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	100 mL	4℃，6个月
Mouse Airway Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20℃，1年
Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250×)		0.4 mL	-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	SHR Biotechnology	OEM-10
正常组织消化液	SHR Biotechnology	NTD-50
上皮类器官基础培养基	SHR Biotechnology	OBM-500

类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100
类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50
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 10 mL 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 (50×)和Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250×)。

注意: 解冻后，建议将Mouse Airway Organoid Complete Medium B (50×)和Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于微量试剂组分Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250×)，建议瞬时离心5秒钟（500-2000 rpm）后，再开盖分装使用，以避免损失。

2. 将 200 µL Mouse Airway Organoid Complete Medium B (50×)，40 µL Mouse Airway Organoid Complete Medium C (250×)加至 9.76 mL Mouse Airway Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 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 °C储存不超过1周，建议现配现用。Mouse Airway Organoid Complete Medium Medium 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 ℃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0.5-1 mm^3的小碎块，放入 5 mL离心管中。
4. 加入5倍体积预热过的正常组织消化液（NTD-50），37 ℃消化60-90 min。

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1 mL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 10 mL（约 3~5 倍体积）上皮类器官基础培养基（OBM-500）来终止消化，并轻轻地上下晃动离心管。
6. 使用 100 μm 滤网过滤，收集滤液。
7. 在4 ℃下，300 *g*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2 mL类器官裂红液（OCM-50）重悬沉淀，在室温下裂解红细胞30 s-1 min，然后300 *g*离心3 min。

注意： 红细胞裂解的具体时间可以根据红色深浅进行判断，尽量去除红细胞。

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. 吸弃上清液后，加入1 mL上皮类器官基础培养基（OBM-500）重悬沉淀，转移至1.5 mL EP管中， 300 *g*离心3 min。
10. 吸弃上清液后，用适量的类器官专用基质胶（OEM-10, > 70% vol/vol）重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每μL基质胶悬液含8-20个细胞团（约200-500个细胞），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： 24孔板每孔推荐接种一个30 μL基质胶滴，可根据细胞计数结果确定需要接种的胶滴数量。混合过程中应尽量避免产生气泡，以免影响后续观察以及类器官生长。

11. 将悬液点入 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： 为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

12. 将铺好的培养板置于 37 ℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
13. 配制小鼠气道类器官完全培养基。
14. 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 500 μL。

注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

15. 将 24 孔板置于 37 ℃ CO_2 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。
16. 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

当类器官直径长至100-200 μm左右时，即可进行传代培养，具体步骤如下：

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 1.5 mL 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 300 *g* 离心 3 min，弃上清，加入 0.2 mL 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。也可以采用机械吹打方式进行类器官传代消化，即在加入 1 mL 上皮类器官基础培养基（OBM-500）重悬底部类器官沉淀后，小心地将类器官悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏类器官。

注意： 密切监测类器官消化情况，使用类器官传代消化液时需要将消化时间控制在最短时间内完成（不要超过 5 min）。根据经验，如果可以观察到大部分小细胞团（由 10-50 个细胞组成）出现，消化就完成了。建议优先采用机械吹打方式进行类器官传代消化，对于无法吹散的类器官进一步使用类器官传代消化液进行消化。

4. 加入 1 mL 上皮类器官基础培养基（OBM-500）洗涤沉淀一次，室温条件下 300*g* 离心 3min。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 吸弃上清液后，用适量的基质胶（OEM-10，> 70% vol/vol）重悬组织沉淀。

注意： 如类器官生长状态较好，传代比例推荐为 1:3~1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

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。
8. 将接种完成后的培养板至于 37 ℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
9. 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 500 μL。

注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

10. 将 24 孔板置于 37 ℃ CO_2 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。

小鼠气道类器官的冻存

当类器官平均直径长至100-200 μm，增殖活性较好且结构透亮，边界清晰时，即可进行冻存。具体步骤如下：

1. 吸弃原培养液，加入4 ℃预冷的上皮类器官基础培养基（OBM-500），用经过类器官润洗液（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1.5 mL EP管中。
2. 用经过类器官润洗液（OMR-100）润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。

注意： 吹打力度需要控制，尽量保证类器官的完整性，以提高冻存后的复苏活性。

3. 在室温条件下300 *g*离心3 min，弃上清。
4. 加入1 mL上皮类器官基础培养基（OBM-500）洗涤沉淀一次，室温条件下300 *g*离心3 min，弃上清。
5. 类器官沉淀中加入1 mL预冷的类器官冻存液（OFM-50），吹打混匀后立即移入冻存管中。
6. 程序降温及长期保存：

冻存方法（1）： 将冻存管放入梯度降温冻存盒然后保存至-80 ℃过夜，第二天取出放入液氮罐。

冻存方法（2）： 4 ℃冰箱放置 10 min，转移至-20 ℃放置 30 min，转移至-80 ℃过夜，第二天取出放入液氮罐。

注意： -80 ℃冻存建议不超过 3 个月，液氮冻存建议不超过 1 年。

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。

论文发表规范引用参考

Mouse airway organoids were cultured with Mouse Airway Organoid Complete Medium (MACM-100，SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.

