

Mouse Alveolar Organoid Complete Medium (小鼠肺泡类器官完全培养基)

货号: MAvCM-100

产品介绍

小鼠肺泡类器官完全培养基是一款用于扩增和分化源自小鼠肺泡上皮 II 型 (ATII) 细胞的肺泡类器官的商品化培养基, 包括小鼠肺泡类器官扩增培养基 (MAvEM) 和小鼠肺泡类器官分化培养基 (MAvDM)。MAvEM 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。MAvDM 可在短时间内将扩增的 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
Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium A	MAvCM-100	100 mL	4°C, 6个月
Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium B (20×)		5 mL	-20°C, 1年
Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium C		20 mL	4°C, 6个月
Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium D (20×)		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
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

小鼠肺泡类器官完全培养基的制备

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

1. 冰上解冻 Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium B (20 \times) 和 Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium D (20 \times)。

注意: 解冻后, 建议将 Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium B (20 \times) 和 Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium D (20 \times) 按需分装后保存取用, 避免反复冻融。

2. 将 500 μ L Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium B (20 \times) 加至 9.5 mL Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 小鼠肺泡类器官扩增培养基 (MAvEM)。
3. 将 50 μ L Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium D (20 \times) 加至 950 μ L Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium C 中, 充分混合, 配制成 1 mL 小鼠肺泡类器官分化培养基 (MAvDM)。

注意: 配制后的培养基可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存不超过 1 周, 建议现配现用。Mouse Alveolar Organoid Expansion Medium A 和 Mouse Alveolar Organoid Differentiation Medium C 中含有细菌及真菌抗生素。

小鼠肺泡类器官的扩增培养

1. 取新鲜的小鼠远端肺组织样本, 消化成单细胞悬液后, 接种到 anti-CD45 和 anti-CD31 抗体包被的 24 孔板中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。



2. 收集非黏附的细胞，经裂红处理后，进行流式或磁珠分选获得含有AT2细胞的EpCAM+肺上皮细胞群。
3. 4 °C 300 *g*离心5 min，弃去上清保留沉淀。
4. 加入1 mL预冷的MAvEM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 μ L 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 μ L 4000 个活细胞的密度进行重悬。

5. 将准备好的细胞悬液按 25 μ L 体积等分至无菌离心管中，每管加入 25 μ L 基质胶 (OEM-10) ，制成体积比大于 50%的基质胶悬浮液，置于冰上。
6. 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 μ L 移液器设置为 50 μ L，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。

7. 将铺好的培养板至于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 35-50 min 左右成胶。
8. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的 MAvEM 培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

9. 将24孔板置于37 °C CO₂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。扩增培养的小鼠肺泡类器官生长状态如图1A所示。

小鼠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，具体步骤如下：

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 μ L 预冷的 DPBS。
2. 用经过润洗液 (OMR-100) 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 μ L 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，加入5倍以上体积的DPBS终止消化。也可以采用机械吹打方式进行类器官传代消化，靠着管底部移液产生的压力来分离基质胶，以获取类器官碎片。

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 μ m，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 MAvEM 培养基轻轻重悬沉淀，并进行类器官计数，调整至每 25 μ L 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 μ L 300个类器官的密度进行重悬。

7. 每 25 μ L 悬液加入 25 μ L 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. 将铺好的培养板置于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 35-50 min 左右成胶。

10. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的 MAVEM 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。

11. 将24孔板置于37 °C CO₂培养箱中培养。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。传代培养的小鼠肺泡类器官生长状态如图1B所示。

小鼠肺泡类器官的分化培养

在扩增培养的第5天（或直到第8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. 配制小鼠肺泡类器官分化培养基（MAvDM）。

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 MAVDM 培养基

3. 每2~3天更换一次培养基，在培养至第5~8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。分化后的小鼠肺泡类器官生长状态如图1D所示。

小鼠肺泡类器官的冻存

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），用经过类器官润洗液（OMR-100）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. 用经过类器官润洗液（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

