Human PSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium（hPSC 肝类器官扩增培养基)

货号：HiLVE-100

产品介绍

本培养基专为人多能干诱导肝祖类器官的体外培养、扩增和维持而设计，适用于从人多能干细胞诱导的肝祖类器官的长期传代培养，可在体外培养体系中有效维持肝祖类器官的增殖能力与双潜能肝祖细胞状态，并支持其后续向成熟肝细胞和胆管细胞等肝实质细胞的定向分化，广泛应用于肝脏疾病建模、药物肝毒性评估与再生医学等领域。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human PSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium A	HiLVE-100	100 mL	4℃，6个月
Supplement B (25×)		4 mL	-20℃，1年

其他需准备的试剂信息：

试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100
类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
上皮类器官基础培养基	SHR Biotechnology	OBM-500

ROCK 抑制剂（Y-27632）	MedChemExpress	HY-10071

hPSC 肝类器官扩增培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 肝类器官扩增培养基。以下是准备 10 mL 完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Supplement B (25×)。

注意: 解冻后，建议将Supplement B (25×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 400 µL Supplement B (25×)加至 9.6 mL Human PSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium 中，充分混合，配制成 10 mL hPSC 肝类器官扩增培养基。

注意: 配制后的培养基可在2-8°C储存不超过3天，建议现配现用。Human PSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium内含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 肝祖类器官的复苏培养

（1）提前在 37℃条件下预热上皮类器官基础培养基（OBM-500），取 5 mL 加入 15 mL 离心管中备用。

（2）从液氮罐取出冻存管，立即在 37℃的水浴中快速摇晃使冻存液迅速融化，当冻存管内冻存物仅剩些许冰渣残留时立即停止水浴并及时转移至洁净操作台。

（3）冻存管开盖前可轻旋盖子 1/4 圈泄压后再拧紧，再开盖。

（4）将冻存悬液转移至预先加入培养基的 15 mL 离心管中，轻轻混匀。

（5）将上一步骤所获类器官悬液进行 200-300 *g* 离心 3-5 min，弃上清（不要吸到细胞沉淀），再次加入基础培养基重悬类器官沉淀。

（6）将上一步骤所获类器官悬液进行 200-300 *g* 离心 3-5 min，弃上清（不要吸到细胞沉淀）。

注意: 对于类器官专用基质胶种板培养体系，参考步骤 7-11，5%类器官专用基质胶悬浮培养体系则参考步骤 12-16。

i: 基质胶培养方案

（7）用适量的基质胶（OEM-10，>70% vol/vol）重悬组织沉淀。

注意: 复苏建议1支冻存管接种到24孔板的1个孔中。

（8）将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30 µL 左右。

（9）将接种完成后的培养板至于 37℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。

（10）待基质胶完全凝固后，加入 37℃预热的 hPSC 肝类器官扩增培养基，24 孔板每孔 500 µL。

（11）将 24 孔板置于 37℃ CO_2 培养箱中培养。每隔 2 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。

ii: 悬浮培养方案

（12）加入适量的含 10 μM Y-27632 hPSC 肝类器官扩增培养基重悬沉淀，并吸取 950 μL 接种至低吸附 24 孔板中的一个孔，再加入 50 μL 类器官专用基质胶（OEM-10），充分混匀，体系终体积 1 mL，基质胶终浓度为 5%。

注意： 复苏建议1支冻存管接种到24孔板的1个孔中。

（13）将 24 孔板置于 37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 24 小时。

（14）24 小时后，将悬浮的肝祖类器官收集至 15 mL 离心管，室温 100 *g* 离心 1 min，吸弃上清培养基。

（15）加入 950 μL 不含 Y-27632 的 hPSC 肝类器官扩增培养基，再加入 50 μL 类器官专用基质胶（OEM-10），充分混匀，体系终体积 1 mL，基质胶终浓度为 5%。

