

hPSC 诱导分化心肌细胞试剂盒使用说明

Cat NO: IMI-CM01

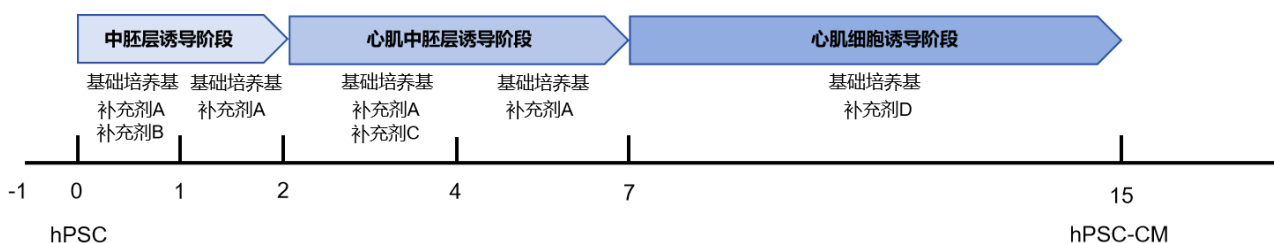
产品描述

本产品为人多能干细胞向心肌细胞诱导分化试剂盒，分化获得的心肌细胞具有搏动能力，能表达特异性标志物（如 Cardiac Troponin T 等），适用于体外研究。

本产品需要操作人员具有细胞培养经验，对心肌细胞具有一定了解。

以六孔板为例，本产品提供的规格可供 6 个孔的 hPSC（约 3×10^6 个细胞）诱导分化。

本产品分化流程图



hPSC: 人多能干细胞; CM: 心肌细胞

产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IMI-CM01BM	基础培养基	150 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-CM01A	补充剂 A (50×)	3 mL	-20°C, 12 个月
IMI-CM01B	补充剂 B (25×)	500 μL	-20°C, 6 个月
IMI-CM01C	补充剂 C (25×)	500 μL	-20°C, 6 个月
IMI-CM01D	补充剂 D (25×)	3.6 mL	-20°C, 6 个月
IMI-CM01X	心肌细胞消化液	10 mL	-20°C, 6 个月
IMI-CM01M	心肌纯化培养基	25 mL	2°C-8°C, 12 个月

注：括号内容如 50× 为母液浓度，使用时终浓度需为 1×。例如补充剂 A (50×) 和补充剂 B (25×) 需添加进基础培养基使其分别稀释 50 倍以及 25 倍，使得补充剂终浓度为 1×，配成心肌诱导培养基 1。



实验试剂与材料

表 2. 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
hESC/iPSC 细胞培养试剂盒	逸漠生物	IMC-014
hESC (H1)	逸漠生物	IM-H522
hESC/iPSC 传代工作液	逸漠生物	IMC-014-E
Y-27632	逸漠生物	IMC-014-Y
RPMI-1640 基础培养基	逸漠生物	IMC-202
Matrigel	Corning	354277
Accutase	STEMCELL	07920
心肌细胞冻存液	逸漠生物	IMC-705
PBS	逸漠生物	IMC-401
低吸附 6 孔细胞培养板	CORNING	3471
15 mL/50 mL 离心管	硕华生物	N/A
10 μ L/200 μ L/1000 μ L 无菌吸头	佳顺生物	N/A
10mL/50mL 移液管	NEST	N/A

实验内容与方法（以 hESC H1 及 6 孔板 1 个孔为例）



一、试剂准备

表 3. 各阶段培养基成分

研究阶段	培养基名称	各阶段培养基组成
中胚层诱导阶段	心肌诱导培养基 1	基础培养基
		补充剂 A (1×)
		补充剂 B (1×)
	心肌诱导培养基 2	基础培养基
		补充剂 A (1×)
		补充剂 B (1×)
心肌中胚层诱导阶段	心肌诱导培养基 3	基础培养基
		补充剂 A (1×)
		补充剂 C (1×)
	心肌诱导培养基 2	基础培养基
		补充剂 A (1×)
		补充剂 B (1×)
心肌细胞诱导阶段	心肌成熟培养基	基础培养基
		补充剂 D (1×)

(1) 在 4℃解冻补充剂 A、B、C、D，不要在 37℃条件下解冻。

(2) 在生物安全柜中，参考表 1 及表 3，按照比例使用无菌移液管及枪头混匀配制成分化各阶段培养基。例如心肌诱导培养基 1 组成为基础培养基、1×浓度的补充剂 A 和 1×浓度的补充剂 B，若用量为 12 mL，配制方法为 11.28 mL 基础培养基+240 μL 补充剂 A (50×)+480 μL 补充剂 B (25×)。

(3) 分化培养基建议现配现用，置于 4℃储存，2 周内使用。

注：所有补充剂以及心肌细胞消化液可根据使用量进行分装以避免反复冻融。



二、hESC 培养和准备（详见 hESC/iPSC 细胞培养试剂盒使用说明书）

（[http://www.immocell.com/xiazai/hESC\(H1\)%E5%9F%B9%E5%85%BB%E8%AF%B4%E6%98%8E%E4%B9%A6.pdf](http://www.immocell.com/xiazai/hESC(H1)%E5%9F%B9%E5%85%BB%E8%AF%B4%E6%98%8E%E4%B9%A6.pdf) 操作说明书）

