

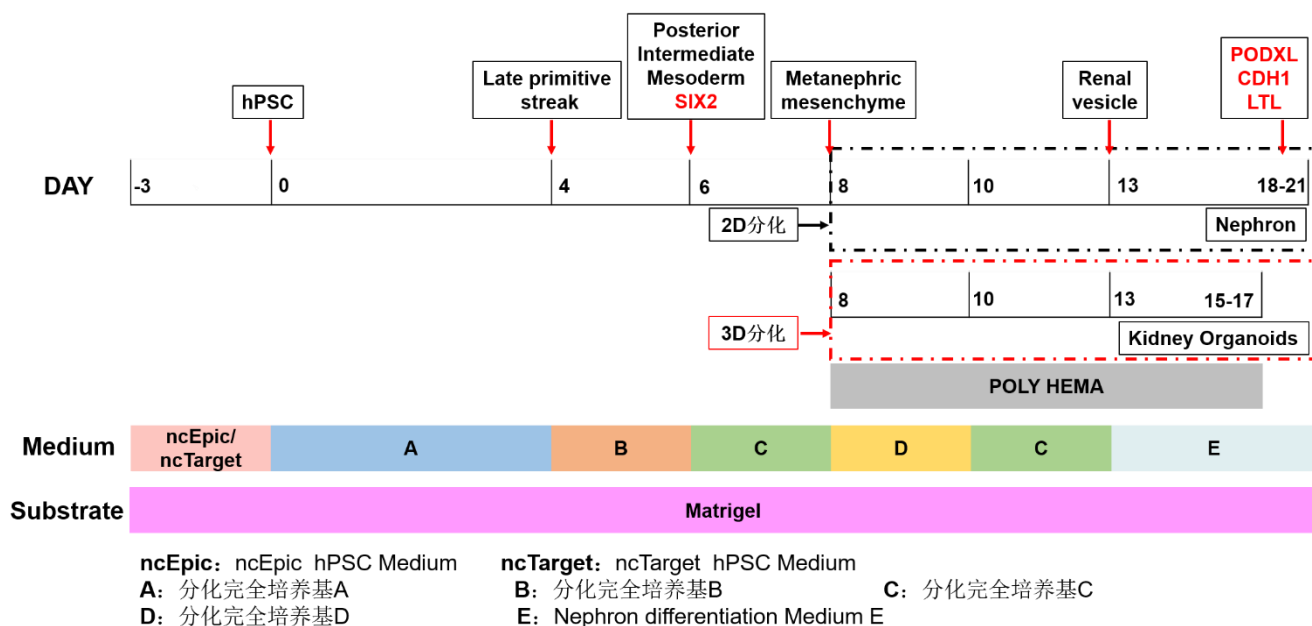
hPSC-类肾器官分化试剂盒

使用说明 V3

一、产品简介

1.1、产品说明

hPSC-类肾器官分化试剂盒用于将人多能干细胞（hPSC）分化生成肾上皮细胞，成熟后具有类肾元结构。分化后的类肾元结构高效表达特异性 Marker（如 CDH1、LTL 和 PODXL 等），适用于各种体外实验、药物筛选和安全性评估，以及疾病模型动物的细胞移植试验。



1.2、产品信息

表 1: hPSC-类肾器官分化系列产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-类肾器官分化试剂盒*	RP01015	1 Kit	基础液 2°C~8°C 添加剂 -20°C~-80°C
hPSC-肾元细胞成熟分化培养基	RP01015-F	1 Kit	
hPSC-肾元细胞**	RC01006	3 × 10 ⁶	液氮保存

*每个试剂盒可获得 2×10⁷ 分化 DAY8 的 NPC 细胞。

*将基础液和添加物混匀配置成分化完全培养基，可在 2°C~8°C 中存储，2 周内用完。

** hPSC-类肾器官分化至 DAY 7 的肾元祖细胞。

1.3、试剂材料

表 2: 推荐试剂&材料&设备

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
ncEpic hPSC Medium	首宁生物	RP01001
ncTarget hPSC Medium	首宁生物	RP01020
科研级hiPSC细胞株	首宁生物	RC01001
hPSC Dissociation buffer	首宁生物	RP01007
Blebbistatin	首宁生物	RP01008
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP01003
Solase细胞消化液	首宁生物	RP01021
0.25%胰蛋白酶消化液	首宁生物	RP02011
胰蛋白酶抑制剂	首宁生物	RP02012
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
24孔板	Thermo Sci.	162485
T25 培养瓶	Thermo Sci.	156367
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
10 µl/200 µl/1000 µl吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001
POLY HEMA	Sigma	P3932