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



附录1 小鼠肺泡类器官培养过程图

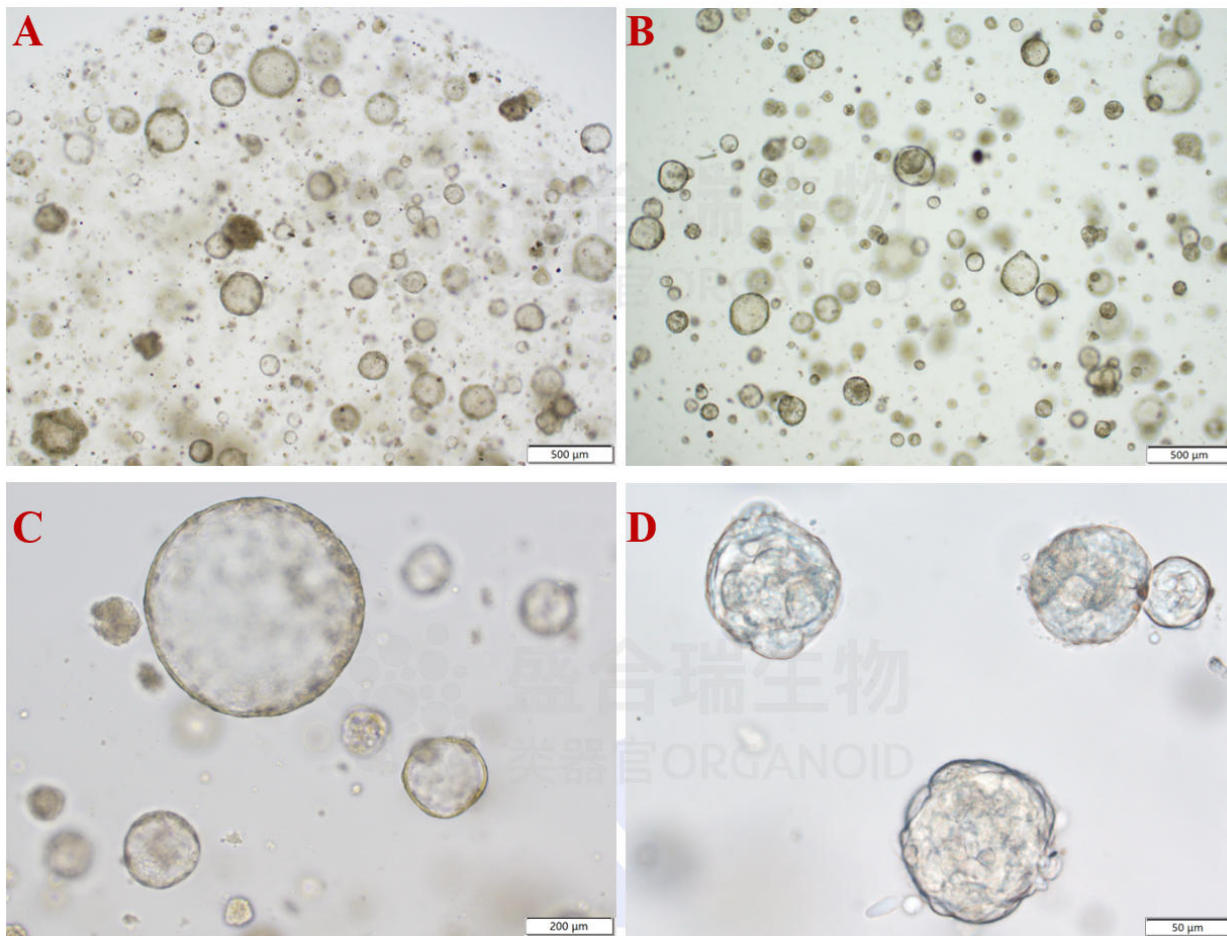


图1 小鼠肺泡类器官扩增、传代及增殖与分化状态示例

(A) 在扩增培养至7天时，可观察到大量囊泡状或实体结构。比例尺：500 μm 。(B) 传代培养过程中，可观察到相似的囊泡状或实体结构。比例尺：500 μm 。(C) 增殖阶段肺泡类器官以空泡囊状结构为主。比例尺：200 μm 。(D) 分化阶段肺泡类器官逐渐实心化，围绕囊体表面形成管状簇状肺泡样结构。比例尺：50 μm 。





图2 小鼠肺泡类器官免疫荧光染色鉴定

分别收集增殖期 (A) 和分化期 (B) 小鼠肺泡类器官进行免疫荧光染色。SFTPC (绿光) 是II型肺泡上皮标记物, AQP5 (红光) 是I型肺泡上皮标志物, DAPI标记细胞核。比例尺: 100 µm。

