

hPSC 诱导分化心肌细胞试剂盒使用说明

Cat NO: IMI-CM01

产品描述

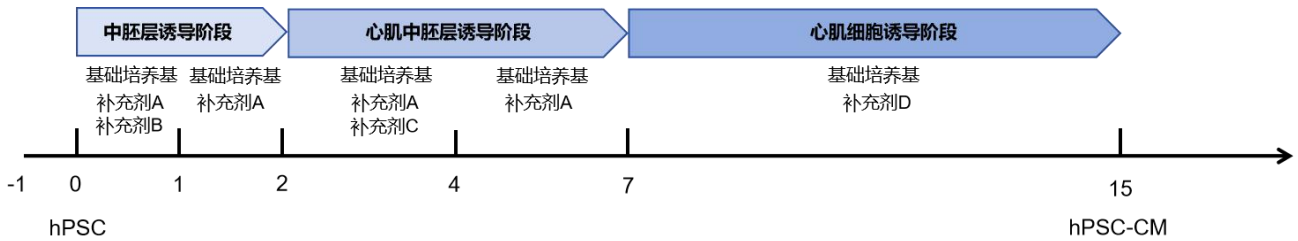
本产品为人多能干细胞向心肌细胞诱导分化试剂盒，分化获得的心肌细胞具有搏动能力，能表达特异性标志物（如 Cardiac Troponin T 等），适用于体外研究。

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。

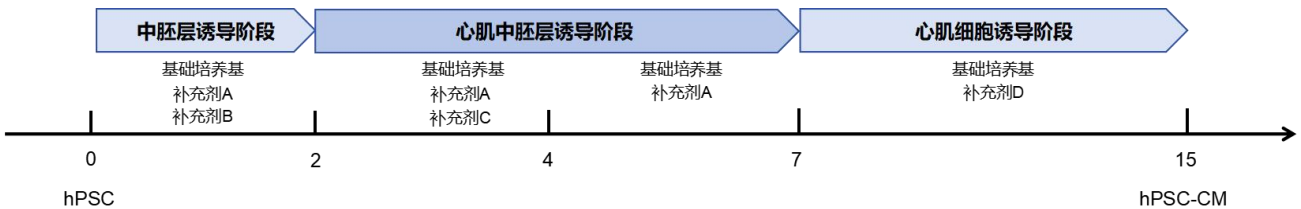
以六孔板为例，本产品提供的规格可供 6 个孔的 hPSC 诱导分化，对于静态悬浮诱导，最终可获得至少 3×10^6 个心肌细胞，对于贴壁诱导最终可获得至少 7.5×10^6 个心肌细胞。

本产品分化流程图

对于悬浮诱导：



对于贴壁诱导：



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-M001BM	基础培养基	270 mL	2°C-8°C, 12 个月
IMI-M001A	补充剂 A (50×)	5.4 mL	-20°C, 12 个月
IMI-M001B	补充剂 B (1000×)	500 μL	-20°C, 6 个月
IMI-M001C	补充剂 C (50×)	720 μL	-20°C, 6 个月

IMI-M001D	补充剂 D (25×)	5.8 mL	-20℃, 6 个月
IMI-M001X	心肌细胞消化液	10 mL	-20℃, 6 个月
IMI-M001M	心肌纯化培养基	25 mL	2℃-8℃, 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 (1000×) 需添加进基础培养基使其分别稀释 50 倍以及 143 倍，使得补充剂 A 终浓度为 1×，补充剂 B 终浓度为 7×，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	-	IMC-014
hESC (H1)	-	IM-H522
hESC/iPSC 传代工作液	-	IMC-014-E
Y-27632	-	IMC-014-Y
RPMI-1640 基础培养基	-	IMC-202
Matrigel (生长因子减量)	Corning	356231
Laminin 521	恺佳	LMN-HM522
Accutase	STEMCELL	07920
心肌细胞冻存液	-	IMC-705
PBS	-	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 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 (7×)
	心肌诱导培养基 2 (悬浮诱导)	基础培养基
		补充剂 A (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×)
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 7×浓度的补充剂 B，若用量为 12 mL，配制方法为 11.676 mL 基础培养基+240 μL 补充剂 A (50×)+84 μL 补充剂 B (1000×)。

(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、DAY 0-2: hESC 向中胚层诱导

对于悬浮诱导：

(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°C 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 - 1×10^6 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°C、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 24 h。

(6) **DAY 0:** 24 h 后，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，7×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：①对于一般细胞株，其细胞球初始直径尽量控制在 **50 μm -100 μm** 附近，若过大，可转移至摇床（60 rpm）上分化，避免细胞球之间融合粘连。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。

②若想提高产量，可以增加细胞接种量全程在转速 60rpm 摇床上分化，但是要求形成的细胞球初始直径控制在 **100 μm -300 μm** 左右（一般初始接种量为 1×10^6 个细胞/mL）。

③由于不同细胞株呈现的生长特性不同，因此不同细胞株所需的最初接种密度可能不同，需自行探究，对于绝大多数细胞株，静态培养接种量为 2.5×10^5 个细胞/mL，生长一天可达到 **50 μm -100 μm** 左右。对于部分敏感细胞，接种密度可增加至 1×10^6 个细胞/mL。

④特别注意要防止细胞球之间粘连。

⑤补充剂 **B 7×** 的浓度适用于绝大多数细胞分化，若分化失败，可在 **5×-15×** 范围内探究最佳浓度（推荐在 12 孔板或 24 孔板上进行浓度梯度探究）。

对于贴壁诱导：

(1) hESC 按照《hESC/iPSC 细胞培养试剂盒使用说明书》步骤传代至 **laminin521 或生长因子减量基质胶** 包被的六孔板上。

(2) **DAY 0**: 当 hESC 的汇合度达到 95%以上时培养基换为 2mL **心肌诱导培养基 1** (成分为: **基础培养基, 1×补充剂 A, 7×补充剂 B**),

(3) 培养 48h, 中途观察培养基颜色若变黄则及时使用**心肌诱导培养基 1** 换液。

注: 补充剂 **B 7×**的浓度适用于绝大多数细胞分化, 若分化失败, 可在 **5×-15×**范围内探究最佳浓度 (推荐在 12 孔板或 24 孔板上进行浓度梯度探究)。

三、DAY 2-7: 中胚层向心肌中胚层诱导

对于悬浮诱导:

(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。

对于贴壁诱导:

换液培养基及换液时间节点步骤同悬浮诱导。注意, 若培养基变黄请及时换液。

四、DAY 7-15: 心肌中胚层向心肌细胞诱导

对于悬浮诱导:

(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 μ M 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球。

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（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，可纯化 2-4 天，期间换一次液。

5、注意，不同细胞株的分化效率会有差异。

对于贴壁诱导：

换液培养基及换液时间节点步骤同悬浮诱导。注意，若培养基变黄请及时换液。

注：若接种在 laminin521 上分化，则消化时可使用含有 10 μ M Y-27632 的胰蛋白酶消化 3-5min。由于细胞贴在 laminin521 上比较牢固，若使用心肌细胞消化液可能需要延长消化时间 1-2h。