

Plurioid™ Human PSC-Derived Islet Organoid Kit (Plurioid™ hPSC 胰岛类器官试剂盒)

货号: HiISO-K100

产品介绍

Plurioid™ hPSC 胰岛类器官试剂盒是一款用于从人多功能干细胞诱导分化成胰岛类器官的试剂盒，可以在体外培养环境下生成结构完整、功能成熟的胰岛样类器官。成熟胰岛类器官既表达胰岛β、α等细胞标志物（如Insulin、Glucagon），又具备葡萄糖刺激胰岛素分泌（GSIS）的核心生理功能，可用于糖尿病研究、体外药物筛选以及细胞治疗开发等。

本试剂盒规格为 1 miniKit，预计可生成超过 200 个胰岛类器官（使用 1 个 6 孔板启动分化流程），需要操作人员具有 hPSC 培养经验，并对类器官具有一定了解。初次诱导也可考虑使用 1 个 12 孔板（即约 1/2 个 6 孔板）启动分化流程，最终可形成约 100 个以上均一大小的胰岛类器官。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A	HiISO-K100	90 mL	4°C, 6个月
Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium B		10 mL	4°C, 6个月
Supplement C (50×)		100 μL	-20°C, 1年
Supplement D (50×)		300 μL	-20°C, 1年
Supplement E (50×)		200 μL	-20°C, 1年



Supplement F (50×)		300 μL	-20°C, 1年
Supplement G (40×)		250 μL	-20°C, 1年
Supplement H (40×)		250 μL	-20°C, 1年
Supplement I (50×)		200 μL	-20°C, 1年
Supplement J (50×)		200 μL	-20°C, 1年
Supplement K (50×)		200 μL	-20°C, 1年

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
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
hPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
ROCK抑制剂 Y-27632	-	-
DPBS	-	-

其他需准备的耗材与设备信息:

耗材名称	厂家	货号
超低吸附6孔细胞培养板	CORNING	3471



二选一	细胞球蜂窝培养片	苏州三体生物科技	A款500 μ M直径
	AggreWell™微孔板	STEM CELL	400 μ M直径
6孔细胞培养板 (TC)		-	-
孔板离心机		-	-
圆周摇床		-	-

hPSC 胰岛类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 胰岛类器官完全培养基。以下是准备 hPSC 诱导为胰岛类器官的各阶段分化培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

- 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 $^{\circ}$ 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，建议分装后置置于2-8 $^{\circ}$ C避光保存取用，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。

- 将 100 μ L Supplement C (50 \times)加至 4.9 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 5 mL 内胚层诱导培养基-1。
- 将 300 μ L Supplement D (50 \times)加至 14.7 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 15 mL 内胚层诱导培养基-2。
- 将 200 μ L Supplement E (50 \times)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 原始肠管诱导培养基。
- 将 300 μ L Supplement F (50 \times)加至 14.7 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 15 mL 后前肠诱导培养基。
- 将 250 μ L Supplement G (40 \times)加至 9.75 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium B 中，充分混合，配制成 10 mL 胰腺祖细胞诱导培养基-1。
- 将 250 μ L Supplement H (40 \times)加至 9.75 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 胰腺祖细胞诱导培养基-2。
- 将 200 μ L Supplement I (50 \times)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-1。
- 将 200 μ L Supplement J (50 \times)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation



Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-2。

10. 将 200 μ L Supplement K (50 \times)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 胰岛细胞成熟诱导培养基。

注意：配制好的各阶段培养基可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存不超过 3 天，建议现配现用。Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium A 和 Human PSC-Derived Islet Organoid Differentiation Medium B 中均含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 胰岛类器官的诱导培养

复苏 hPSC 细胞株，经稳定传代两次以后，用于诱导培养，具体步骤如下：

注意：推荐使用 H8、H9 等胚胎干细胞系，使用人诱导多能干细胞时，需提前鉴定其多能干细胞标志物表达，建议选择 SOX2、OCT4 及 Nanog 阳性细胞比例大于 95% 的代次，且细胞总传代次数较低、增殖活力较好。

1、hPSC 细胞准备

(1) 当观察到 hPSC 的汇合度达到 60%-70% 时，可以准备分化铺板。

注意：hPSC 的细胞状态对分化至关重要，应取对数生长期细胞作为分化对象，无故生长缓慢或自分化较多的细胞不建议作为分化细胞。

(2) 提前于 4 $^{\circ}$ C 解冻 hPSC 培养专用基质胶，配置包被液后 6 孔板每孔加入 1 mL，十字摇匀使包被液完全覆盖孔底，置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中预热，至少预热 1 h，但不宜预热过夜。

