胞，100  $\mu$ L/孔）。在水平孔板离心机内300 *g*离心5 min后细胞聚集成球状。之后将孔板转移到37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育24h。

**注意：**建议接种至孔板中心的30个孔，周围孔补加DPBS，以减少蒸发。一个孔生成一个类器官。

Day -1:

(5) 吸去旧培养基，每孔加入100  $\mu$ L拟胚体诱导培养基b，在37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中继续孵育24 h。此时球体开始出现明显边界。

### 2、内耳谱系诱导

Day 0-3:

(1) 将所有球体吸出至 5 mL EP 管中（使用剪去针尖的 P-1000 吸头），自然沉降，用 PBS 洗两遍，内耳类器官诱导培养基 c 清洗两遍，再用内耳类器官诱导培养基 d 洗一遍，最后按每孔 100  $\mu$ L 的内耳类器官诱导培养基 d，重新接入 96 孔板内（原先的超低吸附板，每孔可用 PBS 清洗一遍），培养 4 天。清洗过后，球体周围碎细胞减少。

**注意：**

1. 将类器官只种在板子的中心孔，周围一圈补加200  $\mu$ L DPBS，以减少中心孔的培养基蒸发；
2. 可定期视情况补加一点培养基，以稳定细胞因子的浓度。

Day 4-7:

(2) 在每孔中加入 25  $\mu$ L 内耳类器官诱导培养基 e，继续培养 4 天。

**注意：**内部产生泡状结构。

Day 8:

(3) 在每孔中加入 25  $\mu$ L 内耳类器官诱导培养基 f，继续培养 4 天。

**注意：**1. 内部观察到耳泡结构；2. 视情况定期补加培养基，以稳定细胞因子的浓度。

### 3、内耳类器官分化及成熟



**Day 12-14:**

(1) 配制新鲜的内耳类器官分化培养基 g，以及额外添加 1% 类器官专用基质胶的内耳类器官分化培养基 h。将每个类器官吸出至 5 mL EP 管内，自然沉降，用 PBS 洗两遍。使用内耳类器官分化培养基 g 继续清洗 2 遍后重新接种至 96 孔板内培养，之后使用内耳类器官分化培养基 h（额外添加 1% 类器官专用基质胶）继续培养 3 天，100  $\mu$ L/孔。

**注意：**此时可观察到耳泡向周围凸起。

**Day 15-17:**

(2) 吸去孔板内培养基，加入新鲜配制的内耳类器官分化培养基 h，继续培养 3 天。

**Day 18-19:**

(3) 吸去孔板内培养基，加入新鲜配制的内耳类器官分化培养基 g，继续培养 2 天。

**Day 20-60:**

(4) 在此期间继续使用内耳类器官分化培养基 g，每 2-3 天更换新鲜配制的内耳类器官分化培养基 g。

**注意：**此阶段耳泡凸起更加明显。随着培养时间延长，耳泡呈现向心性生长模式，类器官整体形态趋于规整，表面更加光滑。

**注意事项**

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。

**论文发表规范引用参考**

Human inner ear organoids were prepared from hPSCs with Plurioid™ Human PSC-Derived Inner Ear Organoid Kit (HiIEO-K100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



