MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Liver Organoid Differentiation Kit

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案

艾名医学 AIMINGMED

杭州艾名医学科技有限公司

官网：www.aimingmed.com

地址：浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园10幢南座1层

电话：0571 - 85352695

邮箱：info@aimingmed.com

产品介绍

MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒通过模拟体内肝脏谱系分化微环境，支持人胚胎干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）经2D内胚层诱导并向肝祖细胞分化，保证肝祖细胞类器官与肝类器官的大量获得。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在35天内将10^7个干细胞分化为12个50 uL成熟肝类器官胶滴（约$3*10^3$个肝类器官）。本试剂盒构建的肝脏类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与肝脏功能鉴定，适用于肝脏发育生物学、疾病模型构建、药物筛选与安全性评价等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒包括：肝细胞分化培养基及添加物、肝祖细胞类器官培养基，肝类器官分化培养基及添加物，除MasterAim®肝祖细胞类器官培养基和MasterAim®肝类器官分化完全培养基外，组分不单独售卖。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒	10-100-461	1 盒 （1T）	/
MasterAim®肝细胞分化培养基A-1	100-464	15 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝细胞分化培养基A-2	100-465	30 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝细胞分化培养基B	100-466	50 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝细胞分化培养基C	100-467	50 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝细胞分化培养基D	100-468	40 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝祖细胞类器官培养基	100-469	50 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝类器官分化培养基	100-498	100 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肝类器官分化培养基添加物	100-499	500 µL	-20°C，6个月

需要使用但本试剂盒中不包含的试剂

产品名称	产品号	规格
干细胞培养基	STEMCELL, mTeSR™ Plus/Gibco, StemFlex™	500 mL
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	MasterAim®, 100-184	500 mL
抗粘附液	MasterAim®, 100-291	100 mL

类器官冻存液	MasterAim®, 100-045	100 mL
类器官消化液	MasterAim®, 100-546	100 mL
基质胶	Corning, 356231	10 mL

MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂配置

1. 试剂准备：按说明书使用顺序提前一天将培养基或添加物从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 试剂配制：将**肝类器官分化培养基添加物（#100-499）**与**肝类器官分化培养基（#100-498）**按1：300（v/v）比例混合配置肝类器官分化完全培养基。

注：现配现用，请勿将所有肝类器官分化培养基配置为完全培养基。

3. 试剂分装：**肝祖细胞类器官培养基（#100-469）**、**肝类器官分化培养基（#100-498）**可按照使用量酌情分装。分装后的培养基4℃保质期为2周，-20℃保质期为3个月。请勿使用超期试剂。

4. 抗黏附处理：所有接触类器官的移液管、枪头等耗材均需进行**抗黏附液（#100-291）**润洗，以免在传代过程中出现类器官的流失。

肝类器官构建

一、内胚层分化（D0-D3）

1. 干细胞准备：提前复苏、传代培养hESC或hiPSC（推荐mTeSR™或StemFlex™培养基）。

注：建议使用复苏后稳定传代1~2次以上的干细胞；1次标准分化的干细胞需求约为10^7个或6孔6孔板80%汇合度细胞量。

2. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

3. 分化：每孔加入2 mL 肝细胞分化培养基A-1（#100-464），在细胞培养箱中静置培养1 d。

4. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

5. 分化：每孔加入2 mL 肝细胞分化培养基A-2（#100-465），在细胞培养箱中静置培养2 d。

注：培养第24 h需换液一次。

二、肝系内胚层分化（D3-D18）

1. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。
2. 分化：每孔加入2 mL肝细胞分化培养基B（#100-466），在细胞培养箱中静置培养4 d。**注：**每天需换液一次。
3. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。
4. 分化：每孔加入2 mL肝细胞分化培养基C（#100-467），在细胞培养箱中静置培养4 d。**注：**每天需换液一次。
5. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。
6. 分化：每孔加入2 mL肝细胞分化培养基D（#100-468），在细胞培养箱中静置培养7 d。**注：**培养第3 d及第5 d需换液一次。

三、肝祖细胞类器官构建（D18-D25）

1. 清洗：去除6孔板内细胞培养基，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

2. 收集：每孔加入1 mL肝祖细胞类器官培养基（#100-469），使用移液枪轻轻吹打细胞，直至成为约含10 - 20个细胞的团块。收集细胞团块至15 mL离心管中，200g、离心5 min，完全移除上清液。

