

# 小鼠食管类器官完全培养基

Cat NO: IMV-NM14

## 产品描述

小鼠食管类器官完全培养基是一款用于构建、稳定培养及传代扩增小鼠食管组织来源类器官的完全培养基。该产品有助于食管复层鳞状上皮结构在体外快速形成与稳态维持，从而有效提高小鼠食管类器官的构建成功率及其在长期培养中的结构完整性。

## 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-NM14	小鼠食管类器官完全培养基	500 mL
IMV-NM14		100 mL

## 小鼠食管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℃，有效期一年，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。

## 小鼠食管类器官的建立与传代培养

### 原代小鼠食管类器官的建立

- 取样：将分离的小鼠食管转移到 10 cm 培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入 10 mL 4℃ 预冷的类器官组织保存液，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，组织标本应浸泡在类器官组织保存液中，冰上运输尽快处理。**

2.清洗：将标本使用类器官专用基础培养基进行清洗，反复涮洗约 5 - 10 次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

**注意：原代分离过程中清洗所用的类器官专用基础培养基应加入 1%双抗，从而减少后续污染的可能。**

3. 机械分离：将组织剪碎成 5 mm<sup>2</sup> 大小组织块。

4. 消化：加入约 10 倍样本体积的正常组织消化液（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。

5. 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。400 g 离心 5 min 收集细胞沉淀。

6.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。

7.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。

8.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 30-50 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。**

9.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 15-30 min 待基质胶凝固。

10.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食管类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL，避免破坏已凝固结构。

11.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，小鼠食管类器官应在 3-4 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。

3. 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。

4. 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 30-50  $\mu$ 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 15-30 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食管类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ 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。