

小鼠肺类器官完全培养基

Cat NO: IMV-NM06

产品描述

小鼠肺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.培养基组成信息

产品货号	产品名称	产品规格
IMV-NM06LBM	小鼠肺类器官基础培养基	500mL
IMV-NM06SBM		100mL
IMV-NM06L1	小鼠肺类器官培养因子 B	10mL
IMV-NM06S1		1mL
IMV-NM06L2	小鼠肺类器官培养因子 C	1mL
IMV-NM06S2		0.4mL

小鼠肺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。

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，小鼠肺类器官应在 3 至 4 天内建成。

小鼠肺类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将肺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肺类器官完全培养基，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。