Plurioid™ Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit（Plurioid™ hPSC 心脏类器官试剂盒）

货号：HiCAO-K160

产品介绍

Plurioid™ hPSC心脏类器官试剂盒是一款专为诱导人多能干细胞（hPSC）定向分化为功能性心脏类器官而开发的实验试剂。本试剂盒能够在体外快速构建包含心肌细胞、心脏成纤维细胞等多种功能性细胞组分的三维类器官模型。该模型可自发形成空腔结构并产生稳定节律性搏动，高度重现了天然心脏的关键生理特征，为心脏疾病机制研究、药物心脏毒性评估及心血管药物筛选 等研究领域提供了高度仿真的实验平台。

本试剂盒规格为 1 miniKit，预计可生成 45 个心脏类器官，需要操作人员具有 hPSC 培养经验，并对类器官具有一定了解。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium	HiCAO-K160	8 mL	4℃，6个月
Supplement A (5×)		1 mL×2	-20℃，12个月
Supplement B (100×)		50 μL	-20℃，12个月
Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium		150 mL	4℃，6个月
Supplement C (50×)		550 μL	-20℃，12个月
Supplement D (50×)		250 μL	-20℃，12个月

Supplement E (50×)		150 µL	-20℃，12个月
Supplement F (50×)		150 µL	-20℃，12个月
Supplement G (50×)		1 mL×2	-20℃，12个月

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
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
hPSC培养专用基质胶	CORNING	354277
DPBS	-	-

hPSC 心脏类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备 hPSC 心脏类器官完全培养基。以下是准备将 hPSC 诱导为心脏类器官的拟胚体诱导培养基 a，心脏类器官诱导培养基 b，以及心脏类器官分化培养基 c，d，e，f，g 的配制示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 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 °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，建议分装后置于2-8°C按需保存取用，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。

2. 将 1 mL Supplement A (5×)和 50 µL Supplement B (100×)加至 3.95 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium 中，充分混合，配制成 5 mL 拟胚体诱导培养基 a。

3. 将 1 mL Supplement A (5×)加至 4 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium 中，充分混合，配制成 5mL 心脏类器官诱导培养基 b。

4. 将 200 μL Supplement C (50×)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成 10 mL 心脏类器官分化基础培养基 c。

5. 将 100 μL Supplement D (50×)和 100 μL 类器官专用基质胶（OEM-10）加至 4.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成 5 mL 心脏类器官分化培养基 d。

注意: 类器官专用基质胶（OEM-10）室温下易凝固。可提前将100 μL Supplement D (50×) 添加至4.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium中配制基础混合液，4℃保存备用，使用前回温至室温。临使用心脏类器官分化培养基d时加入100 μL类器官专用基质胶（OEM-10），充分混匀。心脏类器官分化培养基d需现配现用。

6. 将100 μL Supplement E (50×)加至4.9 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium中，充分混合，配制成5 mL心脏类器官分化培养基e。

7. 将 100 μL Supplement F (50×)加至 4.9 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成 5mL 心脏类器官分化培养基 f。

8. 将 200μL Supplement G (50×)加至 9.8 mL Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium 中，充分混合，配制成 10 mL 心脏类器官分化培养基 g。

注意: 配制好的各种培养基可在2-8°C储存不超过3天，建议现配现用。Human PSC-Derived Cardiac Organoid Induction Medium和Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium内含有细菌及真菌抗生素。

hPSC 心脏类器官的诱导培养

提前复苏 hPSC，传代两代以后，即可使用各阶段培养基进行诱导培养，具体步骤如下：

1、拟胚体诱导（耗时 2 天）

Day -2：

（1）当 hPSC 的汇合度达到 75%-85%，吸去培养基，用 2 mL DPBS室温清洗一次。

（2）吸去上清，加入 0.5 mL 预热至室温的 hPSC 传代消化液，覆盖底面，转移到 37 ℃ 5%CO_2 细胞培养箱中孵育 1-2 min。

（3）吸去上清，加入1 mL的拟胚体诱导培养基a，并使用P1000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: 待克隆边缘细胞出现收缩即可终止消化，台盼蓝染色活细胞比例建议在90%以上。

（4）将单细胞悬液300 *g*离心3 min，离心结束后小心取出离心管，避免扰动管底细胞沉淀，使用移液器轻柔、彻底吸弃管内全部上清废液，全程尽量贴近液面缓慢吸取，防止吸走底部细胞。随后向离心管内加入适量拟胚体诱导培养基a，轻轻吹打重悬管底细胞沉淀，吹打过程中动作温和均匀，避免产生气泡、损

伤细胞，充分打散细胞团直至形成均匀的单细胞悬液。最后采用细胞计数仪或血球计数板精准测定细胞浓度，根据计数结果补加适量拟胚体诱导培养基a，将细胞悬液浓度精准调整至1×10^{5}个/mL，备用。按100 μL/孔接种10000个细胞至96孔U底超低吸附板。在水平孔板离心机内300 *g*离心5 min后细胞聚集成球状。之后将孔板转移到37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养24 h。

