

Plurioid™ Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 心脏类器官试剂盒)

货号: HiCAO-K150

产品介绍

Plurioid™ hPSC心脏类器官试剂盒是一款专为诱导人多能干细胞 (hPSC) 定向分化为功能性心脏类器官而开发的实验试剂。本试剂盒能够在体外快速构建包含心肌细胞、心脏成纤维细胞等多种功能性细胞组分的三维类器官模型。该模型可自发形成空腔结构并产生稳定节律性搏动, 高度重现了天然心脏的关键生理特征, 为心脏疾病机制研究、药物心脏毒性评估及心血管药物筛选 等研究领域提供了高度仿真的实验平台。

本试剂盒规格为 1 miniKit, 预计可生成 45 个心脏类器官, 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
Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium	HiCAO-K160	8 mL	4°C, 6个月
Supplement A (5×)		1 mL×2	-20°C, 12个月
Supplement B (100×)		50 µL	-20°C, 12个月
Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium		150 mL	4°C, 6个月
Supplement C (50×)		550 µL	-20°C, 12个月
Supplement D (50×)		250 µL	-20°C, 12个月



Supplement E (50×)		150 μL	-20℃, 12个月
Supplement F (50×)		150 μL	-20℃, 12个月
Supplement G (50×)		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
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
hPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
DPBS		

hPSC 心脏类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 心脏类器官完全培养基。以下是准备将 hPSC 诱导为心脏类器官的拟胚体诱导培养基 a, 心脏类器官诱导培养基 b, 以及心脏类器官分化培养基 c, d, e, f, g 的配制示例, 如所需量不同, 请进行相应用量调整。

1. 按当前实际分化阶段 (见产品信息表格所描述的各分化阶段), 提前于 2-8 °C 解冻所需的分化培养添加物, 不要过早解冻非当前分化阶段所需添加物。

注意: 所有组分初次解冻后, 建议分装后置于 2-8°C 按需保存取用, 避免反复冻融。对于微量试剂组分建议解冻后瞬时离心 5 秒钟 (500-2000 rpm) 后, 再开盖使用, 以避免损失。

2. 将 1 mL Supplement A (5×) 和 50 μL Supplement B (100×) 加至 3.95 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium 中, 充分混合, 配制成 5 mL 拟胚体诱导培养基 a。



3. 将 1 mL Supplement A (5×)加至 4 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium 中, 充分混合, 配制成 5mL 心脏类器官诱导培养基 b。
4. 将 200μL Supplement C (50×)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中, 充分混合, 配制成 10 mL 心脏类器官分化基础培养基 c。
5. 将 100 μL Supplement D (50×)和 100 μL 类器官专用基质胶 (OEM-10) 加至 4.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中, 充分混合, 配制成 5 mL 心脏类器官分化培养基 d。
6. 将 100 μL Supplement E (50×)加至 4.9 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中, 充分混合, 配制成 5 mL 心脏类器官分化培养基 e。
7. 将 100 μL Supplement F (50×)加至 4.9 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中, 充分混合, 配制成 5mL 心脏类器官分化培养基 f。
8. 将 200μL Supplement G (50×)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中, 充分混合, 配制成 10 mL 心脏类器官分化培养基 g。

注意: 配制好的各种培养基可在2-8℃储存不超过3天, 建议现配现用。Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium和Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium内含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 心脏类器官的诱导培养

提前复苏 hPSC, 传代两代以后, 即可使用各阶段培养基进行诱导培养, 具体步骤如下:

1、拟胚体诱导 (耗时 2 天)

Day -2:

- (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。
- (3) 吸去上清, 加入等体积的 拟胚体诱导培养基a, 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: 待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化, 台盼蓝染色活细胞比例建议在90%以上。

- (4) 300 g离心3 min收集细胞后, 加入拟胚体诱导培养基a重悬细胞至浓度为 1×10^5 个/mL, 按100 μL/孔接种10000个细胞至96孔U底超低吸附板。在水平孔板离心机内300 g离心5 min后细胞聚集成球状。之后将孔板转移到37 °C、5% CO₂细胞培养箱中孵育24 h。

注意: 建议接种至孔板中心的45个孔, 周围孔补加DPBS, 以减少蒸发。一个孔生成一个类器官。

Day -1:

- (6) 吸去旧培养基, 每孔加入 100 μL 心脏类器官诱导培养基 b, 在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 24 h。此时球体开始出现明显边界。



2、心脏中胚层分化（耗时6天）

Day 0:

(1) 使用剪去尖端的黄色枪头将每个球体吸出至5 mL EP管中，自然沉降，加入DPBS，洗两遍。之后，使用 Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium清洗2遍，再使用心脏类器官分化培养基c清洗一遍，自然沉降后去除上清。

