EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒说明书

EZ-Stem™ Cardiomyocyte Differentiation Kit

产品描述

EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒提供一种成分明确、无血清、无异源添加物的体外心肌分化体系，产品包含预优化的基础培养基与添加物，能够将人多能干细胞（包括人胚胎干细胞hESC和人诱导多能干细胞hiPSC）高效分化为可表达特异性标志物并具有收缩性的功能性心肌细胞。其中，在培养过程中，可在分化诱导的第8天观测到具有收缩性的心肌细胞（小区域内的心肌细胞跳动），并在15天内可获得具有大量具有收缩性的功能性心肌细胞。分化后的细胞可通过心肌细胞特异性标志物——心肌肌钙蛋白T（cTnT）进行鉴定，并可用于个性化下游实验，如心肌细胞的大量制备、疾病模型构建、心脏毒性药物筛选等。该试剂盒适用于无饲养层培养体系，可兼容于多种类型的人多能干细胞，优先推荐使用由EZ-Stem™ 干细胞完全培养基（#YM-HA-001）维持培养的人多能干细胞，以保证分化实验的稳定性。

应用背景

心血管疾病是全球范围内的首要致死原因，对新型治疗方法和药物研发提出了迫切需求。人类多能干细胞（包括人胚胎干细胞hESC和人诱导多能干细胞hiPSC）具有自我更新能力和多向分化潜能，为心脏疾病研究、药物筛选和细胞治疗带来了革命性的机遇。然而，将hiPSC高效、稳定地分化为功能成熟的心肌细胞一直是一个技术挑战。传统的分化方法存在流程复杂、批次间差异大、分化效率不稳定、成本高昂等问题，这严重制约了其在基础研究、药物毒理学评估和再生医学中的规模化应用。EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒通过优化的成分配比与长时间稳定性测试，可轻松实现由人多能干细胞到心肌细胞的高效分化，满足各类下游实验的需求。

产品优势

a.高质量：使用EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒生成的心肌细胞具有功能性，可表达心肌肌钙蛋白T、 α-肌动蛋白等特异性标志物，并可在培养体系中正常收缩、跳动。

b.高效性：使用EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒在15天内获得功能性心肌细胞，一个试剂盒可制备超过2000万个表达cTnT的心肌细胞。

c.高兼容性：EZ-Stem™ 心肌分化试剂盒提供了标准化的分化流程，减少了组间的差异性，适用于无饲养层培养体系，可兼容于多种类型的人多能干细胞，分化后的细胞可用于各类下游实验，如心肌细胞的大量制备

包装清单

产品编号	产品名称	产品规格	保存条件	运输条件
YD-CM-001	EZ-Stem™ CM induction basic medium	480mL	4℃	4℃
	EZ-Stem™ CM purification basic medium	70mL		
	EZ-Stem™ CM induction supplement A	6mL	≤-20℃	干冰
	EZ-Stem™ CM induction supplement B	60μL		
	EZ-Stem™ CM induction supplement C	6mL		
	EZ-Stem™ CM induction supplement D	75μL		

