MasterAim® hPSC-肺类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Lung 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-肺类器官分化试剂盒通过模拟体内前肠谱系分化微环境，支持人胚胎干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）经2D途径向全肺类器官分化，保证肺类器官的大量获得。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在36天内将10^7个干细胞分化为100个成熟肺类器官。经本试剂盒构建的肺类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与细胞功能鉴定，可用于肺脏发育生物学、呼吸道疾病模型构建、药物筛选与评价等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-肺类器官分化试剂盒：肺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-肺类器官分化试剂盒	10-100-788	1 盒 （1T）	-20°C，6个月
MasterAim®肺类器官分化培养基A	100-789	40 mL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®肺类器官分化培养基A添加物	100-790	0.5 mL	-20°C，6个月
MasterAim®肺类器官分化培养基B	100-791	39 mL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®肺类器官分化培养基B添加物	100-792	1 mL	-20°C，6个月
MasterAim®肺类器官分化培养基C	100-793	2*95 mL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®肺类器官分化培养基C添加物	100-794	2*5 mL	-20°C，6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

肺类器官构建

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107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®肺类器官分化培养基A（#100-789），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**肺类器官分化完全培养基A**（MasterAim®肺类器官分化培养基A：**MasterAim®肺类器官分化培养基A添加物（#100-790）**（v/v）=**50：1**），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**肺类器官分化完全培养基A**（肺类器官分化培养基A：肺类器官分化培养基A添加物（v/v）=**50：1**），在细胞培养箱中静置培养24 h。

2. 前肠分化（D3~D8）

（1）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL**肺类器官分化完全培养基B**（将**MasterAim®肺类器官分化培养基B添加物（#100-792）**完全转移至**MasterAim®肺类器官分化培养基B（#100-791）**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**肺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前肠球出现，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**肺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前肠球出现。

3. 肺类器官构建（D8~D36）

（1）收集。收集6孔板内悬浮状3D前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100×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100×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，用无菌剪刀将0.2 mL移液器吸头尖端5 mm处剪断，加入200 μL预冷的**肺类器官分化完全培养基C**（将**MasterAim®肺类器官分化培养基C添加物（#100-794）**完全转移至**MasterAim®肺类器官分化培养基C（#100-793）**中）与400 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前肠球较多，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20~50个前肠球为宜。

（6）培养。胶滴凝固后，6孔板每孔加入3 mL或24孔板每孔加入0.8 mL**肺类器官分化完全培养基C**，在细胞培养箱中静置培养28天，期间每隔3~4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；初次接种前肠球密度过大或肺类器官生长至直径为1.0-2.0 mm时，

需进行胶滴重塑；肺类器官可长期培养（不超过80天），长期培养时每2-3周需至少进行一次胶滴重塑；肺类器官不可冻存与传代。

4.肺类器官胶滴重塑

（1）收集。待肺类器官生长至直径为1.0-2.0 mm或长期培养需胶滴重塑时，去除孔板内细胞培养基，用无菌剪刀将1 mL移液器吸头尖端5 mm处剪断，小心刮擦胶滴底部，并将完整胶滴转移至细胞培养皿中。

注：尽量不要破类器官结构。

（2）分割。在体式镜或显微镜下，用无菌刀片或注射器针头将旧基质胶切除，收集完整的单个类器官待用。

（3）接种。将预冷的肺类器官分化完全培养基C与基质胶按1：2（v/v）比例在冰上混匀后，按50 μL/胶滴接种至6孔板或24孔板内。用无菌剪刀将0.2 mL移液器吸头尖端5 mm处剪断，吸取1~3个完整类器官并将其插入胶滴，或用注射器针头挑取1~3个完整类器官并将其插入胶滴。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：操作过程应迅速，谨防胶滴凝固无法插入；1个胶滴最多插入3个直径不超过3 mm类器官；1次标准分化最多支持35个胶滴或100个肺类器官长期培养。

（4）培养。胶滴凝固后，6孔板每孔加入3 mL或24孔板每孔加入0.8 mL肺类器官分化完全培养基C，在细胞培养箱中静置培养，期间每隔3~4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。

【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细胞衍生的肺类器官构建。

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. 前肠球形成失败

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前肠球形成；使用有效期内的肺类器官分化培养基A与B等。

2. 肺类器官不增殖或增殖过慢

可能与培养基失效或接种密度过大等原因有关。使用有效期内新鲜配置的肺类器官分化完全培养基C；初次接种前肠球密度不可过大；肺类器官在培养前期增殖较快，中后期增殖较慢。