3. 计数：用适量预冷的肝祖细胞类器官培养基重悬细胞，调整细胞密度约为$2*10^6$个/mL。

4. 接种：将细胞悬液与基质胶（推荐CORNING，#356231）按1：2（v/v）于冰上混匀后，以50 μL胶滴体积（即$3*10^4$个细胞/胶滴）接种于24孔板或6孔板中。将孔板在细胞培养箱中静置5 min后，翻转倒置并静置25 min待胶滴凝固。

注：本试剂盒一次标准分化流程提供的肝祖细胞类器官培养基最多支持12个胶滴培养容量；多余肝祖细胞可按常规细胞冻存方法进行保存。

5. 培养：胶滴凝固后，24孔板或6孔板每孔分别加入0.8 mL或2 mL肝祖细胞类器官培养基，在细胞培养箱中静置培养7 d。

注：培养第3 d或4 d需换液一次；培养基需提前室温平衡；加培养基时不可直吹胶滴，应沿孔壁缓缓加入。

四、肝祖细胞类器官传代（可选）

1. 清洗：待肝祖细胞类器官生长至直径约80-200 μm时，去除孔板内细胞培养基，每孔用1~2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

2. 消化：每孔加入1~2 mL类器官消化液**（推荐MasterAim®类器官消化液，#100-546）**，用移液器将胶滴吹散后，置于细胞培养箱中消化5 min。

3. 收集：用移液器将肝祖类器官吹打至细胞团块（每个团块约10-30个细胞），转移至离心管中，200g、离心5 min，完全移除上清液。

4. 接种：将细胞沉淀置于冰上预冷，向50 μL胶滴对应细胞量中加入65 μL预冷的肝祖细胞类器官培养基与135 μL基质胶，冰上混匀后按50 μL/孔接种至24孔板或6孔板内（即1：4传代）。将孔板在细胞培养箱中静置5 min后，翻转倒置并静置25 min待胶滴凝固。

5. 培养：胶滴凝固后，24孔板或6孔板每孔分别加入0.8 mL或2 mL肝祖细胞类器官培养基，在细胞培养箱中静置培养7 d。

注：培养第3 d或4 d需换液一次；培养基需提前室温平衡；加培养基时不可直吹胶滴，应沿孔壁缓缓加入。

五、肝类器官分化（D25-D36）

1.清洗：待肝祖细胞类器官生长至平均直径约80-200 μm时，去除孔板内细胞培养基，每孔用1~2 mL DPBS轻轻洗涤并完全移除清洗液。

2. 分化：24孔板或6孔板每孔分别加入0.8 mL或2 mL肝类器官分化培养基（#100-498），在细胞培养箱中静置培养11 d。**注：**每隔2 d需换液一次。

3. 成熟：去除孔板内细胞培养基，24孔板或6孔板每孔分别加入0.8 mL或2 mL肝类器官分化完全培养基，在细胞培养箱中静置培养3 d。

注：每天需换液一次；分化成熟的肝类器官实验窗口期约7-10天，分化完成后需尽快完成下一步实验。

【注意事项】

1.本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

2.本试剂盒仅适用于hPSC细胞衍生的肝类器官的构建。

3. 本试剂盒培养结果会受到培养条件因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。

【常见问题与解决方案】

1. 2D分化阶段失败。

可能与干细胞状态、接种细胞密度、培养基失效等原因有关。建议使用复苏后稳定传代1~2次以上的干细胞，或挑起单克隆后传代的干细胞；细胞汇合度应在70%~90%之间，细胞过少不利于2D分化；使用新鲜的、冻融次数少的分化培养基等。

2. 肝祖细胞类器官生长较慢。

可能与初次3D构建或肝祖细胞类器官解离程度有关。初次3D构建的肝祖类器官生长较慢是正常情况；建议将初次3D构建的肝祖类器官进行传代，稳定传代的肝祖类器官生长较快，传代周期一般为5-7天；肝祖类器官传代时需控制细胞团块大小，即每个团块约10-30个细胞，团块过小会导致肝祖细胞类器官生长较慢。

3. 肝祖细胞类器官扩增期间发生自发分化。

可能与培养基失效等原因有关。使用新鲜配置的肝祖细胞类器官培养基。

4. 成熟肝类器官容易发生黏附现象。

肝类器官易与耗材发生黏附，建议使用抗黏附液事先处理移液管、离心管、吸头等耗材。