MasterAim®人肝类器官完全培养基

MasterAim® Liver 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®人肝类器官培养体系模拟了细胞体内生长的微环境，可以从人体来源的肝组织快速生成肝祖细胞类器官和肝管细胞类器官，极大程度维持了来源于体内肝组织的特征。MasterAim®肝类器官完全培养基适用于人源肝组织来源类器官的构建、维持培养及传代扩增。

产品信息

MasterAim®人肝类器官完全培养基包括：人肝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®人肝类器官完全培养基	10-100-574	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®人肝类器官基础培养基	100-575	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®人肝类器官培养基添加物	100-576	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	100-048	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	100-547	100 mL	4°C，24个月
推荐使用基质胶：Matrigel® 生长因子减量(GFR) 基底膜基质，不含酚红，不含LDEV	356231，Corning	10 mL	-20°C，24个月

MasterAim®人肝类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前将 MasterAim®人肝类器官基础培养基（#100-575）和 MasterAim®人肝类器官培养基添加物（#100-576）从-20℃取出，于冰箱内4℃解冻过夜。

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

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®人肝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℃储存，开封后，4℃保存使用，并于2周内用完，避免反复冻融。

（3）接触到类器官或组织的移液管、枪头、离心管等塑料制品，建议使用预冷的MasterAim®抗粘附液或下一步的试剂提前润洗，减少类器官或组织的丢失。

（4）以下操作步骤除特殊标明，建议在冰上进行操作或使用预冷的试剂。

人源肝类器官构建

1. 样本处理：将组织标本转移到10 cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入10 mL DPBS-PS（#100-184），清除多余组织。

*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：将标本使用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：清洗完成后加入MasterAim®组织消化液Ⅰ（#100-047）约200 μL。将标本剪切至0.5 - 1 mm^3的大小，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。

4.消化阶段Ⅰ：加入4 mL MasterAim®组织消化液Ⅰ，37℃摇床消化，因肝脏组织中含有胆酸，胆酸分泌会使得消化液Ⅰ PH改变，从而影响消化效率，可先消化 10 min，吹匀，300 g 离心 5 min 后弃上清，再加入 2 - 3 mL新的消化液Ⅰ，继续消化10 - 20 min，使用移液器吹打30 - 40次后，镜下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。

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

6. 消化阶段Ⅱ：加入2 mL MasterAim®组织消化液Ⅱ（#100-048），37℃，摇床消化10 - 15 min。镜下观察到大部分细胞呈细胞团块（< 200 μM）既可终止消化阶段Ⅱ（注：不要消化到单细胞状态）。

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

8. 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100 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，300 g，5 min，弃上清。

9. 如含较多红细胞（细胞沉淀呈现红色），可加入2 - 4 mL红细胞裂解液（#100-547）进行裂解，时间约5 - 8 min，若红细胞较多，可增加红细胞裂解液用量。裂解结束后加入2倍体积DPBS-PS终止裂解，300 g，5 min，弃上清。

注：若是1次无法裂解干净，可以进行2次裂红，操作同上，但不建议裂红次数超过2次。

10. 计数：使用1 mL DPBS-PS重悬组织沉淀，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，300 g， 离心5 min，弃上清，收集细胞沉淀。

11.接种：将获取的细胞沉淀，按照4000 - 6000 cells/μL的密度重悬于基质胶中（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℃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℃下静置5 min后，倒置培养板静置25 min。

12. 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®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。

13. 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。

人源肝类器官传代

1.传代标准： 在传代前，确保大部分类器官的大小大于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：将培养类器官的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 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40 - 60 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湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300 g，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，300 g， 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，以24孔板为例，参考接种密度400 cells/μL。吸取50 μL细胞悬液，并加入到提前预热的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℃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600 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：盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO2下进行培养。每3 - 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。

人源肝类器官冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分类器官的大小大于100 μM，数量不低于1000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 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至40 - 60 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湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300 g，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，300 g， 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1000个类器官（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。