MasterAim®hPSC-血管类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Blood Vessel 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-血管类器官分化试剂盒通过模拟体内血管谱系分化微环境，支持人胚胎干细胞（hESC）或人可诱导多能干细胞（hiPSC）经拟胚体（EBs）途径向血管类器官分化，保证血管类器官的大量获得。本试剂盒操作便捷，一次标准的分化流程能够在17天内将$5*10^6$个干细胞分化为至少200个成熟血管类器官。经本试剂盒构建的血管类器官，经过严格的形态学、组织学、分子生物学与细胞功能鉴定，可用于血管发育生物学、血管化类器官构建、药物筛选与评价等研究。

产品信息

MasterAim®hPSC-血管类器官分化试剂盒：血管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-血管类器官分化试剂盒	10-100-845	1 盒	-20°C，6个月；
MasterAim®拟胚体形成培养基	100-846	20 mL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®血管类器官分化培养基A	100-847	50 mL*2	-20°C，6个月；
MasterAim®血管类器官分化培养基B	100-848	100 mL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®血管类器官分化培养基添加物1	100-849	300 µL	-20°C，6个月；
MasterAim®血管类器官分化培养基添加物2	100-850	60 µL	-20°C，6个月；4°C，2周
MasterAim®血管类器官分化培养基添加物3	100-851	300 µL	-20°C，6个月；
MasterAim®细胞外基质组分A	100-852	1 mL	-20°C，6个月；4°C，1个月
MasterAim®细胞外基质组分B	100-853	2 mL	-20°C，6个月；4°C，1个月
MasterAim®细胞外基质组分C	100-854	3 mL	-20°C，6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	推荐品牌与货号	规格
干细胞培养基	STEMCELL®, mTeSR™/Gibco, StemFlex™	500 mL
干细胞消化液	STEMCEL®, GCDR	100 mL
基质胶（干细胞培养）	Corning®, 354277	5 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 24孔板	STEMCELL®, 34411	/
超低吸附6孔板/96孔板	Corning®, 3471/3474	/
12孔板	Corning®, 3513	/

试剂准备

1. 血管类器官分化培养基A-1配置

1）试剂准备：提前一天将 **MasterAim®血管类器官分化培养基A（#100-847）**和 **MasterAim®血管类器官分化培养基添加物1（#100-849）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2）培养基配制：将50 mL MasterAim®血管类器官分化培养基A与300 µL MasterAim®血管类器官分化培养基添加物1全部混合，即为血管类器官分化培养基 A-1。

2. 血管类器官分化培养基A-2配置

1）试剂准备：提前一天将 **MasterAim®血管类器官分化培养基A（#100-847）**和 **MasterAim®血管类器官分化培养基添加物2（#100-850）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2）培养基配制：将50 mL MasterAim®血管类器官分化培养基A与60 µL MasterAim®血管类器官分化培养基添加物2全部混合，即为血管类器官分化培养基 A-2。

3. 血管类器官分化培养基B配置

1）试剂准备：提前一天将 **MasterAim®血管类器官分化培养基B（#100-848）**和 **MasterAim®血管类器官分化培养基添加物3（#100-851）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2）培养基配制：将100 mL MasterAim®血管类器官分化培养基B与300 µL MasterAim®血管类器官分化培养基添加物3全部混合，即为血管类器官分化培养基 B。

4. 细胞外基质ECM混合液配置

1）试剂准备：提前一天将 **MasterAim®细胞外基质组分A（#100-852）**、**MasterAim®细胞外基质组分B（#100-853）**和**MasterAim®细胞外基质组分C（#100-854）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2）细胞外基质ECM混合液配置：将MasterAim®细胞外基质组分A、MasterAim®细胞外基质组分B和MasterAim®细胞外基质组分C按照1:2:3（v/v）比例完全混合即为细胞外基质ECM混合液（冰上操作，抽吸时注意不要产生气泡）。

血管类器官构建

拟胚体诱导（D0-D1）

（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$5*10^6$个或3孔6孔板70%~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1 mL干细胞解离液（推荐常温GCDR），轻轻晃动至消化液完全覆盖孔板底部。37℃孵育6 min后完全移除消化液。

（4）收集。每孔加入2 mL室温复温的MasterAim®拟胚体形成培养基，使用巴氏吸管吹打细胞3-5次后将细胞完全转移至10 mL离心管中。250g，常温离心3 min。弃上清，收集细胞沉淀。

