MasterAim®气道类器官分化完全培养基

MasterAim® Airway Organoid Differentiation Complete Medium

从组织运输到类器官构建、扩增及分化的整体解决方案

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®气道类器官培养基适用于气道组织来源类器官的构建、维持培养及分化培养，本培养基优化了实验步骤，提高气道类器官分化效率。

产品信息

MasterAim®气道类器官完全培养基包括：气道类器官分化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®气道类器官分化完全培养基	10-100-945	100 mL	-20°C，12个月
MasterAim®气道类器官分化基础培养基	100-946	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®气道类器官分化培养基添加物	100-947	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®人肺类器官完全培养基	10-100-377	100 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®组织运输保存液	100-032	100 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®组织消化液Ⅰ	100-047	100 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
Pen-Strep Amphotericin Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
Pen-Strep Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
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
Matrigel，GFR	Corning,356231	10 mL	-20°C，24个月

一、组织运输

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，需将组织标本修剪至体积约为0.5 cm^3），加入足量**MasterAim®组织运输保存液（#100-032）**浸没组织，于2 - 8°C运输，48小时内运输至实验室进行处理。

二、MasterAim®人肺类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®人肺类器官基础培养基（#100-378）**、 **MasterAim®人肺类器官培养基添加物（#100-379）**从-20℃取出，4℃放至融化。

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

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®人肺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 Amphotericin 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。

三、MasterAim®气道类器官分化完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®气道类器官分化基础培养基（#100-946）**、 **MasterAim®气道类器官分化培养基添加物（#100-947）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基配制：将气道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，即为气道类器官分化完全培养基，分装后冻于-20℃。

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 Amphotericin 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。

四、组织来源的人肺类器官构建

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**，清除多余组织。

注：DPBS-PS为添加1% Pen-Strep Solution的**DPBS(#100-184)**。

2. 样本清洗：将标本使用DPBS-PS进行清洗，反复涮洗10次以上，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（用抗粘附液预先润洗）中。

4. 消化阶段Ⅰ：加入4 mL MasterAim®组织消化液Ⅰ，37°C水浴锅震荡消化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，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，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100 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算出细胞个数。计数后300g，离心5 min，去上清，收集组织沉淀。

11. 接种：按照4000 - 6000 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（需在冰盒上操作），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48孔板，则每孔可接种25 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300 μL于37℃预热的MasterAim® 人肺类器官完全培养基，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。

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。

五、组织来源的气道类器官分化

1. 分化标准：在分化前，确保大部分类器官的直径大于100 μm。

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0.3 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：将消化后的类器官使用抗粘附液预先润洗后的40 um滤网中过滤，使用抗粘附液预先润洗的离心管收集过滤后的单细胞，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算出细胞个数。计数后，300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

1）Apical-in型分化

1. 接种：以48孔板为例，参考接种密度200-300 cells/μL（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整，不要接太密）。首先根据计数结果，使用人肺类器官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（需在冰盒上操作）。将重悬后的细胞悬液接种至37℃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），每孔可接种25 μL细胞悬液。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。

2. 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® 人肺类器官完全培养基，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-PS。盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。

3. 扩增：使用人肺类器官完全培养基进行扩增，观察到80%类器官的直径在50-80 μm时，进入下一阶段，扩增常需4-7天，每2-3天换液一次。

4. 分化：移除人肺类器官完全培养基，更换为**MasterAim®气道类器官分化完全培养基**进行分化21天，2天换液一次，约7-10天可见内嵌型纤毛摆动。

2）Apical-out型分化

1. 接种：使用24孔超低吸附培养板，参考接种密度150 cells/μL。首先根据计数结果，使用人肺类器官完全培养基将获取的细胞沉淀重悬，充分混合。将重悬后的细胞悬液接种至24孔超低吸附培养板中，每孔可接种1 mL细胞悬液。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS-PS。盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。

2. 扩增：使用人肺类器官完全培养基进行扩增，观察到大部分类器官生长至实心球状，进入下一阶段，扩增常需2-3天。

3. 分化：移除人肺类器官完全培养基（注意避免吸到类器官），更换为**MasterAim®气道类器官分化完全培养基**进行分化21天，2天换液一次，约7-10天可见外翻型纤毛摆动。

ALI模型分化

1. 接种：使用Transwell（6.5mm）嵌入小皿，参考接种密度1000 cells/μL。首先根据计数结果，使用人肺类器官完全培养基将获取的细胞沉淀重悬，充分混合。将重悬后的细胞悬液接种至Transwell，每个Transwell上室可加入100 μL细胞悬液，每个Transwell下室可添加1 mL人肺类器官完全培养基。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS-PS。盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。

2. 扩增：使用人肺类器官完全培养基进行扩增，每天观察生长情况，细胞均匀贴附于 Transwell 膜上，呈均一贴壁生长时，进入下一阶段，扩增常需2-4天，两天换液1次。

3. 分化：移除Transwell上室人肺类器官完全培养基，下室更换为**MasterAim®气道类器官分化完全培养基**进行分化21天，2天换液一次，约7-10天可见纤毛摆动。分化阶段Transwell上室不添加培养基，每7天清洗Transwell上室一次，可使用DPBS-PS 200μL浸泡5min后移除，重复操作两次进行清洗。

注：分化后期Transwell上室会产生透明粘液，清洗过程中需避免碰到细胞。

【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. 本产品仅适用于人组织来源的气道类器官分化培养。

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。