

## iPSC derived 心肌细胞

**规格:**  $1 \times 10^6$

**储存条件:** 活细胞储存于  $25^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ ，收到后请立即放入  $\text{CO}_2$  培养箱。冻存细胞干冰运输，暂存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，2 周有效期；液氮储存，6 个月有效期。

### 产品简介:

该产品采用高效心肌定向分化和纯化方法产生。同时，包括人多潜能干细胞 (hESC/hiPSC) 在内的所有细胞培养分化过程采用化学成分确定的培养试剂。人心肌细胞主要由具备自主电生理活动的心室肌样细胞组成，同时也包含少量心房肌和窦房结样细胞。这些细胞表达常规的心肌特异性基因，包括多种收缩蛋白和离子通道。同时，这些细胞具备经典的心肌细胞电生理活性，能够对电生理和生物化学刺激做出心肌细胞的常规反应。以电生理和钙转导信号记录为例，这些细胞可以作为新药筛选，毒理学测定和其他生理学研究理想工具。

### 产品内容:

编号	名称	规格	数量
1	iPSC derived 心肌细胞	$1 \times 10^6$	1
2	心肌细胞维持培养基	100mL	1
3	心肌细胞维持添加剂	2mL	1
4	心肌细胞复苏接种完全培养基	10mL	1
5	心肌细胞铺底工作液	10mL	1
6	心肌细胞消化液 I	1.5mL	1
7	心肌细胞消化液 II	1.5mL	1

### 培养材料准备:

心肌细胞铺底工作液包被培养皿/瓶:  $2-8^{\circ}\text{C}$  化冻心肌细胞铺底工作液，往培养皿/瓶中添加工作液至完全覆盖皿/瓶底， $37^{\circ}\text{C}$  包被过夜备用。如果暂时不用，可用封口膜封口后  $2-8^{\circ}\text{C}$  储存，并于 1 周内使用，保存期间铺底工作液需始终保持完全覆盖皿底。

### 人心肌细胞维持培养基

网址: [www.hfwanwu.com](http://www.hfwanwu.com)

电话: 400-1016-218

地址: 合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



人心肌细胞复苏接种完全培养基

人心肌细胞消化液 I

人心肌细胞消化液 II

#### 心肌细胞复苏：

1. 室温平衡心肌细胞维持培养基，取出包被过铺底工作液的培养皿/瓶，吸去包被液并加入适量心肌细胞维持培养基，置于 37℃ CO<sub>2</sub>细胞培养箱中。
2. 37℃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，转移至无菌操作台中。
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 心肌细胞维持培养基润洗冻存管，以收集剩余细胞。然后逐滴加入含有细胞悬液的 15mL 离心管，滴加过程中不断轻摇混匀。
5. 滴加的速率不变，再依次逐滴加入 4mL 心肌细胞维持培养基，滴加过程中不断轻摇混匀。
6. 200-300g 离心 5 min。
7. 弃去上清液，用复苏接种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，水平十字振动使细胞均匀分布。

#### 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。心肌细胞复苏时，细胞量以发货单据上标注的细胞数为准。不建议将 1 支细胞 接种于底面积大于 10cm<sup>2</sup> 的细胞培养容器中。

培养器皿	面积 (cm <sup>2</sup> )	推荐细胞数	培养液 (mL)
96 孔板	0.32	3 ~ 4×10 <sup>4</sup>	0.15
12 孔板	3.8	25 ~ 35×10 <sup>4</sup>	1
6 孔板	9.5	1×10 <sup>6</sup>	2

8. 37℃恒温 CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养 48h，继续使用心肌细胞维持培养基。



**心肌细胞维持：**

1. 心肌细胞维持培养基平衡至室温。
2. 心肌细胞用心肌细胞维持培养基培养，每 48h 换液一次；或者加入标准量 150%的维持培养基，每 72h 换液一次。
3. 细胞在 4 周内性状稳定。
4. 如果需要长期培养，为了维持细胞稳定性和纯度，需要定期采用心肌细胞纯化完全培养基进行处理，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。
2. 室温平衡心肌细胞维持培养基、PBS 溶液和心肌细胞消化液 I\II，取出包被过心肌细胞铺底工作液的培养皿/瓶，吸去包被液并加入适量心肌细胞维持培养基，置于 37℃ 恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。
3. 吸走心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液洗一次。
4. 加入心肌细胞消化液 I，使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 37℃ 孵育 5~10min，于显微镜下观察，发现细胞与细胞之间产生一定的缝隙，即达到第一步消化效果。
6. 立即吸去心肌细胞消化液 I，然后加入心肌细胞消化液 II，使之完全覆盖皿/瓶底。
7. 37℃ 孵育，15~20min，于显微镜下观察，发现细胞完全变圆，并且在拍打后，大部分细胞漂起，即达到第二步消化效果。
8. 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 溶液润洗皿/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

