

Mouse Liver Ductal Organoid Kit Plus (Differentiation)

小鼠肝胆管类器官培养基套装 Plus (分化)

Kit Art.No: MA-0817H009DLP / MA-0817H009DSP



- ◇ 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。

1、产品描述

模基生物小鼠肝胆管类器官培养基套装 Plus (分化) 【Mouse Liver Ductal Organoid Kit Plus (Differentiation)】是一种化学定义的细胞培养基，用于建立和培养从成体干细胞衍生的小鼠肝胆管类器官。肝胆管的自我更新上皮细胞是由位于肝脏的干细胞及其祖细胞的扩增所驱动的。肝胆管类器官因其上皮在结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面的表现，而具有真实器官的特征。肝胆管类器官可以在分化培养基中诱导出肝样细胞，为小鼠类肝脏发育和疾病的研究提供了前所未有的模型。

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
小鼠肝胆管类器官培养基套装 Plus (分化)	MA-0817H009DLP	小鼠肝胆管类器官培养基 (分化)	500mL	MG2006-MLH-A500	-20℃	24 个月
		小鼠肝胆管类器官培养因子 B(250x)	0.25mL	MG2006-MLH-B500		
	MA-0817H009DSP	小鼠肝胆管类器官培养基 (分化)	100mL	MG2006-MLH-A100		
		小鼠肝胆管类器官培养因子 B(250x)	0.05mL	MG2006-MLH-B100		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
模基生物金牌基质胶	082701/082703/082755
上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L / MB-0818L03S

产品名称	产品货号
类器官消化液	MB-0818L01L
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
青霉素-链霉素混合液	-
磷酸盐缓冲液	-
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	-
牛血清白蛋白	-
DPBS(1X),液体, 不含钙和镁	-
细胞过滤器 70μm	-
细胞培养板 96/48/24/12/6 孔	
离心管 1.5/5/15/50mL	
细胞培养皿 6/10cm	

4、小鼠肝胆管类器官培养基（分化）的使用说明

- 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，推荐类器官培养基分装成 10mL/管，培养因子 B 分装为 40μL/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。

5、小鼠肝胆管类器官分化培养

注意：小鼠肝胆管类器官分化培养前需要经过传代扩增培养 3 天后进行

a) 原代小鼠肝胆管类器官的建立

- 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肝脏组织，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（能够通过 10mL 移液管的尖端）。

注：以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用：

- 4、 用预冷的上皮类器官基础培养基重悬样本转移 15mL 离心管中，补充预冷的上皮类器官基础培养基至 10mL。

5、用 10mL 移液器上下吹打至少 10 次，清洗组织。静止 1 分钟，待组织自然沉降至离心管底部，小心吸弃上清，重复清洗组织 3 次。

6、将清洗后的组织用 50 倍组织体积的组织消化液重悬，吹打重悬组织块。于 37°C，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，待悬液中有较多胆管结构即可终止消化，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。

7、将 FBS 加入组织消化混合物中，最终浓度为 2%，使用移液器反复吹打 20 次，静止 2 分钟后，收集上清，4°C 下以 250g 离心 3 分钟。

8、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°C 下以 250g 离心 3 分钟。

9、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°C 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。

10、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：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 μ L 基质胶中或 50 个管状结构接种在 25 μ L 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。

11、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 μ L/孔，48 孔板接种 10~20 μ L/孔，24 孔板接种 20~30 μ L/孔）。

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。

12、将培养板放入 37°C 和 5%CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。

13、待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的小鼠肝胆管类器官扩增培养基 (MA-0817H009HSP)，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。

14、将培养板置于 37°C 和 5%CO₂ 的恒温培养箱中。

15、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小鼠肝胆管类器官扩增培养基 (MA-0817H009HSP)。

16、密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠肝胆管类器官应在 7-14 天内建成。

b) 鼠肝胆管类器官的分化培养

- 1、待类器官培养到直径为 500 μ m 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 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 5~10 分钟。取出吹打混匀,取 10 μ L 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。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 μ L/孔,48 孔板接种 10~20 μ L/孔,24 孔板接种 20~30 μ L/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 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟,让基质胶凝固。
 - 9、待基质胶完全凝固后,沿壁缓慢加入室温平衡的小鼠肝胆管类器官扩增培养基(MA-0817H009HSP),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。
- 10、将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的恒温培养箱中。培养 3 天后,小心地从孔中吸出培养基,并加入新鲜的室温平衡小鼠肝胆管类器官分化培养基(不添加培养因子 B),每天更换一次培养基。
 - 11、使用小鼠肝胆管类器官分化培养基培养 9 天后,按照培养因子 B 标签上的稀释倍数配制含培养因子 B 的小鼠肝胆管分化培养基(例如:取 10mL 小鼠肝胆管分化培养基添加 40 μ L 培养因子 B (250X),使用该培养基继续培养小鼠肝胆管类器官 3 天,期间需要每天更换一次含培养因子 B 的小鼠肝胆管分化培养基。)

