小鼠肝胆管(扩增)类器官原代分离培养套装

Cat NO: IMV-MK04

产品描述

小鼠肝胆管(扩增)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。

产品信息

表 1. 试剂盒

产品名称	产品规格	储存
小鼠肝胆管(扩增)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	

小鼠肝胆管(扩增)类器官完全培养基内含:

小鼠肝胆管(扩增)类器官基础培养基

小鼠肝胆管(扩增)类器官培养因子 B (50X)

小鼠肝胆管(扩增)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

小鼠肝胆管类器官完全培养基的制备

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。

小鼠肝胆管类器官的建立与传代培养

原代小鼠肝胆管类器官的建立

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肝组织片。将组织样品保持在 4° C，直到开始分离。

2. 评估获得的组织片是否纯粹由上皮组成，或者是否也含有脂肪或肌肉组织。如果是，在解剖显微镜下，尽可能使用手术剪刀或手术刀和镊子去除非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织存在，立即继续下一步。

3. 用类器官基专用基础培养基冲洗肝组织，直到上清清澈。

4. 在细胞培养皿中，用外科剪刀或手术刀将组织切成 5 mm³ 的小碎片。解剖的样品必须足够小，能够通过 10 ml 移液管的尖端。

5. 将肝组织样本放入 15ml 离心管中，加入 10ml 预冷的类器官专用基础培养基 (含 1% FBS)。

6. 用 10 ml 移液器上下吹打至少 10 次，清洗样品。在接下来的步骤中，使用前在移液管头的内表面涂上抗粘附冲洗液，以避免样品粘附在移液管壁上。

7. 静置，直到组织沉淀在底部。用 10ml 移液管抽吸上清，加入 10ml 预热正常组织消化液。

8. 在 37°C 下以 100 转/分的转速消化肝组织。消化时间不应超过 30 分钟。为防止消化过度，应在显微镜下检查消化过程中是否出现胆管结构。

9. 一旦胆管结构出现，通过添加 2%FBS 停止消化，然后轻轻地上下吹打。

11. 静置 1-2 分钟，将上清液移入新管。

12. 加入 10mL 类器官专用基础培养基，再次重复步骤 11。

13. 在 4° C 下，300g 旋转上清 3 分钟。抽吸并丢弃上清。

14. 用 10mL 类器官专用基础培养基重新悬浮组织，在 4° C 下，300g 离心 3 分钟。

15. 重复步骤 14 两次。

注意：若沉淀含有较多红细胞，可加入 3~5 mL 红细胞裂解液冰上裂解 3~5 min。

16. 抽吸上清液，在基质胶中重悬微球。基质胶应冰冻保存，防止其凝固;因此，工作要迅速。基质胶的量取决于颗粒的大小。大约每 25 μL 的基质胶含有 20-100 个胆管结构。切勿过多稀释基质胶 (基质胶浓度应大于 70%)，以确保形成固体胶滴。

17. 在 24 孔细胞培养板的底部，将含类器官的基质胶滴在孔中心周围约 30 μL 的液滴中。一旦类器官在基质胶中重悬，尽快进行接种，因为基质胶可能会在管或移液器尖端凝固。不要让基质胶接触孔壁。

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

19. 准备所需量的小鼠肝胆管类器官扩增培养基。基质胶液滴凝固后(15- 25min)，打开平板，每孔小心地加入 500 μL 完全培养基。不要直接将培养基添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏液滴。

21. 将培养板置于 37° C 和 5% CO₂ 的培养箱中。

22. 每 3 天更换一次培养基，小心地从孔中抽吸培养基，并用新鲜的、预热的小鼠肝胆管类器官培养基代替。密切监测类器官的形成。理想情况下，小鼠肝胆管类器官第一次传代应在 5 至 8 天之间。

小鼠肝胆管类器官的传代培养

1. 用移液枪吹打破坏基质胶，并将类器官悬液转移到 1.5 mL 锥形管中。

2. 用移液枪吹打使类器官悬浮液充分混合。

3. 在室温下 300g 离心 3 分钟。

4. 抽吸上清，使用机械破坏或类器官消化液分离类器官。

(I) 对于机械破坏，将类器官重悬在 1ml 类器官专用基础培养基中。用移液管尖端将类器官悬浮液上下移动 30 次。用管子底部制造压力，这将有助于类器官的破坏。

(II) 类器官消化液消化，将基质胶和类器官混合物重悬于类器官传代消化液中 (10 倍体积)，吹打混匀，37°C 孵育 3~10 min 至类器官分离。每 2 分钟用移液枪吹打 10 次，密切监测消化，以保持类器官解离溶液中的孵育时间最短。

5. 解离完成后，加 1 mL 基础培养基洗一次，室温下 300g 离心 3 分钟。

6. 抽吸上清，用 70% 的基质胶重悬类器官，类器官胶滴接种在培养板底部。将孔板转移到 37° C 和 5% CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟。

7. 37°C 预热小鼠肝胆管类器官扩增培养基。

8. 在基质胶凝固后(15-25 分钟)，小心地将预热过的培养基加入孔板中。

9. 将培养板置于 37° C 和 5% CO₂ 的培养箱中静置培养，每天于显微镜下观察类器官的生长状态，每 3 天于显微镜下拍照并记录多个视野中的类器官的形态。

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°C 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°C 超低温冰箱中；也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4°C 静置 10 min，-20°C 保存 1 小时，-80°C 保存过夜。

4. 次日或 12 小时后将冻存管于 -80°C 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°C 条件下预热类器官专用基础培养基。

2. 在 37°C 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。