

## hPSC 诱导分化结肠类器官试剂盒

Cat:IMV-C002

### 产品描述

本产品为 hPSC 诱导分化结肠类器官试剂盒，人多能干细胞 hPSC 通过该试剂盒诱导分化可得到肠类器官，该类器官由结肠相关细胞组成，可表达人结肠类器官特异性标志物，包括结肠转录因子 SATB2、 $\alpha$ -碳酸酐酶 II (CA-II)、 $\alpha$ -碳酸酐酶 IV (CA-IV)、杯状细胞标志物粘蛋白-2 (MUC2) 和粘蛋白-5B (MUC5B)，以及后部 HOX 基因等的表达。

本产品需要操作人员具有 hPSC 细胞培养经验，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、96 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

研究阶段	产品名称	产品规格	储存
定形内胚层(DE)阶段	基础培养基 1	40mL	-20°C, 12 个月
	补充剂 A	1100 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
中后肠球体 (MH) 分化阶段	基础培养基 2	60mL	-20°C, 12 个月
	补充剂 B	640 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
	补充剂 C	640 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
结肠 (3D) 类器官阶段	基础培养基 3	200mL	-20°C, 12 个月
	补充剂 D	200 $\mu$ L	-20°C, 6 个月
	补充剂 E	100 $\mu$ L	-20°C, 12 个月



	补充剂 F	4mL	-20℃, 6 个月
	补充剂 G	200 μL	-20℃, 3 个月

### 其他相关试剂

产品名称	来源	货号
hESC/iPSC 细胞培养试剂盒	IMMOCELL	IMC-014
干细胞基质胶	IMMOCELL	IMV-A026
DMEM/F-12	IMMOCELL	IMC-205
HEPES	IMMOCELL	IMC-407-100 mL
低生长因子基质胶	IMMOCELL	IMV-A019
庆大霉素	-	-

### 实验内容与方法

#### 1、基质胶准备

(1) 在铺板 hPSC 细胞时，要使用干细胞基质胶，基质胶按产品各批次的操作说明进行分装，后续基质胶在 4℃ 下解冻，与含 15mM HEPES 的 DMEM/F12 均匀混合，铺板，备用。

表 1. 培养器皿包被的推荐基质体积

组织培养处理的培养器皿	稀释基质的体积
24 孔板	250 μL/孔
12 孔板	500 μL/孔
6 孔板	1 mL/孔
100 mm 培养皿	6 mL/皿
T-25 cm <sup>2</sup> 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 cm <sup>2</sup> 培养瓶	8 mL/瓶

#### 2、内胚层 (DE) 培养基的制备

注：试剂盒可完成 24 孔板 20 个孔的 hPSC 从 DE 到后肠的分化，第一次分化建议用 2-3 个孔进行尝试。



(1) 在第 0 天, 准备第 0、1 和 2 天所需的 DE 培养基 (基础培养基 1 + 补充剂 A) 体积 (1.7 mL/孔)。

(2) 以制备 2 mL DE 培养基为例:

在冰上解冻补充剂 A。充分混合。

**注: 如果不立即使用, 请分装并在 -20° C 下储存。不要超过补充剂的保质期。解冻等分试剂后, 立即使用, 请勿重新冷冻。**

在室温 (15 - 25° C) 解冻 1h 或在 4° C 冰箱过夜解冻整瓶基础培养基 1, 充分混合。

**注: 如果不立即使用, 可在 2 - 8° C 下储存长达 2 个月。或者, 分装并在 -20° C 下储存。不要超过标签上标明的有效期。解冻等分试样后, 立即使用或在 2 - 8° C 下储存长达 2 周, 请勿重新冷冻。**

将 20  $\mu$ L 补充剂 A 加入 1.98 mL 冷的 (2 - 8° C) 基础培养基 1 中。充分混合后, 储存在 2 - 8° C。

### 3、分化为内胚层细胞 (DE) (以 24 孔板为例)

加入将细胞传代到 24 孔板的操作, 当汇合度达到 85%-90%时进行 DE 分化, 记为第 0 天。

(1) 第 0 天: 预复温 (37° C) 第 0 天所需的 DE 培养基体积 (0.7 mL/孔)。将剩余的 DE 培养基储存在 2 - 8° C。

从 hPSC 细胞中吸去完培。将倾斜的培养板每孔沿孔壁逐滴加入 0.7 mL DE 培养基。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下孵育最多 24 小时。

