

Mouse Airway Organoid Complete Medium (小鼠气道类器官完全培养基)

货号: MACM-100

产品介绍:

小鼠气道类器官完全培养基是一款用于建立和维持源自小鼠气道干细胞的气道类器官的商品化培养基。气道上皮的自我更新是由基底干细胞的增殖驱动的。小鼠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
Mouse Airway Organoid Complete Medium A	MACM-100	100mL	4°C, 6个月
Mouse Airway Organoid Complete Medium B(50X)		1mL*2	-20°C, 1年
Mouse Airway Organoid Complete Medium C(250X)		0.4mL	-20°C, 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)	-	-

小鼠气道类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备小鼠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Mouse Airway Organoid Complete Medium B (50x)和Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250x)。

注意：解冻后，建议将Mouse Airway Organoid Complete Medium B (50x)和Mouse 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 Mouse Airway Organoid Complete Medium B(50X)，40 μ L Mouse Airway Organoid Complete Medium C(250X)加至 9.76mL Mouse Airway Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10mL 小鼠气道类器官完全培养基。

注意：配制后的小鼠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。Mouse Airway Organoid Complete A内含有细菌及真菌抗生素。

小鼠气道类器官原代培养

1. 准备若干培养皿，加入 4 $^{\circ}$ C预冷的含有抗生素的 DPBS 备用。
2. 取小鼠原代气道组织，置于培养皿中用 DPBS 冲洗 2 次。
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 $^{\circ}$ C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-1min，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°C CO₂恒温培养箱中，孵育15-25min左右成胶。
 14. 配制小鼠气道类器官完全培养基。
 15. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠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°C 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，小鼠气道类器官可以在初次接种后5~7天进行首次传代。原代培养的小鼠气道类器官生长过程如图1所示。

小鼠气道类器官传代培养

1. 用经过润洗液（OMR-100）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°C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°C 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，加入配制好的小鼠气道类器官完全培养基，24孔板每孔500μL。
 9. 将24孔板置于37°C CO₂培养箱中培养。传代后的小鼠气道类器官生长过程如图2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 小鼠气道类器官培养过程图

