

## hPSC 诱导分化肝类器官试剂盒

Cat NO: IMV-H001

### 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化肝类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到肝类器官，该类器官由肝细胞组成囊泡状结构，成熟后的类器官具有肝干细胞和肝祖细胞的双表型特征。

本试剂盒需要操作人员具有 hPSC 培养经验，对类器官具有一定了解。

### 实验仪器、材料

仪器：生物安全柜、细胞培养箱、水平式离心机、倒置显微镜、低温冰箱

材料：细胞培养板（规格为：6 孔、12 孔、24 孔）、离心管（规格为 15 mL 和 50 mL）、移液器（规格为 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1000  $\mu$ L）、无菌吸头（规格为 10  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L）、移液管（规格为 10mL、50mL）

### 实验试剂

培养阶段	产品货号	产品名称	产品规格	储存
1 阶段	IMV-H01	基础培养基 1	19.798ml	-20 $^{\circ}$ C, 12 个月
	IMV-H01-A	补充剂 A	200ul	-20 $^{\circ}$ C, 6 个月
	IMV-H01-B	补充剂 B	2ul	-20 $^{\circ}$ C, 6 个月
2 阶段	IMV-H02	基础培养基 2	19.9ml	-20 $^{\circ}$ C, 12 个月
	IMV-H02-C	补充剂 C	100ul	-20 $^{\circ}$ C, 6 个月
3 阶段	IMV-H03	基础培养基 3	194.1ml	-20 $^{\circ}$ C, 12 个月
	IMV-H03-D	补充剂 D	5.9ml	-20 $^{\circ}$ C, 6 个月



		Matrigel	5ml	-20℃, 6 个月
--	--	----------	-----	------------

## 实验内容与方法

### 1、hPSC 分化为内胚层细胞 (DE)

- (1) 取 5.938mL 基础培养基 1+60μL 补充剂 A+2μL 补充剂 B 配成 DE 分化培养基①, 可同时培养 6 孔板的 3 个孔;
- (2) 基质胶在 4℃ 下解冻, 与 DMEM/F12 均匀混合, 铺板, 备用。
- (3) 当 hiPSC 的汇合度达到 75%-85%, 吸去培养基, 用 2mL 1x 室温 PBS (不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) 清洗 hiPSC, 吸去 PBS。
- (4) 加入 1mL 的室温 hESC/iPSC Passage Solution (含 10 μM Y-27632), 转移到 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 5 min, 使其解离成单细胞。
- (5) 5 min 后, 吸去 hESC/iPSC Passage Solution, 加入等体积的 hESC/iPSC 完全培养基 (含 10 μM Y-27632), 并使用 P-1000 吸头轻轻上下吹打细胞, 制成单细胞悬液, 使用自动细胞计数器计数细胞, 使用台盼蓝排除死亡细胞。将细胞单悬液收集到 15mL 离心管中, 室温下 300 g 离心 5 min。
- (6) 从基质胶包被的板中小心地抽吸包被液而不损坏基质胶涂层表面。
- (7) 离心结束, 充分去除上清, 用 1mL DE 分化培养基①重悬细胞, 轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。
- (8) 将细胞悬液转移到包被的孔中, 加入 1mL DE 分化培养基①, 使孔中的体积达到 2mL;
- (9) 24h 后 (第 1 天), 13.86mL 基础培养基 1+140μL 补充剂 A 配成 DE 分化培养基②, 可同时培养 6 孔板的 3 个孔, 吸去培养基, 并加入 2mL DE 分化培养基②, 连续培养 2 天。
- (10) 第 3 天换 HS 培养基前可取一孔进行内胚层指标检测。

### 2、DE 诱导分化为肝特化谱系细胞(HS)

- (1) 第 3 天, 将 19.9mL 基础培养基 2 与 100μL 补充剂 C 充分混合, 配制成 HS 培养基, 可同时培养 6 孔板的 2 个孔, 从培养物中抽吸培养基, 在 6 孔板中每孔用 2 mL 1x 室温 PBS (不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) 清洗培养物, 然后从孔中移除 PBS, 每孔加入 2 mL HS 培养基。
- (2) 将培养板放入 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 24h 更换一次培养基, 连续培养 5 天。



(3) 第 8 天胶埋前可取一孔进行 HS 指标检测。

### 3、HS 诱导分化为 3D 肝类器官（以 24 孔板 6 个孔为例）

(1) 第 8 天，将 194.1mL 基础培养基 3+5.9mL 补充剂充分混合，配制成 3D 肝类器官培养基，分装保存

(2) 在冰上解冻基质胶，并将移液器吸头提前置于-20℃冰箱中。

(3) 吸出 HS 培养基，用 2mL 1x 室温 PBS（不含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>）洗涤 1 次。

(4) 加入含 10μM Y-27632 的室温 EDTA 并在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 min；5 min 后吸去 EDTA，每孔加入 1mL 恢复室温的 DMEM/F12（含 10μM Y-27632），轻轻吹打细胞，使细胞脱离孔底。

(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。

(6) 将细胞悬液收集到 15 mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min，吸出培养基并将细胞重悬于冷基质胶中，以 3000-10000 个细胞/孔的密度包埋在 30-50μL 基质胶中，将基质胶与细胞一起置于冰上。

(7) 将 200μL 基质胶/细胞混合物按每孔 30μL 接种到 24 孔板中。

(8) 将板置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 20-30 分钟使基质胶凝固。

(9) 每孔加入 700μL 3D 肝类器官培养基进行长期培养，每隔一天更换培养基，7-10 天传代。

### 4、3D 肝类器官传代

(1) 取出冷冻的基质胶置于 4℃ 解冻，并提前将枪头放置在-20℃预冷 1h；

(2) 吸除培养基，加入 1mL 预冷的 PBS 溶解基质胶，将混合液转移到 1.5mL EP 管中，300g 离心 5min，去除上层的 PBS 和基质胶；

(3) 加入 1mL Tryple express，吹打 5-8 次，使类器官与 Tryple express 充分接触，接着转移到培养箱中，静置解离 5min；

(4) 5min 后取出 EP 管，300g 离心 5min，去除上清，再加入 1ml DMEM/F12，吹打孔中混合物 40-50 次，使类器官团彻底解离成单细胞，离心，去上清；

(6) 用预冷枪头按每孔 30μL 的量在离心管中加入适量的基质胶，吹打 5-8 次，均匀混合单细胞-基质胶，注意吹打过程中避免产生气泡；

(7) 将提前放在培养箱中的 24 孔板取出，在孔中心位置加入 30μL 胶滴，缓慢打入混合液时，逐渐向上移动枪头，使细胞均匀分布在胶中；



- (8) 将培养板放在培养箱中，20-30min，使胶滴凝固；
- (9) 小心沿孔壁加入 700 $\mu$ L 恢复室温的 3D 肝类器官培养基，注意不要碰到胶滴；
- (10) 将孔板放到培养箱中，继续培养，每隔 1 天换液一次（可周一、周三、周五换液，周五可添加至 800 $\mu$ L，周六、周日不换液），1 周左右传代一次。
- (11) 肝类器官成熟后可进行染色鉴定或肝祖细胞/肝干细胞检测。

