

CardioEasy®人心肌细胞分化试剂盒

V4.2 版本，更新日期：2017 年 3 月 8 日

货号：CA2004500

规格：1 Kit

储存条件：基础培养基：2 ~ 8℃，添加剂 I / II / III：-80 ~ -20℃，混和后 2 ~ 8℃，1 个月内使用完毕。

产品简介：

CardioEasy®人心肌细胞分化试剂盒是由赛贝生物（Cellapy）开发生产，该试剂盒具备高效心肌定向分化能力，可用于人多潜能干细胞（hESC/hiPSC）向心肌细胞诱导分化。分化获得的心肌细胞表达常规的心肌特异性蛋白（e. g. 收缩蛋白和离子通道蛋白）。同时，心肌细胞具备典型的电生理活性，各项特征与人体内心肌细胞高度相似，适合于基础和临床科学研究等应用。

产品内容：

组份代码	名称	规格	数量
CA2004500-1	CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂 I	1mL	2 支
CA2004500-2	CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂 II	1mL	2 支
CA2004500-3	CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂 III	1mL	6 支
CA2004500-4	CardioEasy®人心肌细胞分化基础培养基	500mL	1 瓶

需要材料：

- CardioEasy®人心肌细胞分化试剂盒 (Cellapy: Cat. CA2004500)
- PSCeasy®人多潜能干细胞培养基 (Cellapy: Cat. CA1001500/CA1001100)
- 细胞培养级的PBS溶液 (Hyclone: Cat. SH30256.01)
- PSCeasy®人多潜能干细胞消化液 (Cellapy: Cat. CA3001500)
- CardioEasy®人心肌细胞铺底工作液 (Cellapy: Cat. CA2010100/ CA2010500)
- PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液 (Cellapy: Cat. CA3003100/ CA3003500)
- CardioEasy®人心肌细胞维持培养基 (Cellapy: Cat. CA2003500/CA2003100)
- CardioEasy®人心肌细胞复苏培养基 (Cellapy: Cat. CA2002500/CA2002100)
- CardioEasy®人心肌纯化试剂盒 (Cellapy: Cat. CA2005100)
- CardioEasy®人心肌细胞消化液 (Cellapy: CA2006100)
- CryoStor cell cryopreservation media (Sigma: Cat. C2874)

培养材料准备:

- PSCeasy®完人多潜能干细胞全培养基: 室温解冻PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂, 吹打混匀, 随后将添加剂加入PSCeasy®人多潜能干细胞基础培养基形成PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基。PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存2周。

注: PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂需在室温解冻, 可按实际用量对添加剂进行分装, 分装后重新置于-80 ~ -20℃保存, 避免反复冻融。

- CardioEasy®人心肌细胞铺底工作液包被培养皿/瓶: 往培养皿/瓶中添加工作液至完全覆盖皿/瓶底, 37℃包被4小时以上备用。包被好的培养皿/瓶, 如果暂时不用, 可用PARAFILM封口后2 ~ 8℃储存, 并于1周内使用, 保存期间, CardioEasy®人心肌细胞铺底工作液需始终保持完全覆盖皿底。

- CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 I：在2 ~ 8℃解冻CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂 I，离心后混匀，随后将添加剂 I 加入CardioEasy®人心肌细胞分化基础培养基中形成CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 I（每1mL添加剂 I 与50mL基础培养基混合）。CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 I 可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。
- CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 II：在2 ~ 8℃解冻CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂 II，离心后混匀，随后将添加剂 II 加入CardioEasy®人心肌细胞分化基础培养基中形成CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 II（每1mL添加剂 II 与50mL基础培养基混合）。CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基 II 可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。
- CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基III：在2 ~ 8℃解冻CardioEasy®人心肌细胞分化添加剂III，离心后混匀，随后将添加剂III加入CardioEasy®人心肌细胞分化基础培养基中形成CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基III（每1mL添加剂III与50mL基础培养基混合）。CardioEasy®人心肌细胞分化完全培养基III可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。
- CardioEasy®人心肌纯化完全培养基：在2 ~ 8℃解冻CardioEasy®人心肌纯化添加剂，离心后混匀，随后将添加剂加入CardioEasy®人心肌纯化基础培养基中形成CardioEasy®人心肌纯化完全培养基（每0.2mL添加剂与10mL基础培养基混合）。CardioEasy®人心肌纯化完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。

