

Plurioid™ Human PSC-Derived Blood Vessel Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 血管类器官试剂盒)

货号: HiBVO-K100

产品介绍

Plurioid™ hPSC 血管类器官试剂盒是一款基于人多能干细胞的专用培养系统，通过精准调控血管发育相关信号通路，可在体外高效构建功能完整的三维血管类器官。试剂盒采用优化无血清配方，仅需 23 天即可将 hPSC 定向分化，形成包含 CD31+ 内皮细胞、 α -SMA+ 平滑肌细胞、PDGFR β + 周细胞等多种关键血管细胞的类器官结构，并自发组装出具备生理活性的管腔组织。其细胞构成、组织结构及屏障功能均高度模拟天然血管，可为血管发育机制研究、血管相关疾病模型构建、抗血管药物筛选与药物安全性评价，提供稳定可靠、高仿真的体外三维研究模型。

本试剂盒规格为 1miniKit，预计可生成 60 个成熟血管类器官，并维持培养 10 天。该试剂盒使用需要操作人员具有 hPSC 培养经验，并对类器官具有一定了解。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Embryoid Body Induction formation Medium	HiBVO-K100	8 mL	4°C, 6个月
Supplement A (5×)		1 mL×2	-20°C, 12个月
Mesoderm Induction Medium		10 mL	4°C, 6个月
Supplement B (25×)		400 μ L	-20°C, 12个月
Vascular Lineage Induction Medium		10 mL	4°C, 6个月



Supplement C (25×)		400 μL	-20℃, 12个月
Vascular Differentiation Medium		20 mL	4℃, 6个月
Supplement D (25×)		800 μL	-20℃, 12个月
Vascular Angiogenesis Matrix Preparation Medium		1 mL×2	4℃, 6个月
Vascular Angiogenesis Matrix I		750 μL×2	4℃, 6个月
Vascular Angiogenesis Matrix II		1 mL	-20℃, 6个月
Blood Vessel Organoid Maturity Medium		50 mL	4℃, 6个月
Supplement E (25×)		1 mL×2	-20℃, 12个月

其他需准备的试剂信息：

试剂名称	厂家	货号
hPSC完全培养基	SHR Biotechnology	HPCM-100
hPSC传代消化液	SHR Biotechnology	HPPD-100
hPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
NAOH	-	-
HCL	-	-
DPBS	-	-



hPSC 血管类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 血管类器官完全培养基。以下是准备将 PSC 诱导为血管类器官的拟胚体形成完全培养基、中胚层诱导完全培养基，血管谱系诱导完全培养基，血管分化完全培养基，血管类器官成熟完全培养基以及血管新生基质的制备示例，如所需量不同，请根据比例进行用量调整。

1. 冰上解冻Supplement A (5×), Supplement B (25×), Supplement C (25×), Supplement D (25×), Supplement E (25×)。

注意:解冻后，建议将Supplement A (5×), Supplement B (25×), Supplement C (25×), Supplement D (25×), Supplement E (25×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于微量试剂组分建议瞬时离心5秒钟 (500-2000 rpm) 后，再开盖使用，以避免损失。

2. 将 400 μ L Supplement A (5×)加至 1.6 mL Embryoid Body Induction formation Medium 中，充分混合，配制成 2 mL 拟胚体形成完全培养基。
3. 将 80 μ L Supplement B (25×)加至 1.92 mL Mesoderm Induction Medium 中，充分混合，配制成 2 mL 中胚层诱导完全培养基。
4. 将 160 μ L Supplement C (25×)加至 3.84 mL Vascular Lineage Induction Medium 中，充分混合，配制成 4 mL 血管谱系诱导完全培养基。
5. 将 80 μ L Supplement D (25×)加至 1.92 mL Vascular Differentiation Medium 中，充分混合，配制成 2 mL 血管分化完全培养基。
6. 将 400 μ L Supplement E (25×)加至 9.6 mL Blood Vessel Organoid Maturity Medium 中，充分混合，配制成 10 mL 血管类器官成熟完全培养基。