二、hPSC-类肾器官分化

2.1、试剂的准备

表 3: hPSC-类肾器官分化试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-类肾器官分化试剂盒*包含:	RP01015	1 Kit	
Nephron differentiation Supplement A (100×)	RP01015-A	1 mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Supplement B (100×)	RP01015-B	1mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Supplement C (100×)	RP01015-C	1.5 mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Supplement D (100×)	RP01015-D	1.5 mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Medium E	RP01015-E	500 mL	2°C~8°C

*每个试剂盒可获得 2×10^7 分化 DAY8 的 NPC 细胞。

*每个试剂盒可用于 1 块 24 孔板的 2D 分化, 或 12 孔 (24 孔板) 的 3D 分化。

*将基础液和添加物混匀配置成分化完全培养基, 可在 2°C~8°C 中存储, 2 周内用完。

2.1.1. 在 4°C 解冻 Nephron Differentiation Supplement A、B、C、D, 不要在 37°C 条件下解冻。

2.1.2. 在生物安全柜中, 参照表 4 配制成 分化完全培养基 A/B/C/D。

2.1.3. 分化培养基建议 现配现用, 置于 4°C 储存, 2 周内使用。

TIPS: 可根据实际用量将 Nephron Differentiation Supplement A/B/C/D 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 4: hPSC-类肾器官分化试剂盒试剂配制说明

种类	组分	终浓度
<u>分化完全培养基 A/B/C/D (1×)</u>	Nephron differentiation Supplement A (100×) / B (100×) / C (100×) / D (100×)	1×
	Nephron differentiation Medium E	

2.2、hPSC-类肾器官分化-2D

2.2.1. hPSC 的培养和准备: 详见 hPSC 培养基使用说明书 (<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=20> 操作说明书) (<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=21> 操作视频教程)

2.2.2. **DAY -3**, 以 24 孔板操作为例, hPSC 的接种密度为 $3-5 \times 10^4$ cells/孔, 每天换液。

TIPS: hPSC 的接种密度为 5×10^4 / cm^2 , 200 μL hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) / cm^2 。推荐用于定向分化的 hPSC 细胞复苏后至少传 5 代。

2.2.3. **DAY 0**, 当 hPSC 细胞汇合度达到 50%时, 启动分化程序, 将 hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) 吸除, 加入 500 μ L DPBS (不含钙镁) 洗涤细胞一次, 随后加入 0.5 ml/孔 分化完全培养基 A。每天更换培养基, 培养 4 天 (DAY0-DAY4)

TIPS: 由于初始细胞接种密度和细胞状态不同, 达到 50%汇合度的时间略有差异, 可适当根据达到 50%汇合度的时间调整开始分化时间。

2.2.4. **DAY 4**, 吸除 分化完全培养基 A, 以 1mL/孔加入 分化完全培养基 B, 每天换液, 培养 2 天 (DAY4-DAY 6)。

TIPS: 分化完全培养基 A 培养 4 天后细胞回缩, 细胞回缩后松散或过于致密均会影响后期分化效率 (图 1-B)。

2.2.5. **DAY 6**, 吸除 分化完全培养基 B, 按照 1mL /孔加入 分化完全培养基 C, 连续培养 2 天, 每天换液 (DAY6-DAY 8)。

2.2.6. **DAY 8**, 吸除 分化完全培养基 C, 按照 1mL /孔加入 分化完全培养基 D, 连续培养 2 天, 每天换液 (DAY8-DAY 10)。

2.2.7. **DAY 10**, 吸除 分化完全培养基 D, 按照 1mL /孔加入 分化完全培养基 C, 连续培养 3 天, 每天换液 (DAY10-DAY 13)。

2.2.8. **DAY 13**, 吸除 分化完全培养基 C, 按照 1mL /孔加入 Nephron differentiation Medium E, 每天换液, 约 5-7 天可获得成熟的肾上皮细胞细胞结构 (DAY13-DAY 18/21)。