注：CardioEasy®人心肌纯化添加剂只能在2 ~ 8℃解冻，可按实际用量对添加剂进行分装，分装后重新置于-80 ~ -20℃保存，避免反复冻融。

人ESC/iPSC培养：

1. 将人 ESC/iPSC 在 PSCeasy®人多潜能干细胞培养体系中培养，细胞状态良好，细胞汇合度达到 80%时，进行细胞传代准备分化。
2. 将 PSCeasy®完全培养基取出并平衡至室温，取出包被过 PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液的 12 孔板，吸去包被液并加入适量 PSCeasy®完全培养基，置于 5% CO₂ 的 37℃ 恒温细胞培养箱中，准备**无钙镁**的 PBS 溶液和 PSCeasy®人多潜能干细胞消化液。
3. 吸走 PSCeasy®完全培养基，并且加入**无钙镁**的 PBS 溶液清洗一次。
4. 加入 PSCeasy®人多潜能干细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 室温放置 5 ~ 8 分钟或 37℃ 恒温细胞培养箱中孵育 3 ~ 5 分钟，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离皿/瓶底，克隆内部大部分细胞间出现间隙且相互分离，肉眼观察到细胞集落变得不透明且发白，表明细胞消化时间理想。
6. 彻底吸去消化工作液，即刻加入新鲜的 PSCeasy®完全培养基，用枪扇形吹打培养皿/瓶底，使皿/瓶底贴附的干细胞集落脱落，反复吹吸使细胞尽量分散成单细胞。

注：将细胞消化成单细胞是为了使细胞均匀地分布，要求人 ESC/iPSC 具有单细胞传代的性能；如果人 ESC/iPSC 不能以单细胞的形式存活，则需将细胞消化成尽量小的团块，团块过大导致细胞分布不均匀将会影响分化效率。

7. 细胞计数，用 PSCeasy®培养基将细胞接种在准备好的 12 孔板中，设置 3—5 个细胞接种梯度。
8. 水平十字摇匀，将细胞置于 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱培养，保持每天换液直至达到可以分化的标准。

注：心肌细胞分化过程要求细胞均匀分布，将细胞尽量消化成单细胞和水平十

字摇匀是影响细胞均匀分布的重要因素。

心肌细胞分化:

1. 最高接种密度的孔的细胞汇合度达到 90-98%, 其余梯度的汇合度涵盖 50-90% 后开始进行分化。

注: 需严格控制细胞密度, 不可导致细胞汇合度达到 100%。不同细胞株的生长速度不同, 一般在接种后的 2 ~ 3 天可达到合适密度。

2. CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 I、II、III 使用前取出并平衡至室温, 准备 PBS 溶液。
3. 吸走 PSCeasy® 完全培养基, 并且加入 1mL PBS 溶液清洗一次。
4. 每孔细胞中各加入 2mL CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 I, 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养 48 小时。
5. 吸走 CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 I, 每孔加入 1mL PBS 溶液洗一次, 每孔加入 2mL CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 II, 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养 48 小时。
6. 吸走 CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 II, 并且每孔加入 1mL PBS 溶液洗一次, 每孔加入 2mL CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 III, 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养。
7. 液体变黄时, 更换 2mL 新鲜的 CardioEasy® 人心肌细胞分化完全培养基 III, 最初为每 48 小时更换, 以后逐渐增加换液频率。
8. 每天观察 5 个不同接种密度的细胞的心肌细胞分化情况, 直至显微镜下观察到有跳动的心肌细胞。
9. 选取最合适的细胞接种密度, 重复 2 ~ 8 步。