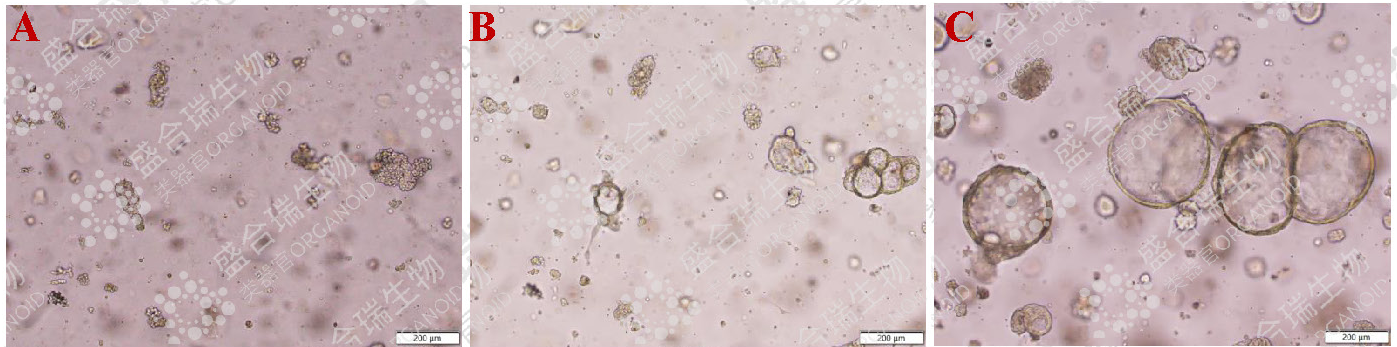


图1 小鼠气道类器官原代 (P0) 培养过程示例

(A) 接种当天可见活性细胞团；(B) 生长至第2天时，可观察到闭合囊泡；(C) 继续生长至第5天，囊泡直径明显增大。比例尺：100µm。

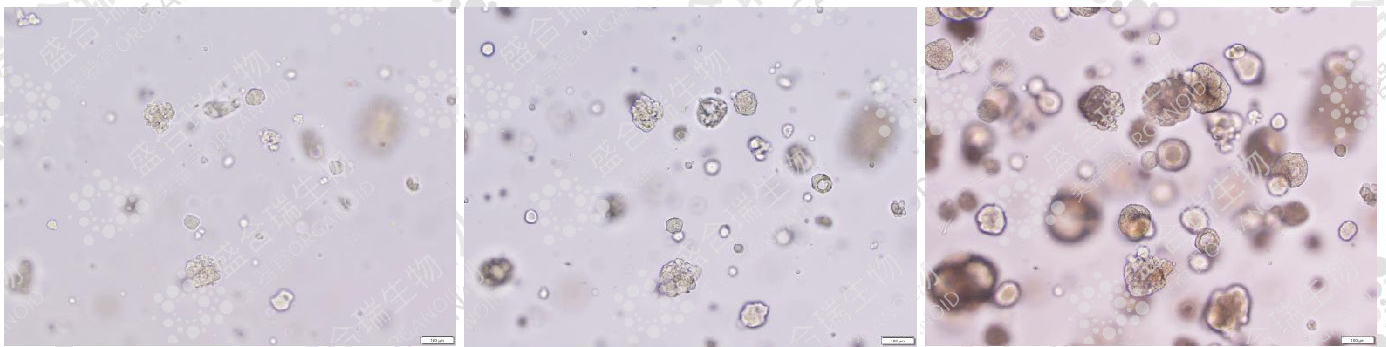


图2 小鼠气道类器官首次传代后 (P1) 生长过程示例

(A) 传代当天可见活性细胞团；(B) 生长至第1天时，可观察到明显的囊泡结构；(C) 继续生长至第6天，囊泡直径明显增大，且状态较好，可继续进行传代。比例尺：100µm。



附录2 小鼠气道类器官组织染色鉴定图

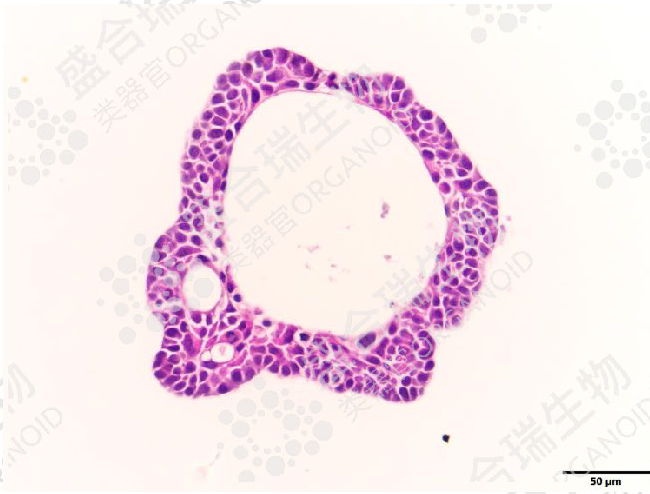


图3 小鼠气道类器官HE染色

HE染色结果显示，小鼠气道类器官中央空腔，具有极化、分层的气道上皮结构，其中含有基底细胞、分泌细胞和纤毛细胞等。比例尺：50μm。

附录3 小鼠气道类器官免疫荧光鉴定图

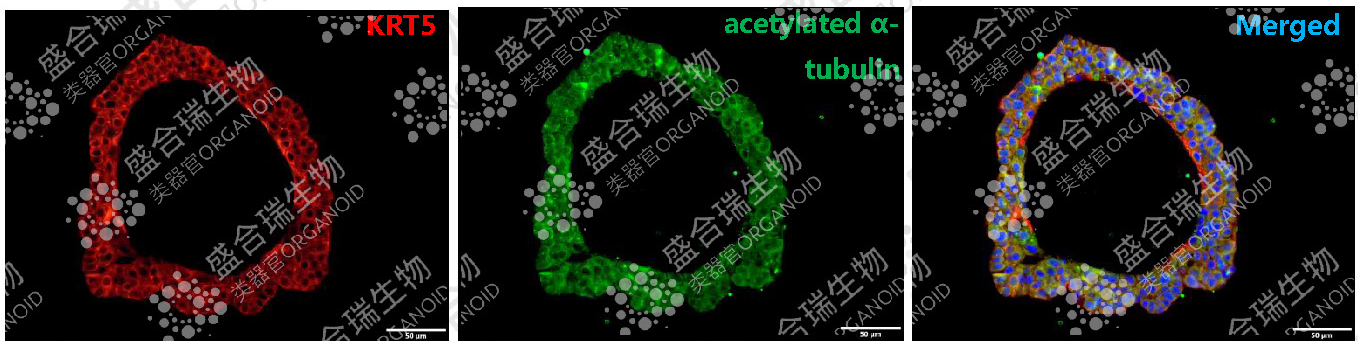


图4 免疫荧光观察小鼠气道类器官中的细胞组成

KRT5（红色）为基底细胞标志物，acetylated α -tubulin（绿色）为纤毛细胞标志物，DAPI（蓝色）用于标记细胞核。比例尺：50μm。