以上组分均以套装出售

自备试剂

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix

EZ-Stem™ 干细胞完全培养基

EZ-Stem™干细胞消化液

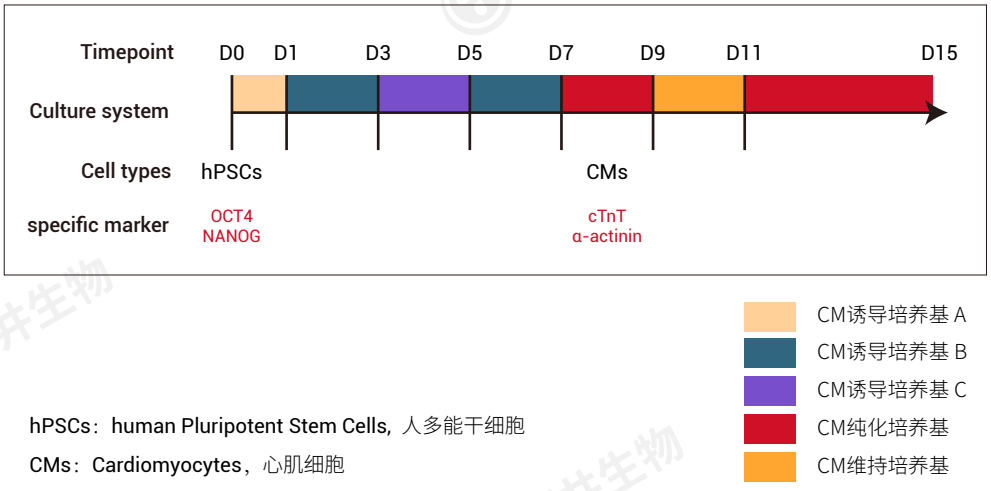
使用说明

A.本说明适用于人多能干细胞（包括人胚胎干细胞hESCs和人诱导多能干细胞hiPSCs）分化形成心肌细胞的实验；

B.请在使用前阅读完整的使用说明。

以下操作以12孔板的培养体系为例进行说明，请根据具体实验调整培养基用量。

Workflow of EZ-Stem™ cardiomyocyte differentiation Kit



hPSCs：human Pluripotent Stem Cells，人多能干细胞

CMs：Cardiomyocytes，心肌细胞

一、人多能干细胞心肌分化前传代

该试剂盒适用于无饲养层培养体系，可兼容于多种类型的人多能干细胞，优先推荐使用由EZ-Stem™ 干细胞完全培养基（#YM-HA-001）维持培养的人多能干细胞，以保证分化实验的稳定性。

1.提前在12孔板培养孔内加入 1mL Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix 进行铺板，37℃孵育至少 30 分钟；

2.将传代所需的 EZ-Stem™干细胞培养基和 EZ-Stem™干细胞消化液提前恢复至室温；

3.显微镜下确认待传代孔内的细胞状态和密度，在 hESCs 或 iPSCs 培养至汇合度为 70-90%时可进行以下传代，吸弃培养基后，在每孔内加入 1mL EZ-Stem™干细胞消化液，孔板置于 37℃环境下孵育 5-8 分；

4.观察细胞消化情况，若几乎所有细胞间连接处折光度发生明显变化（镜下观察细胞间的连接处变亮）但并未脱壁，吸弃消化液，加入适量EZ-Stem™干细胞完全培养基温和吹打贴壁细胞使其脱壁，并温和重悬；

5.吸弃已完成铺板的孔板内部的 Matrigel，按照 1:3 或 1:4 的比例将细胞悬液接种至已完成铺板的孔内，补充适量 EZ-Stem™干细胞完全培养基至总体积为 2mL;

将接种完毕的细胞放于 37℃，5%CO_2培养箱中静置培养24h，每日更换新鲜的EZ-Stem™ 干细胞完全培养基，待细胞密度达到70-90%后，可进行心肌分化诱导；

二、人多能干细胞心肌分化诱导

以12孔板为例，心肌分化所需的诱导体系及培养成分用量如下：

单批次心肌诱导体系（12孔板/每孔）				
培养基名称	**配制方案**	**用量**	**保存条件**	**使用期限**
CM诱导培养基A	EZ-Stem™ CM induction basic medium	1.5mL	4℃	配制后一周内
	2% EZ-Stem™ CM induction supplement A			
	0.1% EZ-Stem™ CM induction supplement B			
CM诱导培养基B	EZ-Stem™ CM induction basic medium	4mL		配制后两周内
	2% EZ-Stem™ CM induction supplement A			
CM诱导培养基C	EZ-Stem™ CM induction basic medium	2mL		配制后一周内
	2% EZ-Stem™ CM induction supplement A			
	0.1% EZ-Stem™ CM induction supplement D			
CM诱导培养基	EZ-Stem™ CM induction basic medium	2mL		配制后两周内
	2% EZ-Stem™ CM induction supplement C			
CM诱导培养基	EZ-Stem™ CM induction basic medium	6mL		
	2% EZ-Stem™ CM induction supplement C			