（16）将 24 孔板置于 37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养。每 2 天换液一次；后续可根据类器官生长状态、团块大小及密度情况，每 7–8 天传代一次。

hPSC 肝祖类器官的扩增传代

（1）提前取出冷冻的类器官专用基质胶（OEM-10）置于 4℃解冻过夜，并将枪头放置在-20℃预冷 1 h 后使用。

注意： 对于基质胶培养体系参考步骤 2-8，悬浮培养体系则参考步骤 9-12。

i: 基质胶内培养方案

（2）吸除培养基，加入 1 mL 预冷的 上皮类器官基础培养基（OBM-500） 溶解待传代的含类器官基质胶滴，将混合液转移到 1.5 mL EP 管中，300 *g* 离心 3 min，去除上层的基础培养基和基质胶后，使用预冷的基础培养基再次清洗去胶。

注意： 建议使用水平转子离心机，更利于基质胶与类器官的分离。

（3）待类器官从基质胶中分离出来后，加入 0.2 mL 的类器官传代消化液（OPD-100），通过吹打混匀使类器官与传代消化液充分接触，接着转移到 37℃培养箱中，静置解离 2 min 后轻微吹打，镜下观察到小细胞团即可终止消化。

（4）终止消化后，300 *g* 离心 3 min，去除上清，用预冷枪头加入适量的类器官专用基质胶（OEM-10，>70% vol/vol），混合均匀。混合过程中应尽量避免产生气泡，且重悬时间不超过 30 s 以避免基质胶过早凝固。

注意： 传代比例建议为 1:3-1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

（5）将基质胶与细胞混合悬液按每孔 25-30 μL 接种到 24 孔板的孔中心位置，避免悬液接触孔板侧壁。

注意： 为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

（6）将铺好的培养板至于 37 ℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。

（7）待基质胶完全凝固后，小心沿孔壁加入恢复室温的 hPSC 肝类器官扩增培养基，24 孔板每孔 500 μL。

注意： 沿壁缓慢加入培养基，避免破坏已凝固结构。如基质胶穹顶结构较高，可加入600 μL保证浸没完全。

（8）将 24 孔板放到 37 ℃、5%CO_2 培养箱中，继续培养。每隔一天换液一次，7 天左右传代一次。

ii: 悬浮培养方案

（9）收集悬浮肝祖类器官，采用移液器反复吹打进行机械解离，将其剪碎为小细胞团片段。

注意： 充分吹打，建议将类器官解离为大小均一的小细胞团块。

（10）将小细胞团悬液收集到 1.5 mL 离心管中，室温下 300 *g* 离心 3 min，吸去培养基。

（11）加入 1 mL hPSC 肝类器官扩增培养基重悬细胞团，按 1:6 传代比例接种至低吸附 24 孔板；补加 hPSC 肝类器官扩增培养基至 950 μL，再加入 50 μL 类器官专用基质胶（OEM-10），充分混匀，体系终体积 1 mL，基质胶终浓度为 5%。

（12）将 24 孔板置于 37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养。每 2 天换液一次；后续可根据类器官生长状态、团块大小及密度情况，每 7–8 天传代一次。

注意： 常规换液过程中无需额外添加类器官专用基质胶（OEM-10）；细胞传代接种步骤中需要加入类器官专用基质胶（OEM-10），使其终浓度达到 5%。

hPSC 肝祖类器官的冻存

待肝祖类器官平均直径达 150–200 μm 时，可按需取部分肝祖类器官进行冻存，操作步骤如下：

注意： 对于基质胶培养体系，参考步骤 1-5、8，悬浮培养体系则参考步骤 6-8。

i: 基质胶培养方案

（1）吸弃原培养液，加入4℃预冷的上皮类器官基础培养基（OBM-500），用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的1.5 mL EP管中。

（2）用经过润洗液（OMR-100）润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬液，使得类器官与基质胶分离。