## 附录 1 hPSC 内耳类器官构建流程

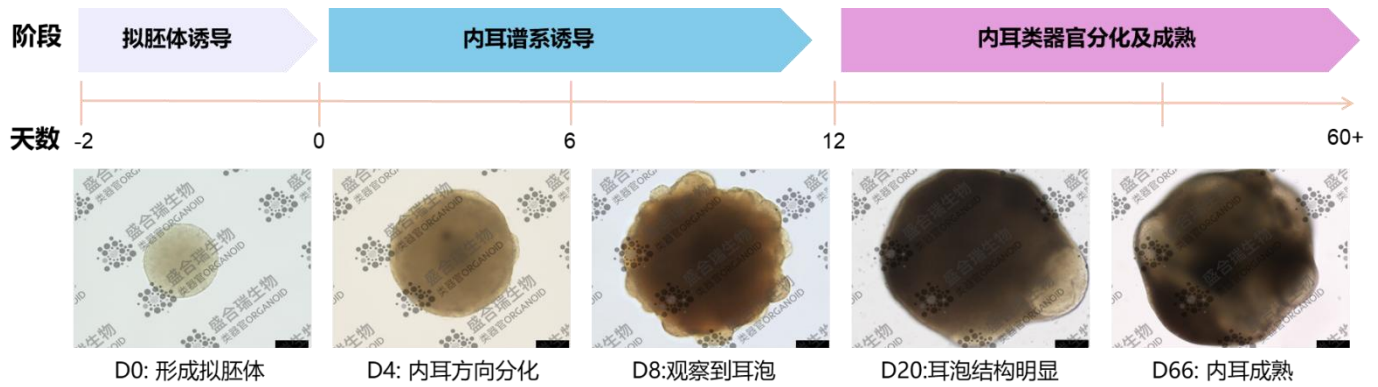


图1 hPSC内耳类器官构建流程图。比例尺：200  $\mu\text{m}$ 。

## 附录2 hPSC内耳类器官鉴定图

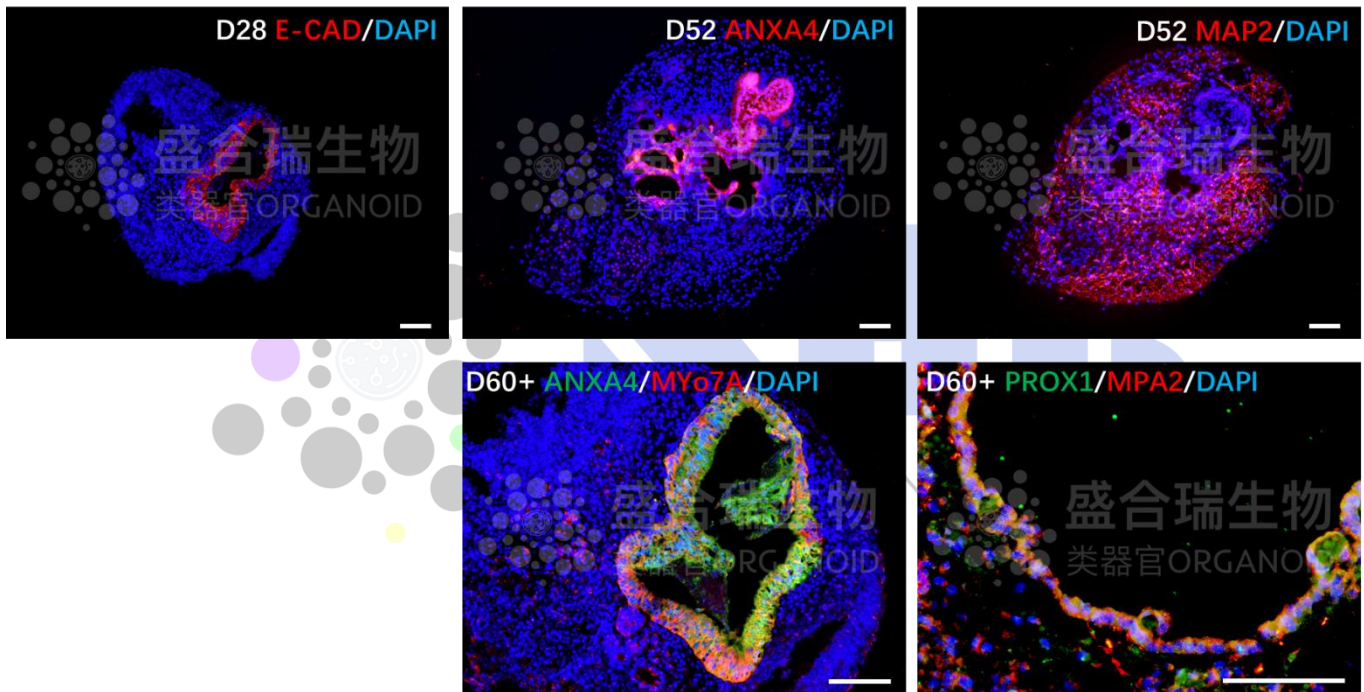


图 2 hPSC 内耳类器官免疫荧光鉴定图

其中 E-CAD 为耳囊阶段标记物，ANXA4、MYO7A 为毛细胞标记物，MAP2、PROX1 为神经元标记物。第 28 天，类器官形成典型耳囊结构，并出现耳前体细胞群；第 52 天，进一步分化出毛细胞及与之突触连接的感觉神经元；第 60 天后，内耳类器官发育形成成熟的毛细胞、听觉神经元等。比例尺：100  $\mu\text{m}$ 。