（5）计数。向离心管中加入2 mL MasterAim®拟胚体形成培养基，将细胞沉淀重悬至单细胞悬液，计数备用。

（6）EB形成。

方法1：向超低吸附6孔板（推荐使用CORNING #3471）中每孔接种80w-120w细胞量，每孔加入2.5 mL MasterAim®拟胚体形成培养基，轻轻混匀后在37℃细胞培养箱中静置培养24 h；

注：细胞接种量可根据细胞状态进行适当调整，细胞接种后24小时可观察到50-80 μm直径的拟胚体形成，若接种细胞量偏低，可能导致EB直径过小，影响后续分化及类器官构建效率。若接种细胞量过高，易出现细胞大量吸附聚集成团的情况，不利于均一化的 EB 形成。

方法2：向24孔拟胚体培养板（推荐使用STEMCELL AggreWell™400）中每孔接种32w-40w细胞量，每孔加入2 mL MasterAim®拟胚体形成培养基，轻轻混匀后在37℃细胞培养箱中静置培养24 h；

注：使用拟胚体培养板可获得数量可控且大小均一的EB。

2. 中胚层诱导（D1~D4）

（1）收集。培养24小时后，小心去除培养基，若EB直径低于50 μm，则等到接种后48小时小心去除培养基。

（2）培养。向每孔中加入3 mL新鲜配置的血管类器官分化培养基A-1重悬EB，轻轻混匀后在37℃细胞培养箱中摇床培养，每隔一天进行换液。

注：培养期间确保EB处于均匀分散状态，根据实际类器官数量可以进行分孔培养，每孔类器官数量约为150个。

3. 血管谱系分化（D4~D7）

（1）收集。培养72小时后，小心去除培养基。

（2）培养。向每孔中加入3 mL新鲜配置的血管类器官分化培养基A-2重悬细胞球，轻轻混匀后在37℃细胞培养箱中摇床培养3天，每隔一天进行换液。

注：培养期间确保EB处于均匀分散状态。

4. 血管网诱导（D7~D9）

（1）包被。向6孔板每孔中加入1 mL预冷的细胞外基质ECM混合液，轻轻摇晃至均匀覆盖皿底后，在37℃细胞培养箱中静置2 h，待ECM凝固。

注：避免在ECM中产生气泡；1次标准分化包被3个孔即可。

（2）收集。收集24孔板中的细胞球，连同培养基全部转移至10 mL离心管中。将离心管竖直静置数分钟，待细胞球自然沉降至管底后，小心去除培养基。

（3）清洗。用4 mL 血管类器官分化培养基B 轻轻洗涤EB。将离心管竖直静置数分钟，待细胞球自然沉降至管底后，小心去除洗涤液并置于冰上冷却。

（4）接种。使用3 mL预冷的细胞外基质ECM混合液重悬细胞球，均匀接种（推荐密度：50-80个血管类器官/mL）至已包被6孔板的ECM层之

上后，在37℃细胞培养箱中静置1 h，待上层ECM凝固。

注：避免在ECM中产生气泡。

（5）培养。上层ECM凝固后，每孔加入2 mL 37℃预热的血管类器官分化培养基B，在37℃细胞培养箱中静置培养，1-2天后可观察到出芽血管类器官出现。

注：加培养基时不可直吹ECM，应沿孔壁缓缓加入。

5. 血管类器官成熟（D9~D16）

（1）分离。ECM包被培养48小时后，小心吸除ECM上层培养基，使用预冷DPBS轻轻将基质胶吹散。将孔内所有液体转移至50 mL离心管中，加入20 mL预冷DPBS，使用巴氏吸管轻柔吹打以清除ECM残留。

注：不要破坏血管类器官结构。

（2）培养。使用宽口枪头吸取单个血管类器官转移至超低吸附96孔板（推荐使用CORNING #3474）进行培养，每孔中加入150 μL血管类器官分化培养基B，在37℃细胞培养箱中静置培养，每隔一天进行换液。

【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hESC或hiPSC细胞衍生的血管类器官构建。

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. 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600~1200个/方格；使用新鲜配置的血管类器官分化完全培养基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. 血管谱系分化过程中细胞球破碎

可能与收集方式等原因有关。细胞球在中胚层诱导与血管谱系分化期间增长迅速，建议使用剪口的1 mL吸头或无菌巴氏吸管转移细胞球；转移过程中需小心，勿猛烈吹打。

3.血管网分离或血管类器官成熟失败

可能与破坏血管网结构、ECM残留过多等原因有关。尽量在体式镜或显微镜下，用无菌刀片或1 mL注射器吸头完整剥离单个血管网；剥离过程尽量不要破坏血管网结构，并尽可能去除多余ECM。