MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒V2.0（悬浮法）

MasterAim® hPSC-Hepatocyte Organoid Differentiation Kit
Version 2.0（Suspension Culture）

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2.0（悬浮法）通过模拟体内肝脏谱系分化微环境，诱导人胚胎干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）依次向定型内胚层、肝系内胚层、肝内胚层类器官与成熟肝细胞类器官分化。本试剂盒操作便捷，无需拟胚体形成、胶滴培养与抗黏附处理等步骤，一次标准的分化流程支持$1*10^7$个干细胞在28~30天收获$1*10^3$个成熟肝类器官，支持肝内胚层类器官长期传代培养与冻存。经本试剂盒构建的肝类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与细胞功能鉴定，可用于肝脏发育生物学、疾病模型构建、药物筛选、药理毒理、药物代谢等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒2.0（悬浮法）：肝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-肝类器官分化试剂盒2.0（悬浮法）	10-100-834	1 盒（300 mL）	-20°C，9个月
MasterAim®肝类器官分化培养基A	100-835	19 mL	混合前：-20°C，9个月 混合后：-20°C，6个月；4°C，1个月
MasterAim®肝类器官分化培养基A添加物	100-836	1 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基B	100-837	39 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基B添加物	100-838	1 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基C	100-839	39 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基C添加物	100-840	1 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基D	100-841	90 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基D添加物	100-842	10 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基E	100-843	90 mL	
MasterAim®肝类器官分化培养基E添加物	100-844	10 mL	

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™/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
6孔板	Corning®, 3516	/
超低吸附6孔板	Corning®, 3471	/
MasterAim®Express 酶	MasterAim®, 100-546	100 mL
MasterAim®类器官冻存液	MasterAim®, 100-045	100 mL
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	MasterAim®, 100-184	500 mL

操作步骤

1. 定向内胚层诱导与肝系内胚层分化（D0-D9）

（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，需单独购买**）。

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1*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肝类器官分化完全培养基A（将MasterAim®肝类器官分化培养基A添加物（#100-836）完全转移至MasterAim®肝类器官分化培养基A（#100-835）中），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肝类器官分化完全培养基B（将MasterAim®肝类器官分化培养基B添加物（#100-838）完全转移至MasterAim®肝类器官分化培养基B（#100-837）中），在细胞培养箱中静置培养96 h，每24 h换液一次。

注：细胞易脱落，换液时勿直吹细胞，应沿壁缓慢加入分化液。

（4）换液。去除6孔板内细胞培养基，每孔加入2 mL肝类器官分化完全培养基C（将MasterAim®肝类器官分化培养基C添加物（#100-840）完全转移至MasterAim®肝类器官分化培养基C（#100-839）中），在细胞培养箱中静置培养96 h，每24 h换液一次。

注：细胞易脱落，换液时勿直吹细胞，应沿壁缓慢加入分化液。

2. 肝内胚层类器官构建（D9-D24）

（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。

注：细胞易脱落，换液时勿直吹细胞，应沿壁缓慢加入分化液。

（2）消化。每孔加入1 mL MasterAim®Express 酶消化液（**#100-546，需单独购买**），轻轻晃动液体至覆盖皿底，37℃放置3~5 min，待细胞完全脱落。

注：若细胞未完全解离，可适当增加消化时间。

（3）离心。每孔加入2 mL肝类器官分化完全培养基D（将MasterAim®肝类器官分化培养基D添加物（#100-842）完全转移至MasterAim®肝类器官分化培养基D（#100-841）中），将消化好的细胞完全转移至50 mL离心管中，300×g、室温离心3 min。

（4）计数。完全移除上清液，用3~5 mL肝类器官分化完全培养基D 轻轻吹打沉淀至单细胞悬液并计数。用肝类器官分化完全培养基D 调整细胞密度至2*10^4个/mL。

注：总体积应不多于12 mL；多余细胞可常规冻存待后续使用。

（5）接种。向超低吸附6孔板（**推荐Corning，#3471，需单独购买**）中每孔接种2 mL细胞悬液，轻轻晃动培养皿待细胞分散均匀后，在细胞培养箱中静置培养15 d，每2~3 d换液一次。

注：1次标准分化最多支持6孔6孔板体量；换液时可将用移液管将类器官收集至15 mL离心管中，300×g、室温离心3 min，去除上清液后，用肝类器官分化完全培养基D 轻轻重悬沉淀并转移至原孔板中即可。

3. 肝内胚层类器官扩增（可选）

（1）离心。待类器官平均直径为150~200 μm时，将类器官收集至15 mL离心管中，300×g、室温离心3 min，完全移除上清液。

（2）消化。加入2 mL MasterAim®Express 酶消化液（**#100-546，需单独购买**）轻轻重悬沉淀，室温放置3~5 min，待类器官可吹打为细胞团块即可。

注：需控制消化时间，不可过分消化为单细胞；

（3）离心。加入4 mL肝类器官分化完全培养基D 中止消化，300×g、室温离心3 min，完全移除上清液；

（4）接种。向超低吸附6孔板中每孔接种2 mL细胞悬液，轻轻晃动培养皿待细胞分散均匀后，在细胞培养箱中静置培养，每2~3 d换液一次。

4. 肝内胚层类器官冻存（可选）

（1）离心。待类器官平均直径为50~100 μm时，将类器官收集至15 mL离心管中，300×g、室温离心3 min，完全移除上清液。

（2）冻存。按200~500个类器官/mL比例，加入适量MasterAim®类器官冻存液（**#100-045，需单独购买**）轻轻重悬沉淀，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。

5. 肝类器官分化与成熟（D24-D30）

（1）离心。待6孔板中类器官平均直径为150~200 μm时，将类器官收集至15 mL离心管中，300×g、室温离心3 min，完全移除上清液。

（2）接种。加入12 mL肝类器官分化完全培养基E（将MasterAim®肝类器官分化培养基E添加物（#100-844）完全转移至MasterAim®肝类器官分化培养基E（#100-843）中）轻轻重悬沉淀，向超低吸附6孔板中每孔接种2 mL类器官悬液，轻轻晃动培养皿待类器官分散均匀后，在细胞培养箱中静置培养6 d，每2 d换液一次。

注：换液时可将培养板稍稍倾斜，利用重力将类器官聚集在孔板底部，再移除上清即可。

【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细胞衍生的肝类器官构建。

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。