

**BiozellenCM® hPSC-肝类器官分化试剂盒**  
**( BiozellenCM® hPSC-Liver Organoid Differentiation Kit )**

Catalog No B-MN-00008

Specification 1 Kit

**一、产品介绍**

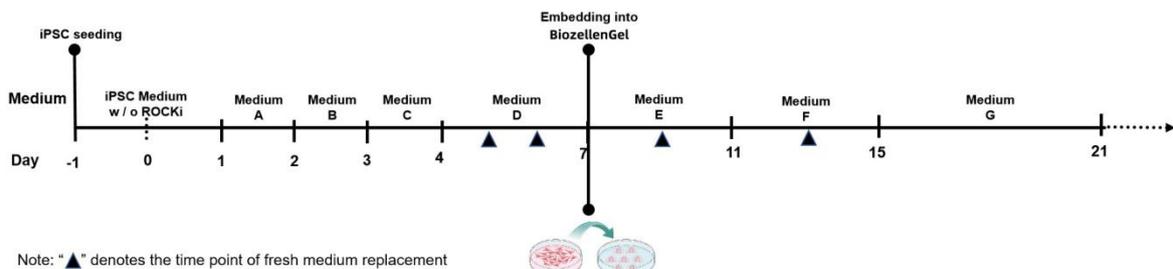
BiozellenCM® hPSC-肝类器官分化体系模拟了细胞体内生长的微环境，支持人多能干细胞（hPSC）向肝祖细胞类器官分化；构建成功的肝祖细胞类器官可进行冻存、扩增及下游分化，同时广泛适用于肝毒性检测、功能性验证等下游应用。BiozellenCM® hPSC-肝类器官分化试剂盒适用于hPSC培养、定向内胚层分化、肝祖细胞类器官分化、培养和扩增，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

**二、产品信息**

组成	货号	规格	储存温度&质保期
BiozellenCM® hPSC-肝类器官分化试剂盒	B-MN-00008	1 Kit	-20℃，6个月
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 A	B-MN-00008-A	20mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 B	B-MN-00008-B	20mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 C	B-MN-00008-C	20mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 D	B-MN-00008-D	50mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 E	B-MN-00008-E	50mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 F	B-MN-00008-F	50mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周
BiozellenCM® 肝类器官分化培养基 G	B-MN-00008-G	100mL	-20℃，6个月，4℃，2-3周

**\*备注：**首次使用时，根据使用流程依次冰上解冻各培养基，如不能一次性使用完毕，可分装小份于-20℃冻存备用（不超过6个月）；

**三、肝类器官分化流程示意图**



#### 四、需要但不包含的其他试剂与耗材

产品名称	产品号	规格
人多能干细胞培养基	B-SM-00002-500	500 mL
温和型细胞消化液	B-SM-00003-100	100 mL
BiozellenGel®干细胞基质胶	B-P-00011-5	5 mL
BiozellenGel®低因子基质胶	B-P-00007-10	10 mL
DPBS 缓冲液	/	/
DMEM/F12基础培养基	/	/
ROCK抑制剂	/	/
0.4% 台盼蓝溶液	/	/
细胞计数板/仪	/	/

#### 五、多能干细胞复苏

1. 试剂准备：提前将BiozellenCM® 多能干细胞培养基添加剂 (B-SM-00002-A)和基质胶 (B-P-00011-5) 于冰箱内4°C解冻过夜；
2. 多能干细胞培养基配置：按照2%的比例，将解冻后的人多能干细胞培养基添加剂 (B-SM-00002-A) 添加至人多能干细胞基础培养基中，混匀后备用；
3. 孔板包被：用预冷的多能干细胞培养基稀释基质胶（稀释比例为1:50），以 1mL/孔加入 6 孔板中，轻轻摇动板子以确保混合液均匀地覆盖在板上。置于37°C培养箱中孵育 1h 以上；待形成基层膜后，将 6 孔板中的包被液弃掉；
4. 细胞解冻：将iPSC冻存管放在 37 °C 的水浴中快速融化细胞，并在水浴时不停摇晃冷冻管，以确保快速解冻；
5. 细胞收集：用无菌移液管将冷冻保护剂 / 细胞混合物转移到15 mL离心管中。再吸6 mL 预温的人多能干细胞培养基，并轻柔混匀。300 x g 离心 3 min，小心吸弃上清液；
6. 细胞接种：使用多能干细胞培养基重悬细胞，接种至包被过基质胶的6孔板中（2 mL/孔），并加入Y27632 (终浓度为 10μM)，轻轻摇匀，并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下进行培养；
7. 细胞换液：每天更换培养基(不含Y27632)。

