

小鼠肺类器官原代分离培养套装

Cat NO：IMV-MK06

产品描述

小鼠肺类器官原代分离培养套装是一款用于构建、维持培养及传代扩增小鼠肺组织来源类器官的完全培养基。该产品有助于肺实质组织包括肺内各级支气管以及终端的肺泡结构在体外快速生成以及生长，从而提高小鼠肺类器官培养的成功率和小鼠肺类器官的生长速率。

产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品名称	产品规格	储存
小鼠肺类器官完全培养基	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	

小鼠肺类器官完全培养基内含：

小鼠肺类器官基础培养基

小鼠肺类器官培养因子 B (50X)

小鼠肺类器官培养因子 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-014-Y	iPS Y27632	IMMOCELL

小鼠肺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抗生素。

正常组织消化液使用说明

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。

小鼠肺类器官的建立与传代培养

原代小鼠肺类器官的建立

1.取样：将分离的小鼠肺转移到 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。

注意：如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在活组织细胞保存液中，冰上运输尽快处理。

3. 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。

4. 机械分离：将组织剪碎成 5mm² 大小组织块。

3. 消化：加入约 10 倍样本体积的完全组织消化液（一般加入 10 mL），置 37℃ 摇床上，80 rpm，消化 30 min。每隔 10 min 取出吹打，将消化组织团块分散。

4. 终止过筛：消化完成后，加入 5% 血清终止，将消化液过 70 μm 细胞筛网去除组织块，并用类器官专用基础培养基冲洗。400g 离心 5 min 收集细胞沉淀。

5.裂红：弃上清，加入 1 mL 红细胞裂解液重悬，冰上静置 3 min。300 g 离心 3 min。观察细胞沉淀颜色，若沉淀颜色仍是红色，重复本步骤。

6.过筛：将细胞沉淀用 1 mL 类器官专用基础培养基重悬。过 70 μm 细胞筛网去除较大的粘连细胞团，用类器官专用基础培养基冲洗，300 g 离心 3 min。

7.铺胶：用适量类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀（推荐加入 10 倍沉淀体积），置于冰上预冷，加入适量基质胶（IMV-A017）混匀配置成 70% 胶浓度的细胞-培养基-基质胶混合液，点入 24 孔板底部正中央，每孔 30 μL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

注意：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡。

10.凝胶：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.加入培养基：待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的小鼠肺类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL，避免破坏已凝固结构。在原代培养前四天应额外在培养基中添加 y27632（IMC-014-Y）提高类器官存活率，终浓度为 10 uM。

12.后续培养：将 24 孔板置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。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，小鼠肺类器官应在 3 至 4 天内建成。

类器官的传代培养

1. 去胶：用经过类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗的枪头吹打刮取类器官，并将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。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。

注意：移取类器官前枪头都应用类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗，以减少类器官损失。后续不再特意注明。

2. 消化：300 g 离心 3 min，弃上清，加入 10 倍体积的类器官传代消化液并充分混匀，37℃条件下消化孵育 3~10 min 至类器官分散。消化结束后加入适量类器官专用基础培养基中止消化。300 g 离心 3 min。

4. 清洗：弃上清，加入 1 mL 类器官专用基础培养基重悬。300 g 离心 3 min。

5. 铺胶：用适量类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀（推荐加入 10 倍沉淀体积），置于冰上预冷，加入适量基质胶（IMV-A017）混匀配置成 70%胶浓度的细胞-培养基-基质胶混合液，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：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡。

6. 凝胶：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。

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

8. 将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养，每 3~4 天更换培养基，直到类器官需要进一步的实验。

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. 用类器官专用基础培养基清洗两次后，加入类器官冻存液，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）。

注意：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。