

## Human Alveolar Organoid Complete Medium (人肺泡类器官完全培养基)

货号: HAvCM-100

### 产品介绍

人肺泡类器官完全培养基是一款用于扩增和分化源自人肺泡上皮 II 型 (ATII) 细胞的肺泡类器官的商品化培养基, 包括人肺泡类器官扩增培养基 (HAVEM) 和人肺泡类器官分化培养基 (HAVDM)。HAVEM 能够使 ATII 细胞作为类器官长期传代和扩增, 这些肺泡类器官保留了 ATII 细胞表型的特性, 包括自我更新的能力、标志物表达和分化为肺泡上皮 I 型 (ATI) 细胞的谱系潜力。HAVDM 可在短时间内 (10 天左右) 将扩增的 ATII 类器官分化为 ATI 类器官, 这些肺泡类器官显示出 ATII 标志物表达降低和 ATI 细胞标志物的显著增加, 非常适合肺泡生物学研究、传染病研究和药物筛选。

### 产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human Alveolar Organoid Expansion Medium A	HAVCM-100	100 mL	4°C, 6个月
Human Alveolar Organoid Expansion Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Human Alveolar Organoid Expansion Medium C (250×)		0.4 mL	-20°C, 1年
Human Alveolar Organoid Differentiation Medium A		20 mL	4°C, 6个月
Human Alveolar Organoid Differentiation Medium B (50×)		0.4 mL	-20°C, 1年
Human Alveolar Organoid Differentiation Medium C (200×)		0.1 mL	-20°C, 1年



## 其他需准备的试剂信息

试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
正常组织消化液	SHR Biotechnology	NTD-50
上皮类器官基础培养基	SHR Biotechnology	OBM-500
类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100
类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50

## 人肺泡类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备人肺泡类器官完全培养基。以下是准备 10 mL 人肺泡类器官扩增培养基 (HAvEM) 和 1 mL 人肺泡类器官分化培养基 (HAvDM) 的示例, 如所需量不同, 请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻 Human Alveolar Organoid Expansion Medium B (50 $\times$ )、Human Alveolar Organoid Expansion Medium C (250 $\times$ )、Human Alveolar Organoid Differentiation Medium B (50 $\times$ ) 和 Human Alveolar Organoid Differentiation Medium C (200 $\times$ )。

**注意:** 解冻后, 建议将 Human Alveolar Organoid Expansion Medium B (50 $\times$ )、Human Alveolar Organoid Expansion Medium C (250 $\times$ )、Human Alveolar Organoid Differentiation Medium B (50 $\times$ ) 和 Human Alveolar Organoid Differentiation Medium C (200 $\times$ ) 按需分装后保存取用, 避免反复冻融。对于所有微量试剂组分, 建议瞬时离心 5 秒钟 (500-2000 rpm) 后, 再开盖分装使用, 以避免损失。

2. 将 200  $\mu$ L Human Alveolar Organoid Expansion Medium B (50 $\times$ ), 40  $\mu$ L Human Alveolar Organoid Expansion Medium C (250 $\times$ ) 加至 9.76 mL Human Alveolar Organoid Expansion Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 人肺泡类器官扩增培养基 (HAvEM)。
3. 将 20  $\mu$ L Human Alveolar Organoid Differentiation Medium B (50 $\times$ ) 和 5  $\mu$ L Human Alveolar



Organoid Differentiation Medium C (200×)加至 975 μL Human Alveolar Organoid Differentiation Medium A 中，充分混合，配制成 1 mL 人肺泡类器官分化培养基 (HAvDM)。

**注意：**配制后的培养基可在2-8 °C储存不超过7天，建议现配现用。Human Alveolar Organoid Expansion Medium A、Human Alveolar Organoid Expansion Medium A内含有细菌及真菌抗生素。

## 人肺泡类器官原代培养

**注意：**涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关机构和政府法规。在收集人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

1. 将组织从4 °C样本保存液 (SPS-100) 中取出，消化成单细胞悬液后，经流式或磁珠分选获得含有AT2细胞的EpCAM+肺上皮细胞群 (或直接分选HTII-280+ AT2细胞群)。
2. 4 °C 300 *g*离心5 min，弃去上清保留沉淀。
3. 加入1 mL预冷的HAvEM培养基轻轻重悬沉淀，并进行活细胞计数，将细胞悬浮液调整至每25 μL 4000个细胞的浓度。

**注意：**如果需要，离心浓缩细胞沉淀后再以每 25 μL 4000 个活细胞的密度进行重悬。

4. 将准备好的细胞悬液按 25 μL 体积等分至无菌离心管中，每管加入 25 μL 基质胶 (OEM-10)，制成体积比大于 50%的基质胶悬浮液，置于冰上。
5. 用 1 mL 移液器快速而轻柔地上下吹吸 8-10 次，形成均匀的悬浮液，避免气泡产生。将 200 μL 移液器设置为 50 μL，小心吸取悬液点入 24 孔板底部正中央，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。

