

Cardiomyocyte Inducer Medium Kit

CardiOid series 心肌细胞诱导试剂盒

Kit Art.No: ML-0827C01



- ◇ 产品是无菌的，产品外包装是非无菌的，请在使用前对产品外包装充分消毒。
- ◇ 产品一经拆封，应妥善存放以确保产品的无菌性。

1、产品描述

模基生物 CardiOid series 心肌细胞诱导试剂盒采用经优化的 GIWI 分化策略，通过精确时序调控 Wnt/ β -catenin 信号通路（阶段性的激活与抑制）驱动人多能干细胞向心肌细胞的高效定向分化。该体系模拟心脏发育过程：首先通过 48 小时的 Wnt 激活诱导心源性侧板中胚层特化与祖细胞扩增，随后经 4 天 Wnt 抑制阶段促进心肌前体细胞向搏动心肌谱系分化，最后通过 8 天的成熟培养及代谢筛选（无糖高乳酸处理）促使细胞发生肌节结构组装、电生理功能成熟及代谢模式转变（如 MYH6 向 MYH7 转换），最终在 14-15 天内获得具有同步自发搏动能力、高纯度（cTnT⁺）、电生理成熟的心肌细胞（iCMs）。试剂盒提供涵盖上述五个关键阶段的化学成分明确培养基，支持从 1 个 24 孔板规模起始分化并可维持培养至第 20 天，为心脏疾病建模、药物心脏毒性评估及机制研究提供了高度可重复且功能可靠的体外细胞模型。

2、产品信息

产品名称	产品货号	试剂盒组分	规格	试剂盒组分货号	存储/运输	保质期
CardiOid series 心肌细胞诱导试剂盒	ML-0827C01	中胚层激活培养基 1 CardiOid CME induce Medium 1	30 mL	ML-0827C01A	-20°C	24 个月
		中胚层扩增培养基 2 CardiOid CME induce Medium 2	30 mL	ML-0827C01B		
		心源中胚层诱导培养基 3 CardiOid CME induce Medium3	50 mL	ML-0827C01C		
		心肌前体细胞发生培养基 CardiOid CMP formation Medium	100 mL	ML-0827C01D		

产品名称	产品货号	试剂盒组分	规格	试剂盒组分货号	存储/运输	保质期
		iCMs 成熟培养基 iCMs Maturation Medium	100 mL	ML-0827C01E		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
干细胞金牌基质胶	082777
StemGrowth series 水解酶温和消化液	ML-0827S03
StemGrowth series 多能干细胞金牌培养基	ML-0827S04
iCMs select 心肌细胞解离试剂盒	ML-0827C02
24 孔 TC 处理培养皿	-

