

# hPSC 诱导分化内皮细胞试剂盒

Cat NO : IMI-EC01

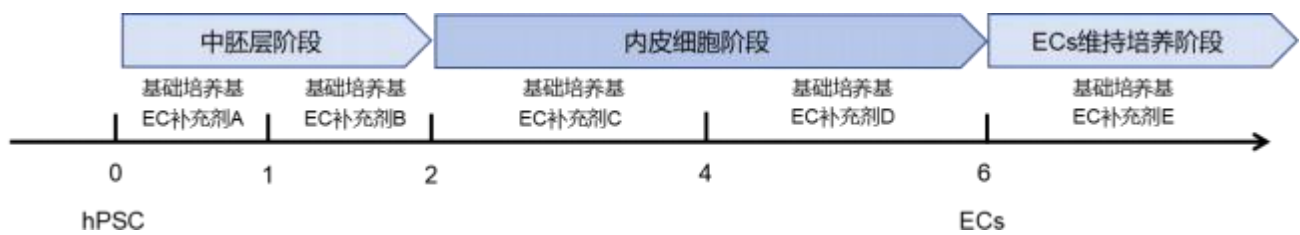
## 产品描述

本试剂盒专为人诱导多能干细胞（hPSC）高效定向分化为内皮细胞（Endothelial Cells, ECs）而设计，提供标准化、无血清、化学成分明确的培养体系，适用于疾病模型构建、药物筛选及细胞治疗研究，获得的 ECs 能表达特异性标志物（如 PECAM , VE-Cadherin 等），并且能够形成血管，适用于体外研究。

本产品需要操作人员具有细胞培养经验，对内皮细胞培养具有一定了解。

以六孔板为例，本产品提供的规格可供 10 个孔的 hPSC 诱导分化，最终可获得至少 $2.5\times10^7$  细胞量的内皮细胞，以及可供获得的内皮细胞扩增一代。

## 本产品分化流程图



hPSC：人多能干细胞；ECs：内皮细胞

## 产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

| 产品名称            | 产品规格   | 储存           |
|-----------------|--------|--------------|
| 基础培养基           | 240 mL | 2℃-8℃， 12 个月 |
| EC 补充剂 A (50×)  | 200 μL | -20℃， 6 个月   |
| EC 补充剂 B (100×) | 100 μL | -20℃， 6 个月   |
| EC 补充剂 C (50×)  | 400 μL | -20℃， 6 个月   |
| EC 补充剂 D (50×)  | 400 μL | -20℃， 6 个月   |
| EC 补充剂 E (50×)  | 3.6 mL | -20℃， 6 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 EC 补充剂 A（50×）需添加进基础培养基使其稀释 50 倍，使得补充剂终浓度为 1×，配成诱导培养基 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 |
| DMEM/F12 培养基              | 逸漠生物     | IMC-205   |
| Matrigel                  | Corning  | 354277    |
| Accutase                  | STEMCELL | 07920     |
| 无血清细胞冻存液                  | 逸漠生物     | IMC-701   |
| PBS                       | 逸漠生物     | IMC-401   |
| 6 孔细胞培养板                  | 硕华生物     | N/A       |
| 15 mL/50 mL 离心管           | 硕华生物     | N/A       |
| 10 μL/200 μL/1000 μL 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      |
|------------|-----------|---------------|
| 中胚层阶段      | 诱导培养基 1   | 基础培养基         |
|            |           | EC 补充剂 A (1×) |
|            | 诱导培养基2    | 基础培养基         |
|            |           | EC 补充剂 B (1×) |
| 内皮细胞阶段     | 诱导培养基3    | 基础培养基         |
|            |           | EC 补充剂 C (1×) |
|            | 诱导培养基4    | 基础培养基         |
|            |           | EC 补充剂 D (1×) |
| 内皮细胞维持培养阶段 | 内皮细胞维持培养基 | 基础培养基         |
|            |           | EC 补充剂 E (1×) |

(1) 在 4℃解冻 补充剂 A、B、C、D、E，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。例如诱导培养基 1 组成为基础培养基、1×浓度的 EC 补充剂 A，若用量为 10mL，配制方法为 9.8mL 基础培养基+200 μL 补充剂 A（50×）。

(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 0-7:神经外胚层阶段



(1) 基质胶在 4℃下解冻，与 DMEM/F12 均匀混合（**基质胶:DMEM/F12=1:100**），铺板，备用。

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

(3) 加入 1mL 含 **Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ )** 的室温 **Accutase**，转移到 37℃ 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 3-5min，使其解离成单细胞。

(4) 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，将细胞单悬液收集到 15mL 离心管中，室温下 300 g 离心 5 min。

(5) 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。

(6) 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  $\mu\text{M}$  Y-27632**）重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。

(7) 按  $2.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 密度接种到步骤 1 制备的基质胶包被的板上，在 6 孔板中每孔最终体积为 2 mL（含 **10  $\mu\text{M}$  Y-27632**），将孔板转移到 37℃、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 6 孔板。标记为 Day -2，持续培养 48 小时（每天换液，换液培养基不含 **10  $\mu\text{M}$  Y-27632**）。

(8) **DAY 0:** 吸去培养基，并加入 2mL 诱导培养基 1（成分为：**基础培养基，1×EC 补充剂A**）培养 24 小时。

(9) **DAY 1:** 吸去培养基，并加入 2mL 诱导培养基 2（成分为：**基础培养基，1×EC 补充剂B**）培养 24 小时。

**注：基质胶使用时需在冰上操作，所有与基质胶直接接触的物品需提前预冷，基质胶超过 10℃将迅速凝固，导致铺板失败。**

#### **四、DAY 2-6:内皮细胞阶段**

(1) **DAY 2:** 第 2 天，使用 2mL 预热的诱导培养基 3（成分为：**基础培养基，1×EC 补充剂C**）换液。

(2) 根据培养基颜色每天或隔天使用诱导培养基 3 换液，直到第 4 天。

(3) **DAY 4:** 第 4 天，使用 2mL 预热的诱导培养基 4（成分为：**基础培养基，1×EC 补充剂D**）换液。

(4) 根据培养基颜色每天或隔天使用诱导培养基 4 换液，直到第6 天。

注：注意每天观察培养基颜色及时换液。

## 五、内皮细胞维持培养阶段

(1) **DAY 6:** 第 14 天，从培养物中抽吸培养基，在 6 孔板中每孔用2 mL1×室温 PBS（不含  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ）清洗培养物，吸去 PBS。

(2) 每孔加入 1mL 的室温 **Accutase**，将培养物置于37℃ 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育2-5 min。

(3) 细胞解离后使用等体积的 DMEM/F12 中止消化，室温下 300g 离心 3 min，仔细抽吸上清液，不干扰细胞，用 1mL 恢复室温的内皮细胞维持培养基（成分为：内皮细胞维持基础培养基，1×EC 补充剂E）重悬细胞，轻轻地上下移液以确保单细胞溶液均匀。

(4) 以 1：3 比例接种在基质胶包被的板上传代，每 2-3 天换一次液，当密度达到90%左右可按上述步骤传代，或使用**逸漠生物无血清细胞冻存液**冻存。