9. 200g 离心 5 min。
10. 弃上清，并且加入 5-10mL PBS 溶液清洗一次。
11. 200-300g 离心 5 min。



12. 弃去上清，用心肌细胞复苏接种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，水平十字振动使细胞均匀分布。
13. 37℃恒温 CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养 48h，继续使用心肌细胞维持培养基维持培养。

#### 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 溶液和心肌细胞消化液 I\II，4℃预冷 CryoStor cell cryopreservation media。
3. 吸走心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液洗一次。
4. 加入人心肌细胞消化液 I，使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 37℃孵育 5~10min，于显微镜下观察，发现细胞与细胞之间产生一定的缝隙，即达到第一步消化效果。
6. 立即吸去心肌细胞消化液 I，加入心肌细胞消化液 II，使之完全覆盖皿 /瓶底。
7. 37℃孵育，15~20min，于显微镜下观察，发现细胞完全变圆，并且在拍打后，大部分细胞漂起，即达到第二步消化效果。
8. 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 溶液润洗皿/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

9. 200-300g 离心 5 min。
10. 弃上清，并且加入 5-10mL PBS 溶液清洗一次。
11. 200-300g 离心 5 min
12. 弃去上清，用 CryoStor cell cryopreservation media 重悬细胞，轻柔吹打混匀。
13. 按复苏所需要的量，1mL 每管冻存。
14. 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）。
15. -80℃过夜后，将冻存细胞转移至液氮保存。

#### 疑难解答：

iPSC derived 心肌细胞是否可以增殖？

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



iPSC derived 心肌细胞是终末分化的功能细胞，与人体内的心肌细胞性质相同，不能增殖扩增。

#### iPSC derived 心肌细胞所含的细胞亚类有哪些？

通过 MLC2v、MLC2a 和 HCN4 蛋白的免疫荧光检测，表明 iPSC derived 人心肌细胞中含有 70~80%的心室肌样细胞、20~30%的心房肌细胞和<5%的窦房结样细胞。

#### iPSC derived 心肌细胞是否可以用自己配置的培养基？

iPSC derived 心肌细胞配套有心肌细胞维持培养基和心肌细胞纯化培养基（心肌细胞富集）。心肌系列培养基可维持心肌细胞在体外长期性状稳定并保持高纯度。

#### 如何提高 iPSC derived 心肌细胞的复苏存活率？

iPSC derived 心肌细胞复苏的要点是：

1. 复苏过程的时间尽量短，水浴解冻的时间 $\leq 90s$ ，转移至超净台的过程 $\leq 20s$ ，滴加心肌细胞维持培养基，速率应维持在 5 秒 1 滴；
2. 由于心肌细胞极易受到物理剪切力的伤害，转移和混匀细胞时要避免剧烈吹吸；
3. 准确控制滴加液体的速度，并在滴加过程中不断摇晃混匀。

#### iPSC derived 心肌细胞如何形成单层组织？

心肌细胞传导动作电位需要细胞间形成连接，按照合适的密度接种 iPSC derived 心肌细胞，可以形成均一的同步化跳动的单层心肌组织。请参考说明书并结合实际经验，摸索出合适的接种密度。

#### 接种后 iPSC derived 心肌细胞没有跳动怎么办？

iPSC derived 心肌细胞一般在接种后 2~3 天开始跳动，不超过 5 天。换液、传代和在培养箱外长期放置等导致细胞外环境变化的操作，会使心肌细胞停止跳动。如果心肌细胞长时间不跳动，请检查培养箱的温度和 CO<sub>2</sub> 浓度。

#### iPSC derived 心肌细胞可以在体外稳定维持多长时间？

网址：[www.hfwanwu.com](http://www.hfwanwu.com)

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



iPSC derived 心肌细胞能在 3 个月内维持基因表达的稳定性，6 个月内维持特征与功能的完整性。考虑到非心肌细胞的增殖，1 个月以上的研究项目需要每 4~6 周用心肌细胞纯化完全培养基进行一次纯化处理。

### iPSC derived 心肌细胞纯化培养基的作用是什么？

iPSC derived 心肌细胞纯化培养基是根据心肌细胞的生理特性研发出的心肌富集试剂盒，非 心肌的细胞在纯化培养基中无法存活。纯化后 2 周内，心肌细胞的纯度可达到 99%以上。

### 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 1~3h 才能恢复正常搏动；
3. 心肌细胞长时间在心肌细胞纯化完全培养基中培养，搏动会减缓，需及时停止纯化，在心肌细胞维持培养基中恢复 4 天以上，才能再次纯化。