(2) 第 1 天: 预复温 (37° C) 第 1 天使用所需的 DE 培养基体积 (0.5 mL/孔)。将剩余的 DE 培养基储存在 2 - 8° C。从细胞中吸去培养基。将倾斜的培养板每孔沿孔壁逐滴加入 0.5 mL DE 培养基。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下孵育 24 小时。

(3) 第 2 天: 预复温(37° C) 剩余的 DE 培养基。从细胞中吸去培养基。将倾斜的培养板每孔沿孔壁逐滴加入 0.5 mL DE 培养基。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下孵育 24 小时。

(4) 第 3 天: 细胞可检测定形内胚层的形成。可继续将复孔细胞分化为中后肠球体 (MH)。

**注: 在定形内胚层诱导过程中, 细胞似乎会发生大量细胞死亡。尽可能缩短细胞在 37°**



C 培养箱外的时间。经过 24 小时的定形内胚层诱导后，细胞非常敏感，需要小心更换培养基。孵育 72 小时后，将形成紧密排列的内胚层细胞的汇合单层。

#### 4、中/后肠 (MH)培养基的制备

(1) 在第 3 天，准备第 3 - 8 天所需的 MH 培养基（基础培养基 2+补充剂 B+补充剂 C）体积（3 mL/孔）。

(2) 以制备 3 mL MH 培养基为例：

在冰上解冻补充剂 B 和 C。在混入基础培养基 2 之前保持在冰上。充分混合。

**注：如果不立即使用，请分装并在 -20° C 下储存。不要超过补充剂的保质期。解冻等分试剂后，立即使用，请勿重新冷冻。**

将 30  $\mu$ L 补充剂 B 和 30  $\mu$ L 补充剂 C 加入 2.94 mL 冷的 (2 - 8° C)基础培养基 2 中。充分混合，储存在 2 - 8° C。

#### 5、内胚层细胞分化为中/后肠 (MH)

(1) 第 3 天：预复温(15 - 25° C) 足量的 MH 培养基 (0.5 mL/孔)。将剩余的 MH 培养基储存在 2 - 8° C。

(2) 从内胚层细胞中吸去培养基，更换为 0.5 mL MH 培养基。在 37° C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下孵育 24 小时。

(3) 第 4 - 8 天：每 24 小时进行一次完全培养基更换并评估球状体，培养出中肠/后肠球体。

**注：确保培养物在取出后 30 分钟内放回培养箱。**

a. 在显微镜下观察单层。早在分化第 4 天就可能观察到 3D 结构。游离漂浮的中后肠球状体将在分化第 5 - 8 天出现。

b. 使用 1 mL 移液器，从细胞中吸去 0.5 mL 培养基，转移到无菌的 24 孔透明平底板中，以评估从细胞单层释放的中后肠球状体的数量和浓度。

c. 向细胞中加入 0.5 mL 新鲜的 MH 培养基。在 37° C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下孵育。

**注：最高中后肠球状体产量的时间可能因不同 hPSC 细胞系而异。为获得可重复的实验结果，应始终使用在分化同一天生成的中后肠球状体来收获和启动人结肠类器官培养。通常在分化第 8 天观察到最多的出芽。**



(4) 球状体包埋当天：使用移液器，将每个孔中的球状体悬液加入新的 24 孔板的一个孔中进行计数。将大约 70-100 个游离漂浮球状体（基于之前的球状体计数）的相应体积加入 15 mL 锥形管中。进行肠道类器官的培养。

