

Human iPSC-Derived Liver Organoid Kit (HiPSC 肝脏类器官试剂盒)

货号: HiLVO-K500

产品介绍:

HiPSC 肝脏类器官试剂盒是一款用于从人多功能干细胞诱导分化成肝脏类器官的试剂盒,可以在体外培养环境下重现肝脏与胆管结构。构建好的肝脏类器官包含肝细胞(CYP3A4)、胆管细胞(CK7)和其他构成肝脏的关键细胞类型,可用于各种病理相关的肝脏功能障碍的研究,也可用于药物毒性筛选。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human iPSC-Derived Liver Organoid Differentiation Medium	HiLVO-K500	100 mL	4℃, 6个月
Supplement A (50X)		2 mL	-20℃, 1年
Supplement B (50X)		2 mL	-20℃, 1年
Supplement C (50X)		2 mL	-20℃, 1年
Human iPSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium		200mL	4℃, 6个月
Supplement D (50X)		4 mL	-20℃, 1年
Human iPSC-Derived Liver Organoid Maturity Medium		200 mL	4℃, 6个月
Supplement E (50X)		4 mL	-20℃, 1年

其他需准备的试剂信息:



试剂名称	厂家	货号
hiPSC 完全培养基	STEM CELL	85850
hiPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
hiPSC细胞解离液	Gibco	12605010
类器官专用基质胶	SHRbio	OEM-10
类器官传代消化液	SHRbio	OPD-100
DPBS	-	-

HiPSC 肝脏类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 HiPSC 肝脏类器官完全培养基。以下是准备 iPSC 诱导为肝脏类器官的分化培养基、扩增培养基和成熟培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Supplement A (50X), Supplement B (50X), Supplement C (50X), Supplement D (50X), Supplement E (50X)。

注意: 解冻后，建议将Supplement A (50X), Supplement B (50X), Supplement C (50X), Supplement D (50X), Supplement E (50X)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将40μL Supplement A (50X)加至1.96mL Human iPSC-Derived Liver Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成2mL人肝类器官分化培养基 a。
3. 将200μL Supplement B (50X)加至9.8mL Human iPSC-Derived Liver Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成10mL人肝类器官分化培养基 b。
4. 将160μL Supplement C (50X)加至7.84mL Human iPSC-Derived Liver Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成8mL人肝类器官分化培养基 c。
5. 将200μL Supplement D (50X)加至9.8mL Human iPSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium 中，充分混合，配制成10mL人肝类器官扩增培养基。
6. 将200μL Supplement E (50X)加至9.8mL Human iPSC-Derived Liver Organoid Maturity Medium 中，充分混合，配制成10mL人肝类器官成熟培养基。

注意: 配制后的培养基可在2-8℃储存，建议现配现用，配置好的培养基在尽量三天内用完。Human iPSC-



Derived Liver Organoid Differentiation Medium、Human iPSC-Derived Liver Organoid Expansion Medium和 Human iPSC-Derived Liver Organoid Maturity Medium 内含有细菌及真菌抗生素。

HiPSC 肝脏类器官的诱导培养

提前复苏 hiPSC，传代两代以后，即可使用人肝类器官分化培养基进行诱导培养，具体步骤如下：

1、hiPSC 分化为内胚层细胞 (DE)

- (1) 4°C下解冻hiPSC培养专用基质胶，配置工作液后铺板，备用。
- (2) 当 hiPSC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2mL DPBS 室温清洗一次。
- (3) 吸去上清，加入 0.5 mL 的已放至室温的 hiPSC 细胞解离液，转移到 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱中 2-3 min，使其解离成单细胞。

(4) 吸去上清，加入等体积的 hiPSC 完全培养基，并使用 P-1000 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：台盼蓝染色活细胞比例在90%以上，6孔板需要的接种细胞数量为 $6 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ /孔。

- (5) 将单细胞悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 300g 离心 3 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，加入 1mL 人肝类器官分化培养基 a 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 6 孔板中，每孔继续加入 1mL 人肝类器官分化培养基 a，使孔中的体积达到 2mL。

(9) 24h 后 (第 1 天)，吸去培养基，并加入 2mL 人肝类器官分化培养基 b，每 24h 更换一次培养基，连续培养 5 天。

2、DE 诱导分化为肝内胚层 (HE)

- (1) 第 5 天，从培养物中抽吸培养基，并加入 2 mL DPBS 室温清洗培养物，然后从孔中移除 DPBS。
- (2) 每孔加入 2 mL 人肝类器官分化培养基 c，将培养板放入 37°C 5%CO₂ 培养箱中培养，每 24 h 更换一次培养基，连续培养 4 天。

3、HE 诱导分化为 3D 肝类器官

- (1) 第 9 天，配制人肝类器官扩增培养基。
- (2) 在冰上解冻基质胶，并将移液器吸头提前置于-20°C冰箱中。
- (3) 吸出人肝类器官分化培养基 c，用已放置室温的 DPBS 洗涤 1 次。
- (4) 加入细胞解离液并在 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 min。
- (5) 吸去细胞解离液，每孔加入 1mL 恢复室温的 hiPSC 完全培养基终止消化，轻轻吹打细胞，使细胞脱离孔底。取少部分细胞悬液使用台盼蓝染色确定细胞活性 (活细胞比例在 90%以上) 并计数。