4、模基生物推荐用细胞系

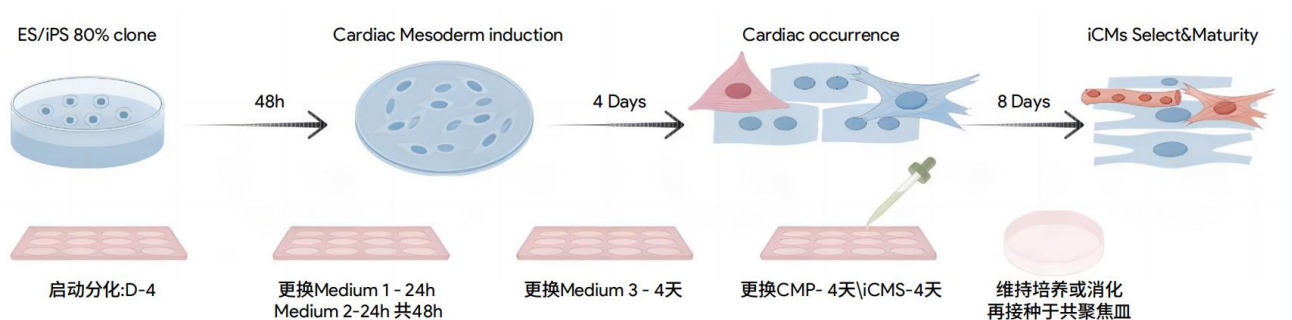
H1、H9、HN4、H7、H6、iPSC 包皮来源、iPSC-THY1

5、新手须知

H9 和部分 iPSC 系中胚层分化能力受限，对于新手优先选择 H1、H7 和经过中胚分化验证的 iPSC 株系。

注意事项：在使用时应始终穿戴防护服，在处理诸如人体细胞或其他生物及有害物质时应遵循安全的实验室规程。

仅用于科学研究。



6、使用说明

a) 实验用品

干细胞专用基质胶、干细胞完全培养基、CardiOid series 心肌细胞诱导试剂盒、TC 处理 24 孔培养皿、iCMs select 心肌细胞解离试剂盒

b) 使用程序：

b.1、PSC 细胞培养及诱导前传代

1、 根据不同 PSC 细胞系的特性从 ESC < 60P、iPSCs < 50P 中复苏一支细胞、经过两次高质量传代记作复苏后 P3（干细胞培养操作见 Mogengel® 多能干细胞金牌培养基系列提供的 PSC 培养 SOP）。

2、 当复苏后传代至第三代（P3）的多能干细胞状态符合分化要求时（表现为细胞克隆形态圆润、核质比适中（细胞核约占细胞面积的 60%）、细胞间连接紧密且支原体检测为阴性），即可启动心肌定向分化。分化起始时，取六孔板中单孔细胞，以 DPBS 轻柔洗涤两次后，加入 1 mL StemGrowth series 水解酶温和消化液，于 37°C 条件下消化 6-8 分钟；随后加入 2 mL HBSS 或 DMEM/F12 基础培养基终止消化，轻柔吹打细胞集群 2 次并将其收集至 15 mL 离心管中，以 120g 离心 5 分钟；弃去上清，使用 12 mL 多能干细胞金牌培养基与 12 μ L StemGrowth series 抗胁迫补充剂（1000x）的混合液重悬细胞沉淀，以每孔 500 μ L 的悬液量接种至经基质胶包被并提前预热 2 小时的 24 孔板中，完成分化准备的细胞铺板步骤。

3、 接种于 24 孔板中 24 小时后，弃掉上清，每天每孔补充 500 μ L 多能干细胞金牌培养基，直到细胞克隆密度达到 90% 以上。

注意！注意！PSC 克隆出现问题、自分化及漂浮的情况应再启动复苏扩增一株，不可直接用于分化

b.2、侧板中胚层脉冲激活及扩增

当细胞融合度达到 90% 以上时，即可启动中胚层定向分化与扩增程序。分化第 0 天（D0），使用预温的 HBSS 或 DMEM/F12 培养基轻柔洗涤细胞两次，以彻底去除残留的白蛋白及代谢废物。随后，向每孔中加入 500 μ L 中胚层激活培养基 1，启动为期 24 小时的定时脉冲诱导，精确激活 WNT 等信号通路以特化心源性中胚层谱系。至分化第 1 天（D1/24h），准时吸弃上清，再次使用 HBSS 或 DMEM/F12 洗涤细胞两次，彻底清除上一阶段的诱导因子。之后，每孔换入 1 mL 中胚层扩增培养基 2，继续培养 24 小时，以支持并扩增已定向的中胚层祖细胞群体。此中胚层诱导与扩增阶段总计持续 48 小时，为后续的心肌发生奠定必要的细胞基础。

b.3、心源中胚层激活及心肌前体细胞发生

1、 在中胚层激活与扩增阶段结束后，需使用 TrypE 消化 3 个孔细胞并通过 qPCR 验证分化效率。使用以下引物对检测核心中胚层标志基因：

Brachyury (T): Forward: 5'-TATGAGCCTCGAATCCACATAGT-3'

Reverse: 5'-CCTCGTTCTGATAAGCAGTCAC-3'

PDGFR α : Forward: 5'-AGCACCTTCGTTCTGACCTG-3'

Reverse: 5'-TATTCTCCCGTGTCTAGCCCA-3'