注意：包被液最好现配现用，基质胶避免反复冻融。提前包被的培养板用封口膜封边后可于 4 $^{\circ}$ C 保存不超过一周。

(3) 吸去 hPSC 培养上清，用 1 mL 室温 DPBS 清洗一次，加入 1 mL 预热至室温的 hPSC 传代消化液，转移到 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育，约 1 min 后取出，轻拍孔板侧壁，有少量细胞脱落且显微镜下观察到大部分细胞均为不重叠颗粒状时，加入 1 mL hPSC 完全培养基以终止消化，否则继续孵育 20-30 s。

注意：待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化。

(4) 用孔内液体环状吹下贴壁细胞，收集细胞悬液并用 hPSC 完全培养基润洗一遍孔内后离心，室温下 300 g 离心 3~4 min。

(5) 弃上清，轻弹细胞团，加入 1 mL hPSC 完全培养基轻柔吹打，再补加合适体积，混匀后取样，经台盼蓝染色确定细胞活率，计数后按 1×10^6 /孔的细胞密度接种到 6 孔板，每孔加入 2 mL 含 10 μ M Y-27632 的 hPSC 完全培养基，十字摇匀后放入 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养。

注意：台盼蓝染色活细胞比例建议在 90% 以上。

2、hPSC 分化为定向内胚层 (S1 阶段)

S1D 1:

(1) 培养过夜后可观察 hPSC 细胞汇合度，汇合度达 40-60% 即可加入内胚层诱导培养基-1，否则继续培养



约 12 h 以后再更换内胚层诱导培养基-1。

(2) 吸去旧培养液上清，每孔加入 3 mL 内胚层诱导培养基-1，将培养板放入 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养。

注意：内胚层诱导培养基-1 必须培养满 24 小时，不能过早更换。

S1D 2-4:

(3) 24 h 后 更换内胚层诱导培养基-2，每孔 3 mL，每天更换内胚层诱导培养基-2，共培养 3 天。

3、定向内胚层诱导分化原始肠管 (S2 阶段)

S2D 1-2:

吸去旧培养液上清，每孔加入 3 mL 原始肠管诱导培养基，每天更换原始肠管诱导培养基，共培养 2 天。

4、原始肠管诱导分化后前肠 (S3 阶段)

S3D 1-4:

吸去旧培养液上清，每孔加入 2.5 mL 后前肠诱导培养基，每天更换后前肠诱导培养基，共培养 4 天。

5、后前肠诱导分化胰腺祖细胞 (S4 阶段)

S4D 1:

(1) 2D 转 3D 培养准备工作：将无菌细胞球蜂窝培养片（或 AggreWell™ 微孔板）平铺至 24 孔细胞培养板底部，按照实际需要准备若干孔（6 孔板每孔细胞量大约可以接种到 4 个 24 孔板蜂窝片中），每孔加入 0.5 mL 类器官润洗液（OMR-100），静置约 20 min 后再吸出加入 0.5 mL DPBS，放入 37 °C、5%CO₂ 培养箱备用。另外，提前配制后前肠诱导培养基、胰腺祖细胞诱导培养基-1，并在使用前预热至室温。

(2) 细胞消化：吸去旧培养液上清，用 1 mL 室温 DPBS 清洗一次，加入 1 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，约 1 min 后取出，轻拍孔板侧壁，有少量细胞脱落且显微镜下观察到大部分细胞均为不重叠颗粒状时，加入 1 mL 后前肠诱导培养基以终止消化，否则继续孵育 30-40 s。

注意：不同 hPSC 来源的细胞在该阶段消化情况可能差异较大，以观察判断为准，不要求遵守固定的消化时间。

(3) 用孔内液体环状吹下贴壁细胞，收集细胞悬液并用 1 mL 后前肠诱导培养基润洗一遍孔内后离心，室温下 300 g 离心 4~5 min。

(4) 弃上清，轻弹细胞团，加入 1 mL 胰腺祖细胞诱导培养基-1 轻柔吹打，混匀后取样，经台盼蓝染色确定细胞活率（至少 >85%），计数后补充胰腺祖细胞诱导培养基-1 至细胞密度为 $2-4 \times 10^6$ （根据实际准备的蜂窝片孔数可适当调整密度）。