2.3、hPSC-类肾器官分化-3D

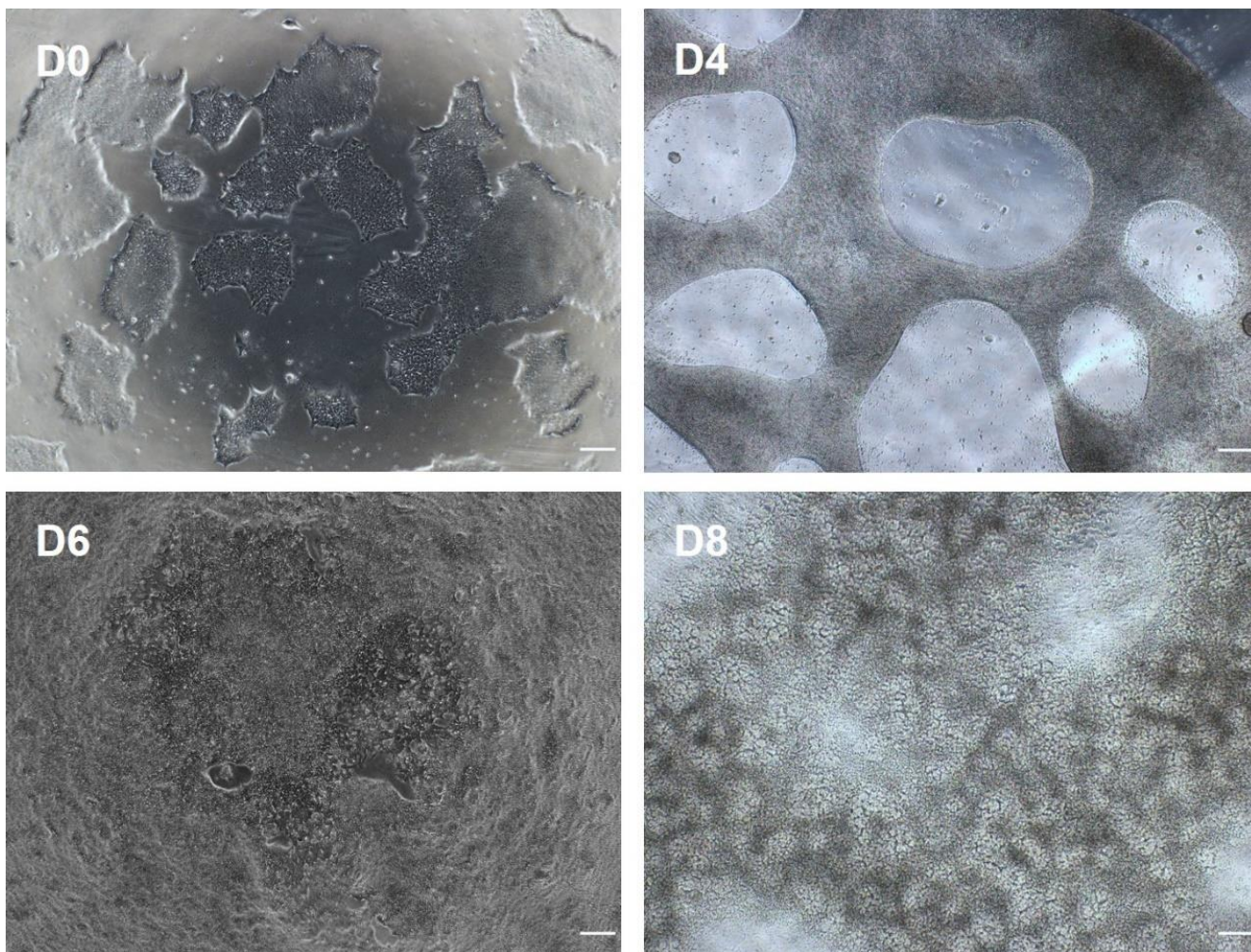
2.3.1. hPSC 的培养和准备, DAY 0-DAY 8 分化的操作步骤, 详见 2.2.1-2.2.6。