注意：清洗过后，球体周围碎细胞减少。

(2) 于EP管中加入2-3 mL心脏类器官分化培养基d重悬球体。

(3) 使用DPBS清洗第一阶段使用的96孔U底超低吸附培养板。

(4) 用心脏类器官分化培养基d重悬球体再次接种至先前使用的96孔U底超低吸附培养板中，一个孔一个球体。每孔心脏类器官分化培养基d补加至250 μ L。

注意：①将类器官只种在板子的中心孔，周围一圈补加200 μ L PBS，以减少中心孔的培养基蒸发；②每次接触类器官以及培养基的枪头，都需要用类器官润洗液（OMR-100）润洗一遍，以减少枪头上的杂质带入类器官内生长。

Day 1:

(4) 吸去166 μ L培养基/孔，补加166 μ L心脏类器官分化培养基c/孔。

Day 2:

(5) 继续吸去166 μ L培养基/孔，补加入166 μ L心脏类器官分化培养基e。

注意：球体开始生长变大。

Day 4-6:

(6) 继续吸去166 μ L培养基/孔，补加入166 μ L心脏类器官分化培养基c/孔。Day 6进行相同操作。

注意：球体内部出现逐渐变大的空腔。

4、心脏类器官分化及成熟

Day 7:

(1) 配制心脏类器官分化培养基f和心脏类器官分化培养基g

(2) 吸去166 μ L 培养基/孔，补加入166 μ L心脏类器官分化培养基f/孔。

(3) 于细胞培养箱培养1 h后，继续吸去166 μ L 培养基/孔，补加入166 μ L心脏类器官分化培养基g/孔

Day 8-30:

(4) 于Day 8 吸去166 μ L 培养基/孔，补加入166 μ L心脏类器官分化培养基g/孔。之后每2-3天如此操作，补加一次心脏类器官分化培养基g。

注意：球体结构更加紧密，约于Day 10-15天左右观察到跳动。

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 Cardiac organoids were prepared from hPSCs with Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit (HiCAO-K150, Plurioid™ SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



附录1 hPSC心脏类器官构建流程

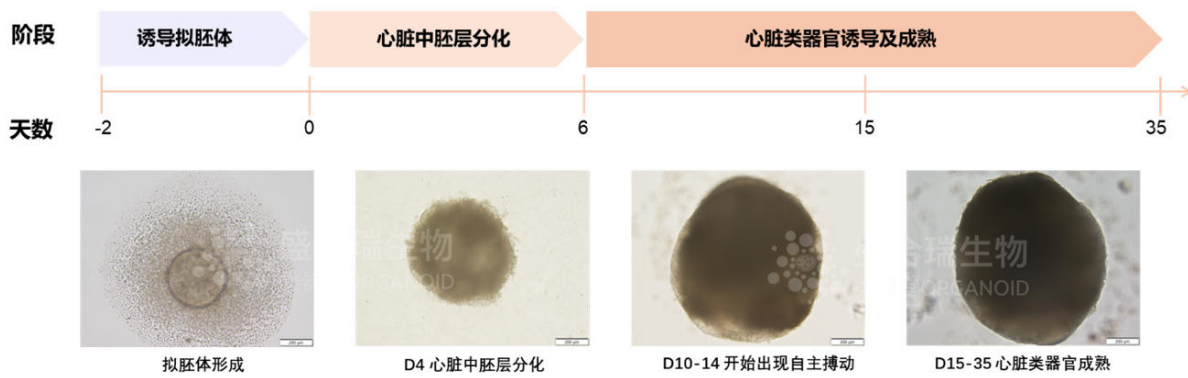


图1 hPSC心脏类器官构建流程图

附录2 hPSC心脏类器官鉴定图

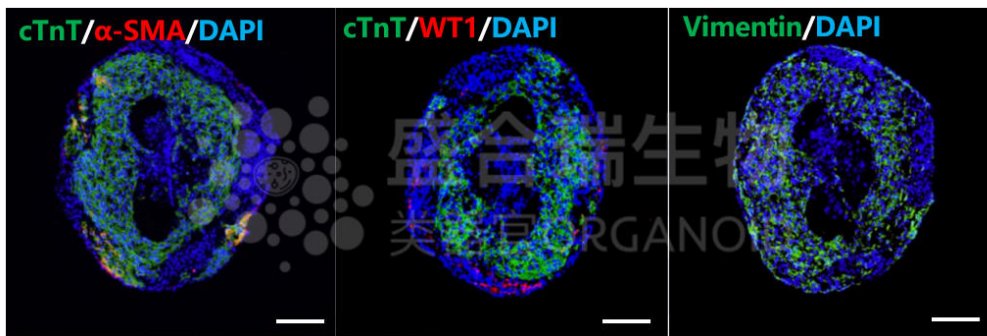


图2 hPSC心脏类器官免疫荧光染色鉴定

分别对成熟心脏类器官进行免疫荧光染色。其中，cTnT用于标记心肌细胞， α -SMA用于标记血管平滑肌细胞，WT1用于标记心外膜细胞，Vimentin用于标记心脏成纤维细胞。比例尺：50 μ m。