注意：中后肠球状体是直径  $\geq 75 \mu\text{m}$  的细胞聚集体，有潜力产生一个人肠道类器官。多个融合的球状体应计为一个单元，该单元将生成一个人肠道类器官。剩余的单层培养物可用于检测中后肠的形成，或在后续几天进一步分化以包埋更多的球状体。

## 6、人结肠类器官培养基 (HCO) 的制备

(1) 准备所需的结肠 HCO 培养基（基础培养基 3+补充剂 D+补充剂 E+补充剂 F）体积（2 mL/孔）。

(2) 以制备 100 mL 结肠 HCO 培养基为例：

在冰上解冻补充剂 D、补充剂 E、补充剂 F。在混入基础培养基 3 之前保持在冰上。充分混合。

注：如果不立即使用，请分装并在  $2-8^{\circ}\text{C}$  下储存，可保存 6 周。不要超过补充剂的保质期。解冻等分试剂后，立即使用，请勿重新冷冻。

将 100  $\mu\text{L}$  补充剂 D、50  $\mu\text{L}$  补充剂 E 和 2 mL 补充剂 F 加入 98 mL 冷的 ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) 基础培养基 3 中。充分混合，储存在  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

## 7、将球状体包埋在 Matrigel 中

(1) 将低生长因子基质胶进行分装并冷冻保存（每等分试剂 200  $\mu\text{L}$  用于 4 个样本）。

(2) 在冰上解冻一份低生长因子基质胶等分试样（每个样本需要 50  $\mu\text{L}$  生长因子减少型基质胶）。将一盒无菌的 100  $\mu\text{L}$  移液器吸头置于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 等收集到的 MH 球状体沉降到锥形管底部，小心吸出并弃去上清液。

(4) 向球状体中加入 1 mL 含 15 mM HEPES 的 DMEM/F-12。在室温 ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) 下以 300xg 离心 5 分钟。

(5) 使用 1 mL 移液器，小心地吸出并弃去上清液。

注：尽可能去除上清液。

(6) 解冻的基质胶和细胞悬液放在冰盒上，用预冷枪头吸取 50  $\mu\text{L}$  基质胶，与细胞悬液混匀，注意避免产生气泡。



(10) 使用预冷枪头，按每孔 50  $\mu$  L 将含细胞的基质胶种到 24 孔板上，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。

(11) 将培养板放在培养箱中，20-30min，使胶滴凝固；

(12) 冰上解冻结肠类器官补充剂 G，保持在冰上，充分混合。取 5 mL 结肠 (HCO) 培养基加入 5  $\mu$  L 结肠类器官补充剂 G，充分混合。每孔 500  $\mu$  L 加入到每个孔的边缘处，同时注意不要扰动孔盖，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下进行培养。

**注：结肠类器官补充剂 G 需现配现用，注意每次使用的量再进行配置。**

## 8、更换人结肠类器官培养基 (HCO)

(1) 3 天后，进行一次 HCO 培养基 (不含补充剂 G) 的更换，并向每个培养孔中新增 500  $\mu$  L HCO 培养基 (不含补充剂 G)，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度下进行培养。

(2) 每周进行 3 次培养基更换，并每隔 10-14 天将类器官培养物转移到新的含基质胶的培养基中，更换时应按照适当传代比例 (每个培养皿约 80-100 个器官细胞数) 进行操作。

**注：在第一次传代后，可将抗生素 (如 50  $\mu$  g/ml 庆大霉素) 加入到培养基中**

(3) 经过第 3 次传代后，结直肠组织细胞团应已完全形成，即可进行鉴定和相关实验。

**注：经过多次传代后，细胞生长速度可能会下降，这可能是由于间充质细胞及干细胞数量减少的原因。**