表1. 心肌分化体系各培养基成分及配制方案

1.根据实验需求，对EZ-Stem™ CM induction supplement A、EZ-Stem™ CM induction supplement B、EZ-Stem™ CM induction supplement C以及EZ-Stem™ CM induction supplement D四种添加物进行适量分装，储存于-20℃或-80℃，切勿反复冻融；

2.Day 0：将细胞启动诱导分化的日期记为Day 0，将本轮分化所需的EZ-Stem™ CM induction supplement A和EZ-Stem™ CM induction supplement B提前置于2-8℃解冻，解冻在2-8℃下短暂保存，尽量在2周内用完。另外，将EZ-Stem™ CM induction basic medium从冰箱取出恢复至室温，；

3.根据表1，配制本轮实验所需用量的CM诱导培养基A，弃去人多能干细胞原有的维持培养基，每孔加入1.5mL CM诱导培养基A，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养24h；

4.Day 1：诱导24h小时后，将EZ-Stem™ CM induction basic medium从冰箱取出恢复至室温，根据表1，配制本轮实验所需用量的CM诱导培养基B，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM诱导培养基B，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养；

5.Day 3：将EZ-Stem™ CM induction basic medium从冰箱取出恢复至室温，并将本轮分化所需的EZ-Stem™ CM induction supplement D提前置于2-8℃解冻，根据表1，配制本轮实验所需用量的CM诱导培养基C，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM诱导培养基C，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养；

6.Day 5：弃去孔内原有培养基，每孔加2mL CM诱导培养基B，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养；

7.Day 7：将EZ-Stem™ CM induction basic medium从冰箱取出恢复至室温，并将本轮分化所需的EZ-Stem™ CM induction supplement C提前置于2-8℃解冻，解冻在2-8℃下短暂保存，尽量在2周内用完。根据表1，配制本轮实验所需用量的CM维持培养基，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM维持培养基，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养。剩余的CM维持培养基可于2-8℃短暂保存，尽可能在2周内用完。一般在分化后的第7-9天内，能观测到具有收缩性的心肌细胞的小区域跳动现象；

8.Day 9：将EZ-Stem™ CM purification basic medium从冰箱取出恢复至室温，根据表1，配制本轮实验所需用量的CM纯化培养基，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM纯化培养基，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养；

9.Day 11：将已配置的CM维持培养基从冰箱取出恢复至室温，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM维持培养基，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养。剩余的CM维持培养基可于2-8℃短暂保存，尽可能在2周内用完；

10.Day 13：已配置的CM维持培养基从冰箱取出恢复至室温，弃去孔内原有培养基，每孔加入2mL CM维持培养基，放于37℃，5% CO_2培养箱中静置培养；

11.Day15：该时间点为本轮心肌分化的分化终点，可获取大量具有收缩性的心肌细胞，可根据实验需要对分化后的细胞进行相应的特异性标志物鉴定或进行下游实验，如心肌细胞扩增、疾病模型构建或药物筛选等。同时，分化后的心肌细胞也可在CM维持培养基的培养中维持>15天。

注意事项

1.培养基及补充剂无需过滤，-20摄氏度储存的添加物可按实验需求进行分装储存，切勿反复冻融，请在包装标识的使用期限内使用，防止过期的成分影响实验结果；

2.本试剂盒使用于无饲养层体系培养的人多能干细胞，但为了保证实验的成功率和稳定性，建议使用由EZ-Stem™ 干细胞完全培养基（#YM-HA-001）维持培养的人多能干细胞；

3.本试剂盒可适用于大部分广泛使用的人多能干细胞，如H1、H9以及iPS-DYR0100，通过以上标准化流程可高效获得具有收缩性的功能性心肌细胞。对于新建系、非常用或来源特殊的人多能干细胞细胞系，若在分化效率上出现明显变化，可对分化起始细胞量、EZ-Stem™ CM induction supplement B的工作浓度与作用时间等因素进行适当调整，摸索出该细胞系最佳的分化条件，以达到最好的分化效果。