MasterAim®小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）

MasterAim® Mouse Bladder Organoid Complete Medium（ Budding）

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案

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®小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）适用于小鼠膀胱组织来源类器官的构建、维持培养及传代扩增，可以从小鼠膀胱组织快速生成膀胱类器官，极大程度维持了来源于体内膀胱组织的特征，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

产品信息

MasterAim®小鼠膀胱类器官完全培养基包括：小鼠膀胱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®小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）	10-100-716	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠膀胱类器官基础培养基（出芽版）	100-717	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®小鼠膀胱类器官培养基添加物（出芽版）	100-718	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；4°C，2周
MasterAim®小鼠膀胱组织消化液Ⅰ（10X）	100-818	5 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®组织消化液Ⅱ	100-048	50 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim® Primary Enhancer（1000X）	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
红细胞裂解液	100-547	100 mL	4°C，24个月
Matrigel，GFR	Corning,356231	10 mL	-20°C，24个月

MasterAim®小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）制备

1. 试剂准备：提前一天将 MasterAim®小鼠膀胱类器官基础培养基（出芽版）（#100-717）、 MasterAim®小鼠膀胱类器官培养基添加物（出芽版）（#100-718）、MasterAim®小鼠膀胱组织消化液Ⅰ（10X）（#100-818）和MasterAim®组织消化液Ⅱ（#100-048）从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基配制：将小鼠膀胱类器官培养基添加物（出芽版）全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）。

3. 消化液配制：取2.7 mL DPBS，加入0.3 mL MasterAim®小鼠膀胱组织消化液Ⅰ（10X）（#100-818），混合均匀，配置成为3 mL小鼠膀胱组织消化液I（终浓度为1X）备用。

4. 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）。

5. 维持培养：对于非原代标本的培养，使用MasterAim®小鼠膀胱类器官完全培养基（出芽版）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。

小鼠来源的膀胱类器官（出芽版）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，将肾及输尿管组织舍弃，仅保留膀胱组织。

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：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，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（用抗粘附液预先润洗）中。

4. 消化阶段Ⅰ：加入3 mL MasterAim®小鼠膀胱组织消化液Ⅰ（1X），37℃水浴锅震荡消化15 - 20 min（10 min取出镜下观察是否有大量的细胞漏出，之后每隔5 min观察1次），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6 mL DPBS-PS终止消化，300g，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℃水浴锅震荡消化5 - 10 min。镜下观察到消化成单细胞状态，既可终止消化阶段Ⅱ。

7. 终止消化阶段Ⅱ：加入6 mL DPBS-PS终止消化，300g，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。

9.（可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色），加入红细胞裂解液进行裂红（具体方法参考产品说明书）后，300g，离心5 min，弃上清。

10. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）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。

11. 接种：按照600 - 800 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4-5倍体积的基质胶（膀胱类器官较容易贴壁，故需提高基质胶比例），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（不要将类器官接种到最外侧的孔中）。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。

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®小鼠类器官完全培养基（出芽版），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。

13. 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。

小鼠来源的膀胱类器官（出芽版）传代

1. 传代标准：在传代前，确保大部分囊性类器官的直径大于200 μm。传代窗口期一般为4 - 8天，P0-P2传代比例一般为1:5或1:10，P3之后传代比例一般为1:15或1:20。

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 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（额外添加1%FBS）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 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4-5倍体积的基质胶，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®类器官完全培养基（出芽版），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。

小鼠来源的膀胱类器官（出芽版）冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分囊性类器官的直径大于200 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 min，显微镜

下观察类器官消化情况，待类器官消化至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（额外添加1%FBS）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。