注意: 配制好的培养基可在2-8 °C储存不超过3天，建议现配现用。Embryoid Body Induction formation Medium , Mesoderm Induction Medium , Vascular Lineage Induction Medium , Vascular Differentiation Medium, 以及Blood Vessel Organoid Maturity Medium内均含有细菌及真菌抗生素。

7. 血管新生基质配制，以 4 mL 用量为例：

- (1) 配制 pH 为 7.4 的血管新生专用胶混合溶液：将 1.5 mL Vascular Angiogenesis Matrix I 与 1.5 mL Vascular Angiogenesis Matrix Preparation Medium 混合，制备成 3 mL 血管新生专用胶混合溶液，快速用 pH 指示条测量混合溶液的 pH 值，pH 值应为~7.4 。如不符合 pH 值要求，使用 NaOH (1M) 和 HCl (1M) 进行调节。
- (2) 配制血管新生基质：将 3 mL 血管新生专用胶混合溶液与 1 mL Vascular Angiogenesis Matrix II 充分混匀，配制成血管新生基质。

注意: 此操作均需在冰上操作。



hPSC 血管类器官的诱导培养

提前复苏 hPSC，传代两代以后，即可使用不同阶段的分化培养基依次进行诱导培养，具体步骤如下：

1、拟胚体形成（耗时 1-3 天）

Day 0-3:

- (1) 当 hPSC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2 mL DPBS 室温清洗一次。
- (2) 吸去上清，加入 0.5 mL 预热至室温的 hPSC 传代消化液，转移到 37 °C 5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 1-2 min。

注意：待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化。

- (3) 吸去上清，加入等体积的 hPSC 完全培养基，并使用 P1000 吸头轻轻上下吹打细胞，制成单细胞悬液，经台盼蓝染色确定细胞活性并计数。

注意：台盼蓝染色活细胞比例在90%以上。

- (4) 将单细胞悬液收集到15 mL离心管中，室温下300 *g*离心5 min。
- (5) 配制拟胚体形成完全培养基。
- (6) 离心结束，充分去除上清，使用预热的拟胚体形成完全培养基重悬细胞，并调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。
- (7) 将细胞按照 2×10^5 个/孔接种至低吸附6孔板内，即加入2 mL细胞悬液进行悬浮培养。每日半量换液。

注意：一般1-3天可形成球状拟胚体。待球体结构紧密，直径达到50-100 μ m进入下一步骤。

2、中胚层诱导（耗时 3 天左右）

Day 4-6:

- (1) 配制中胚层诱导完全培养基。
- (2) 用剪去尖端的1 mL枪头，将球状拟胚体吸入5 mL离心管内，待自然沉降后，吸除上清。
- (3) 继续加入2 mL中胚层诱导完全培养基重悬球体，并重新接种至6孔板内，继续培养3天左右。

注意：若有球体黏连，使用剪去尖端的1 mL轻轻吹散以防止类器官融合，或轻微摇晃孔板使类器官分布均匀。

3、血管谱系诱导（耗时3天）

Day 7-9:

- (1) 配制血管谱系诱导完全培养基。
- (2) 用剪去尖端的1 mL枪头，将球体吸入5 mL离心管内，待自然沉降后，吸除上清。
- (3) 继续加入2 mL血管谱系诱导完全培养基重悬球体，并重新接种至原先的6孔板内。每隔2天更换一次培养基。此阶段血管球体逐渐变大，当开始出现空泡时，进入下一步骤。

注意：如发生球体黏连，使用剪去尖端的1 mL枪头轻轻吹散。

4、血管新生（耗时7天左右）

Day 10-16:



(1) 计算血管新生阶段需要使用血管新生基质体积：血管新生一般在12孔板内进行，每个孔需使用1 mL血管新生基质，可接种20-40个球体。根据以下公式来计算需要配制的血管新生基质体积：血管新生基质体积/mL = 1 mL × 血管谱系诱导阶段6孔板内球体总数/(20-40)。

