

## 小鼠肝类器官培养试剂盒

Cat NO: IMV-NM20

### 产品描述

小鼠肝类器官培养基套装 (Mouse Liver Organoids Culture Kit) 是一款用于构建、维持培养及传代扩增小鼠肝组织来源类器官的完全培养基。该产品可以从小鼠肝组织快速生成肝祖细胞类器官, 极大程度维持了来源于体内肝组织的特征, 优化了实验步骤, 提高类器官构建效率。

### 产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格
IMV-NM20LBM	小鼠肝类器官基础培养基	500mL
IMV-NM20SBM		100mL
IMV-NM20L1	小鼠肝类器官培养因子 B	10mL
IMV-NM20S1		1mL
IMV-NM20L2	小鼠肝类器官培养因子 C	1mL
IMV-NM20S2		0.4mL

### 小鼠肝类器官完全培养基使用说明

- 收到类器官培养基后, 将培养基置于四度冰箱进行解冻;
- 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀, 在无菌的生物安全柜或超净工作台将培养基进行分装, 推荐分装成 10ml 规格;
- 将分装后的培养基储存于-20℃, 使用时拿出分装后的培养基解冻后即可使用。

#### 注意:

- 分装后的类器官培养基需储存于-20℃, 有效期两年, 注意避免反复冻融;
- 解冻后类器官完全培养基可在 4℃ 储存, 建议在两周内使用;
- 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。



## 小鼠肝类器官的建立与传代培养

### 原代小鼠肝类器官的建立

1. 取样：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 4℃ 预冷的含双抗（IMC-601）的 DPBS 溶液，将组织表面的血管、筋膜和脂肪轻取舍弃。

注：如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在组织保存液（IMV-A004）中，冰上运输尽快处理。

2. 清洗：将标本使用含双抗（IMC-601）的 DPBS 溶液进行清洗，反复涮洗约 5 - 10 次，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3. 消化：加入 30 mL 的 DPBS 溶液中再加入 150  $\mu$ L 0.5M EDTA，至 EDTA 终浓度为 2.5mM。置 4℃ 摇床上，80rpm，消化 60 min。

4. 清洗：消化完成后，静置待沉淀，弃上清。加入预冷 DPBS，轻柔摇匀，静置后弃上清，重复 2 次以去除 EDTA。

5. 重悬：加入 30 mL 预冷的含 1%FBS 的 DPBS，涡旋 30s，取上清 70  $\mu$ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复收集 2 次，记为馏分 2 和馏分 3。

6. 收集：300g 离心力 4℃ 离心 3min。

7. 计数：弃上清，根据沉淀量使用 DPBS 重悬组织沉淀，取 20  $\mu$ L 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液，300g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清后置于冰上。

8. 用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10  $\mu$ L 基质胶悬液包含 100 至 200 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。

**注意：基质胶稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。**

9. 将基质胶和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30  $\mu$ L 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

**注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。**

10. 将接种完成后的培养板至于 37℃ 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 30 min 左右待基质胶凝固。



11.待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的小鼠肝类器官完全培养基，24孔板每孔 500  $\mu$ L，避免破坏已凝固结构。

12.将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养。

13.每 3~4 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠肝类器官应在 3 至 4 天内建成。

### 小鼠肝类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将肝类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。

2. 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，多次吹打使得类器官与基质胶分离。

3. 300 $\times$ g，4°C 离心 3 min，弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 200  $\mu$ L 类器官消化液并充分混匀，37°C 条件下消化 1-3 min，消化结束后加入 1 mL 上皮类器官基础培养基吹打混匀。

4. 300 $\times$ g，4°C 离心 3 min，弃上清，再次加入 1 mL 上皮类器官基础培养基并混匀。

5. 300 $\times$ g，4°C 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。

6. 用适量的基质胶重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30 s 以避免基质胶过早凝固。

**注意：基质胶稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。**

7. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30  $\mu$ L 左右。

**注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。**

8. 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 30 min 左右待基质胶凝固后取出。

9. 待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠肝类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L。

10. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验。

