



弗元（上海）生物科技有限公司
www.fuyuanbio.com

Regencode

产品说明书

人肾类器官分化试剂盒

Human Kidney Organoids Differentiation Kit

货号：RC200134

仅用于科学研究

Version 1.5



人肾类器官分化试剂盒

仅用于科学研究

产品信息

产品名称：人肾类器官分化试剂盒

货号：RC200134

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 ×2	RC200134-1	-20 至-80 °C
2	S2 完全培养基	50 ml ×1	RC200134-2	-20 至-80 °C
3	S3 完全培养基	50 ml ×1	RC200134-3	-20 至-80 °C
4	S4 完全培养基	100 ml ×2	RC200134-4	-20 至-80 °C
5	基础培养基	100 ml ×1	RC200134-5	2-8 °C

存储与有效期：

组分 1、2、3、4 于-20 至-80 °C 避光保存，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。组分 5 于 2-8°C 避光保存，有效期 1 年。

适用范围：

本试剂盒适用于人多能干细胞（胚胎干细胞 ES、诱导多能干细胞 iPSC）定向肾系细胞分化，同时进行立体培养，形成血管化肾类器官。

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向肾类器官的诱导，血管标志物 KDR 等在该肾类器官部分细胞中表达阳性，说明该肾类器官能获得部分血管化。

操作方法

实验准备

◆ 完全培养基准备：

组分 1-4 (S1、S2、S3、S4) 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 °C，避免反复冻融。

注意：2-8 °C 冰箱过夜，切不可置于 37 °C 水浴剧烈解冻，解冻后请务必充分混匀，以保证培养基成分均匀度。冷冻组分解冻时会有絮状沉淀或结晶，每次使用前混合均匀使用即可，不影响使用效果。

◆ 自备试剂耗材：

- 多能干细胞完全培养基（推荐使用 *mTesR1* 培养系统）
- 多能干细胞消化液（*Accutase* 等）
- 基质胶
- 贴壁细胞培养板
- 低吸附细胞培养板
- Rock 抑制剂（*Y27632*）
- 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（ES、iPS）生长至约 60%汇合开始血管化的肾类器官诱导分化，要求人多能干细胞克隆形态良好。用基础培养基（*RC200134-5*）每孔 2-3 ml 洗细胞 2 次，加入 S1 完全培养基每孔 2 ml，每天换液，连续 4 天。该阶段为原条诱导阶段（*primitive streak*）。有部分细胞死亡为



正常现象。

注意：本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。

注意：起始的多能干细胞 (ES、iPSC) 对后续诱导成功非常关键，请务必保证诱导时多能干细胞生长状态良好，50-60%汇合 (参考诱导形态示例图)。该阶段诱导过程中有部分细胞死亡为正常现象。

2. **S2 阶段：**诱导第 5 天，用基础培养基每孔 2-3 ml 轻柔洗细胞 2 次，加入 S2 完全培养基每孔 2 ml，每天换液，连续 3 天。该阶段为肾中胚层特化阶段 (*kidney mesodermal specialization*)。

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。

注意：初次使用本试剂盒时，每个阶段的末期均进行相关标志物的检测，标志物表达符合预期则可以进入下一个阶段的诱导，标志物不符合预期，则考虑停止实验或调整方案。

3. **S3 阶段：**诱导第 8 天，用基础培养基每孔 2-3 ml 轻柔洗细胞 2 次，加入 S3 完全培养基每孔 2 ml，每天换液，连续 4 天。该阶段为肾祖细胞阶段 (*nephronic progenitor cells*)。

4. **S4 阶段：**诱导第 12 天，用 DPBS 每孔 2-3 ml 轻柔洗细胞 2 次，加入适量 (每孔 1 ml) 消化液 Accutase (Gibco, 货号 A1110501)，同时加入终浓度为 10 μM 的 Rock 抑制剂 (Y27632) 以提高细胞存活率。细胞消化约 3-6 分钟，待细胞易吹下即加入适量 (每孔 1-2 ml) S4 完全培养基终止消化。收集细胞悬液到离心管中，800 转/分离心 5 分钟，弃上清；用适量 S4 完全培养基重悬细胞，同时加入终浓度为 10 μM 的 Rock 抑制剂 (Y27632)。细胞接种于低黏附的培养器皿，6 孔板一个孔消化的细胞接种于 1 个低黏附 6 孔板的一个孔 (若细胞密度过大，可适当调整接种密度，可避免成团过大)，S4 完全培养基加入量为每孔 2-3 ml，每天用 S4 完全培养基每孔 2-3 ml 换液 (不需添加 Rock 抑制剂)。培养过程中可通过低速离心的方式去除死细胞。若细胞团块过大，可以用枪头轻柔吹打至均



一大小，继续培养至第 24-26 天。该阶段为相对成熟的阶段（*maturation of kidney cells*）。

注意：去除死细胞和单个细胞。类器官团块低速离心的方法为，使用巴士吸管收集细胞悬液，置于离心管或 EP 管中，建议 200 转/分，离心 3-5 分钟，轻柔吸弃上清。或者直接静置 5-10 分钟，类器官团块会沉到底部，轻柔吸弃上清。死细胞不会沉底，弃上清即可去除死细胞。细胞沉淀用完全培养基重悬，继续培养。

注意：S4 阶段诱导过夜后细胞便会聚团成球（参考诱导形态示例图），若此时成球不明显，则后续成功的可能性很小，请注意根据形态示例图判断。

注意：继续培养过程中，若细胞团数量过多，可适当分到其他孔中继续培养。若出现细胞聚成过大团块，可能的原因有细胞量过多、细胞未消化成单细胞、细胞分布不均匀导致。过大团块可以用移液器吹打成小团块。

