



MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒

MasterAim® hPSC-Liver 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-肝类器官分化体系模拟了细胞体内生长的微环境，支持人多能干细胞（hPSC）向肝祖细胞类器官分化；构建成功的肝祖细胞类器官可进行冻存、扩增及下游分化，同时广泛适用于肝毒性检测、功能性验证等下游应用。MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒适用于hPSC培养、定向内胚层分化、肝祖细胞类器官分化、培养和扩增，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

产品信息

MasterAim®hPSC-肝类器官分化试剂盒包括：多能干细胞培养基及添加物、肝细胞分化培养基及添加物、肝祖细胞类器官培养基，肝类器官分化培养基及添加物，除MasterAim®肝祖细胞类器官培养基和MasterAim®肝类器官分化完全培养基外，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	10-100-461	1 盒	/
MasterAim®多能干细胞基础培养基	100-462	80 mL	4°C, 6个月
MasterAim®多能干细胞培养基添加物	100-463	20 mL	-20°C, 6个月
MasterAim®肝细胞分化培养基A-1	100-464	20 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝细胞分化培养基A-2	100-465	30 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝细胞分化培养基B	100-466	50 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝细胞分化培养基C	100-467	50 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝细胞分化培养基D	100-468	50 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝祖细胞类器官培养基	100-469	100 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝类器官分化培养基	100-498	100 mL	-20°C, 3个月; 4°C, 2周
MasterAim®肝类器官分化培养基添加物	100-499	500 µL	-20°C, 6个月

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	储存温度&质保期
DMEM: F12培养基	100-151	500 mL	2-8°C, 12个月
DPBS平衡盐溶液 (无钙镁, 无酚红)	100-184	500 mL	AMB, 24个月
MasterAim®抗粘附液	100-291	100 mL	4°C, 12个月

无血清干细胞专用冻存液	100-272	100 mL	2-8°C, 12个月
MasterAim®类器官冻存液	100-045	100 mL	4°C, 12个月
MasterAim®团块解离消化液	100-358	50 mL	4-°C, 12个月
ROCK抑制剂	/	/	/
TrypLE	/	/	/
基质胶	CORNING 354277	/	参见该产品说明书
基质胶 (Matrigel)	/	/	/

使用说明

一、多能干细胞复苏

- 1.试剂准备：提前将MasterAim®多能干细胞培养基添加物(#100-463)和基质胶 (354277) 于冰箱内4°C解冻过夜。
- 2.完全培养基配置：将MasterAim®多能干细胞培养基添加物(#100-463)全部转移至MasterAim®多能干细胞培养基(#100-462)中，混合均匀，即为多能干细胞完全培养基。
- 3.培养板包被：将基质胶 (354277) 和DMEM: F12 (#100-151) 按照5: 95的体积比混合配制成5%基质胶 (冰上放置)，取出6孔板，每孔内加入1.5 mL预冷的5%基质胶，轻轻晃动6孔板至基质胶完全覆盖皿底，置于37°C培养箱中孵育30 min以上；待形成基层膜后，将6孔板中的包被液弃掉。
- 4.解冻：将细胞冻存管从液氮中取出，放入细胞复苏仪，等待复苏仪程序结束；或使用恒温水浴法复苏：将冻存管于37°C恒温水浴中，并左右轻晃冻存管至少量细胞还处于冻存结晶状态，立即取出。
- 5.细胞收集：取15 mL离心管一支，加入用5 mL 37°C的DMEM: F12，使用1 mL移液枪头将冻存管中的细胞悬液缓慢转移至含有5 mL DMEM: F12 (37°C) 的15 mL的离心管中，室温下200 g，离心5 min，弃上清液。
- 6.接种：将离心沉淀重悬于12 mL多能干细胞完全培养基中，并加入ROCK抑制剂(终浓度为5μM)，平均接种至包被过基质胶的6孔板中，轻轻摇匀，并在37°C和5%CO₂下进行培养 (24 h内请勿移动)，建议每2天进行全换液，每次2 mL (无需添加ROCK抑制剂)。

