

Human Airway Organoid Complete Medium (人气道类器官完全培养基)

货号: HACM-100

产品介绍:

人气道类器官完全培养基是一款用于建立和维持源自人气道干细胞的气道类器官的商品化培养基。气道上皮自我更新是由基底干细胞的增殖驱动的。人气道类器官包含基底细胞、纤毛细胞、分泌细胞和少数神经内分泌细胞,因此在结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面表现出气道上皮的所有特征,在气道发育和疾病的研究中具有良好的应用前景。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human Airway Organoid Complete Medium A	HACM-100	100mL	4℃, 6个月
Human Airway Organoid Complete Medium B(50X)		1mL*2	-20℃, 1年
Human Airway Organoid Complete Medium C(250X)		0.4mL	-20℃, 1年

其他需准备的试剂信息

试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHRbio	OEM-10
正常组织消化液	SHRbio	NTD-50
上皮类器官基础培养基	SHRbio	OBM-500
类器官传代消化液	SHRbio	OPD-100
类器官润洗液	SHRbio	OMR-100



红细胞裂解液	-	-
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

人气道类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备人气道类器官完全培养基。以下是准备 10mL 完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Human Airway Organoid Complete Medium B (50x)和Human Airway Organoid Complete Medium C (250x)。

注意：解冻后，建议将Human Airway Organoid Complete Medium B (50x)和Human Airway Organoid Complete Medium C (250x)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 200 μ L Human Airway Organoid Complete Medium B(50X)，40 μ L Human Airway Organoid Complete Medium C(250X)加至 9.76mL Human Airway Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10mL 人气道类器官完全培养基。

注意：配制后的人气道类器官完全培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存，建议在两周内使用。Human Airway Organoid Complete A内含有细菌及真菌抗生素。

人气道类器官原代培养

注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关机构和政府法规。在收集人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

1. 将组织从 4 $^{\circ}$ C样本保存液 (SPS-100) 中取出，评估所获得的组织块是否由上皮细胞组成，是否含有脂肪或肌肉组织。如果含有脂肪或肌肉组织，需在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和钳子尽可能移除非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，立即继续下一步。
2. 用上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 或 DPBS 冲洗组织，直到上清液澄清。
3. 使用外科剪刀或手术刀将组织切成0.5-1mm³的小碎块，放入 5mL离心管中。
4. 加入10 mL预热过的正常组织消化液 (NTD-50)，37 $^{\circ}$ C消化60-90min。

注意：密切监测消化过程，每10分钟通过剧烈摇晃或上下吸取混合物来混合试管中的内容物。当大多数组织碎片能够通过1mL移液管尖端时，消化过程就可以完成。为了防止过度消化，也可以在显微镜下观察消化情况。

5. 加入 2%的 FBS 来终止消化，并轻轻地上下晃动离心管。
6. 使用 100 μ m 滤网过滤，收集滤液。



7. 在4℃下, 300g离心滤液3 min, 弃上清。如果细胞沉淀为红色, 吸弃上清液后, 加入2mL红细胞裂解液重悬沉淀, 在室温下裂解红细胞30s, 然后300g离心3min。
8. 吸弃上清液后, 加入10 mL的上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀, 300 g离心3 min, 弃上清。
9. 重复步骤8一次。
10. 吸弃上清液后, 加入1mL上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀, 转移至1.5mL EP管中, 300g离心3 min。
11. 吸弃上清液后, 用适量的基质胶 (OEM-10, > 70% vol/vol) 重悬组织沉淀, 推荐重悬密度为每25μL基质胶悬液含10000个细胞, 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。
12. 将悬液点入 24 孔板底部正中央, 每孔 30μL 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。
13. 将铺好的培养板至于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中, 孵育 15-25min 左右成胶。
14. 配制人气道类器官完全培养基。
15. 待基质胶完全凝固后, 加入已配制好的人气道类器官完全培养基, 24 孔板每孔 500μL。
注意: 请沿壁缓慢加入, 避免破坏已凝固结构。
16. 将 24 孔板置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。每 3 天更换一次培养基, 更换培养基时应避免破坏基质胶。
17. 密切监测类器官的形成。理想情况下, 人气道类器官可以在初次接种后5~7天进行首次传代。原代培养的人气道类器官生长过程如图1A-B所示。

人气道类器官传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官, 并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5mL EP 管中。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力吹打重悬类器官悬浮液, 使得类器官与基质胶分离。
3. 在室温条件下 300g 离心 3min, 弃上清, 加入 0.2ml 类器官传代消化液 (OPD-100) 重悬底部类器官沉淀, 用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于 37℃ 下孵育, 直到类器官消化完成。
注意: 密切监测类器官消化情况, 将消化时间控制在最短时间内完成 (不要超过6min)。根据经验, 如果可以观察到小块细胞 (由10-50个细胞组成) 的混合物, 消化就完成了。
4. 加入 1mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 洗涤沉淀一次, 室温条件下 300g 离心 3min。
5. 吸弃上清液后, 用适量的基质胶 (OEM-10, > 70% vol/vol) 重悬组织沉淀。
6. 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 30μL 左右。
7. 将接种完成后的培养板至于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中, 孵育 15-25min 左右成胶。
8. 待基质胶完全凝固后, 加入配制好的人气道类器官完全培养基, 24 孔板每孔 500μL。