（<http://www.immocell.com/xbpyvideo/4240.html> 操作视频教程）

三、DAY 0-2: hESC 向中胚层诱导

(1) **DAY -1:** 当 hESC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2mL 1×室温 PBS（不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ）清洗 hESC，吸去 PBS。

(2) 加入 1mL 含 **Y-27632 (10 μM)** 的室温 **Accutase**，转移到 37℃ 5% CO_2 细胞培养箱中 3-5min，使其解离成单细胞。

(3) 3-5min 后，将干细胞传代培养基以等体积直接加入 **Accutase** 中，并使用 P-1000 吸头轻轻上下吹打细胞，制成单细胞悬液，将单细胞悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 200 g 离心 5 min。

(4) 离心结束，充分去除上清，将 1 mL 预热的 hESC/iPSC 完全培养基（含 **10 μM Y-27632**）重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。

(5) 使用自动细胞计数器计数细胞，使用台盼蓝排除死亡细胞，按 **2.5×10^5 个细胞/mL**，接种于低吸附 6 孔板中每孔最终体积为 2 mL（含 **10 μM Y-27632**），将孔板转移到 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 24 h。

(6) **DAY 0:** 24 h 后，在镜下观察，细胞球直接应在 **50 μm-100 μm** 左右。100g 离心 3min，吸去培养基，加入 2mL **心肌诱导培养基 1**（成分为：**基础培养基**，**1×补充剂 A**，**1×补充剂 B**）重悬，转移至原孔内。

(7) **DAY 1:** 使用**心肌诱导培养基 2**（成分为：**基础培养基**，**1×补充剂 A**），按步骤（6）操作换液，继续培养 24 h。

注：细胞球直径尽量控制在 **50 μm-100 μm** 附近，若过大，在分化后期将导致细胞球死亡解聚。换液时尽量不要过多吹打细胞球，除低速离心外，还可将细胞球吸至 15mL 离心管，待其自然沉降，弃上清换液。除了用低吸附板外，还可使用经过防止细胞贴壁的特殊液体润洗的板进行培养。



四、DAY 2-7: 中胚层向心肌中胚层诱导

(1) **DAY 2:** 将细胞球摇晃至中心, 缓慢倾斜一定角度, 沿着液面缓慢弃去培养基, 在不吸到细胞球的情况下尽量将培养基吸尽。每孔加入 2 mL **心肌诱导培养基 3** (成分为: **基础培养基, 1×补充剂 A, 1×补充剂 C**), 于培养箱培养 48 h。

(2) **DAY 4:** 将细胞球摇晃至中心, 缓慢倾斜一定角度, 沿着液面缓慢弃去培养基, 在不吸到细胞球的情况下尽量将培养基吸尽。每孔加入 2 mL **心肌诱导培养基 2** (成分为: **基础培养基, 1×补充剂 A**), 隔天换液, 直到 **DAY 7**。

注: 除步骤中换液方式外, 还可将细胞球吸至 15mL 离心管, 待其自然沉降, 弃上清换液, 换液时尽量不要吹打细胞球。

五、DAY 7-15: 心肌中胚层向心肌细胞诱导

(1) **DAY 7:** 将细胞球摇晃至中心, 缓慢倾斜一定角度, 沿着液面缓慢弃去培养基, 在不吸到细胞球的情况下尽量将培养基吸尽。每孔加入 2 mL **心肌成熟培养基** (成分为: **基础培养基, 1×补充剂 D**), 隔天换液, 直到 **DAY 15**。

(2) **DAY 15:** 将细胞球摇晃至中心, 缓慢倾斜一定角度, 沿着液面缓慢弃去培养基, 在不吸到细胞球的情况下尽量将培养基吸尽。每孔加入 2 mL **心肌细胞消化液**, 于培养箱中孵育 3-4 h。待单个细胞颗粒明显时, 随后使用同等体积的**心肌成熟培养基** (含 **10 μM Y-27632**) 中止消化, 吹散。

(3) 200 g 离心弃去上清, 可加入**心肌成熟培养基**重悬接种于 Matrigel 上进行维持培养, 或加入冻存液进行冻存。

注: 1、在第 8 天至第 15 天之间, 可观察到搏动的细胞。

2、消化时可将六孔的细胞球收集至 2 孔或 3 孔进行消化。冻存液可以使用 **90%FBS+10%DMSO** 或**心肌细胞冻存液** (逸漠生物, **IMC-705**) 进行冻存。

3、若进行 **2D** 维持培养, 消化时可使用**心肌细胞消化液**消化 1-2 h。

4、进行 **2D** 培养时, 若杂细胞较多, 可加入**心肌纯化培养基**进行纯化。观察纯化情况, 最长可纯化 4 天, 期间换一次液。