附录1 小鼠气道类器官培养过程图

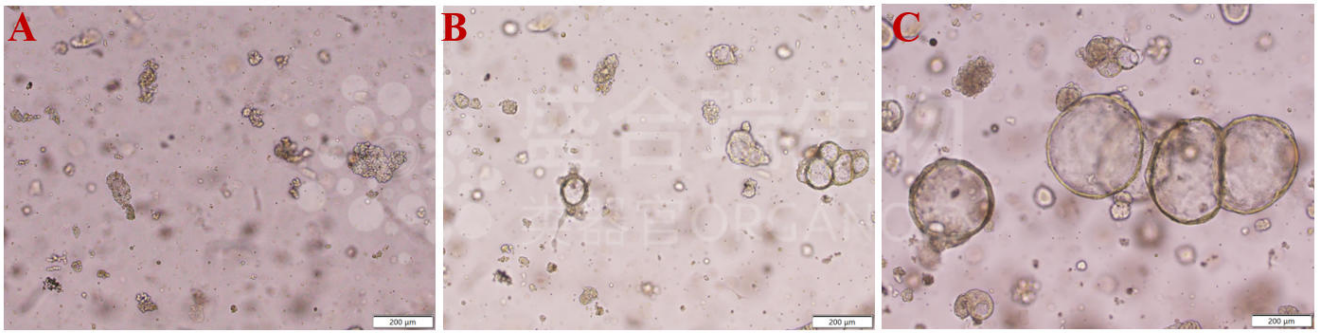

图1 小鼠气道类器官原代（P0）培养过程示例

（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。

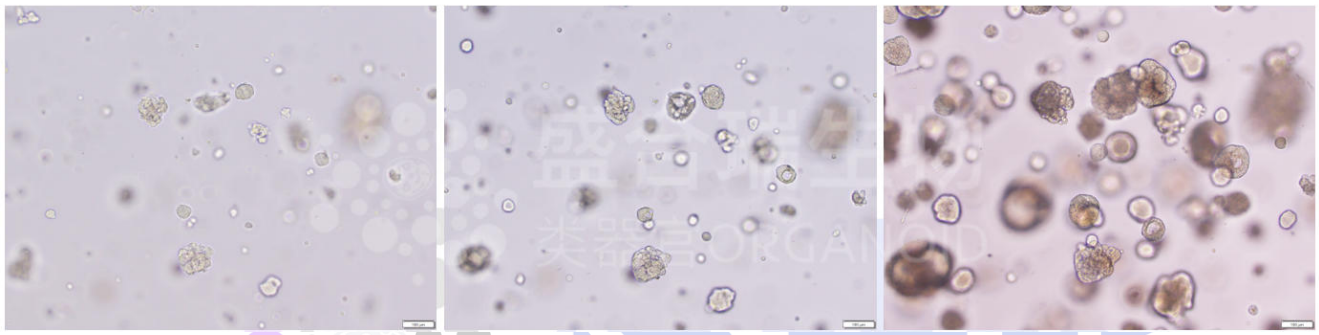

图2 小鼠气道类器官首次传代后（P1）生长过程示例

（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

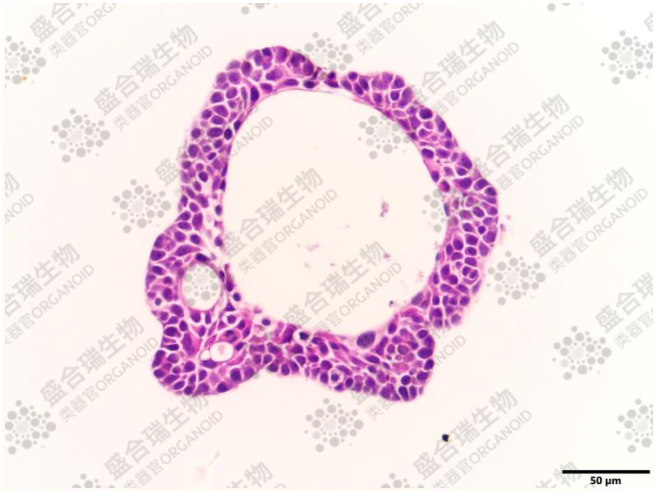

图3 小鼠气道类器官HE染色

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

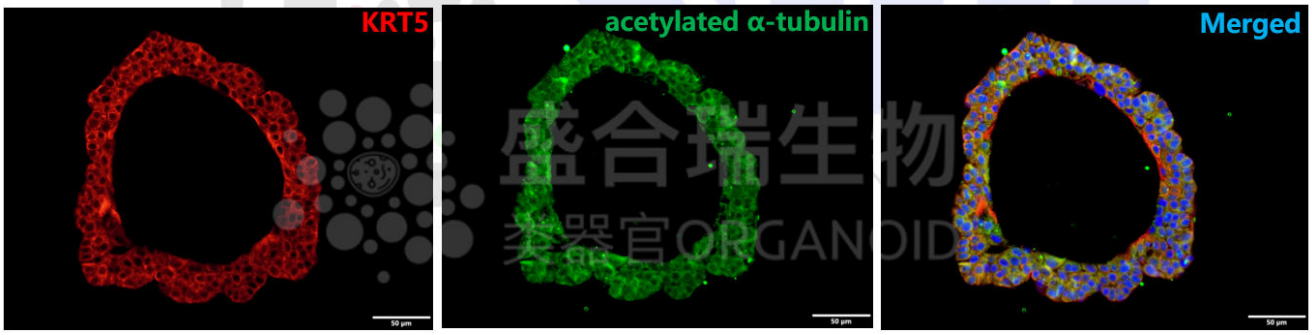

图4 免疫荧光观察小鼠气道类器官中的细胞组成

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：50 μm。