10. 分化获得心肌细胞后，可用 CardioEasy® 人心肌纯化完全培养基培养 3 ~ 4 天进行纯化，获取纯度更高的心肌细胞。

心肌细胞维持：

1. 室温平衡 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基。
2. 获得的心肌细胞用 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基培养，每 48 小时换液一次；或者加入标准量 150% 的维持培养基，每 72 小时换液一次。
3. 如果需要长期培养，为了维持细胞稳定性和纯度，需要定期采用 CardioEasy® 人心肌纯化培养基进行处理，一般每 4 ~ 6 周处理一次。

心肌细胞再接种：

1. 如果需要将心肌细胞按合适密度接种到新的培养皿/瓶中，可对心肌细胞进行再接种，再接种操作会导致 20% 左右的细胞死亡。

注：心肌细胞传导动作电位需要细胞间形成连接，能使细胞间形成连接的参考接种密度如下表。其它实验需求可根据具体情况调节。

培养器皿	面积 (cm ²)	推荐细胞数	培养液 (mL)
96 孔板	0.32	1.2 ~ 2 × 10 ⁴	0.1
24 孔板	1.9	8 ~ 12 × 10 ⁴	0.5
12 孔板	3.8	16 ~ 24 × 10 ⁴	1
6 孔板	9.5	40 ~ 60 × 10 ⁴	2
T25 培养瓶	25	100 ~ 150 × 10 ⁴	5

2. 室温平衡 CardioEasy® 人心肌细胞复苏培养基、PBS 溶液和 CardioEasy® 人心肌细胞消化液，取出包被过 CardioEasy® 人心肌细胞铺底工作液的培养皿/瓶，

吸去包被液并加入适量 CardioEasy® 人心肌细胞复苏完全培养基，置于 5% CO₂ 的 37℃ 恒温细胞培养箱中。

3. 吸走 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液清洗一次。
4. 加入 CardioEasy® 人心肌细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 37℃ 恒温 CO₂ 培养箱孵育 20 ~ 30 min，显微镜下观察到大部分细胞相互分离，表明细胞消化时间理想。
6. 用移液器扇形吹打培养皿/瓶底，使皿/瓶底贴附的心肌细胞脱落，将细胞转移至 15mL 离心管中，再向皿/瓶中加入适量 PBS 溶液清洗皿/瓶底，收集剩余细胞加入 15mL 离心管。

注：吹打力度要轻柔，避免损伤心肌细胞

7. 200g 离心 5 min。
8. 弃去上清，用 CardioEasy® 人心肌细胞复苏完全培养基重悬细胞，轻柔吹打混匀，并接种到准备好的培养皿/瓶中，水平十字摇匀。
9. 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养 48h，更换为 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基。

心肌细胞冻存：

1. 如果需要将心肌细胞长期保存，可对心肌细胞进行冻存，冻存操作会导致 40% 左右的细胞死亡。
2. 室温平衡 PBS 溶液和 CardioEasy® 人心肌细胞消化液，4℃ 预冷 CryoStor cell cryopreservation media。
3. 吸走 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液清洗一次。
4. 加入 CardioEasy® 人心肌细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。

5. 37℃恒温 CO₂ 培养箱孵育 20 ~ 30 min, 显微镜下观察到大部分细胞相互分离, 表明细胞消化时间理想。
6. 用移液器扇形吹打培养皿/瓶底, 使皿/瓶底贴附的心肌细胞脱落, 将细胞转移至 15mL 离心管中, 再向皿/瓶中加入适量 PBS 溶液清洗皿/瓶底, 收集剩余细胞加入 15mL 离心管中。

