



弗元（上海）生物科技有限公司
www.fuyuanbio.com

Regencode

产品说明书

人肺类器官分化试剂盒

Human Lung Organoids Differentiation Kit

货号：RC200130

仅用于科学研究

Version 1.0



人肺类器官分化试剂盒

仅用于科学研究

产品信息

产品名称：人肺类器官分化试剂盒

货号：RC200130

批号：见包装

试剂清单：

序号	名称	数量	货号	存储
1	S1 完全培养基	50 ml ×1	RC200130-1	-20 至-80 °C
2	S2 完全培养基	100 ml ×2	RC200130-2	-20 至-80 °C
3	S3 完全培养基	100 ml ×3	RC200130-3	-20 至-80 °C
4	基础培养基	100 ml ×1	RC200130-4	2-8 °C

存储与有效期：

组分 1、2、3 于-20 至-80 °C 避光保存，组分 4 于 2-8 °C 避光保存。组分 1、2、3 必须避免反复冻融；首次完全解冻后可以按使用量进行分装，置于-20 至-80 °C 长期保存；2-8 °C 条件下，稳定储存 2 周。

适用范围：

本试剂盒适用于人定型内胚层细胞（SOX17⁺/FOXA2⁺细胞，详见本公司定型内胚层高效分化试剂盒，RC200123）进一步定向肺系细胞分化，同时进行立体培养，形成肺类器官。

产品介绍

类器官与悬浮培养是当前再生医学研究与应用的前沿，是未来再生医学与组织工程发展的趋势。为适应日益发展的科研需求，并为生命科学尤其是再生医学研究的需要，开发优化了相关产品，可以为科研工作者提供稳定的研究平台，以助力研究的时效性和经济性。该产品设计同时考虑再生医学临床前研究的需求，



可以为研究人员提供大量稳定的种子细胞，加速应用后期技术的研发。

本产品无血清、成分明确、含有细胞保护因子，适合于人多能干细胞分化为定型内胚层细胞之后进一步肺类器官的诱导。

操作方法

实验准备

◆ 完全培养基准备：

组分 1-3 (S1、S2、S3) 均为完全培养基：2-8℃解冻。完全融化后轻轻摇匀，可以按照实际使用量分装。分装后立即存储于-20 至-80 ℃，避免反复冻融。

注意：2-8℃冰箱过夜，切不可置于 37℃水浴剧烈解冻，解冻后请务必充分混匀，以保证培养基成分的均匀度。

◆ 自备试剂耗材：

- 多能干细胞完全培养基
- 定型内胚层高效分化试剂盒 (RC200123)
- 基质胶
- 贴壁细胞培养板
- 细胞固定液 (2-4%中性多聚甲醛)

操作方法

1. **S1 阶段：**人多能干细胞提前分化为定型内胚层细胞 (建议分化效率大于 80%，流式细胞术检测 SOX17⁺/FOXA2⁺细胞)，弃去培养基，用适量基础培养基 (RC200130-4)，培养基加入量约 2 ml/孔 (六孔板)，轻柔洗 2 次。弃去培养基，轻柔加入 S1 完全培养基，培养基加入量约 2 ml/孔 (六孔板)，每天换液，连续 5 天。

注意：该试剂盒从定型内胚层细胞起始，定型内胚层细胞诱导方法见定型内胚层高效分化试剂盒，RC200123。定型内胚层细胞状态对肺类器官诱导成败十分关键，需特别注意。

注意：以上操作方案以六孔板为例，若使用其他器皿可以根据需要自行调整方案。调整方案时建议以细胞密度为稳定因素。细胞培养箱条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。所有



