MasterAim® hPSC-肠类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Intestinal 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

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-肠类器官分化试剂盒通过模拟体内后肠谱系分化微环境，支持人胚胎干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）经2D途径向肠类器官分化，保证肠祖细胞类器官与肠类器官的大量获得。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在30天内将10^7个干细胞分化为$1*10^3$个成熟肠类器官。经本试剂盒构建的肠类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与细胞功能鉴定，可用于肠发育生物学、肠道疾病模型构建、药物筛选与评价等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-肠类器官分化试剂盒：肠类器官分化培养基及添加物，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-肠类器官分化试剂盒	10-100-780	1 盒 （1T）	-20°C，3个月
MasterAim®肠类器官分化培养基A	100-781	40 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肠类器官分化培养基A添加物	100-782	0.5 mL	-20°C，3个月
MasterAim®肠类器官分化培养基B	100-783	39 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肠类器官分化培养基B添加物	100-784	1 mL	-20°C，3个月
MasterAim®肠类器官分化培养基C	100-785	2*95 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肠类器官分化培养基C添加物1	100-786	2*5 mL	-20°C，3个月
MasterAim®肠类器官分化培养基C添加物2 (1000X)	100-787	0.05 mL	-20°C，3个月

需要使用但本试剂盒中不包含的试

产品名称	产品号	规格
干细胞培养基	STEMCELL®, mTeSR™/Gibco, StemFlex™	500 mL
干细胞消化液	STEMCEL®, ReLeSR™/Gibco, Accutase™	100 mL
基质胶（干细胞培养）	Corning®, 354277	5 mL
基质胶（类器官培养）	Corning®, 356231	10 mL
6孔板/24孔板	Corning®, 3516/3524	/
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

肠类器官构建

1. 定向内胚层诱导（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60~70%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。每孔加入2 mL MasterAim®肠类器官分化培养基A（#100-781），在细胞培养箱中静置培养24 h。

（3）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL新鲜配置的肠类器官分化完全培养基A（MasterAim®肠类器官分化培养基A：**MasterAim®肠类器官分化培养基A添加物（#100-782）**（v/v）=500：1），在细胞培养箱中静置培养24 h。

（4）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL新鲜配置的肠类器官分化完全培养基A（肠类器官分化培养基A：肠类器官分化培养基A添加物（v/v）=50：1），在细胞培养箱中静置培养24 h。

2. 后肠分化（D3~D8）

（1）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL肠类器官分化完全培养基B（将**MasterAim®肠类器官分化培养基B添加物（#100-784）**完全转移至**MasterAim®肠类器官分化培养基B（#100-783）**中），在细胞培养箱中静置培养48 h。

（2）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL肠类器官分化完全培养基B，在细胞培养箱中静置培养48 h。

注：若换液前可见悬浮状3D后肠球出现，可按步骤3进行操作。

（3）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL肠类器官分化完全培养基B，在细胞培养箱中静置培养24 h。

注：分化结束可见大量悬浮状3D后肠球出现。

3. 肠类器官构建（D8~D20）

（1）收集。收集6孔板内悬浮状3D后肠球与细胞培养基至15 mL EP管内，每孔用2 mL DPBS轻轻洗涤，收集洗涤液至另一支15 mL EP管内。

（2）离心。将培养液与洗涤液以200×g、室温离心5 min。

（3）合并。完全去除上清液，分别用2 mL DPBS重悬沉淀后，将沉淀合并至一支EP管内。

（4）离心。将合并液以200×g、室温离心5 min。

（5）接种。完全去除上清液，将EP管置于冰浴中冷却后，加入100 µL预冷的肠类器官分化完全培养基C（将**MasterAim®肠类器官分化培养基C添加物1（#100-786）**完全转移至**MasterAim®肠类器官分化培养基C（#100-785）**中）与200 µL预冷的基质胶（推荐Corning®，Matrigel#356231），冰上混匀后按50 µL/胶滴接种至6孔板或24孔板内。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：若收集到的3D后肠球较多，可适当增加混合基质胶总体积或丢弃；初次接种时密度不宜过大，6孔板每孔接种5~6个胶滴，24孔板每孔接种1个胶滴，每个胶滴含100~200个后肠球为宜。