2.3.2. **DAY 8**, 转 3D 培养: 提前配置好 6 mL 分化完全培养基 D, 按照 1:1000 的比例加入 Blebbistatin, 向 24 孔板的一个孔中加入 500 μ L 0.25%胰蛋白酶消化液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3min 后加入 500 μ L 胰蛋白酶抑制剂终止消化, 使用 1 mL 移液器轻柔吹打, 随后将细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管, 掌上离心机瞬时离心 5-10 s, 吸弃上清。加入含 Blebbistatin 的 分化完全培养基 D 重悬细胞并转移至 POLY HEMA 包被的 T25 培养瓶中, 置于三维摇床, 转速 15 rpm 培养。每天换液 (DAY 8-DAY 10)。

TIPS: 24 小时后撤掉 Blebbistatin, 使用新鲜培养基换液。

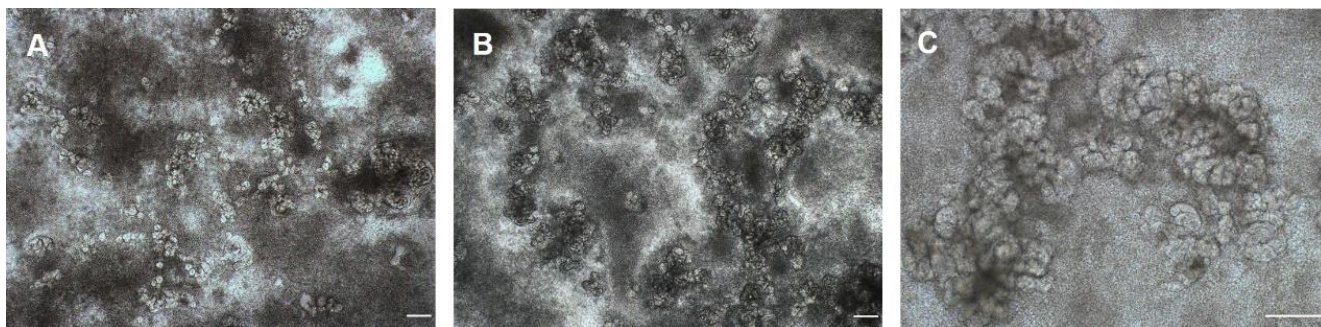
2.3.3. **DAY 10**, 吸除 分化完全培养基 D, 按照 6 mL /孔加入 分化完全培养基 C, 连续培养 3 天, 每天换液 (DAY10-DAY 13)。

2.3.4. **DAY 13**, 吸除 分化完全培养基 C, 按照 5 mL /孔加入 Nephron differentiation Medium E, 每天换液, 约 2-4 天可获得结构明显的 Kidney Organoids (DAY 13-DAY 15/17)。