#### 六、多能干细胞传代

1. 试剂准备：提前将 DPBS缓冲液，温和型细胞消化液和多能干细胞培养基 (B-P-00011-5) 于温热至室温；
2. 孔板包被：用预冷的多能干细胞培养基稀释基质胶（稀释比例为1:50），以 1mL/孔加入 6 孔板中，轻轻摇动板子以确保混合液均匀地覆盖在板上。置于37°C培养箱中孵育 1h 以上；待形成基层膜后，将 6 孔板中的包被液弃掉；
3. 细胞漂洗：吸弃培养基，小心加入 2 mL DPBS 缓冲液漂洗细胞，稍晃匀后即吸弃漂洗液；
4. 细胞消化：每孔加入1 mL 温和型细胞消化液。 将板在 37°C 下孵育 3-5 min；
5. 终止消化：当显微镜下观察大部分细胞变圆、脱落时，小心加入 5 mL DMEM/F-12或人多能干细胞培养基终止；
6. 细胞收集：使用移液枪小心吹打吹打孔底细胞，并将细胞悬液吸取至15 mL离心管中，300 x g 离心 3 min，小心吸弃上清液。
7. 细胞接种：根据传代比例，吸取适量的含有10 μM Y27632的人多能干细胞培养基重悬细胞，并接种至新的包被孔板中。

备注：一般传代周期为 5 天左右，传代比例为 1 : 3-1 : 6。如果集落过于密集或过于稀疏，则下一次传代时相应地调整传代比例。

8. 细胞换液：每天更换培养基(不含Y27632)。

#### 七、肝类器官构建

内胚层定向分化 (Day1-Day3)

1. Day1: 当接种的多能干细胞汇合度达到 40%-50%时，即可进行第一阶段的分化。小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓

冲液，晃匀后吸弃。每孔加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 A，在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

2. Day2: 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM® 肝细胞分化培养基 B，在 37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

3. Day3: 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 C，在 37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

肝系内胚层定向分化 ( Day4-Day6 )

4. Day4 : 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 D，在 37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养 3 天。

5. Day5: 小心吸弃一半的培养基，并加入1 mL 新鲜的 BiozellenCM®肝细胞分化培养基 D, 在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养。

6. Day6 : 小心吸弃一半的培养基，并加入1 mL 新鲜的 BiozellenCM®肝细胞分化培养基 D, 在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养。

肝类器官分化 ( D7-D25 )

7. Day7 : 小心吸弃培养基，加入1 mL 温和型细胞消化液，在 37°C 下孵育 4 min ;

8. 加入DMEM/F-12基础培养基终止消化，并将悬液转移至15 mL离心管中，300 x g 离心 3 min，吸弃上清液。

备注 2 : 吸取部分细胞悬液，并采用 0.4% 台酚蓝溶液进行细胞计数

9. 使用预冷枪头吸取适量的 BiozellenGel基质胶 (B-P-00007-10) 重悬细胞沉淀，以1× 10<sup>5</sup>/50 μL 基质胶，50μL/滴接种至 6 孔板中，加入 2 mL 肝类器官分化培养基 E，于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养。

10. Day9 : 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 E，在 37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

11. Day11 : 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 F，在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

12. Day13 : 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 F，在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养24 h。

13. Day15 : 小心吸弃培养基，每孔加 2 mL DPBS 缓冲液，晃匀后吸弃。加入 2 mL BiozellenCM®肝细胞分化培养基 G，在37°C，5%CO<sub>2</sub>下培养。2-3天换液一次。

14. Day21 后可获得成熟的肝类器官。

## 八、注意事项

1. 本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

2. 本试剂盒适用于hPSC细胞衍生的肝类器官的构建。

3. 本试剂盒培养结果会受到培养条件因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。