二、多能干细胞传代

- 1.细胞计数：当细胞汇合度达到80%后，即可进行细胞传代，根据细胞密度进行传代，接种比例可为1:6至1:10，即1个孔中的细胞传至6-10个孔中。
- 2.培养板包被：取出6孔板，每孔内加入1.5 mL预冷的5%基质胶 (将基质胶 (354277) 和DMEM: F12按照5: 95的体积比混合)，轻轻晃动6孔板至基质胶完全覆盖皿底，置于37°C培养箱中孵育30 min以上；待形成基层膜后，将6孔板中的包被液弃掉。
- 3.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除培养基，每孔加2 mL DPBS-PS (#100-184) 清洗，去除清洗液。
- 4.消化：每孔加入1 mL MasterAim®团块解离消化液 (#100-358)，室温放置6 min，镜下观察到贴壁细胞边缘卷起，即可移除解离液停止消化。
- 5.细胞收集：用细胞刮轻轻将集落刮取收集，重悬于1 mL多能干细胞完全培养基，上下轻轻吹打2 - 3次，将较大的细胞团吹打成50-200μm

的均一细胞团悬液，（不建议制备成单细胞悬液）。

6.接种：将细胞悬液转移到15 mL离心管中并加入11 mL多能干细胞完全培养基，混匀。将混匀后的悬液平均接种至包被过基质胶的6孔板中，轻轻摇匀，并在37°C和5%CO₂下进行培养（24 h内请勿移动），建议每2天进行全换液，每次2 mL（无需添加ROCK抑制剂）。

三、多能干细胞冻存（可选步骤）

1.计数：当细胞汇合度达到80%，即可进行细胞冻存。

2.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中，使用移液器去除培养基，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

3.消化：每孔加入1 mL MasterAim®团块解离消化液，室温放置6 min，镜下观察到贴壁细胞边缘卷起，即可移除解离液停止消化。

4.细胞收集：每孔加入1 mL DMEM: F12培养基，轻轻吹打后将细胞转移到15mL离心管中，200 g，离心5 min，弃上清。

5.冻存：将细胞沉淀重悬于适量干细胞冻存液中（可每孔冻存为1管，1 mL/管），将冻存管置于程序降温盒中进行梯度降温，次日转移至液氮罐中。

四、肝类器官构建

定向内胚层分化 (D0-D3)

1.清洗：当细胞汇合至50%-60%时，可开始进行第一阶段的分化，将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除培养基，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

2.分化培养：每孔加入2 mL MasterAim®肝细胞分化培养基A-1 (#100-464)，在37°C和5%CO₂下培养24 h。

3.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除MasterAim®肝细胞分化培养基A-1，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

4.分化培养：每孔加入2 mL MasterAim®肝细胞分化培养基A-2 (#100-465)，在37°C和5%CO₂下继续诱导培养48 h，期间需每天进行全换液。（无需添加ROCK抑制剂）

定向肝系内胚层分化 (D3-D7)

1.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除MasterAim®肝细胞分化培养基A-2，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

2.分化培养：每孔加入2 mL MasterAim®肝细胞分化培养基B (#100-466)，在37°C和5%CO₂下培养4天，期间需每天进行全换液。（无需添加ROCK抑制剂）

肝祖细胞扩增 (D7-D11)

1.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除MasterAim®肝细胞分化培养基B，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

2.分化培养：每孔加入2 mL MasterAim®肝细胞分化培养基C (#100-467)，在37°C和5%CO₂下培养4天，期间需每天进行全换液。（无需添加ROCK抑制剂）

肝细胞成熟 (D11-D18)

1.清洗：将培养细胞的6孔板从培养箱中取出，使用移液器去除MasterAim®肝细胞分化培养基C，每孔加2 mL DPBS-PS清洗，去除清洗液。

2.分化培养：每孔加入2 mL MasterAim®肝细胞分化培养基D (#100-468)，在37°C和5%CO₂下培养7天，期间需每天进行全换液。（无

需添加ROCK抑制剂)