注意： 建议接种至孔板中心的45个孔，周围孔补加DPBS，以减少蒸发。一个孔生成一个类器官。

Day -1：

（6）吸去旧培养基，每孔加入 100 μL 心脏类器官诱导培养基 b，在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中继续孵育 24 h。此时球体开始出现明显边界，如图 1。

图 1. 使用盛合瑞生物 Plurioid™ Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit 诱导人多能干细胞（hPSC）形成拟胚体的代表性结果。可成功定向分化为功能性心脏类器官的拟胚体应具备边界清晰、形态圆润的特征；拟胚体周边少量零散的细胞碎片可于后续培养步骤中洗涤去除。

2、心脏中胚层分化（耗时6天）

Day 0：

(1) 使用剪去尖端的黄色枪头将每个球体吸出至5 mL EP管中，自然沉降，加入DPBS，洗两遍。之后，使用Human PSC-Derived Cardiac Organoid Differentiation Medium清洗2遍，再使用心脏类器官分化培养基c清洗一遍，自然沉降后去除上清。

注意： 清洗过后，球体周围碎细胞减少。

(2) 于EP管中加入2-3 mL心脏类器官分化培养基d重悬球体。

(3) 使用DPBS清洗第一阶段使用的96孔U底超低吸附培养板。

(4) 用心脏类器官分化培养基d重悬球体再次接种至先前使用的96孔U底超低吸附培养板中，一个孔一个球体。每孔心脏类器官分化培养基d补加至250 μL。

注意： ①将类器官只种在板子的中心孔，周围一圈补加200 μL PBS，以减少中心孔的培养基蒸发；②每次接触类器官以及培养基的枪头，都需要用类器官润洗液（OMR-100）润洗一遍，以减少枪头上的杂质带入类器官内生长。

Day 1：

（4）吸去166 μL培养基/孔，补加166 μL心脏类器官分化培养基c/孔。

Day 2：

（5）继续吸去166 μL培养基/孔，补加入166 μL心脏类器官分化培养基e。

注意： 球体开始生长变大。

Day 4-6：

（6）继续吸去166 μL培养基/孔，补加入166 μL心脏类器官分化培养基c/孔。Day 6进行相同操作。一般在第3-4天可以观察到内部开始出现空腔，如图2。

注意： 球体内部出现逐渐变大的空腔。

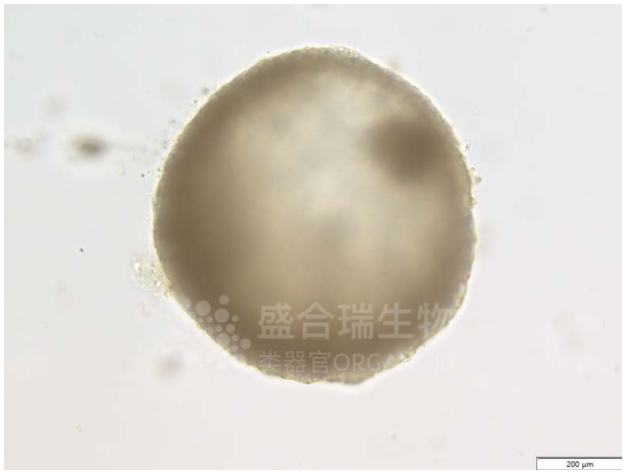

图 2. 盛合瑞生物 Plurioid™ Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit 介导心脏中胚层分化的代表性图像。自分化第 2 天（Day 2）起可观察到球体体积增大；在分化第 3-4 天（Day 3-4），球体内部可见逐步扩张的空腔结构。

4、心脏类器官分化及成熟

Day 7:

（1）配制心脏类器官分化培养基f和心脏类器官分化培养基g

（2）吸去166 μL 培养基/孔，补加入166 μL心脏类器官分化培养基f/孔。

（3）于细胞培养箱培养1 h后，继续吸去166 μL 培养基/孔，补加入166 μL心脏类器官分化培养基g/孔

Day 8-30:

（4）于Day 8 吸去166 μL 培养基/孔，补加入166 μL心脏类器官分化培养基g/孔。之后每2-3天如此操作，补加一次心脏类器官分化培养基g。约10-15天左右能看到心脏跳动，心脏类器官变得更加厚实，如图3。

注意： 约于Day 10-15天左右观察到跳动。

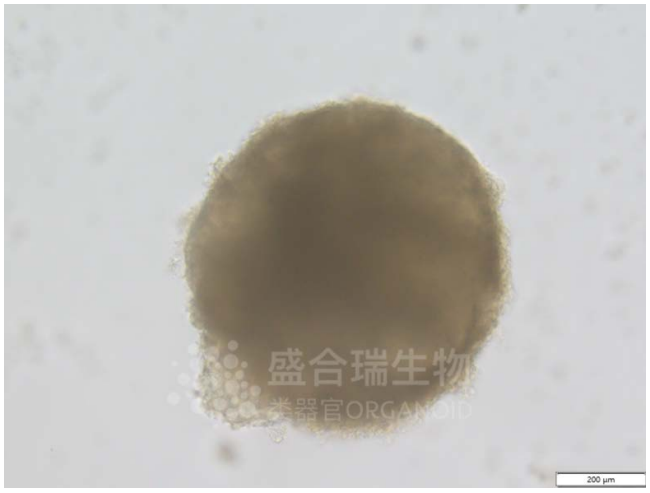

图 3. 盛合瑞生物 Plurioid™ Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit 介导心脏类器官分化与成熟的代表性图像。