培养基在使用前必须进行室温复温。这些注意事项同样适用于以下步骤。

- S2 阶段:** S1 阶段 5 天诱导结束后, 提前准备好立体培养用基质胶 (推荐 BD Biosciences 公司, 货号 356237, 以下简称 3D 胶)。S1 细胞用 DMEM/F12 培养基洗 2 次, 加入适量的消化液 (RegenTASE, RC200111 或 ACCUTASE; 6 孔板每孔 700 μ l 左右, 消化液覆盖细胞即可), 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 3-6 分钟。每 2 分钟置于倒置显微镜下观察, 待克隆边缘发亮时即轻柔吸弃消化液。加入适量的 S2 完全培养基轻柔吹打细胞数次, 将细胞悬液移至 1.5 ml EP 管中, 200-300 g 离心 5 分钟。弃上清 (20 μ l 枪头进一步吸弃上清, 过多上清残留会影响立体培养), 轻轻振荡使细胞团块散开, 置于冰上 2-3 分钟。取 100 μ l 提前准备好的 3D 胶 (冰上) 加入细胞, 轻柔吹打, 使细胞分布均匀, 切勿产生大量气泡。按 20 μ l 左右每滴分散滴入六孔板, 推荐每孔滴 6 滴左右, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 20 分钟左右使 3D 胶固化, 固化后加入 3-5 ml 的 S2 完全培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。每 2 天换液一次, 每 4-6 天传代一次。S2 阶段共 12 天。

注意: 试剂准备, BD Biosciences 公司货号 356237 的 3D 胶使用方法, 须将 3D 胶置于冰上融化, 分装后保存于 -80 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。使用时, 提前按置于冰上过夜融化备用。

注意: 为了降低消化过程对细胞状态的影响, 建议在消化液中加入 10 μ M 的 Y-27632。

注意: 移液枪吹打细胞时务必轻柔, 切不可产生大量气泡, 本试剂盒全程均需注意此问题。

3D 传代方法: 用无菌巴氏吸管将立体培养的组织器官 (含 3D 胶) 刮下并转移至 1.5 ml EP 管中, 用 1 ml 枪头机械吹散胶体, 200-300 g 离心 5 分钟。弃上清 (20 μ l 小枪头进一步吸弃上清, 过多上清残留会影响立体培养), 置于冰上 2-3 分钟。取 100-200 μ l 左右提前准备好的 3D 胶 (冰上) 加入细胞, 并轻柔吹打, 使细胞分布均匀, 按 20 μ l 左右每滴分散滴入六孔板, 推荐每孔滴 6 滴左右, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 20 分钟左右, 使 3D 胶固化, 固化后加入 3-5 ml S2 完全培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。



注意： 传代比例 1: 2 到 1: 4，根据类器官生长情况具体判断。

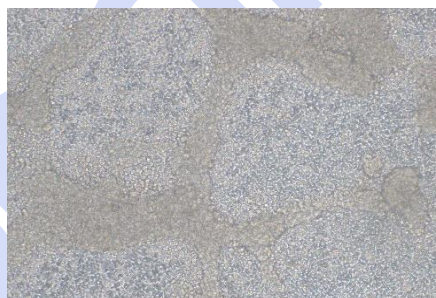
3. S3 阶段：S2 阶段诱导 12 天后，3D 培养物用基础培养基轻柔洗 2 次，加入适量 S3 完全培养基，S3 阶段 3D 传代同 S2 阶段，S3 阶段共 20 天，形成立体的含肺谱系多种类型细胞的肺类器官。

特别提示： 以上所有操作均在无菌细胞培养室进行，细胞开放操作要在生物安全柜内进行；该研究常用的培养器皿包括培养皿、培养板，也可自行设计方案使用细胞培养瓶、细胞工厂等，请根据实验需要自行选择；细胞的初始状态对分化的成功至关重要，请务必保证初始细胞的可靠性。该试剂盒仅用于定型内胚层细胞向肺类器官分化的研究，用于其他研究时该操作规程仅作为参考。