注意： 吹打力度需要控制，尽量保证类器官的完整性，以提高冻存后的复苏活性。

（3）在室温条件下300 *g*离心3 min，弃上清。

（4）加入1 mL上皮类器官基础培养基（OBM-500）洗涤沉淀一次，室温条件下300 *g*离心3 min，弃上清。

（5）类器官沉淀中加入1 mL预冷的类器官冻存液（OFM-50），吹打混匀后立即移入冻存管中。

ii: 悬浮培养方案

（6）收集悬浮肝祖类器官至 15 mL 离心管，室温 300 *g* 离心 2 min，吸弃上清。

（7）加入 1 mL 预冷类器官冻存液（OFM-50）重悬肝祖类器官，混匀后立即移入冻存管中。

（8）程序降温及长期保存：

冻存方法（1）： 将冻存管放入梯度降温冻存盒然后保存至-80℃过夜，第二天取出放入液氮罐。

*冻存方法（2）：*4℃冰箱放置 10 min，转移至-20℃放置 30 min，转移至-80℃过夜，第二天取出放入液氮罐。

注意：-80℃冻存建议不超过3个月，液氮冻存建议不超过1年。

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 liver progenitor organoids were cultured with Human PSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium（HiLVE-100，SHR Biotechnology, Wuxi, China）according to manufacturer instructions.