注意：血管新生阶段每个孔中的球体密度很关键，过于密集的播种会导致血管网络过度融合，而过于稀疏导致血管网络形成效率低。

(2) 配置单次实验所需的血管新生基质，冰上操作。

(3) 12孔板中每孔加入500 μL血管新生基质进行包被处理，37 °C孵育2 h使其固化。

(4) 用剪去尖端的1 mL枪头，将球体吸入5 mL离心管内，待自然沉降后，吸去上清，继续加入3 mL Vascular Differentiation Medium重悬球体，待自然沉降后，吸去上清。

(6) 每20-40个球体使用500 μL血管新生基质重悬，并按照500 μL/孔的浓度接种至预先包被好的12孔板。通过前后摇晃平板，使胶液平铺在孔板。待球体分布良好，慢慢地将平板移至培养箱，37 °C孵育2 h使其固化。

(7) 配置血管分化完全培养基，预热后按照1 mL/孔加入到12孔板内。加入后约1-3d内出现新生血管。

(8) 3 d后更换新鲜的血管分化完全培养基，之后每隔一天更换一次。待血管网络形成后，进行下一步实验。

5、血管类器官组装及成熟（耗时5天）

Day 17-21:

(1) 配制血管类器官成熟完全培养基。

(2) 使用高压灭菌的小镊子，轻轻将血管网络周围的胶分离，并将其挑入超低吸附96孔板的一个孔内（血管类器官被少量周围基质包裹一起悬浮培养），1个球体/孔。

(3) 按200 μL/孔加入血管类器官成熟完全培养基，继续培养。每2天换一次培养基。约4-5天左右可见血管类器官呈圆形且出现完全包裹的形态。

注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。

论文发表规范引用参考

Human blood vessel organoids were prepared from hPSCs with Human PSC-Derived Blood Vessel Organoid Kit (HiBVO-K100, Plurioid™ SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