6. 将铺好的培养板至于 37 °C CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中，孵育 35-50 min 左右成胶。
7. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的 HAvEM 培养基，24 孔板每孔 500 μL。

**注意：**请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

8. 将24孔板置于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每2~3天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。扩增培养的人肺泡类器官生长状态如图1所示。

## 人肺泡类器官的传代培养

选取生长状态较好的肺泡类器官进行传代培养，步骤如下：

1. 在避免破坏基质胶的情况下，小心从待传代孔中吸出所有培养基，然后加入 500 μL 预冷的 DPBS。
2. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。
3. 用经过润洗液润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬浮液20~30次，使得类器官与基质胶分离。
4. 4 °C 300 *g*离心 5 min，弃上清，加入 500 μL 新的预冷 DPBS，用经过润洗液润洗的枪头反复吹打重悬



20~30次。

5. 4 °C 300 g离心5 min, 弃上清, 加入0.2 mL类器官传代消化液 (OPD-100) 重悬底部类器官沉淀, 用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于37 °C下孵育, 直到类器官消化完成。

**注意:** 密切监测类器官消化情况, 将消化时间控制在最短时间内完成 (不要超过5 min)。根据经验, 如果可以观察到类器官碎片小于30 μm, 消化就完成了。

6. 4 °C 300 g离心5 min, 吸弃上清液后, 加入适量预冷的 HAvEM 培养基轻轻重悬沉淀, 并进行类器官计数, 调整至每 25 μL 300 个类器官的浓度。

**注意:** 如果需要, 离心浓缩类器官沉淀后再以每25 μL 300个类器官的密度进行重悬。

7. 每 25 μL 悬液加入 25 μL 基质胶 (OEM-10), 制成体积比大于 50%的基质胶悬浮液。

8. 轻轻混匀后, 小心吸取悬液点入 24 孔板底部正中央, 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。

9. 将铺好的培养板至于 37 °C CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中, 孵育 35-50 min 左右成胶。

10. 配制人肺泡类器官扩增培养基 (HAVEM)。

11. 待基质胶完全凝固后, 加入已配制好的 HAVEM 培养基, 24 孔板每孔 500 μL。

**注意:** 请沿壁缓慢加入, 避免破坏已凝固结构。

12. 将24孔板置于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每2~3天更换一次培养基, 更换培养基时应避免破坏基质胶。传代培养的人肺泡类器官生长状态如图2所示。

## 人肺泡类器官的分化培养

在扩增培养的第10天 (或直到第14天), 扩增期类器官可以在终点测定中进行分化培养, 步骤如下:

1. 配制人肺泡类器官分化培养基 (HAVDM)。
2. 在避免破坏基质胶的情况下, 小心从待分化孔中吸出所有培养基, 然后加入500 μL已配制好的HAVDM培养基
3. 每3~4天更换一次培养基, 在培养至第10天即可完全分化为ATI细胞, 并可用于标准测定或收获用于免疫染色或流式细胞术分析等。

## 人肺泡类器官的冻存

当类器官平均直径长至100-200 μm, 增殖活性较好且结构透亮, 边界清晰时, 即可进行冻存。具体步骤如下:

1. 吸弃原培养液, 加入4 °C预冷的上皮类器官基础培养基 (OBM-500), 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官, 并将类器官和培养基的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 (OMR-100) 润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬浮液, 使得类器官与基质胶分离。
3. **注意:** 吹打力度需要控制, 尽量保证类器官的完整性, 以提高冻存后的复苏活性。
4. 在室温条件下300 g离心3 min, 弃上清。



5. 加入1 mL上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 洗涤沉淀一次, 室温条件下300 *g*离心3 min, 弃上清。
6. 类器官沉淀中加入1 mL预冷的类器官冻存液 (OFM-50), 吹打混匀后立即移入冻存管中。
7. 程序降温及长期保存:

*冻存方法 (1)* : 将冻存管放入梯度降温冻存盒然后保存至-80 °C过夜, 第二天取出放入液氮罐。

*冻存方法 (2)* : 4 °C冰箱放置 10 min, 转移至-20°C放置 30 min, 转移至-80 °C过夜, 第二天取出放入液氮罐。

**注意:** -80 °C冻存建议不超过3个月, 液氮冻存建议不超过1年。

## 注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用, 禁止用于人体。

## 论文发表规范引用参考

Human alveolar organoids were cultured with Human Alveolar Organoid Complete Medium (HAVCM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