附录1 hPSC肝祖类器官的扩增传代与复苏生长

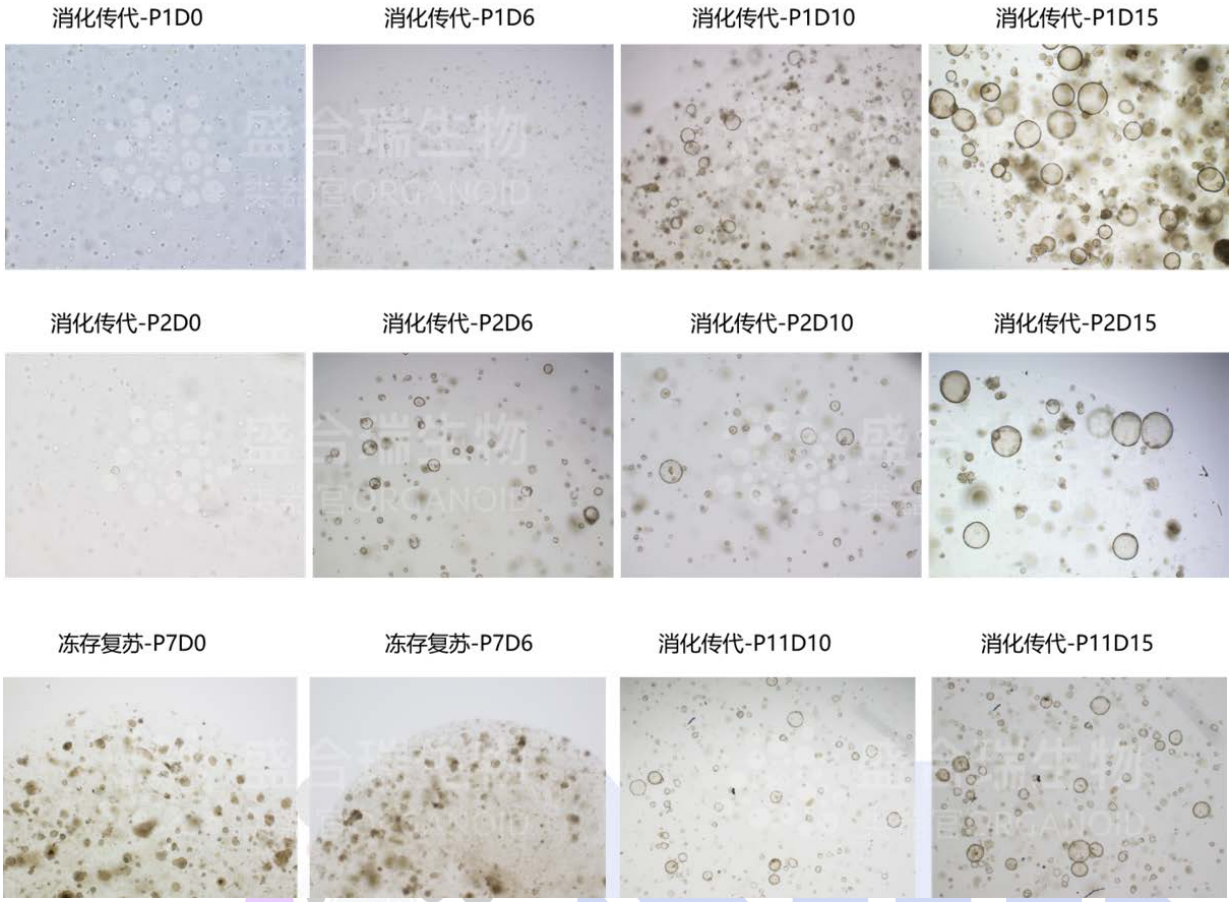


图1 hPSC肝祖类器官的传代与复苏生长示意图（基质胶培养方案）

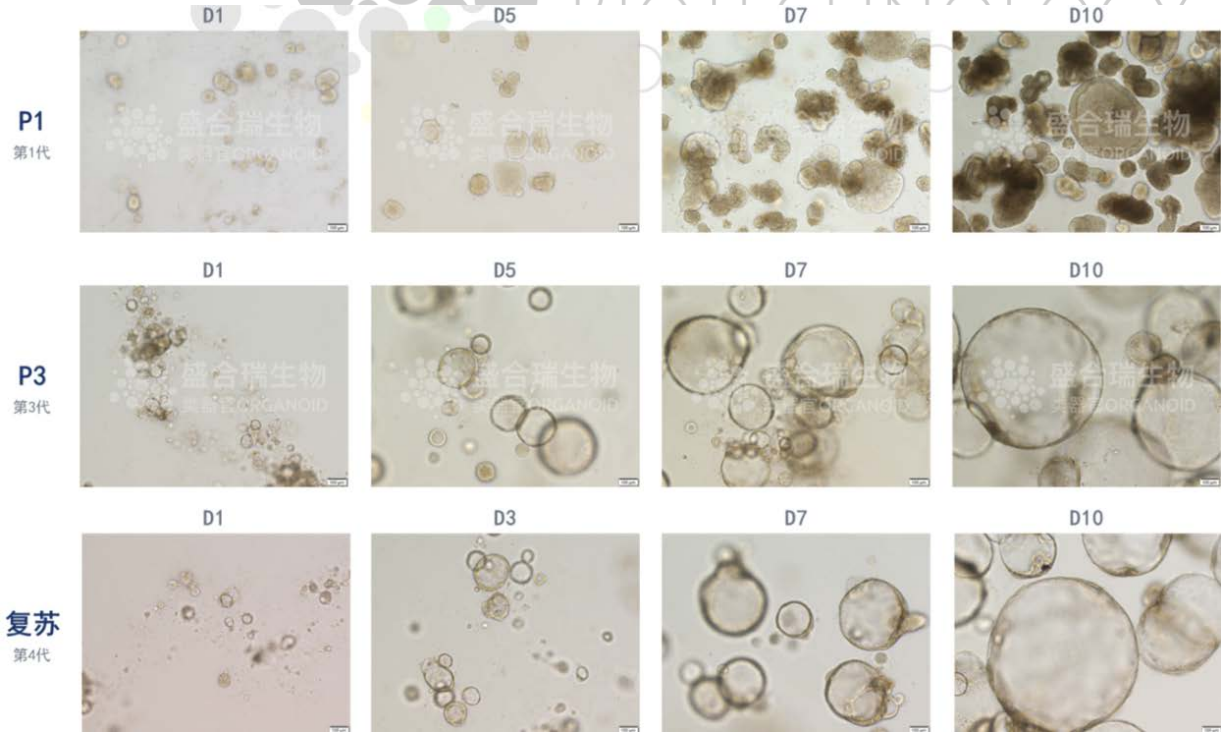


图2 hPSC肝祖类器官的传代与复苏生长示意图（悬浮培养方案）