

模基生物小鼠气管类器官培养基套装

产品描述

模基生物小鼠气管类器官培养基套装 (Mouse Airway Organoid Kit) 是一种化学定义的细胞培养基, 用于建立和维持从小鼠气道干细胞衍生的小鼠气道器官。气道上皮的自我更新由基底干细胞的增殖驱动。小鼠气道器官包含基底细胞、纤毛细胞、分泌细胞和少量神经内分泌细胞, 因此器官显示出在体系结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面与气道上皮的所有特征, 因此对于气道发育和疾病研究具有巨大的潜力。

产品信息

产品名称	产品货号	规格	储存/运输	保质期
小鼠气管类器官培养基套装 Plus	MA-0817H005LP	500ml	-20℃	24 个月
	MA-0817H005SP	100ml		

其他自备试剂

英文名称	产品名称	产品货号
Mogengel Matrix	模基生物金牌基质胶	082701/082703/082755
Epithelial Organoid Basal Medium	上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
Anti-Adherence Rinsing Solution	类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L/S
Tissue Digestion Solution	组织消化液	MB-0818L06L
Red Blood Cell Lysis Solution	红细胞裂解液	MB-0818L08L/S
Primary Tissue Storage Solution	活组织细胞保存液	MB-0818L04L
Fetal Bovine Serum (FBS)	胎牛血清	-
DPBS (1X)	磷酸盐缓冲液	-
Organoid Dissociation Solution	类器官消化液	MB-0818L01L

其他自备耗材

英文名称	产品名称	规格
Cell Strainers	细胞过滤器	100 μm
Cell Culture Plates	细胞培养板	96/48/24/12/6 孔
Centrifuge Tubes	离心管	1.5/5/15/50mL
Cell Culture Dishes	细胞培养皿	6/10cm
	模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005

小鼠气管类器官完全培养基使用说明

1. 收到类器官培养基后, 将培养基置于 4℃ 冰箱进行解冻;
2. 待培养基完全解冻后上下颠倒充分混匀, 在生物安全柜或洁净工作台中根据日常需求量进行分装, 推荐分装成 10ml/管;
3. 分装后的培养基请密封后储存于 -20℃, 使用时取出分装的培养基放置室温平衡后即可使用。



注意：

- ◇ 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期两年，注意避免反复冻融；
- ◇ 解冻后类器官完全培养基可在 4℃ 储存，建议在两周内使用；
- ◇ 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。

小鼠气管类器官的建立与传代培养

➤ 原代小鼠气管类器官的建立

1. 实验前先将基质胶放置 4℃ 冰上解冻，同时取出培养基放置室温平衡。与细胞接触的离心管、试管或者塑料吸头需要用类器官培养防粘附润洗液润洗后使用。
2. 取样：小鼠断颈处死，表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出小鼠气管组织，放入 4℃ 预冷的上皮类器官基础培养基或含双抗的 DPBS 中，清洗组织 2 次。
3. 使用镊子将组织转移至 1.5mL 离心管中，在冰上用无菌的组织剪将组织剪碎为 0.5~2mm² 大小。
4. 将剪碎的组织用 50 倍组织体积的组织消化液重悬，并转移至 15ml 离心管内，吹打重悬组织块。于 37℃，100rpm 条件下的恒温摇床中，水平振荡消化 30 分钟，每隔 10 分钟观察组织消化情况，待组织块明显分散，悬液较浑浊时，取适量组织消化悬液镜检，待悬液中有较多活细胞团即可终止消化，若组织碎块较大或消化不完全可适当延长消化时间。消化期间可以使用不同规格（顺序从大到小如 10ml、5ml、1ml）的移液管吹打组织消化悬液，帮助充分消化。当大多数组织片段能够通过 1mL 移液器吸头时，消化过程即完成。
5. 将 FBS 加入组织消化混合物中，最终浓度为 2%，并使用 100μm 细胞过滤器过滤。
6. 收集滤液并在 4℃ 下以 250g 离心 3 分钟。在可见的红色沉淀的情况下，吸弃上清液，加入 2mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 1 分钟，并在 4℃ 下以 250g 离心 3 分钟。
7. 吸弃上清液并将沉淀重悬于上皮类器官基础培养基中，在 4℃ 下以 250g 离心 3 分钟，再次重复此步骤以完全去除消化液和 FBS，在离心前可取适量的悬液进行细胞活性检测。
8. 吸弃上清液，根据培养需求取适量细胞沉淀加入基质胶（>70%）并在冰上混匀（注意：混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 秒内），混匀后置于冰上。注：基质胶应保存在冰上以防止其凝固。尽快进行该过程。大约 10,000 个细胞应接种在 25 μL 基质胶中。不要过度稀释基质胶（基质胶比例应>70%（基质胶体积/总体积）），因为这可能会抑制固体液滴的正确形成。
9. 将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，使用枪头稍微摊平悬液，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μL/孔，48 孔板接种 10~20 μL/孔，24 孔板接种 20~30 μL/孔）。
10. 注意：一旦类器官重悬于基质胶中，尽快进行种板，因为基质胶可能会在试管或移液器吸头中凝固。



11. 将培养板放入 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。
12. 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μL/孔，48 孔板加入 250 μL/孔，24 孔板加入 500 μL/孔）。注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。
13. 将培养板置于 37 °C 和 5% CO₂ 的恒温培养箱中。
14. 每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。
15. 密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠气道类器官应在 7-14 天内建成。

➤ 小鼠气管类器官的传代培养

1. 待类器官培养到直径为 100~500 μm 大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约 1~2 周）。
以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用：
2. 吸弃旧培养基，加入等体积上皮类器官基础培养基，用细胞刮刀或者移液管吸头尖端轻轻刮下（或吹打）基质胶和类器官混合物，转移至 1.5mL 离心管中（每管最多收集 2~3 孔类器官，避免体积过大消化效率低），吹打 5~10 次，使类器官和基质胶分离，300g 离心 3 分钟。
3. 去除上清液加入 5 倍于基质胶和类器官混合物体积的类器官消化液，吹打混匀后置于 37℃ 培养箱中消化 5~10 分钟。取出吹打混匀，取 10 μL 混合液镜检是否消化成小的细胞团块，消化不充分可适当延长消化时间。若要求细胞计数则需消化成单个细胞，可延长消化时间至 10~20 分钟后终止消化后台盼蓝染色进行细胞计数。密切监视消化过程使在类器官解离液中的孵育时间最短。
4. 消化完成后，加入 5 倍体积上皮类器官基础培养基吹打混匀以终止消化反应，然后 250g 离心 3 分钟。
5. 吸弃上清液，用上皮类器官基础培养基清洗 2 次以去除残留的消化液。最后一次清洗可将类器官合并收集在同一个离心管中。
6. 清洗完成后将离心沉淀中的细胞进行传代培养，在细胞沉淀中加入基质胶（>70%）并在冰上混匀（注意，混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 秒内），混匀后置于冰上。

注意：基质胶稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。

7. 将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，使用枪头稍微摊平悬液，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μL/孔，48 孔板接种 10~20 μL/孔，24 孔板接种 20~30 μL/孔）。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

8. 将培养板放入 37℃ 和 5% CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。



- 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96孔板加入 100 μ L/孔，48孔板加入 250 μ L/孔，24孔板加入 500 μ L/孔）。注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。
- 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 的恒温培养箱中。
- 每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。
- 密切监测类器官生长状态，直到类器官需要进行下一步实验。

更新日期：2024 年 12 月 19 日