细胞形态展示图：



定型内胚层细胞



S1 阶段



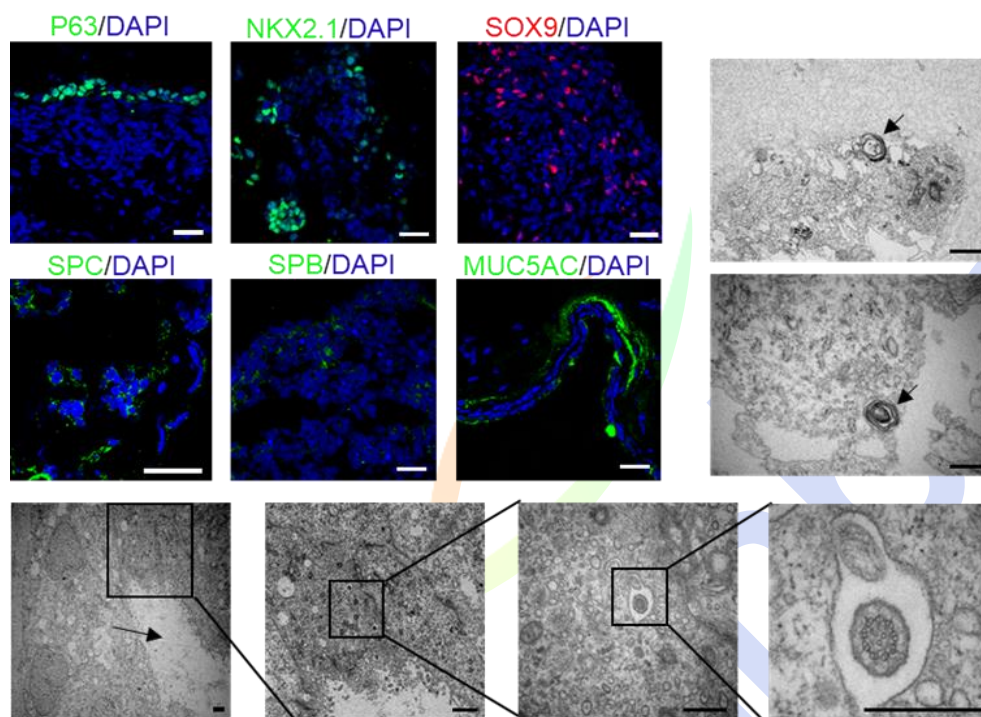
S2 阶段立体培养



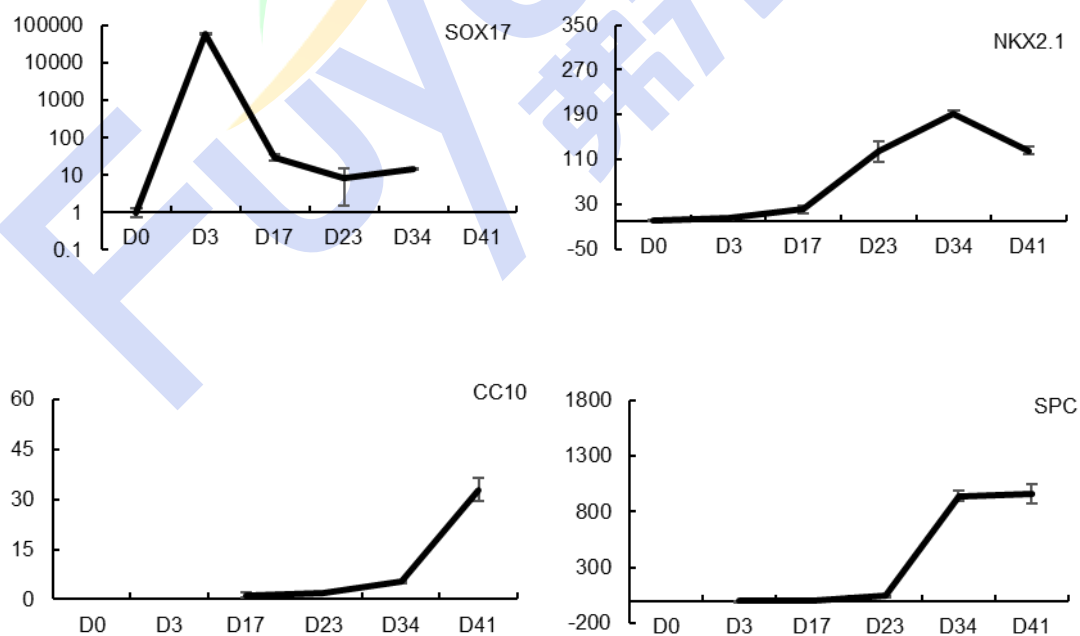
S3 阶段形成肺类器官



分化结果检测:



转录水平:



D0 为人多能干细胞诱导起始, D3 为定向内胚层阶段, D41 为 S3 阶段。



相关产品

名称	货号
RegenTASE 细胞消化液	RC200111
细胞冻存液 I	RC200105
定型内胚层高效分化试剂盒 RegenDE™ Optimised Definitive Endoderm Differentiation Kit	RC200123
肝类器官分化试剂盒 RegenHep™ Liver Organoids Differentiation Kit	RC200128

