MasterAim®小鼠毛囊类器官培养试剂盒

MasterAim® Mouse Hair Follicle Organoid 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®小鼠毛囊类器官培养试剂盒适用于胎鼠皮肤样本来源的毛囊类器官的构建及维持培养。构建的小鼠毛囊类器官可表达毛囊干细胞特征标志物，且含有上皮干祖细胞和间充质细胞群，能够部分重建上皮-间充质相互作用。MasterAim®小鼠毛囊类器官培养试剂盒（1盒）约可构建30个毛囊类器官（培养周期为1个月），构建的小鼠毛囊类器官可作为有效评价生发类药物的体外模型。

产品信息

MasterAim®小鼠毛囊类器官培养试剂盒包括：小鼠毛囊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®小鼠毛囊类器官培养试剂盒	10-100-829	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠毛囊类器官基础培养基	100-830	105 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物A	100-831	10 mL	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物B	100-832	5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物C（1000X）	100-833	0.15 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®皮肤组织消化液 I	100-639	100 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®皮肤组织消化液II	100-640	50 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®抗粘附液	100-291	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
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

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。

MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®小鼠毛囊类器官基础培养基（#100-830）**和 **MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物A（#100-831）**、**MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物B（#100-832）**、**MasterAim®小鼠毛囊类器官培养基添加物C（#100-833）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基配制：

（1）将10 mL小鼠毛囊类器官培养基添加物A全部转移到10 mL小鼠毛囊类器官基础培养基中，混合均匀，即为小鼠毛囊类器官培养基I。

（2）将5 mL小鼠毛囊类器官培养基添加物B全部转移到95 mL小鼠毛囊类器官基础培养基中，混合均匀，即为小鼠毛囊类器官培养基II。

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，以免在操作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。

小鼠来源的组织样本处理

处理胎鼠背部皮肤组织的方法有两种：

方法一：同时酶解真皮和表皮组织（即整块皮肤组织），表皮和真皮两种细胞混合在一起进行共培养。

方法二：皮肤组织经消化液I酶解，分离真皮和表皮组织后，对两种组织分别进行酶解，表皮细胞和真皮细胞两种细胞按照比例混合在一起进行共培养。

推荐使用方法一，成功率更高，处理过程更短，也可根据实验需求进行选择。

方法一

1. 样本处理：取E18胚胎期孕鼠背部皮肤，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**，用弯剪除掉多余的脂肪组织和筋膜，尽量减少皮下组织的粘连。

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，反复涮洗约5 - 10次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3. 消化阶段Ⅰ：清洗完成后，将胎鼠背部皮肤组织于培养皿中展平，加入10 mL **MasterAim®皮肤组织消化液Ⅰ（#100-639）**。37 °C细胞培养箱内消化50 min（若胎鼠过小，皮肤组织较容易破损，可以仅消化40 min，可根据实验情况进行调整）。

4. 消化阶段Ⅱ：将消化后的皮肤组织转移至1.5 mL EP管内，加入200 µL **MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ (#100-640)**，将标本剪切至0.5 - 1 mm^3的大小。将剪碎的组织转移至15 mL的EP管（用抗粘附液预先润洗）中，加入10 mL MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ，吹打混匀后置于37 °C细胞培养箱中消化60 min，观察到大量细胞漏出后即可终止消化（可每间隔30 min镜下观察一次消化情况，对消化组织进行缓慢吹打，根据实验情况调整消化时间）。

5. 终止消化阶段Ⅱ：将消化后的组织转移至50 mLEP管，加入20 mL DPBS-PS终止消化，300g，离心8 min，弃上清。

6. 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，将滤液收集进行离心，300g，5 min，弃上清。

7.（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。

8. 计数：使用1 mL 预热的DPBS-PS重悬细胞沉淀，通过自动细胞计数仪或手动计数板计出细胞个数。计数后300g，离心5 min，去上清，收集细胞沉淀。

9. 调整细胞至接种密度：将获取的细胞沉淀按照2×10^4个细胞/200 μL重悬至含2% (v/v) 基质胶的**小鼠毛囊类器官培养基I**中，即1×10^5个细胞/mL，充分混匀。

方法二

1. 样本处理：取E18胚胎期孕鼠背部皮肤，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**，用弯剪除掉多余的脂肪组织和筋膜，尽量减少皮下组织的粘连。