注意：离心重悬后的细胞如发现有絮状细胞团，吹打后无法散开，可使用 40 μm 细胞筛网过滤除去。

(5) 取出准备好铺有蜂窝片的 24 孔板，吸出 DPBS，将细胞悬液混匀后每孔加入 0.5 mL，将 24 孔板置于孔板离心机中离心 300 g 离心 4~5 min，然后置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中。

S4D 2-3:

(6) 培养约 24 小时后，将 24 孔板小心取出（避免剧烈晃动或震荡），置于显微镜下观察，大部分细胞应聚



集于微孔底部，近似圆形球体。将 24 孔板静置于工作台面，约 30°倾斜以吸去大部分培养上清（尽量避免吸掉细胞球），用 0.5 mL 预热至室温的胰腺祖细胞诱导培养基-1 吹下蜂窝片上的细胞球，收集到离心管中，待细胞球自然沉降后，吸去上清，按大约每 4 个蜂窝片的细胞球接种超低吸附 6 孔板 1 孔的比例，每孔加入 4 mL 胰腺祖细胞诱导培养基-2，然后放入 37 °C、5%CO₂ 培养箱中的圆周摇床上培养，转速设置为 70-80 rpm。

注意：刚形成的细胞球体不稳固，转移细胞球时避免吹打，吹吸过程尽量轻柔，可考虑使用去尖枪头。

S4D 4-5:

(7) 培养约 48 小时后，取出低吸附 6 孔板，将其倾斜置于工作台面（可使用支架辅助支撑），静置 1.5-2 min 使细胞球完全沉降后，吸去培养上清，加入 4 mL 预热的胰腺祖细胞诱导培养基-2，放回圆周摇床上继续培养 2 天。

6、胰腺祖细胞诱导分化胰腺内分泌祖细胞 (S5 阶段)

S5D 1-2:

(1) 提前配制并预热胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-1。

(2) 取出低吸附 6 孔板，将其倾斜置于工作台面，静置 1.5-2 min 使细胞球完全沉降后，吸去培养上清，加入 4 mL 胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-1，放回圆周摇床上继续培养 2 天。

S5D 3:

(3) 2 天后进行半量换液，即吸出 2 mL 旧培养液上清，再补充 2 mL 胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-1，继续培养 1 天。

S5D 4-6:

(4) 同 (2) 操作，将胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-1 更换为胰腺内分泌祖细胞诱导培养基-2，并在第 2 天进行半量换液，共培养 3 天。

7、胰腺内分泌祖细胞诱导分化成熟胰岛细胞 (S6 阶段)

S6D 1-2:

(1) 提前配制并预热胰岛细胞成熟诱导培养基。

(2) 取出低吸附 6 孔板，将其倾斜置于工作台面，静置 1.5-2 min 使细胞球完全沉降后，吸去培养上清，加入 4 mL 胰岛细胞成熟诱导培养基，放回圆周摇床上继续培养。

S6D 3:

(3) 培养约 48 小时后，细胞球可用于免疫染色或功能（如 GSIS）分析。也可以选择通过半量换液继续维持培养（一般可继续维持培养 5~6 天）。



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 Islet organoids were prepared from hPSCs with Plurioid™ Human PSC-Derived Islet Organoid Kit (HiISO-K100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.



