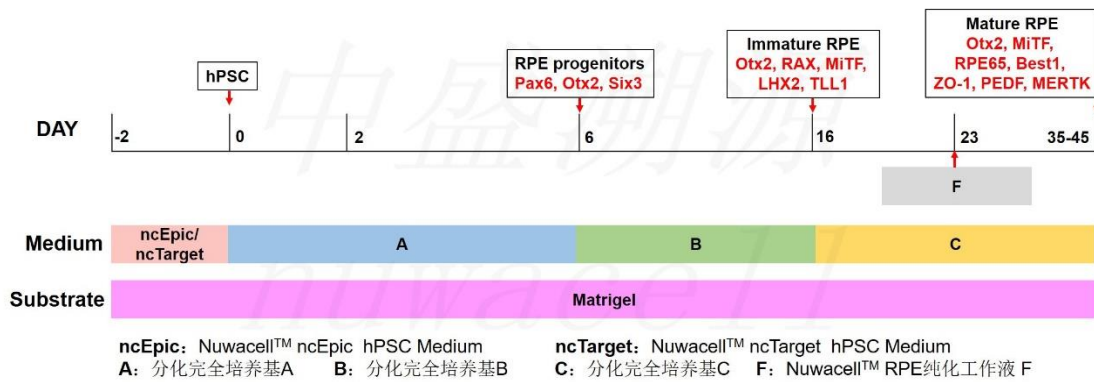


Nuwacell™ hPSC-RPE 分化试剂盒-使用说明 V2

一、产品简介

1.1、产品说明

Nuwacell™ hPSC-RPE 分化试剂盒是中盛溯源生物科技有限公司原研的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 Nuwacell™ 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: Nuwacell™ hPSC-RPE 分化系列产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
Nuwacell™ hPSC-RPE分化试剂盒*	RP01016	1 Kit	基础液 2℃~8℃
Nuwacell™ hPSC-RPE细胞成熟培养基*	RP01016-H	1 Kit	添加剂 -20℃~-80℃
Nuwacell™ hPSC-RPE细胞**	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℃~8℃中存储, 2 周内用完。

** hPSC-RPE 分化至 DAY 23-25 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.)
Nuwacell™ ncEpic hPSC Medium	中盛溯源	RP01001
Nuwacell™ ncTarget hPSC Medium	中盛溯源	RP01020
Nuwacell™ 科研级hiPSC细胞株	中盛溯源	RC01001
Nuwacell™ EDTA传代工作液	中盛溯源	RP01007
Nuwacell™ Blebbistatin	中盛溯源	RP01008
Nuwacell™ hPSC冻存液	中盛溯源	RP01003
Nuwacell™ Solase细胞消化液	中盛溯源	RP01021
Nuwacell™ 0.25%胰蛋白酶消化液	中盛溯源	RP02011
Nuwacell™ 胰蛋白酶抑制剂	中盛溯源	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: Nuwacell™ hPSC-RPE 分化试剂盒产品说明

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

*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 24 孔板的 12 个孔的分化，或者 12 孔板的 6 个孔、6 孔板的 3 个孔。

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

2.1.1. 在 4℃解冻 Nuwacell™ RPE Differentiation Supplement A、B、C，不要在 37℃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 (1x)。

2.1.3. 分化培养基建议现配现用，置于 4℃储存，2 周内使用。

TIPS: 可根据实际用量将 Nuwacell™ 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 (1x)</u>	Nuwacell™ RPE differentiation Supplement A (50x) / B (50x)	1x
	Nuwacell™ RPE differentiation Basal Medium D	
分化完全培养基 <u>C (1x)</u>	Nuwacell™ RPE differentiation Supplement C (50x)	1x
	Nuwacell™ RPE differentiation Basal Medium E	