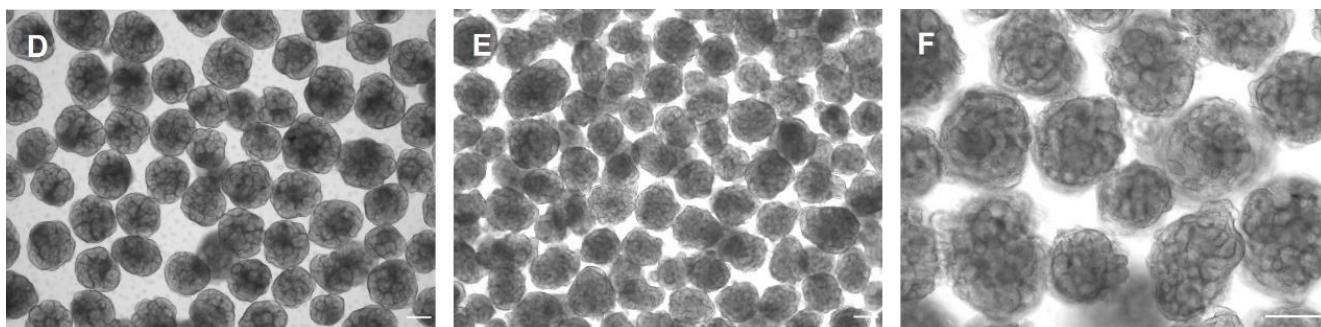
hPSC-类肾器官分化试剂盒分化过程中细胞形态图示。

图示分别为分化第0、4、6、8天时的细胞形态图示。标尺：200 μm。



hPSC-类肾器官分化试剂盒 2D 分化过程中细胞形态图示。标尺：200 μm。

图 A 为 2D 分化第 14 天的细胞形态图示，图 B 和 C 为 2D 分化第 20 天的细胞形态图示。



hPSC-类肾器官分化试剂盒 3D 分化过程中细胞形态图示。标尺：200 μm。

图 D 为 3D 分化第 13 天时的细胞形态图示，图 E、F 为 3D 分化第 17 天时的细胞形态图示。

三、hPSC-肾元细胞复苏与继续分化

3.1、试剂的准备

表 5: hPSC-肾元细胞培养相关产品体系

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-肾元细胞	RC01006	3 × 10 ⁶	液氮保存
hPSC-肾元细胞成熟分化培养基	RP01015-F	1 Kit	
Nephron differentiation Supplement C (100×)	RP01015-C	1.5 mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Supplement D (100×)	RP01015-D	1.5 mL	-20°C或-80°C
Nephron differentiation Medium E	RP01015-E	500 mL	2°C~8°C

3.1.1. 在 4°C 解冻 **Nephron differentiation Supplement C、D**，不要在 37°C 下解冻。

3.1.2. 在生物安全柜中，参考表 4 配制成**分化完全培养基 C/D (1×)**。

3.1.3. 分化培养基建议**现配现用**，置于 4°C 储存，2 周内使用。

TIPS: 可根据实际将 Supplement C/D 分装后冷冻保存。冻融次数不能超过 2 次。

3.2、hPSC-肾元细胞复苏与继续分化-2D

3.2.1. 将水浴锅预热至 37°C。将 Matrigel 包被的 24 孔板，提前放置生物安全柜中约 30 分钟恢复至室温。取 1 mL **分化完全培养基 C**，按照 1:2000 比例加入 **Blebbistatin** (终浓度 5 μM)，恢复至室温。

3.2.2. 从液氮罐中取出 1 管冻存的 **hPSC-肾元细胞**，干冰转移至细胞间，立即放置于 37°C 水浴锅中手持轻轻摇晃，1 分钟内解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失时取出。