- (6) 将细胞悬液收集到 15 mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min，吸去培养基。
 - (7) 将细胞重悬于冷的基质胶中，吹打混匀后以 20000-30000 个细胞/孔的密度包埋在 30-50 μ L 基质胶中。
- 注意：**基质胶的浓度需在 70%以上，吹打过程中应避免产生气泡，尽量在 30s 内完成。
- (8) 将基质胶与细胞混合物按每孔 30 μ L 接种到 24 孔板的孔中心位置。
 - (9) 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中 15-30 min，使基质胶凝固。
 - (10) 小心沿孔壁加入 500 μ L 人肝类器官扩增培养基进行长期培养，注意不要碰到胶滴。
 - (11) 将孔板放到培养箱中，继续培养，每隔一天更换培养基，7-10 天后可进行传代。

HiPSC 肝脏类器官的传代培养

- (1) 取出冷冻的基质胶置于 4 $^{\circ}$ C 解冻，并提前将枪头放置在 -20 $^{\circ}$ C 预冷 1h。
- (2) 吸除培养基，加入 1mL 预冷的 DPBS 溶解基质胶，将混合液转移到 1.5mL EP 管中，300g 离心 3min，去除上层的 DPBS 和基质胶后，使用预冷的 DPBS 再次清洗去胶。
- (3) 类器官从基质胶中分离出来后，加入 0.5mL 的类器官传代消化液，通过吹打混匀使类器官与传代消化液充分接触，接着转移到培养箱中，静置解离 2min 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 3min，去除上清，用预冷枪头加入适量的基质胶（传代比例为 1: 3），混合均匀。

注意：基质胶的浓度需在 70%以上，吹打过程中应避免产生气泡，尽量在 30s 内完成。

- (5) 将基质胶与细胞混合物按每孔 30 μ L 接种到 24 孔板的孔中心位置。
- (6) 将培养板倒置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中 15-30min，使基质胶凝固。
- (7) 小心沿孔壁加入 500 μ L 恢复室温的人肝类器官扩增培养基，注意不要碰到胶滴。
- (8) 将孔板放到培养箱中，继续培养，每隔 1 天换液一次，1 周左右传代一次。

HiPSC 肝脏类器官的成熟分化

在传代后扩增培养的第14天，加入人肝类器官成熟培养基进行成熟分化，步骤如下：

1. 配制人肝类器官成熟培养基。
2. 在避免破坏基质胶的情况下，小心从待分化孔中吸出所有培养基，然后加入500 μ L已配制好的成熟培养基。
3. 每2~3天更换一次培养基，在分化培养基中持续培养至第10天即可完全分化为成熟肝类器官，并可收获用于免疫染色或功能分析等。