2.2、hPSC-RPE 分化

- 2.2.1. hPSC 的培养和准备：详见 Nuwacell™ 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 24 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 4×10^4 /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 2×10^4 / 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**, 当 hPSC 细胞生长 2 天后, 启动分化程序, 将 Nuwacell™ hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) 吸除, 随后加入 分化完全培养基 A, 每孔 0.5 mL。每天更换培养基, 培养至 DAY 6 (DAY 0-6)。
- 2.2.4. **DAY 6**, 吸除 分化完全培养基 A, 随后加入 0.5 mL/孔 分化完全培养基 B, 每天更换培养基, 培养至 DAY 16 (DAY6-16)。
- 2.2.5. **DAY 16**, 吸除 分化完全培养基 B, 随后加入 0.5 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 0.5 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 次, 随后加入 0.5 mL Nuwacell™ RPE 纯化工作液 F, 置于 37°C, 5%CO₂ 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 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 0.5 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 1 mL 分化完全培养基 C, 继续培养至 DAY45-50, 3-4 天更换培养基。DAY 45-50 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 0.5 mL/孔 DPBS (不含钙镁) 洗涤 1 次, 随后加入 0.5 mL Nuwacell™ 0.25%胰蛋白酶消化液 置于 37°C, 5%CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 8-10 分钟。当 RPE 细胞脱离培养皿底部时, 每孔加入 0.5 mL Nuwacell™ 胰蛋白酶抑制剂 以终止消化。收集 RPE 细胞于 15mL 离心管中。
- 2.2.10. 细胞悬液 178xg 离心 5 分钟。吸弃上清, 加入适量 Nuwacell™ RPE 冻存液 G 重悬 RPE 细胞并计数, 随后将细胞按 5×10^6 /管的密度进行冻存。

三、hPSC-RPE 细胞复苏与成熟培养

3.1、试剂的准备

表 5: Nuwacell™ hPSC-RPE 细胞培养相关产品体系

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

3.1.1. 在 4℃解冻 Nuwacell™ RPE Differentiation Supplement C，不要在 37℃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×)**。

Nuwacell™ RPE Differentiation Basal Medium E: 98 mL

Nuwacell™ RPE Differentiation Supplement C (50×): 2 mL

3.1.3. 分化培养基建议**现配现用**，置于 4℃储存，2 周内使用。

TIPS: 可根据实际用量将 Nuwacell™ RPE differentiation Supplement C 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

3.2、Nuwacell™ hPSC-RPE 细胞复苏与成熟培养

3.2.1. 将水浴锅预热至 37℃。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℃)。

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

3.2.3. 从液氮罐中取出 1 管冷冻的 **Nuwacell™ hPSC-RPE 细胞**，立即放置于 37℃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 15mL 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，178×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 Nuwacell™ **Blebbistatin + RPE 细胞成熟完全培养基**混匀细胞，尽量避免吹打。

