# MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基

MasterAim® Mouse Epidermal 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

MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基适用于原代小鼠皮肤样本来源的小鼠表皮类器官的构建，或从冻存的小鼠表皮类器官进行维持培养及传代扩增，构建的小鼠表皮类器官主要细胞类型为增殖的表皮干/祖细胞和分化的表皮细胞，极大程度维持了来源于小鼠表皮组织的特征，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

## 产品信息

MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基包括：小鼠表皮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®小鼠表皮类器官完全培养基 | 10-100-635 | 1 盒 | -20°C，12个月 |
| MasterAim®小鼠表皮类器官基础培养基 | 100-636 | 95 mL | -20°C，12个月；4°C，3个月 |
| MasterAim®小鼠表皮类器官培养基添加物 | 100-637 | 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 | 10-032 | 100mL | -20°C，12个月 |
| MasterAim®皮肤组织消化液 I | 100-639 | 100 mL | -20°C，12个月 |
| MasterAim®皮肤组织消化液II | 100-640 | 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 |
| Pen-Strep Solution | / | 参考供应商说明书 | 参考供应商说明书 |
| MasterAim® Express 酶（1X），含酚红 | 100-546 | 100 mL | 4°C，24个月 |
| Matrigel，GFR | Corning,356231 | 10 mL | -20°C，24个月 |

## MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®小鼠表皮类器官基础培养基（#100-636）**和 **MasterAim®小鼠表皮类器官培养基添加物（#100-637）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基配制：将小鼠表皮类器官培养基添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为小鼠表皮类器官完全培养基。

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®小鼠表皮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，推荐使用Pen-Strep Solution，工作浓度为1%。

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

（3）所有移液管、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类器官的流失，推荐使用MasterAim®抗粘附液（#100-291）效果更佳。

## 小鼠来源的表皮类器官构建

1. 样本处理：将新生3天内的小鼠浸泡于75%酒精中，淹没浸润5 min，随后转移至10 cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入10 mL **DPBS-PS**。

注：DPBS-PS为添加1% Pen-Strep Solution的**DPBS(#100-184)**。*如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在组织保存液中，建议使用MasterAim®组织运输保存液（#100-032），冰上运输尽快处理。

2. 样本清洗：用手术剪小心剥去小鼠背部皮肤，同时剪去多余的脂肪组织和筋膜，将组织使用DPBS-PS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。

3. 消化前样本准备：清洗完成之后，将组织转移至新的培养皿中，用镊子将小鼠背部皮肤调整为真皮面向上，表皮面向下，至于培养皿中展平。

4. 消化阶段Ⅰ：加入10 mL的**MasterAim®皮肤组织消化液Ⅰ（#100-639）**，37 °C孵箱内消化1 h。随后用巴氏吸管吸除消化液，将小鼠背部皮肤组织转移至含有新的10mL预冷的清洗液的培养皿中，用无齿弯镊小心地将表皮剥下。

5. 消化阶段Ⅱ：将剥下的表皮组织转移至1.5mLEP管中，使用手术剪刀，将小鼠表皮组织剪碎成1 - 2 $mm^3$的碎块，可加少量（200 µL）**MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ(#100-640)**进行剪切，将切碎的组织转移至15 mL的离心管（用抗粘附液预先润湿）中。收集剪碎表皮组织于15 mL离心管，补充5 mL的MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ，置于37 °C孵箱中消化1 h。

6. 终止消化阶段Ⅱ：加入10 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，用巴氏吸管上下吹打多次后，使用2 mL **MasterAim®抗粘附液（#100-291）**预先润洗一个70 µm的细胞筛网，将细胞悬液使用该细胞筛网过滤，将滤液进行离心，300g，5 min，弃上清。

8. 计数：使用1 mL DPBS-PS重悬，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后300g，离心5 min，去上清，收集组织沉淀。

9. 接种：按照2000 - 4000 cells/µL的密度接种（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。首先根据计数结果，使用完全培养基将获取的细胞沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶，充分混合，将重悬后的细胞悬液接种至37℃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24孔板，则每孔可接种50 µL。将接种好的培养板放置在37℃培养箱中静置5 min后，倒置培养板静置25 min。

10. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入600 µL于37℃预热的MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

11. 培养：盖上培养板板盖，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3 - 4天进行全换

液或半换液）。一般在接种3 - 4天后，可观测到类器官形成。

## 小鼠来源的表皮类器官传代

1. 传代标准：在传代前，确保大部分类器官的直径大于100 μm。传代窗口期一般为7 - 10天，传代比例一般为1:2或1:3。

2. 消化：将24孔板取出，用移液器去除培养基，每孔加入0.5 mL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红（#100-546）**，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℃培养箱消化5 - 10 min（避免消化过度，影响类器官生长），显微镜下观察类器官消化情况，待大部分类器官消化至30 - 40 μm大小时，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洗离心管），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。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS重悬，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后，300g， 离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 接种：以24孔板为例，参考接种密度200-500 cells/μL（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。首先根据计数结果，使用完全培养基将获取的类器官沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶（Matrigel），充分混合。吸取50 μL细胞悬液，并加入到37℃预热的24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℃培养箱中静置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600 μL于37℃预热的MasterAim®小鼠表皮类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

7. 培养：盖上培养板板盖，并在37℃和5%$CO_2$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样本的流失，推荐使用**MasterAim®抗粘附液（#100-291）**效果更佳。

## 小鼠来源的表皮类器官冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分类器官的直径大于100 μm，数量不低于500个时，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0.5 mL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**，吹散胶滴，37℃培养箱消化5 - 10 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至30 - 40 μm大小时，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洗离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，弃上清。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS重悬，通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞个数。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，推荐每管冻存500个类器官（细胞量约为$5*10^5$个），冻存数量过少可能会影响类器官的复苏，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。