MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基

MasterAim® Human-Derived Trophoblast Organoid Complete Medium

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案

艾名医学 AIMINGMED
杭州艾名医学科技有限公司
官网：www.aimingmed.com
地址：浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园10幢南座1层
电话：0571 - 85352695
邮箱：info@aimingmed.com

产品介绍

人源滋养层类器官模型一般用来研究人类胎盘发育以及研究胎儿与母体环境的相互作用。 MasterAim®人源滋养层类器官培养体系模拟了滋养层细胞体内生长的微环境，可以从人胎盘绒毛组织快速生成滋养层祖细胞类器官，极大程度的维持了来源于体内的胎盘绒毛组织中滋养层的特征。MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基适用于人胎盘绒毛组织来源的滋养层类器官的构建、维持培养及传代扩增。

产品信息

MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基包括：人源滋养层类器官基础培养基及添加物，组分不单独售卖。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基	10-100-452	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®人源滋养层类器官基础培养基	100-453	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®人源滋养层类器官培养基添加物	100-454	5 mL	-20°C，12个月

相关产品

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®组织运输保存液	100-032	100 mL	-20°C，12个月
MasterAim®组织消化液 I	100-047	100 mL	-20°C，12个月
MasterAim®组织消化液II Plus	100-486	50 mL	-20°C，12个月
MasterAim® Primary Enhancer	100-008	0.5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®抗粘附液	100-291	100 mL	4°C，12个月
MasterAim®类器官冻存液	100-045	100 mL	4°C，12个月
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
MasterAim® Express 酶 (1X)，含酚红	100-546	100 mL	4°C，24个月
红细胞裂解液	/	/	/
基质胶	/	/	/

人胎盘组织的运输

将新鲜组织标本置于标本储存管中（注：组织块太大将影响组织运输保存液中营养物质的交换，影响标本活性），需加入足量MasterAim®组织运输保存液（#100-032）浸没组织，于2 - 8°C运输，尽快运输至实验室进行处理。

MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前将 MasterAim®人源滋养层类器官基础培养基（#100-453）和 MasterAim®人源滋养层类器官添加物（#100-454）从-20°C取出，冰上放至融化。

2. 完全培养基配制：将人源滋养层类器官培养基添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为人源滋养层类器官完全培养基。

3. 原代标本培养：取10 mL配置好的完全培养基，加入100 µL MasterAim®Primary Enhancer（#100-008），即可使用。

4. 维持培养：对于非原代标本的培养，使用MasterAim®人源滋养层类器官完全培养基即可。

注：（1）类器官完全培养基中不含有抗生素成分，请根据实验需求自行添加，推荐工作浓度为1%。

（2）建议进行适当分装，-20°C储存，开封后，4°C保存使用，并于2周内用完，避免反复冻融。

人源滋养层类器官构建

1. 标本处理和清洗：将组织标本（6-9周胎龄）转移到10 cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入10 mL DPBS-PS（#100-184），清除血凝块。随后，使用DPBS-PS进行标本清洗，反复涮洗约3 - 5次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

注：PS为双抗，DPBS-PS为添加1%双抗的DPBS(#100-184)。

2. 消化前标本准备：清洗完成后在干净的培养皿中加入10 mL DPBS-PS，保证液体能完全没过标本。用镊子将胎盘摊平，胎膜面在下，绒毛面朝上，左手持镊子夹住绒毛根部位置，右手持手术剪刀剪下绒毛，收集绒毛至另一个装有DPBS-PS的培养皿中，注意不要剪到胎膜。将收集到的绒毛转移至1.5 mL EP管中，离心机瞬离后去除上清，加入200 uL的MasterAim®组织消化液Ⅰ（#100-047），用手术剪将绒毛剪至1 mm^3的碎片。将绒毛碎片转移至15 mL的离心管（用抗粘附液预先润湿）中。

3.消化阶段Ⅰ：向离心管中加入4 mL MasterAim®组织消化液Ⅰ，37°C摇床消化30 min，每隔10 min观察是否有大量的细胞漏出，该步骤的消化时间可能会根据标本的情况进行调整。当有细胞大量漏出，且组织块中大部分细胞已经被消化出来时，即可终止消化阶段Ⅰ。