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。



附录1 HiPSC肝脏类器官构建流程



图1 hiPSC肝脏类器官构建流程图

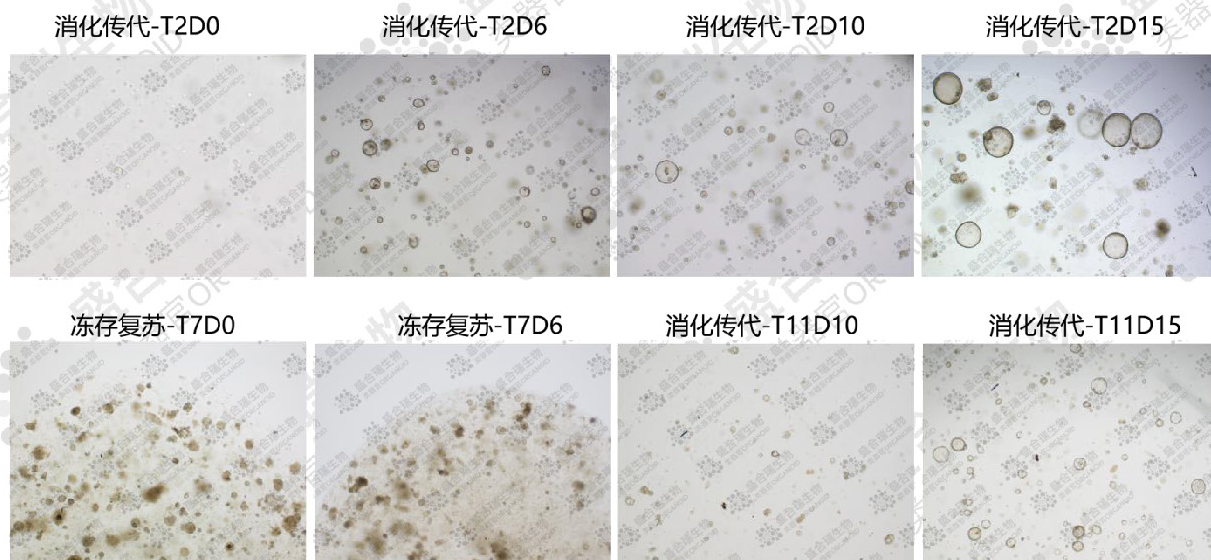


图2 hiPSC肝脏类器官的传代与复苏生长示意图

附录2 HiPSC肝脏类器官鉴定图

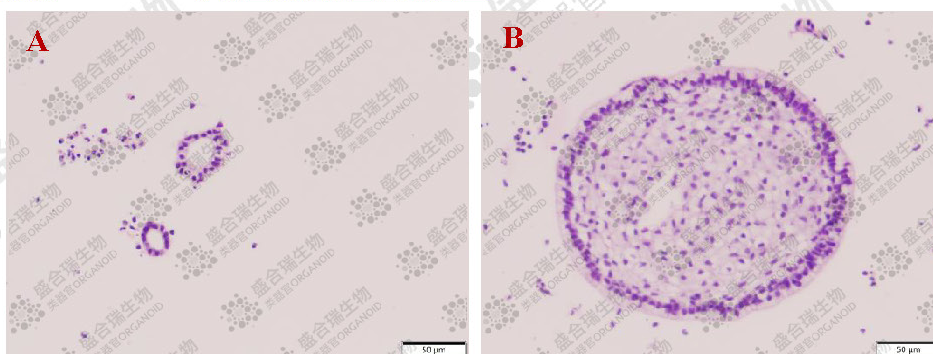


图3 hiPSC肝脏类器官HE染色鉴定

分别对扩增期 (A) 和成熟分化 (B) 的肝脏类器官进行HE染色观察病理结构。比例尺: 50 μ m。



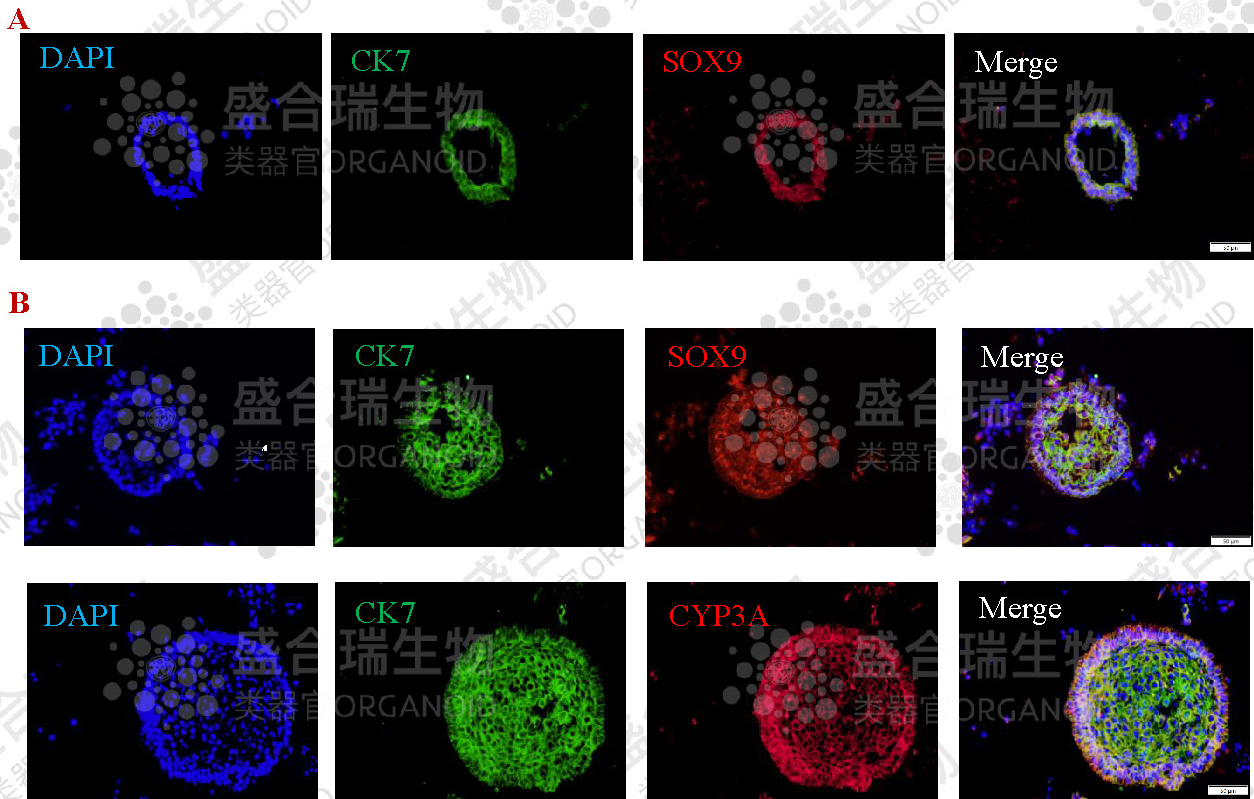


图4 hiPSC肝脏类器官免疫荧光染色鉴定

分别对扩增期 (A) 和成熟分化 (B) 的肝脏类器官进行免疫荧光染色。其中, SOX9用于标记肝祖细胞, CK7用于标记胆管细胞, CYP3A4用于标记肝细胞。比例尺: 50μm。

