MasterAim®小鼠肝类器官分化试剂盒

MasterAim® Mouse Liver Organoid Differentiation Kit

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®小鼠肝类器官分化试剂盒提供从小鼠肝祖细胞类器官构建、扩增和分化的全套试剂，包括MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官培养基（基础培养基和添加物）和MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基（基础培养基和添加物）。MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官培养基用于从原代小鼠肝脏组织高效生成肝祖细胞类器官，构建成功的肝祖细胞类器官可进行冻存、扩增及下游分化；MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基用于将构建的肝祖细胞细胞类器官分化为成熟的肝类器官，分化后的肝类器官表达成熟肝细胞的标志物并具有成熟肝细胞功能，可用于候选化合物的肝毒性检测等下游应用。

产品信息

MasterAim®小鼠肝类器官分化试剂盒包括：MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官基础培养基及添加物，MasterAim®小鼠肝类器官分化基础培养基及添加物，其中MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官培养基（基础培养基和添加物）和MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基（基础培养基和添加物）可单独售卖。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®小鼠肝类器官分化试剂盒	10-100-520	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官基础培养基	100-521	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®小鼠祖细胞肝类器官培养基添加物	100-522	5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠肝类器官分化基础培养基	100-523	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基添加物1	100-524	5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基添加物2（100X）	100-525	1 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
TrypLE	/	/	/
红细胞裂解液	/	/	/
基质胶	/	/	/

MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前1天将 **MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官基础培养基（#100-521）**和 **MasterAim®小鼠肝祖细胞类器官添加物（##100-522）**从-20℃取出，4℃解冻。

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

3. 原代标本培养：可每 10 mL配置好的完全培养基加入终浓度为0.5X-1X的**MasterAim®Primary Enhancer（#100-008）**。

4. 维持培养：对于非原代标本的培养，使用MasterAim®小鼠肝祖细胞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。

小鼠来源肝祖细胞类器官构建

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30 - 40 min，每隔15 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。

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. （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，300 g，5 min，弃上清，使用1 mL DPBS-PS重悬。

10. 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，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2-4*10^3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℃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®肝祖细胞类器官完全培养基，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2-3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。

小鼠来源肝祖细胞类器官传代

1.传代标准： 在传代前，确保大部分类器官的大小大于100 μm。

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 **TrypLE**，使用1 mL枪头将胶滴吹散（可根据类器官量适量增加TrypLE的体积）。室温消化5 - 8 min，或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，一个胶滴大约需要200 - 500个细胞团（约2 – 5万个细胞）。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。

小鼠来源肝祖细胞类器官冻存

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 TrypLE，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；加入3 mL DPBS-PS重悬细胞，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，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20min，-20℃放置2h，-80℃放置过夜），最后转移至液氮罐。

MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基制备

1. 试剂准备：提前将 MasterAim®小鼠肝类器官分化基础培养基（#100-523）和 MasterAim®小鼠肝类器官分化培养基添加物（#100-524）从-20℃取出，冰上放至融化。

2. 完全培养基配制：将小鼠肝类器官分化培养基添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为小鼠肝祖细胞类器官完全培养基。

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。

小鼠来源肝祖细胞类器官分化

1. 镜下观察肝祖细胞类器官的培养情况，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3-4天后，可观测到类器官形成。

2. 肝祖细胞类器官在传代后继续培养3-5天，在分化前，确保大部分类器官的直径在50-100 μm，此时将用移液器去除培养基，使用1 mL的DPBS-PS清洗一遍，然后加入1mL的MasterAim® 小鼠肝类器官分化培养基，继续培养12天，期间每天换液。

3. 第13天时，将MasterAim® 肝类器官分化培养基和MasterAim® 肝类器官分化培养基添加物2（100X）（#100-525）按照比例充分混合即为肝类器官分化完全培养基，向每孔中加入1 m肝类器官分化完全培养基，直到第15天即可获得成熟的肝类器官。

注：（1）分化后的成熟的小鼠肝类器官不能再进行传代扩增和冻存，请尽快使用。

【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。