4. 终止消化阶段Ⅰ：加入8 mL DPBS-PS终止消化，300g，离心5 min，弃上清。

5. 消化阶段Ⅱ：向离心管中加入2 mL MasterAim®组织消化液Ⅱ Plus（#100-486），37°C，摇床消化10 min。镜下观察大部分细胞呈单细胞状态，即可终止消化阶段Ⅱ。

6. 终止消化阶段Ⅱ：加入8 mL DPBS-PS终止消化，300g，离心5 min，弃上清。

7. 收集细胞：加入10 mL DPBS-PS对细胞进行重悬，使用2 mL MasterAim®抗粘附液（#100-291）预先湿润一个40 µm的细胞筛网，将细胞悬液使用该细胞筛网过滤，将滤出的滤液进行离心，300g，5 min，弃上清。

8. （可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈现红色），加入红细胞裂解液进行裂红（具体实验方法参考产品说明书）后，300g，5 min，弃上清，使用1 mL DPBS-PS重悬。

9. 计数：通过自动细胞计数仪或者手动计数板计出细胞的个数。计数后，300g， 离心5 min，弃上清，收集细胞沉淀。

10. 接种：将获取的细胞沉淀，按照800个单细胞/µL的密度重悬于基质胶（BME或Matrigel）中（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。将基质胶重悬后的细胞接种至37°C预热的细胞培养板中，注意枪尖不要接种至培养板的底部，胶滴应接种于培养孔的中心位置，若是48孔板，则每孔可接种25 µL。将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后，倒置培养板静置25 min。

11. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入300 µL预热的MasterAim®类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将1 mL

DPBS-PS均匀加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。

12. 培养：将培养板的盖子盖上，并在37℃和5％CO_2下进行培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（一般建议每2-3天进行全换液或半换液）。一般在接种6-7天后，可观测到类器官形成。*此处应注意监测鉴别类器官形态：空泡状类器官来源于蜕膜腺，若空泡状的类器官数目较多，则可判定为组织分离时腺体污染，应尽可能避免传代。

人源滋养层类器官传代

1.传代标准： 在传代前，保证生成数量较多且致密的类器官簇，同时还需确保大部分类器官的大小大于100 μm。（一般每7-10天左右可进行传代。）

2.消化：将培养类器官的48孔板取出，用移液器去除培养基，每孔加入200 μL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**，使用1 mL枪头将胶滴吹散（可根据类器官量适量增加**MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**的体积）。37℃培养箱孵育5 min后，使用移液枪吹打5-10次，显微镜下观察类器官消化情况，待大部分类器官消化至单细胞时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

3. 收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，去上清，收集类器官，使用1 mL DPBS-PS重悬。

4. 计数：通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞的个数。计数后，300g， 离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 接种：将获取的类器官沉淀，根据计数结果重悬于基质胶（Matrigel）中，一个胶滴大约需要2万个单细胞。吸取25 μL细胞悬液，并加入到提前预热的48孔板（提前预热半小时）的中心部位。（不要将类器官接种到最外侧的孔中。）将接种好的培养板放置在37℃下静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。

6. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入300 μL于37℃预热的MasterAim®类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将1 mL DPBS-PS均匀加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。

7. 培养：37℃，5％CO2下进行培养。每2 - 4天进行一次全换液，观察生长情况，并进行拍照记录，直至下次传代。

注：所有接触类器官的移液管、枪头等类器官培养耗材均需进行润洗，以免在传代过程中出现本的流失，推荐使用MasterAim®抗粘附液（#100-291）效果更佳。

人源滋养层类器官冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，数目较多，大部分类器官的大小大于100 μm时，即可进行冻存。

2. 消化：小心吸走培养孔中的培养基，每孔加入200 μL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**，吹散胶滴，37℃培养箱，孵育3 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至大部分为单细胞时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

3.收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，弃上清；使用1 mL DPBS-PS重悬。

4. 计数：通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞的个数。计数后，300g， 离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 冻存：根据类器官计数结果，加入适量MasterAim®类器官冻存液（#100-045）重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，类器官每管冻存细胞量约为$5*10^5$个，每管1 mL，若细胞量较多时应注意分管冻存；将冻存管置于程序降温盒中，-80℃过夜保存（或进行梯度降温，4℃放置20 min，-20℃放置2 h，-80℃放置过夜），最后转移至液氮罐。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

2. 本产品仅适用于新鲜获取或在组织保存液中保存24 h内的新鲜标本。

3. 本产品培养结果会受到标本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。