附录1 hPSC胰岛类器官构建流程

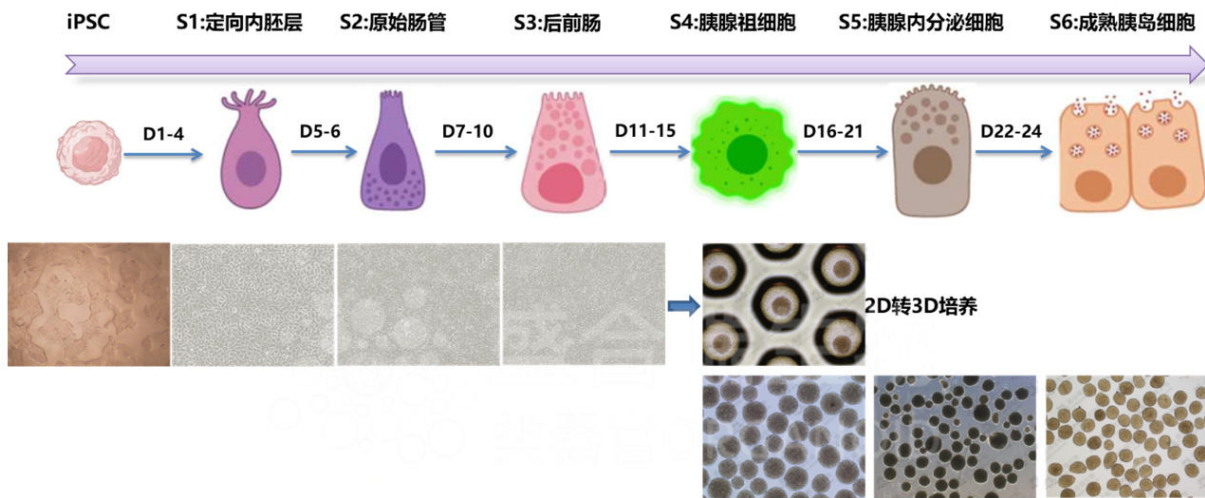


图1 hPSC胰岛类器官构建流程图

附录2 hPSC胰岛类器官鉴定图

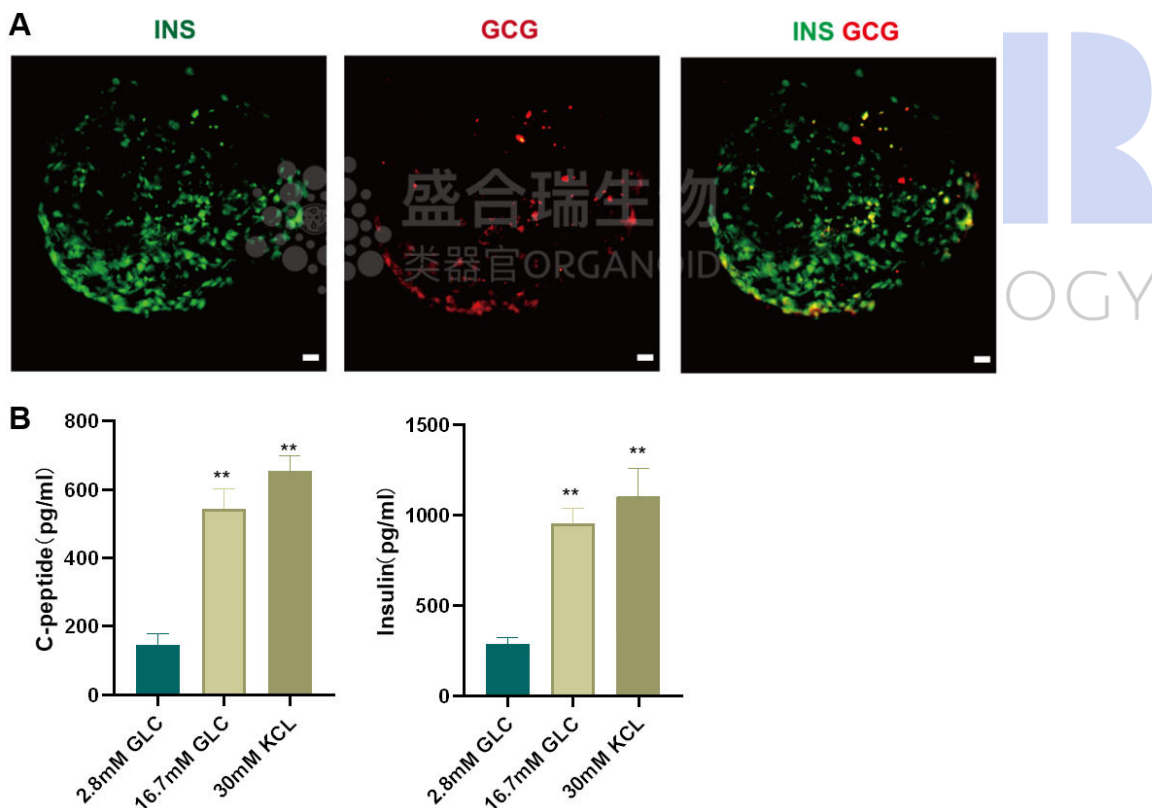


图2 hPSC胰岛类器官免疫荧光染色鉴定与功能检测

(A) 收集S6阶段胰岛类器官进行免疫荧光染色。其中，INS用于标记胰岛β细胞，GCG用于标记胰岛α细胞。比例尺：20 μm。(B) 通过静态葡萄糖刺激试验评估S6阶段胰岛类器官的功能：利用低糖(2.8 mM)和高糖(16.7 mM)模拟血糖变化，并使用30 mM KCl验证最大分泌能力。结果表明，该类器官在高糖条件下表现出显著的C-肽和胰岛素分泌响应。