附录1 hPSC血管类器官构建流程图

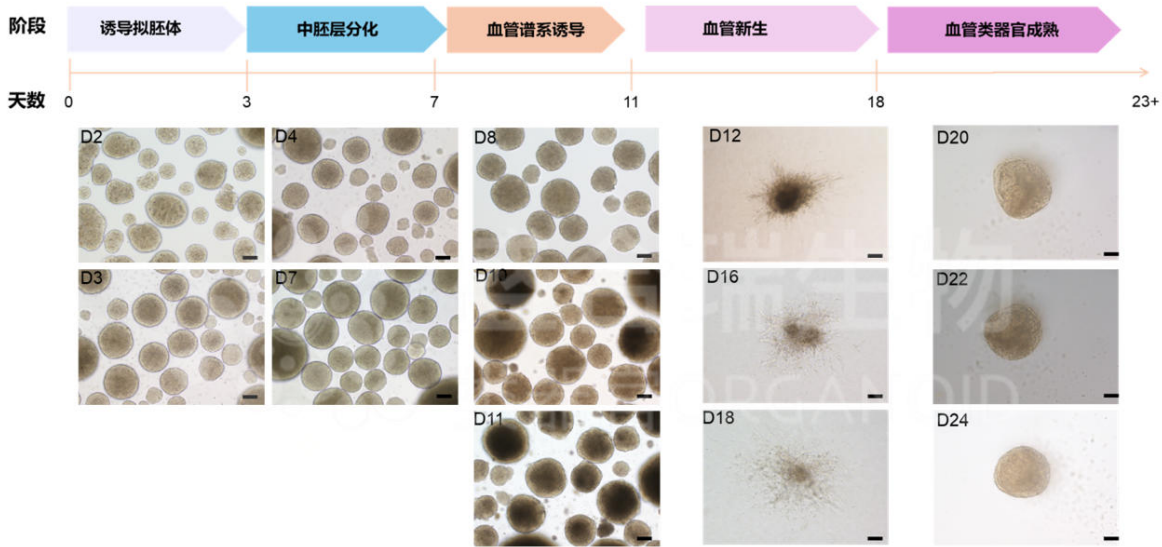


图1 hPSC血管类器官构建流程图，比例尺：100 μm 。

附录2 hPSC血管类器官鉴定图

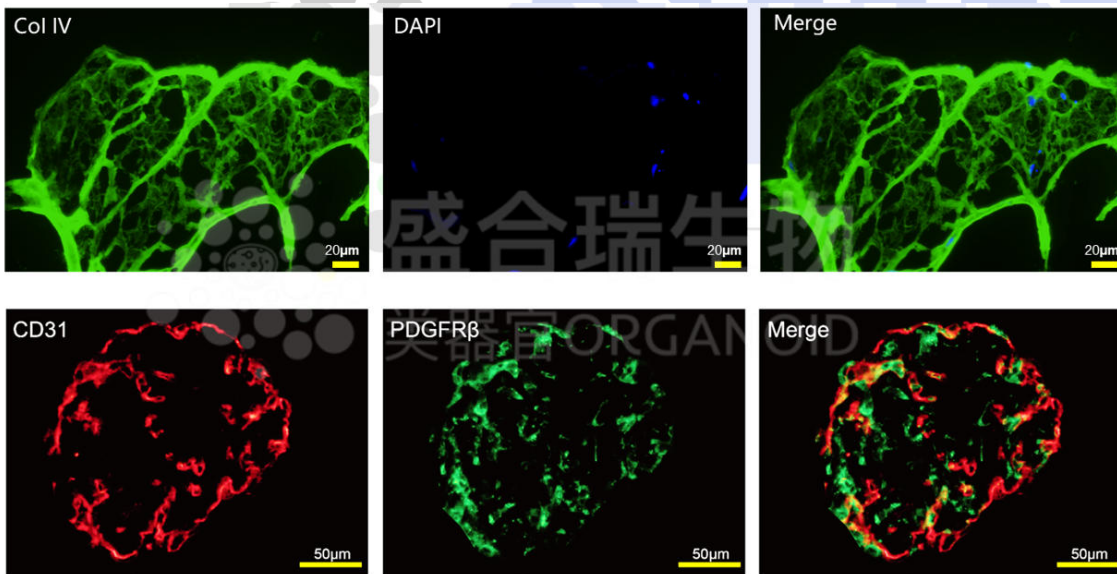


图2 hPSC血管类器官免疫荧光染色鉴定

分别对成熟血管类器官进行免疫荧光染色。其中，Col IV用于标记血管基底膜、CD31用于标记血管内皮细胞， α -SMA用于标记血管平滑肌细胞。比例尺20 μm (上)或50 μm (下)。



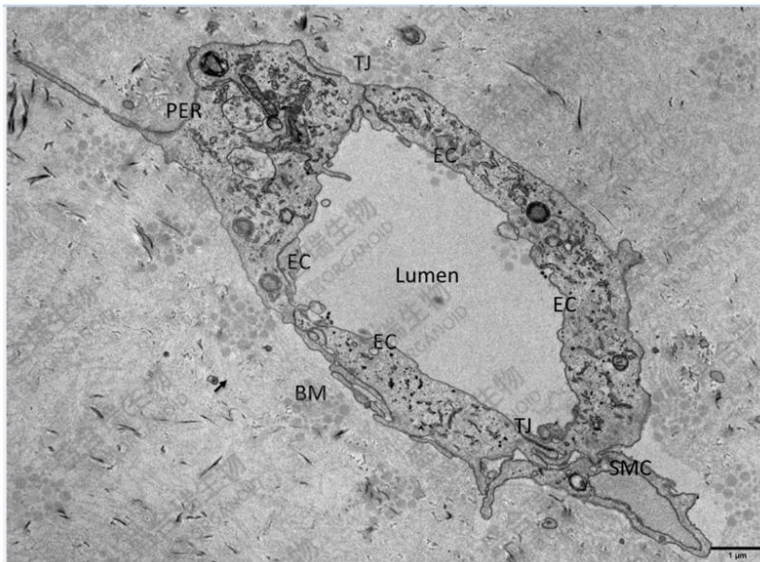


图3 透射电镜观察hPSC血管类器官

透射电镜观察hPSC血管类器官中的管腔结构，可见血管腔外周环绕着内皮细胞，并且出现紧密连接，外周存在结合的周细胞和平滑肌细胞。EC-内皮细胞；PER-周细胞；SMC-平滑肌细胞；Lumen-管腔；BM-基底膜；TJ-紧密连接。