判定标准：当 Brachyury 与 PDGFR α 的 mRNA 表达量经 $\Delta\Delta Ct$ 法计算（以内参 β -Actin 为基准）均高于内参 120-1500 倍时，表明中胚层分化成功，可立即切换至心源中胚层诱导培养基以启动心肌定向分化。此阈值确保下游心肌分化所需的前体细胞丰度与纯度，避免非心系细胞（如血系或骨系）污染。注：qPCR 应使用 SYBR Green 法，反应体系含 cDNA 模板 100 ng/反应，退火温度统一设为 60°C，循环数 40。每次运行需包含无模板对照（NTC）及熔解曲线分析以确认扩增特异性。

2、经 qPCR 确认中胚层标志基因（Brachyury 及 PDGFR α ）高表达后，弃去原培养基，使用预冷的 HBSS/DMEM/F12 轻柔洗涤细胞两次，以彻底清除残留分化因子及细胞碎片。每孔精确加入 500 μ L 心源中胚层诱导培养基 3（CardiOid CME Induce Medium 3），并于 37°C/5% CO₂ 条件下继续培养。此后每日进行全量换液：先以 HBSS/DMEM/F12 洗涤清除凋亡细胞（避免死亡细胞聚集引发的“集体感应”凋亡效应），再补充新鲜预温的心源诱导培养基。此心源中胚层诱导阶段需持续 4 天。

3、心源中胚层诱导 4 天后，弃去培养基，使用预冷的 HBSS/DMEM/F12 缓冲液轻柔洗涤细胞两次，以彻底清除代谢废物。随后每孔加入 1 mL 心肌前体细胞发生培养基（CardiOid CMP Formation Medium），并于 37°C/5% CO₂ 条件下继续培养。此后每日遵循相同流程：先以缓冲液洗涤去除凋亡细胞（维持培养基洁净度），再补充 1 mL 新鲜预温的心肌前体细胞发生培养基。此阶段持续 4 天，与前期心源中胚诱导共同构成 8 天的核心分化周期。形态学验证：40 倍显微镜下可见细胞集落色泽转为深棕至黑色，并出现黑色条状山脊样隆起，同时伴随细胞核浓缩变小、细胞间隙显著增大等特征性改变

b.4、iCMs 成熟及再接种

心肌前体细胞完成分化后，其代谢模式由糖酵解向脂肪酸 β 氧化转变；为促进其向成熟心肌分化并增强肌节组装，本体系通过调整碳源（如降低葡萄糖、增加脂肪酸/酮体、乳酸）优化代谢适应性。使用 HBSS/DMEM/F12 洗涤细胞两次后，将 6 mL iCMs 成熟培养基（iCMs Maturation Medium）与 6 mL 心肌前体细胞发生培养基按 1:1 混合，并加入 12 μ L StemGrowth 抗胁迫补充剂（1000 $\times$ ），每孔加入 500 μ L 混合培养基进行 24 小时适应性培养，以缓解代谢转换压力并维持细胞存活。24 小时后更换为每孔 1 mL 纯 iCMs 成熟培养基，继续诱导 3 天。该阶段通过代谢重编程（激活 PPAR α /PGC-1 α 通路）驱动线粒体生物合成与肌原纤维精确排布，最终可观测到同步化早期搏动，标志功能性心肌细胞网络形成。

对于经代谢重编程诱导成熟并具备同步搏动功能的心肌细胞（iCMs），可进行 2-3 次再接种以用于共聚焦成像鉴定。首先将基质胶包被的共聚焦小皿或玻片于 37°C 预热 12 小时以活化细胞黏附位点。弃原培养基后，使用 DPBS 洗涤细胞一次，每孔加入 500 μ L iCMs Select 心肌细胞解离试剂，37°C 消化 12-15 分钟（至细胞间隙增大、胞体回缩）。弃去解离液，以心肌前体细胞发生培养基（含 1 $\times$ StemGrowth 抗胁迫补充剂）轻柔重悬细胞（避免肌节断裂），最终将 21 孔细胞量接种于 48 个预处理的共聚焦小皿/玻片上（接种密度需保障细胞间电耦联）。24 小时后更换为不含补充剂的心肌前体细胞发生培养基继续培养 2 天，促进细胞贴壁扩展及肌节结构重建，即可进行多标志物免疫荧光共定位分析（TNNT2/NKX2-5/SMA/TBX5/COL4），验证心肌细胞纯度、亚型特异性及胞外基质组装状态。

V1.3 版

更新时间：2025/10/14