

小鼠肝类器官完全培养基

Cat NO: IMV-NM20

产品描述

小鼠肝类器官完全培养基是一款用于构建、维持培养及传代扩增小鼠肝组织来源类器官的完全培养基。该产品可以从小鼠肝组织快速生成肝祖细胞类器官，极大程度维持了来源于体内肝组织的特征，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

产品信息

表 1. 培养基组成信息

产品货号	产品名称	产品规格
IMV-NM20LBM	小鼠肝类器官基础培养基	500mL
IMV-NM20SBM		100mL
IMV-NM20L1	小鼠肝类器官培养因子 B	10mL
IMV-NM20S1		1mL
IMV-NM20L2	小鼠肝类器官培养因子 C	1mL
IMV-NM20S2		0.4mL

小鼠肝类器官完全培养基使用说明

- 收到类器官培养基后，将培养基置于四度冰箱进行解冻；
- 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；
- 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。

小鼠肝类器官的建立与传代培养

原代小鼠肝类器官的建立

1.取样：将组织标本转移到 10 cm 培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入 10 mL 4℃ 预冷的含双抗（IMC-601）的 DPBS 溶液，将组织表面的血管、筋膜和脂肪轻取舍弃。

注：如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在组织保存液（IMV-A004）中，冰上运输尽快处理。

2.清洗：将标本使用含双抗（IMC-601）的 DPBS 溶液进行清洗，反复涮洗约 5 - 10 次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3. 消化：加入 30 mL 的 DPBS 溶液中再加入 150 μ L 0.5M EDTA，至 EDTA 终浓度为 2.5mM。置 4℃ 摇床上，80rpm，消化 60 min。

4.清洗：消化完成后，静置待沉淀，弃上清。加入预冷 DPBS，轻柔摇匀，静置后弃上清，重复 2 次以去除 EDTA。

5.重悬：加入 30 mL 预冷的含 1%FBS 的 DPBS，涡旋 30s，取上清 70 μ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复收集 2 次，记为馏分 2 和馏分 3。

6.收集：300g 离心力 4℃ 离心 3min。

7.计数：弃上清，根据沉淀量使用 DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μ L 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液，300g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清后置于冰上。

8.用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10 μ L 基质胶悬液包含 100 至 200 个隐窝，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。

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 30 μ L 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℃ 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 30 min 左右待基质胶凝固。

11.待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的小鼠肝类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L，避免破坏已凝固结构。

12.将 24 孔板置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。

13.每 3~4 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠肝类器官应在 3 至 4 天内建成。

小鼠肝类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将肝类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL 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，多次吹打使得类器官与基质胶分离。
3. $300\times g$ ， 4°C 离心 3 min，弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 200 μL 类器官消化液并充分混匀， 37°C 条件下消化 1-3 min，消化结束后加入 1 mL 上皮类器官基础培养基吹打混匀。
4. $300\times g$ ， 4°C 离心 3 min，弃上清，再次加入 1 mL 上皮类器官基础培养基并混匀。
5. $300\times g$ ， 4°C 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。
6. 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 30 s 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 30 μL 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 30 min 左右待基质胶凝固后取出。
9. 待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠肝类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL 。
10. 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。