## 附录1 人肺泡类器官培养过程图

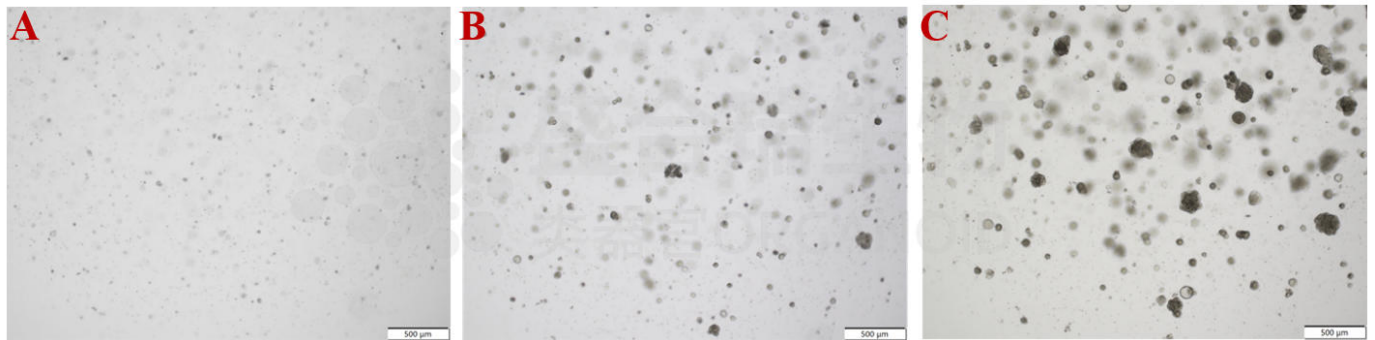


图1 人肺泡类器官扩增培养过程示例

(A) 利用磁珠分选获取HTII-280+ AT2细胞后，接种培养。在生长至第7天时可观察到实心球结构形成；(B) 在生长至第14天时，类器官数量进一步增多，直径增大；(C) 在生长至第21天时，类器官直径显著增加。比例尺：500 µm。



图2 人肺泡类器官传代培养过程示例

(A) 经消化后的人肺泡类器官在传代培养至第0天时，由不规则团块逐渐形成新的3D细胞球；(B) 在第7天时类器官生长为实心结构；(C) 生长至第14天时，类器官数量进一步增多，直径增加。比例尺：500 µm。



## 附录 2 人肺泡类器官染色鉴定图

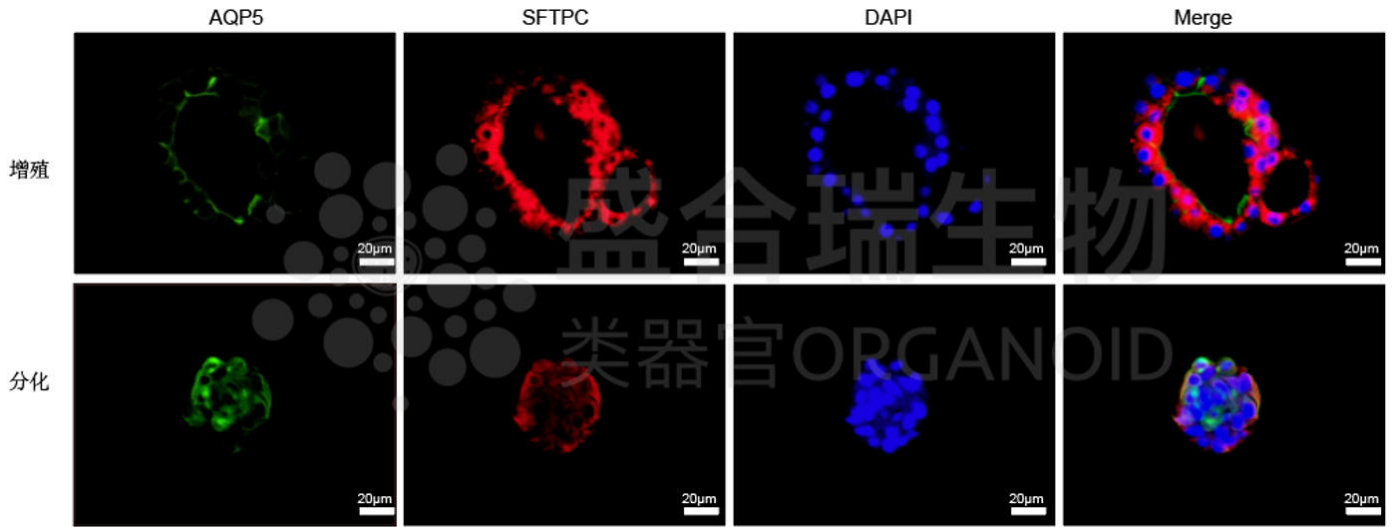


图 3 人肺泡类器官免疫荧光染色

分别收集增殖期（上）和分化期（下）人肺泡类器官进行免疫荧光染色。AQP5（绿光）是 I 型肺泡上皮标志物，SFTPC（红光）是 II 型肺泡上皮标记物，DAPI 标记细胞核。比例尺：20  $\mu\text{m}$ 。