注: 吹打力度要轻柔, 避免损伤心肌细胞。

7. 200g 离心 5 min。
8. 弃去上清, 用 CryoStor cell cryopreservation media 重悬细胞, 轻柔吹打混匀。
9. 按复苏所需要的量, 每管 1mL 冻存。
10. 以1℃每分钟的速率降至-80℃过夜 (一般常见商品化程序降温盒均可提供此条件)。
11. -80℃过夜后, 将冻存细胞转移至液氮保存。

心肌细胞复苏:

1. 室温平衡CardioEasy®人心肌细胞复苏培养基, 取出包被过CardioEasy®人心肌细胞铺底工作液的培养皿/瓶, 吸去包被液并加入适量CardioEasy®人心肌细胞复苏完全培养基, 置于5% CO₂的37℃恒温细胞培养箱中。
2. 37℃水浴解冻细胞, 快速摇晃使细胞融化至仅剩一小块冰晶 (避免冻存管盖接触水面), 迅速取出并用75%酒精消毒冻存管外表面。
3. 用1mL移液器小心的将细胞悬液转移至一个新的15mL离心管, 避免剧烈吹吸。
4. 用1mL CardioEasy®人心肌细胞维持培养基清洗冻存管, 以收集剩余细胞。然后逐滴加入含有细胞悬液的15mL离心管, 由于最初滴加的稀释比例较大, 应

维持在5秒1滴（50 μ L）的较慢速率，1分钟左右滴加完此1mL培养基，滴加过程中不断轻摇混匀。

5. 以每秒1滴的速率，逐滴加入4mL CardioEasy®人心肌细胞维持培养基，滴加过程中不断轻摇混匀。
6. 200g离心5 min。
7. 用CardioEasy®人心肌细胞复苏完全培养基重悬细胞，轻柔吹打混匀，并接种到准备好的培养皿/瓶中，水平十字摇匀。
8. 5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养48h，更换为CardioEasy®人心肌细胞维持培养基。

疑难解答：

- CardioEasy®人心肌细胞分化试剂盒能否适用于PSCeasy®以外的培养体系？

理论上，CardioEasy®人心肌细胞分化试剂盒可以适用于所有无饲养层培养体系的多潜能干细胞。在实际操作中，良好的细胞生长状态是决定心肌细胞分化成功的关键因素，建议采用经过测试的PSCeasy®培养体系，采用其他体系会产生不确定因素而提高实验难度。

- 分化过程中出现大量死细胞且液体严重偏黄是否可以提前换液？

心肌细胞分化高度依赖于细胞的自分泌和旁分泌因子，换液将降低因子的浓度。在心肌细胞分化步骤4-6过程中，需严格按照说明书要求的时间间隔更换培养基。在心肌细胞分化步骤7过程中，当观察到有搏动的心肌细胞出现，可以根据液体颜色偏黄的程度，缩短换液间隔时间。

- CardioEasy®人心肌细胞消化液传代心肌细胞时，何种程度才算是消化合适？

超过推荐时间（30min）会对心肌细胞造成损伤吗？

加入CardioEasy®人心肌细胞消化液后，显微镜下观察细胞脱离皿底，观察细胞呈“圆形”，即可终止消化。消化终止时细胞不需要呈单细胞，而是通过吹打将细胞制成单细胞悬液。可根据具体情况适当延长/缩短消化时间，1小时之内，不会对心肌细胞造成过大损伤。

- **心肌细胞停止搏动或搏动缓慢**

1) 心肌细胞在再接种操作后，需要 1~3 天才能恢复搏动；2) 心肌细胞在冻存复苏操作后，需要 3~5 天才能恢复搏动；3) 心肌细胞在换液操作后、或在培养箱外放置过久，会减缓搏动或停止搏动，需要 1~3 小时才能恢复正常搏动；4) 心肌细胞在特殊处理后，需要一段时间恢复期才能正常搏动；某些特殊处理对心肌细胞造成剧烈损伤，心肌细胞的状态将难以复原。