MasterAim®hPSC-肾类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Kidney 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-肾类器官分化试剂盒通过模拟体内肾脏谱系分化微环境，支持人全能干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）经拟胚体（EB）途径向肾类器官分化。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在14天内将10^7个干细胞分化为$3*10^3$个具有肾小球与肾小管结构的肾类器官。经本试剂盒构建的肾类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与肾脏功能鉴定，可用于肾脏发育生物学、肾疾病模型构建、药物筛选与评价等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-肾类器官分化试剂盒：肾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-肾类器官分化试剂盒	10-100-455	1 盒（5T）	
MasterAim®肾类器官分化培养基A	100-458	50 mL	-20°C，3个月；4°C，2周
MasterAim®肾类器官分化培养基A添加物1(100X)	100-459	0.5 mL	-20°C，6个月；4°C，3个月
MasterAim®肾类器官分化培养基A添加物2(1000X)	100-731	0.05 mL	-20°C，6个月；4°C，3个月
MasterAim®肾类器官分化培养基B	100-460	5*50 mL	-20°C，3个月；4°C，2周

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
干细胞消化液	STEMCEL, ReLeSR™/Gibco, Accutase™	100 mL
干细胞培养贴壁基质	STEMCELL, Vitronectin XF™	2 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
AggreWell™400孔板	STEMCELL, 34411/34415	1 Unit/5 Units
超低吸附6孔板	Corning, 3471	/

MasterAim® hPSC-肾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：将肾类器官分化培养基A添加物1、添加物2全部转移到肾类器官分化培养基A中，混合均匀，即为肾类器官分化完全培养基A。

3. 试剂分装：肾类器官分化完全培养基A或肾类器官分化培养基B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。

肾类器官构建

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. 消化：每孔加入0.5 mL干细胞消化液（推荐使用ReLeSR™或Accutase™解离液），轻轻晃动至消化液完全覆盖孔板底部。室温放置4 min后完全移除消化液，继续放置2 - 4 min至细胞完全脱落。

4. 收集：每孔加入2 mL提前配置好的**肾类器官分化完全培养基A**，并将消化好的细胞完全转移至15 mL离心管中。

5. 计数：将细胞重悬至单细胞悬液，用**肾类器官分化完全培养基A**调整细胞密度至合适密度待用。

注：总体积应不超过10 mL。

6. 拟胚体（EB）诱导：**方法1：**向超低吸附6孔板（推荐使用CORNING #3471）中每孔接种150 w细胞，每孔培养体系为3 mL，轻轻混匀后在37℃细胞培养箱中静置培养48 h；**方法2：**向24孔拟胚体培养板（推荐使用STEMCELL AggreWell™400）中每孔接种1 mL细胞悬液（即每方格约800个细胞，每孔可形成1200个EB），轻轻混匀并确保方格中的细胞数量均等后，100g、常温离心3 min，在37℃细胞培养箱中静置培养48 h。

注：使用拟胚体培养板可获得数量可控且大小均一的EB。

7. EB收集：收集超低吸附6孔板或24孔拟胚体培养板中的EB，连同培养基全部转移至15 mL离心管中。将EP管竖直静置数分钟，待EB自然沉降至管底后，小心去除培养基。

8. 清洗：用2 mL DPBS轻轻洗涤EB。将EP管竖直静置数分钟，待EB自然沉降至管底后，小心去除洗涤液。

9. 肾类器官分化：用**肾类器官分化培养基B**将EB重悬，按1000~2000个EB/2 mL/孔接种至超低吸附6孔板中，轻轻晃动培养皿待EB分散均匀后，在37℃细胞培养箱中静置培养8 d，每2 d换液一次。

注：本试剂盒一次标准分化流程提供的50 mL分化培养基B最多支持3孔6孔板培养容量；接种初期可能会发生EB融合现象，尽量保证EB分散均匀可减少EB融合；换液方法同步骤7~9。

10. 肾类器官成熟：将分化第8天的肾类器官换液后置于摇床上，100 rpm转速在37℃细胞培养箱中继续培养6 d，每2 d换液一次。

注：换液方法同步骤7~9；分化成熟的肾类器官应在7 d内进行后续实验，避免类器官老化与凋亡。

【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.本试剂盒适用于hPSC细胞衍生的肾类器官的构建。

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. EB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，或经单克隆挑选后传代的干细胞；干细胞在AggreWell™400中推荐接种密度为600~1000个/方格，细胞过少不利于大尺寸EB形成；使用新鲜配置的类器官分化培养基A等。

2. EB大小不均匀

可能与细胞解离程度、接种均匀度等原因有关。建议将解离后干细胞彻底重悬为单细胞悬液，避免细胞团块产生；接种时避免细胞密度不均一；EB形成过程中不要移动拟胚体培养板，防止EB移位融合；已经形成的EB要在孔板中分散均匀，尽量避免聚集融合等。

3. 肾类器官形成失败

可能与培养基失效等原因有关。使用新鲜配置的类器官分化培养基B等。

4. 肾类器官丢失

可能与换液时吸头误将类器官吸出等原因有关。建议每次换液时避免将类器官吸出；换液时动作要轻柔，避免破坏类器官等。