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，反复涮洗约5 - 10次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3. 消化阶段Ⅰ：清洗完成后，将胎鼠背部皮肤组织于培养皿中展平（真皮向上，表皮向下），加入10 mL **MasterAim®皮肤组织消化液Ⅰ（#100-639）**。37 °C细胞培养箱内消化50 min（若胎鼠过小，皮肤组织较容易破损，可以仅消化40 min，可根据实验情况进行调整）。

4. 消化阶段Ⅱ：将消化后的皮肤组织转移至含有10 mL预冷的清洗液的培养皿中，用无齿弯镊小心地将表皮和真皮分离，将真皮组织和表皮组织**分别转移**至1.5 mL EP管内。向含有真皮组织和表皮组织的EP管中分别加入200 μL **MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ（#100-640），**将标本剪切至0.5 - 1 mm^3的大小。将剪碎的表皮组织和真皮组织分别转移至15 mL的EP管（用抗粘附液预先润洗）中，向两支EP管中各加入4.5 mL MasterAim®皮肤组织消化液Ⅱ，吹打混匀后置于37 °C细胞培养箱中消化60 min，观察到大量细胞漏出后即可终止消化（可每间隔30 min镜下观察一次消化情况，对消化组织进行缓慢吹打，根据实验情况调整消化时间）。

5. 终止消化阶段Ⅱ：向两支EP管中各加入9 mL DPBS-PS终止消化，300g，离心8 min，弃上清。

6. 收集细胞：两支EP管中分别加入10 mL DPBS-PS对细胞进行重悬，使用2 mL **MasterAim®抗粘附液（#100-291）**预先润洗两个70 μm的细胞筛网，将表皮细胞悬液和真皮细胞悬液分别使用细胞筛网过滤，将滤液分别收集，分别进行离心，300g，5 min，弃上清。

7.（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。

8. 计数：使用1 mL 预热的DPBS-PS重悬细胞沉淀，通过自动细胞计数仪或手动计数板计出细胞个数。计数后300g，离心5 min，去上清，收集细胞沉淀。

9. 调整细胞至接种密度：将获取的表皮细胞和真皮细胞按照2×10^4个细胞/200 μL (建议表皮细胞数量：真皮细胞数量为1:1) 重悬至含2% (v/v) 基质胶的**小鼠毛囊类器官培养基I**中，即5×10^4个表皮细胞/mL和5×10^4个真皮细胞/mL（细胞数量为1:1），充分混匀。

小鼠来源的毛囊类器官构建及维持培养

1. 接种：将混合的细胞悬液接种于提前在4°C预冷的圆底超低吸附96孔板（Corning，#7007）中，每孔接种200 μL（采用方法一或方法二，此步骤均每孔接种200 μL细胞悬液，即每孔细胞量为2×10^4个细胞）。向未接种的孔沿孔壁加入适量DPBS，以减少培养基的蒸发。将接种好的培养板100g，离心5 min，使细胞全部聚集在超低吸附孔板底部。离心后放置于4°C冰箱冷却30 min， 随后转移至37°C，5%CO_2培养箱中培养。

2. 维持培养：在接种后D3时，进行样本观察与维护，在显微镜下可以观察到细胞在超低吸附的圆底96孔板中聚集生长形成细胞球，其中可能有一些细胞团尚未与细胞球完成融合为一体，可以开始进行换液。吸弃旧培养基后，每孔可加入200 μL含1%PS的1X培养基添加物C的**小鼠毛囊类器官培养基Ⅱ**进行换液，此后每隔一天观察一次，并进行全换液或半换液。

3. 类器官时间窗口：D7-D11期间，毛囊类器官外圈长出突起，随着培养时间的延长，外圈的突起逐渐生长为芽状结构（注意：毛囊细胞球出芽的具体时间，会受表皮及真皮细胞的比例和细胞活性所影响，具体的出芽时间会有一定差异）。D11-D20期间，小鼠毛囊类器官的芽状结构逐渐变长，且出芽数量有所增多。毛囊类器官培养至D18-D20时，芽状结构最长且状态较好。当培养至D21后，芽状结构不再继续延长；在培养至D25后，类器官状态逐渐变差，外圈细胞有凋亡迹象，不建议培养时间超过1个月。

【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. 本产品仅适用于小鼠毛囊类器官培养。

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。