（6）培养。胶滴凝固后，6孔板每孔加入2.5 mL或24孔板每孔加入0.6 mL肠类器官分化完全培养基C，在细胞培养箱中静置培养12天，期间每隔2天换液一次。

注：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；类器官生长至直径为0.5-2.0 mm时，需进行传代（步骤4）、冻存（步骤5）或分化（步骤7）。

4. 肠类器官传代（可选）

（1）收集。待类器官生长至直径为0.5-2.0 mm时，去除孔板内细胞培养基，每孔加入1 mL预冷的抗黏附液，用移液器吸头轻轻分离类器官与基质胶，将类器官转移至细胞培养皿内。

（2）分割。在体式镜或显微镜下，使用1 mL注射器吸头或无菌刀片切割类器官，至裂解为直径为0.1~0.4 mm的碎片（或按1：3~6比例分割）。

（3）收集。向平皿中加入1 mL预冷的抗黏附液，收集类器官碎片至1.5 mL EP管中。

（4）接种。取将30-50个肠类器官碎片，与15 μL预冷的**肠类器官分化完全培养基C**、35 μL预冷的基质胶于冰上混匀后，接种至6孔板或24孔板内，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，6孔板每孔加入2.5 mL或24孔板每孔加入0.6 mL**肠类器官分化完全培养基C**，在细胞培养箱中静置培养。

注：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；每隔2天换液一次。

5. 肠类器官冻存（可选）

（1）收集。待类器官生长至直径为0.5-2.0 mm时，去除孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL预冷的抗黏附液，用移液器轻轻吹散胶滴并收集至15 mL离心管内。

（2）离心。将收集液以200×g、室温离心5 min。

（3）清洗。去除残胶与上清液，加入2 mL预冷的抗黏附液，用移液器轻轻重悬沉淀。

（4） 离心。将重悬液以200×g、室温离心5 min。

（5）冻存。去除残胶与上清液，按100-200个类器官碎片对应1 mL冻存液比例，吹打均匀后分装至冻存管中。将冻存管置于梯度降温盒中，置于-80℃冰箱中，后置于液氮中长期保存。

6. 肠类器官复苏（可选）

（1）复苏。将冻存管置于37℃水域中快速晃动，待内容物完全融解后，以200×g、室温离心5 min。

（2）清洗。去除冻存液，加入1 mL抗黏附液，用移液器轻轻重悬沉淀。

（3） 离心。将重悬液以200×g、室温离心5 min。

（4）接种。同步骤3.（5）~（6）。

7. 肠类器官成熟（D20~D30）

（1）分化。待类器官生长至直径为0.5-2.0 mm时，去除孔板内细胞培养基，6孔板每孔加入2.5 mL或24孔板每孔加入0.6 mL新鲜配置的**肠类器官分化成熟培养基C**（MasterAim®肠类器官分化完全培养基C：**MasterAim®肠类器官分化培养基C添加物2（#100-787）**（v/v）=1000：1），在细胞培养箱中静置培养10天，期间每隔2天换液一次。

注：肠类器官分化成熟培养基C需提现配现用；加培养基时不可直吹胶滴，应沿孔壁缓缓加入。注：1次标准分化最多支持24个50 μL胶滴分化成熟；成熟的肠类器官不可传代与冻存。

【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hESC或hiPSC细胞衍生的肠类器官构建。

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. 后肠球形成失败

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；干细胞分化开始密度为50%~70%，密度过低或过高不利于后肠球形成；使用有效期内的肠类器官分化培养基A与B等。

2. 肠类器官不增殖或增殖过慢

可能与培养基失效等原因有关。使用有效期内新鲜配置的肠类器官分化完全培养基C；肠类器官分化成熟培养基C须现用现配，不可提前配置或存放过长时间；

3. 肠类器官自发成熟

可能与后肠球过度分化等原因有关。建议将第二次肠类器官分化完全培养基B诱导时间缩短至24 h；尽量收集第一、二次肠类器官分化完全培养基B诱导形成的后肠球。