肝祖细胞类器官构建

1. 清洗: 将培养细胞的6孔板从培养箱中取出, 使用移液器去除MasterAim®肝细胞分化培养基D, 每孔加2 mL DPBS-PS清洗, 去除清洗液。
2. 计数: 每孔加入1 mL MasterAim®肝祖细胞类器官培养基 (#100-469), 使用移液枪轻轻吹打细胞悬液, 吹打均匀后进行细胞计数 (此步骤无需消化)。将细胞悬液200 g, 离心5 min, 弃上清。
3. 接种: 按2000 个细胞/ μ L的密度重悬于基质胶 (Matrigel) 中, 将细胞悬液接种至37°C预热的细胞培养板中, 每孔接种1个胶滴 (50 μ L), 胶滴应接种于培养孔的中心位置。将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后, 倒置培养板静置25 min, 以待基质胶倒置凝固。
4. 培养: 使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入800 μ L于37°C预热的MasterAim®肝祖细胞类器官培养基 (需添加ROCK抑制剂, 终浓度为5 μ M)。将DPBS-PS加至其它未接种液滴的孔中, 以保持培养时的湿度, 并在37°C和5%CO₂下培养7-14天, 每2-3天进行全换液 (无需添加ROCK抑制剂)。此步骤获得的肝祖细胞类器官可传代、可冻存。

肝类器官分化

1. 清洗: 待肝祖细胞类器官形成后培养3天, 将培养类器官的6孔板从培养箱中取出, 使用移液器去除MasterAim®肝祖细胞类器官培养基, 每孔加2 mL DPBS-PS清洗, 去除清洗液。
2. 培养: 使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入1 mL的MasterAim®肝类器官分化培养基 (#100-498), 在37°C和5%CO₂下培养12天, 期间需每天进行全换液。
3. 补液: 第13天时, 将MasterAim®肝类器官分化培养基和MasterAim®肝类器官分化培养基添加物 (100X) (#100-499) 按照比例充分混合即为肝类器官分化完全培养基, 向每孔中加入1 mL肝类器官分化完全培养基, 在37°C和5%CO₂下继续培养3天, 期间需每天进行全换液, 即可获得成熟的肝类器官。

五、肝祖细胞类器官传代

1. 消化: 将培养类器官的24孔板取出, 用移液器去除培养基, 加入2 mL TrypLE, 使用1 mL枪头将胶滴吹散 (可根据类器官量适量增加TrypLE的体积)。室温消化5 - 8 min, 或37°C培养箱消化5 min (避免消化过度, 影响类器官生长)。
2. 类器官收集: 将消化后的类器官悬液转入6 mL预冷的DPBS-PS中, 保证培养孔中的类器官都被收集起来。300 g, 离心5 min, 去上清, 收集类器官。
3. 计数: 将离心收集的细胞沉淀重悬于1 mL DPBS-PS中, 通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞团的个数, 一个胶滴大约需要200 - 500个细胞团 (约5 - 10万个细胞)。计数后, 300 g, 离心5 min, 去上清, 收集类器官。
4. 接种: 将获取的细胞沉淀根据计数结果重悬于基质胶 (Matrigel) 中。提前预热的24孔板 (提前预热半小时), 每孔加入50 μ L类器官悬液 (胶滴应接种于培养孔的中心位置)。将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后, 倒置培养板静置25 min, 以待基质胶倒置凝固。
5. 培养: 使用移液枪沿着孔侧壁向每孔中轻轻地加入500 μ L于37°C预热的MasterAim®肝祖细胞类器官培养基 (胶滴应接种于培养孔的中心位置)。将适量DPBS-PS加至其它未接种液滴的孔中, 以保持培养时的湿度。在37°C和5%CO₂下进行培养, 建议每2 - 3天进行全换液 (无需添加ROCK抑制剂)。观察生长情况, 并进行拍照记录, 直至下次传代。

注: 所有接触类器官的移液管、枪头等类器官培养耗材均需进行润洗, 以免在传代过程中出现样本的流失, 推荐使用MasterAim®抗粘附液 (#100-291) 效果更佳。

六、肝祖细胞类器官冻存

1.计数：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，每毫升活细胞数不低于 5×10^5 个时，即可进行冻存，类器官每管冻存细胞量约为 5×10^5 个，若细胞量较多时应注意分管冻存。

2.类器官收集：小心吸走培养孔中的培养基，加入适量 TrypLE，吹散胶滴，37°C培养箱，孵育3 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至40-60 μm 大小时，即可加入2-3倍消化液体积的DPBS-PS终止消化，300 g，离心5 min，弃上清；加入3 mL DPBS-PS重悬细胞，300 g，离心5 min，弃上清。

3.冻存：加入MasterAim®类器官冻存液 (#100-45) 重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，每管1 mL；将冻存管置于程序降温盒中，进行梯度降温：4°C (20 min) ， -20°C (2 h) ， -80°C (过夜) ，最后转移至液氮罐。

【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细胞衍生的肝类器官的构建。

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。