自分化第 7 天（Day 7）起，球体结构上外壁逐步增厚；分化第 10-15 天（Day 10-15）球体开始出现自主搏动；至分化第 15 天（Day 15）左右，搏动频率接近人类心脏生理跳动频率。

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 Cardiac organoids were prepared from hPSCs with Human PSC-Derived Cardiac Organoid Kit （HiCAO-K160， Plurioid™ SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer instructions.

附录1 hPSC心脏类器官构建流程

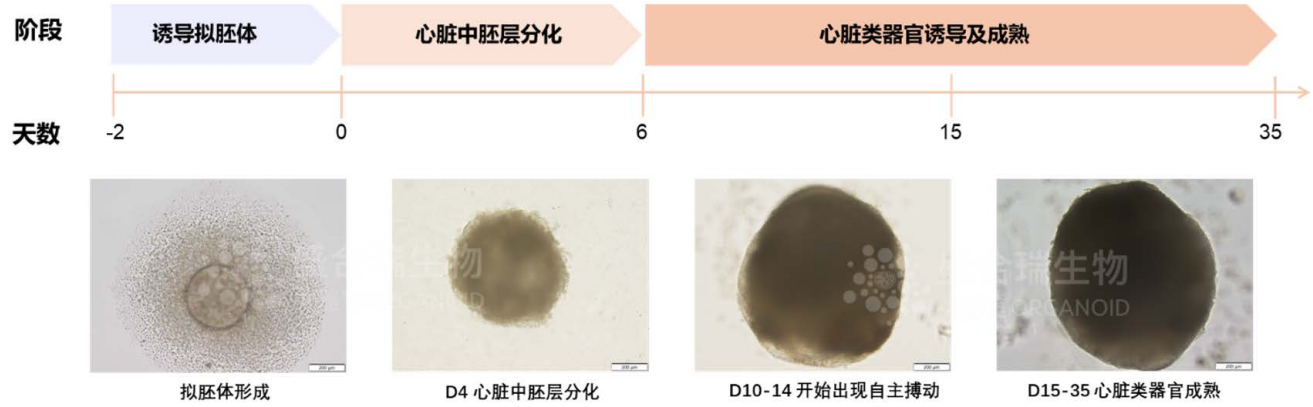

图4 hPSC心脏类器官构建流程图

附录2 hPSC心脏类器官鉴定图

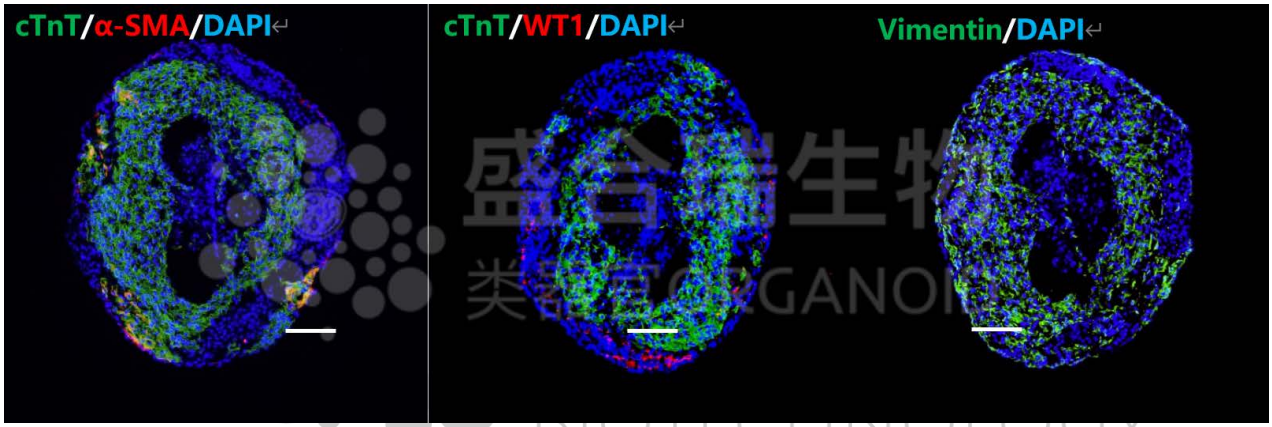

图5 hPSC心脏类器官免疫荧光染色鉴定

分别对成熟心脏类器官进行免疫荧光染色。其中，cTnT用于标记心肌细胞，α-SMA用于标记血管平滑肌细胞，WT1用于标记心外膜细胞，Vimentin用于标记心脏成纤维细胞。比例尺：50 μm。