9. 将 24 孔板置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。传代后的人气道类器官生长过程如图 1C-D 所示。

注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。



附录1 人气道类器官培养过程图

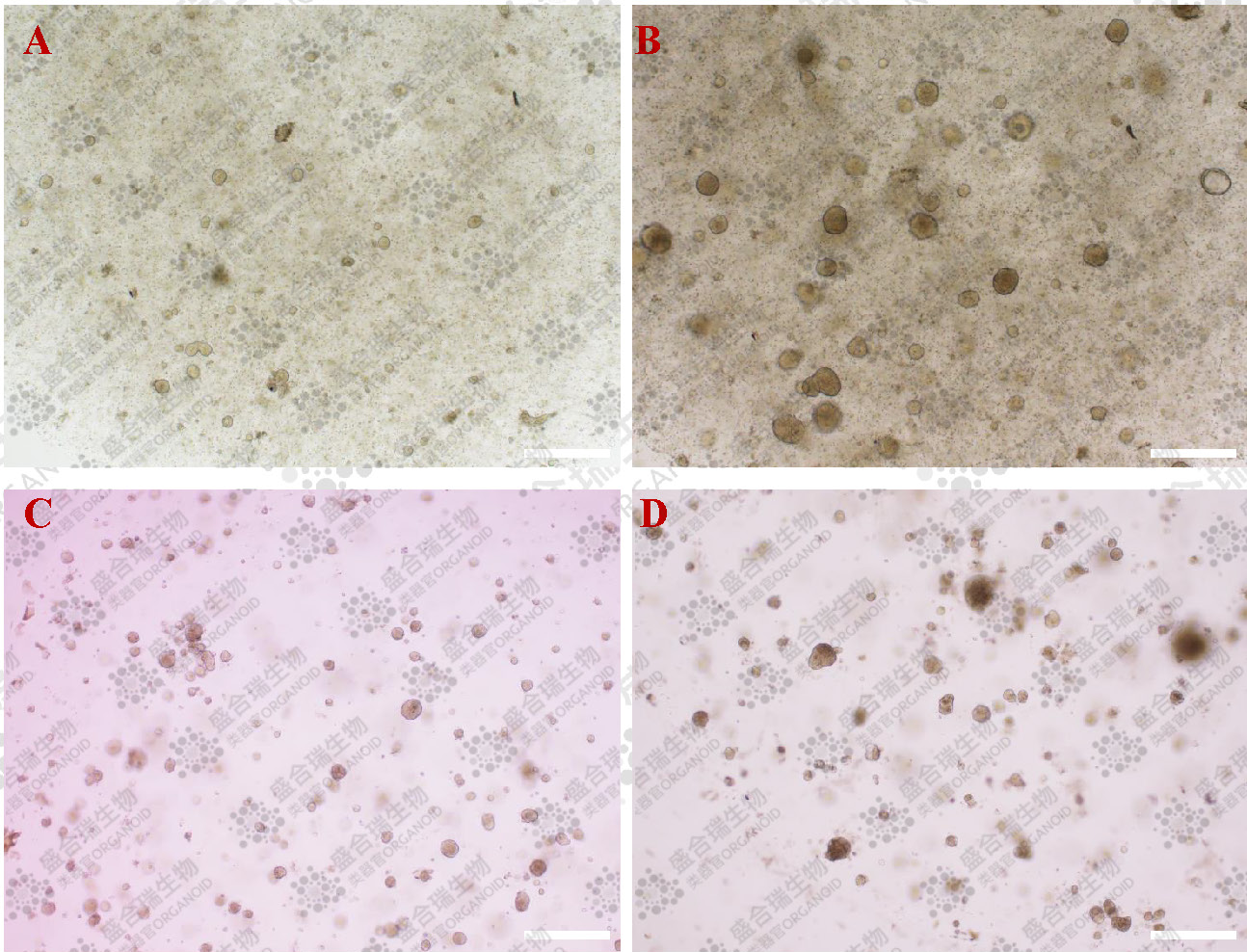


图1 人气道类器官培养过程示例

(A-B) 原代人气道皮类器官的生长状态 (P0)，可见明显的生长趋势。原代类器官以实质结构为主，直径约80-100 μm 。(C-D) 第一代人气道类器官的生长状态 (P1)，传代后的类器官仍以实质结构为主。比例尺：500 μm 。

