小鼠气管类器官原代分离培养套装

Cat NO: IMV-MK18

产品描述

小鼠气管类器官原代分离培养套装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

表 1. 试剂盒

产品名称	产品规格	储存
小鼠气管类器官完全培养基	500mL	2~8℃，12 个月
	100mL	
组织基础消化液	100mL	2~8℃，18 个月
	20mL	
组织消化液添加因子 B (20×)	5mL	-20℃，24 个月
	1mL	
类器官专用基础培养基	500mL	2~8℃避光，18 个月
	200 mL	
类器官冻存液	100mL	2~8℃，36 个月
	20mL	
类器官传代消化液	100 mL	2~8℃，18 个月
	20mL	
红细胞裂解液	100 mL	2~8℃避光，24 个月
	20mL	
活组织细胞保存液	100 mL	-20℃，18 个月
	20mL	

小鼠气管类器官完全培养基内含：

小鼠气管类器官基础培养基

小鼠气管类器官培养因子 B (50X)

小鼠气管类器官培养因子 C (250X)

表 2. 其他自备材料和试剂

产品货号	产品名称	品牌
IMV-A017	标准型基质胶	IMMOCELL
IMV-A003	抗细胞粘附润洗液	IMMOCELL
-	70 μ m 细胞滤网	SAINING
IMC-101-500	FBS	IMMOCELL

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，将培养基置于四度冰箱进行解冻；
2. 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀，在无菌的生物安全柜或超净工作台中将培养基进行分装，推荐分装成 10ml 规格；
3. 将分装后的培养基储存于-20℃，使用时拿出分装后的培养基解冻后即可使用。

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。

正常组织消化液的配制

无菌条件下配制组织消化液，下面是配制 10mL 完全组织消化液的示例，如果需要制备其他体积，可自行相应调整。

1. 4℃解冻组织消化液添加剂（20×），解冻后充分混匀；

注意：解冻后，建议将组织消化液添加剂分装后保存，按需取用，避免多次反复冻融；

2. 将 500uL 组织消化液添加剂（20×）加至 9.5mL 组织消化液基础培养基中，充分混合，配制成 10mL 组织消化液。

注意：配制后的完全组织消化液可在 2-8℃ 储存，建议 24 h 内使用，或-20℃ 储存 1 个月。

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

准备适量标准型基质胶于冰上解冻

1. 用 50 或 15ml 离心管在预冷的活组织细胞保存液中收集原代小鼠气管组织。将组织样品保持在 4° C，直到开始分离。

2. 用类器官专用基础培养基冲洗组织两次。

3. 在细胞培养皿中使用外科剪刀或手术刀将组织切成 1-3 mm³ 的小碎片。

4. 用 10mL 正常组织消化液在 15mL 离心管中 37° C 消化组织碎片，孵育时间从 30 分钟到 1 小时不等。仔细监测消化过程，每 5-10 分钟摇一次离心管，或上下颠倒混匀。当大多数组织碎片能够通过 1mL 移液管尖端时，消化过程就完成了。

5. 将 FBS 加入组织消化液中，最终浓度为 2%，用 100 μm 细胞过滤筛过滤。

6. 收集过滤后的细胞，在 4°C 下 250g 离心 3 分钟。如发现明显的红色颗粒，抽吸上清，用 2mL 红细胞裂解液重悬红细胞在室温下静置 3~5 分钟，然后在 4°C 下 250g 离心 3 分钟。

7. 弃去上清液，将颗粒重悬于类器官专用基础培养基，在 4°C 下 250g 离心 3 分钟，再次重复此步骤。

8. 弃去上清液，将细胞悬液重悬于基质胶中。基质胶应该保存在冰上以防止固化，此步骤应尽快完成。基质的用量取决于基质的大小，推荐重悬密度为每 10uL 基质胶悬液包含大约 10,000 个细胞。

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。

9. 将基质胶和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30uL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

10. 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15-25 分钟待基质胶凝固。

11. 配制小鼠气管类器官完全培养基。

12. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠气管类器官完全培养基，24 孔板每孔 500uL。

13. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验。

小鼠气管类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养液的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5mL EP 管中。

2. 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。

3. 250g 离心力室温离心 3min。

4. 弃上清，使用类器官消化液或用机械破坏。对于使用类器官传代消化液的细胞解离，在类器官传代消化液中重悬类器官悬浮液，移液器反复上下吹打并置于 37° C 孵育，直至类器官解离。使用带滤芯移液头每 2 分钟反复上下吹吸 8 次，以帮助破坏类器官。密切监视消化过程使在类器官解离液中的孵育时间最短。如发生机械故障，在 1.5 mL 类器官专用基础培养基中重悬类器官悬浮液。小心地用移液管吸取类器官悬浮液，反复上下 30 次，这将有助于消化。

注意:不要在类器官解离液中解离超过 15 分钟，因为这可能会导致较差的类器官的生长甚至破坏。根据经验，如果是小块细胞的混合物，可以观察到由 10-50 个细胞组成的细胞团，消化就完成了。

5. 消化完成后，用 1ml 类器官专用基础培养基进行一次冲洗，然后室温下 250g 离心 3 分钟。

6. 弃上清，用适量的基质胶重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。

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. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30uL 左右。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

8. 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15min 左右待基质胶凝固。

9. 配制小鼠气管类器官完全培养基。

10. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠气管类器官完全培养基，24 孔板每孔 500uL。

11. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验类器官的形态。

类器官的冻存

1. 将消化完成后的细胞悬液，200 g，离心 5 min，弃去上清。
2. 用基础培养基清洗两次后，加入 4℃ 预冷的类器官冻存液，轻轻吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中（冻存管内细胞悬液体积应大于 0.5 mL）。

注：每 1 mL 冻存液推荐冻存 1×10^6 个细胞或对应细胞量的类器官。

3. 将冻存管放入细胞冻存程序降温盒内（降温盒须提前平衡至室温），随后立即将降温盒放入 -80℃ 超低温冰箱中；也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4℃ 静置 10 min，-20℃ 保存 1 小时，-80℃ 保存过夜。

4. 次日或 12 小时后将冻存管于 -80℃ 超低温冰箱转移至液氮中长期保存。

类器官的复苏

1. 提前在 37℃ 条件下预热类器官专用基础培养基。
2. 在 37℃ 的水浴中快速解冻细胞冻存管，当冻存管内冻存物仅剩些许冰渣残留时立即停止水浴并及时转移至洁净操作台。
3. 将细胞悬液转移至离心管中，缓缓加入 5-10 倍体积的类器官专用基础培养基，轻轻混匀。
4. 200 g，离心 3-5 min，弃上清，再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀。
5. 再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀，重复步骤 4。
6. 弃上清后所获细胞沉淀可用于后续类器官培养。