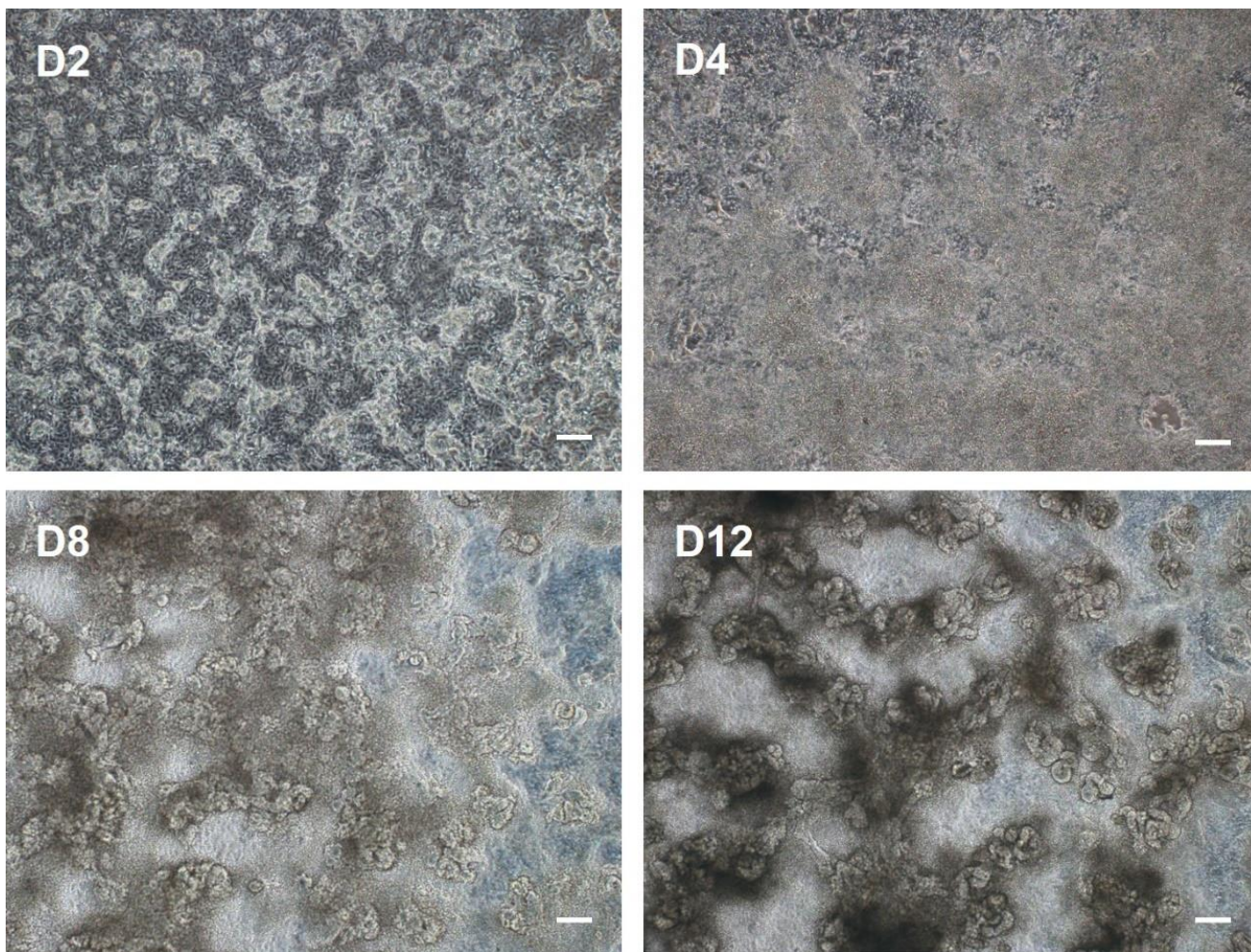
3.2.3. 75%酒精无尘纸擦拭冻存管表面，转入生物安全柜中；将细胞悬液移到事先准备好的 15 mL 离心管中，移液管吸取 8 mL **Nephron differentiation Medium E**，逐滴加入冻存细胞悬液，过程中轻柔晃动混匀细胞，150×g 离心 5 分钟。

3.2.4. 弃去上清，加入预温的 1 mL **分化完全培养基 C (含有 Blebbistatin)** 混匀细胞，尽量避免吹打，全部接种到 **Matrigel** 包被的 24 孔板中的 1 个孔中。置于 37°C，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中，水平十字摇匀 3 次培养。

3.2.5. **DAY 2**，吸除**分化完全培养基 C**，按照 1 mL/孔加入**分化完全培养基 D**，连续培养 2 天，每天换液 (DAY 2-DAY 4)。

3.2.6. **DAY 4**，吸除**分化完全培养基 D**，按照 1 mL/孔加入**分化完全培养基 C**，连续培养 3 天，每天换液 (DAY 4-DAY 7)。

3.2.7. **DAY 7**，吸除**分化完全培养基 C**，按照 1 mL/孔加入 **Nephron differentiation Medium E**，每天换液，约 5-7 天后可获得成熟的肾上皮细胞细胞结构。



hPSC-肾元细胞复苏及继续分化 DAY2-DAY12 细胞形态图示(2D)。

标尺: 200 μm 。

3.3、 hPSC-肾元细胞复苏与继续分化-3D

- 3.3.1. 取 6 mL 分化完全培养基 C，按照 1:1000 的比例加入 Blebbistatin，按照 3.2.3-3.2.4 的方法进行细胞复苏并收集细胞沉淀。
- 3.3.2. 加入含 Blebbistatin 的分化完全培养基 C重悬细胞并转移至 POLY HEMA 包被的 T25 培养瓶中，置于三维摇床，转速 15 rpm 培养。
- 3.3.3. **DAY1**，吸除分化完全培养基 C，按照 6 mL/孔加入分化完全培养基 D，连续培养 2 天，每天换液。
- 3.3.4. **DAY3**，吸除分化完全培养基 D，按照 6 mL/孔加入分化完全培养基 C，连续培养 3 天，每天换液。
- 3.3.5. **DAY 6**，吸除分化完全培养基 C，按照 5 mL/孔加入 Nephron differentiation Medium E，每天换液，约 2-4 天后可获得结构明显的 Kidney Organoids。