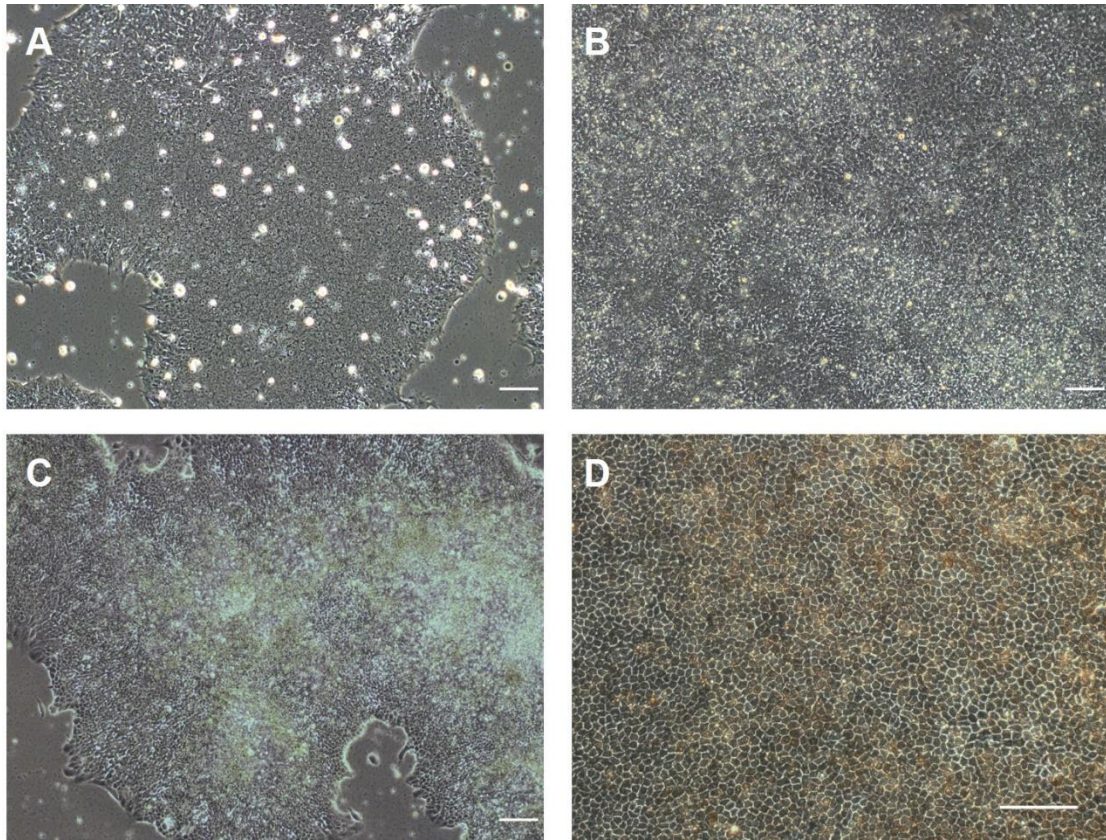
3.2.6. 吸去 6 孔板中的 2 孔 Matrigel 溶液，并按 3mL/孔逐滴将细胞接种到板中。

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

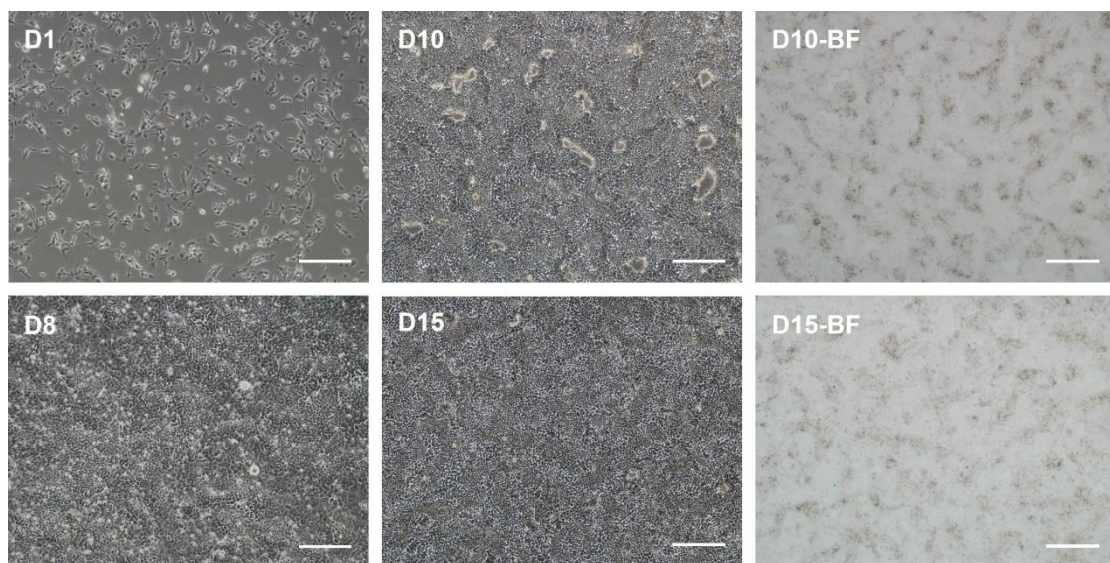
37°C, 5%CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 再次水平十字摇匀三次, 培养。

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 3mL/孔。DAY8 时可见典型 RPE 细胞形态, DAY10 开始可见明显黑色素分泌。



Nuwacell™ hPSC-RPE 分化试剂盒分化过程中细胞形态图示。标尺: 200µm。

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



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

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