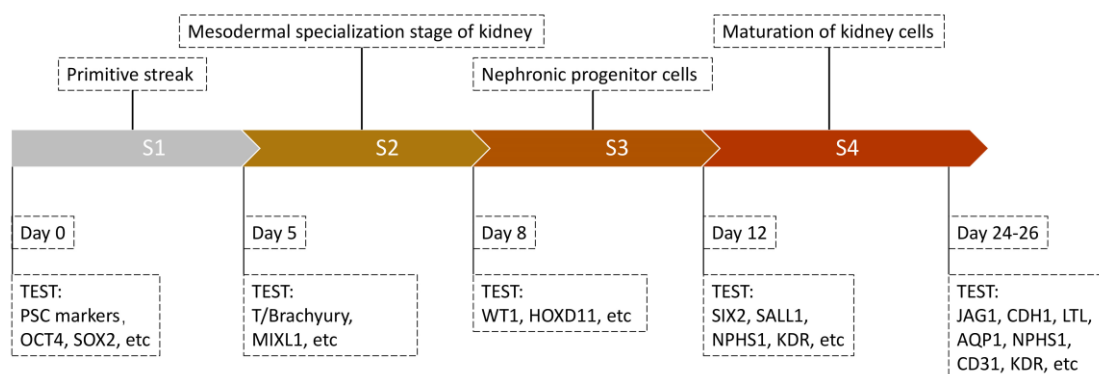
5. **推荐检测：**第 0 天、5 天、12 天及 24-26 天的各阶段标志物。第 0 天检测多能干细胞标志物，如 OCT4、SOX2 等；第 5 天检测原条阶段的标志物，如 T/Brachyury、MIXL1 等；第 12 天检测肾相关标志物，如 SIX2、SALL1、NPHS1 等，此阶段起可检测血管标志物 KDR 等；第 24 天检测相对成熟肾标志物和血管标志物，如 JAG1、CDH1、LTL、AQP1、NPHS1、CD31、KDR 等。

注意：以上每个阶段的时间为推荐时间，每个实验室可能存在差异，若发现细胞状态突然变化或标志物表达不符合预期，则可以适当提前或者延后进入下一个阶段。

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肾类器官分化的研究，用于其他研究时该操作规程仅作为参考。

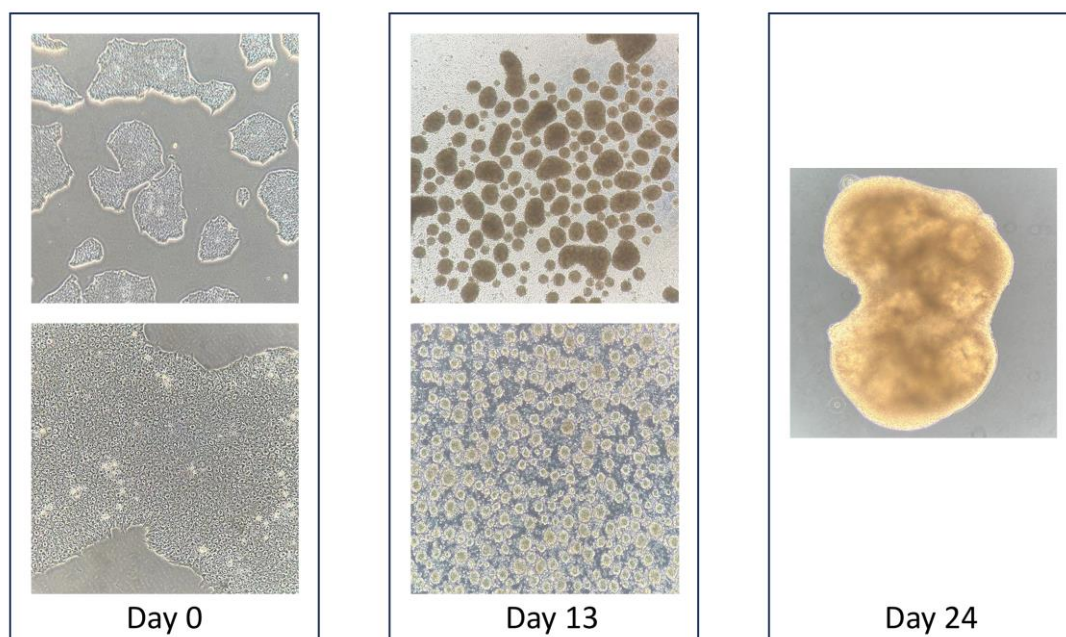


诱导过程示意图:



注意: 为了确保成功率, 实验室首次使用该试剂盒时, 在每个阶段的后期需要检测相应的指标, 阳性指标明确后进入下一个阶段的诱导。每个阶段的诱导时间不同实验室可能有差异, 可适当进行调整。

诱导形态示例图:



相关产品

名称	货号
定型内胚层高效分化试剂盒 RegenDE™ Optimised Definitive Endoderm Differentiation Kit	RC200123
人肝类器官分化试剂盒 RegenHep™ Liver Organoids Differentiation Kit	RC200128
人肺类器官分化试剂盒 Human Lung Organoids Differentiation KIT	RC200130
人肝类器官维持培养基 Human Liver Organoids Maintenance Medium	RC200132
人肺类器官维持培养基 Human Lung Organoids Maintenance Medium	RC200131

