

Mouse Esophageal Organoids Complete Medium (小鼠食管类器官完全培养基)

货号: MECM-100

产品介绍

小鼠食管类器官完全培养基是一款专用于小鼠正常食管类器官体外培养的商品化培养基，可有效支持食管上皮干祖细胞体外 3D 构建、稳定传代，维持鳞状上皮正常分化表型与生理结构。该产品适配食管发育、黏膜损伤修复、肿瘤建模、基因编辑等科研场景，可有效保障类器官增殖与形态完整，满足长期培养及各类功能学实验需求。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Mouse Esophageal Organoid Complete Medium A	MECM-100	100 mL	4°C, 6个月
Mouse Esophageal Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Mouse Esophageal Organoid Complete Medium C (250×)		0.4 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
样本保存液	SHR Biotechnology	SPS-100
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
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

小鼠食管类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制小鼠食管类器官完全培养基。以下是准备 10 mL 完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Mouse Esophageal Organoid Complete Medium B (50×)和Mouse Esophageal Organoid Complete Medium C (250×)。

注意：解冻后，建议将Mouse Esophageal Organoid Complete Medium B (50×)和Mouse Esophageal Organoid Complete Medium C (250×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于微量试剂组分Mouse Esophageal Organoid Complete Medium C (250×)，建议瞬时离心5秒钟（500-2000 rpm）后，再开盖使用，以避免损失。

2. 将 200 μ L Mouse Esophageal Organoid Complete Medium B (50×)，40 μ L Mouse Esophageal Organoid Complete Medium C (250×)加至 9.76 mL Mouse Esophageal Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 食管类器官完全培养基。

注意：配制好的小鼠食管类器官完全培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存不超过1周，建议现配现用。Mouse Esophageal Organoid Complete Medium A内含有细菌及真菌抗生素。

小鼠食管类器官的原代培养

1. 准备若干培养皿，加入 4 $^{\circ}$ C预冷的含有抗生素的 DPBS 备用。
2. 取小鼠食管组织，置于培养皿中用DPBS冲洗2次，直到上清液澄清。
3. 使用外科剪刀或手术刀在细胞培养皿中将组织切成 1-3 mm³的小碎片，放入 15 mL 离心管中。
4. 加入5倍体积预热过的正常组织消化液（NTD-50），37 $^{\circ}$ C消化30 min。



注意：密切监测消化过程，可配合剧烈摇晃或使用减去尖端的1 mL枪头上下吸取混合物来加快消化进程。为了防止过度消化，每5-10 min应在显微镜下观察是否出现细胞团，并及时终止消化。

5. 加入 10 mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 来终止消化，并轻轻地吹打或上下晃动离心管混匀。
6. 使用 100 μm 滤网过滤，收集滤液。
7. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心滤液 3 min，弃上清。如果细胞沉淀为红色，吸弃上清液后，加入 2 mL 类器官裂红液 (OCM-50) 重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 1-2 min，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 300 g 离心 3 min。

注意：红细胞裂解的具体时间可以根据红色深浅进行判断，尽量去除红细胞。

8. 吸弃上清液后，加入 10 mL 的上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心 3 min，弃上清。
9. 加入 1 mL 的上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，转移至 1.5 mL EP 管，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心 3 min。
10. 吸弃上清液后，用适量的类器官专用基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 μL 基质胶悬液含 8-20 个细胞团 (约 200-500 个细胞)，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：24 孔板每孔推荐接种一个 30 μL 基质胶滴，可根据细胞计数结果确定需要接种的胶滴数量。混合过程中应尽量避免产生气泡，以免影响后续观察以及类器官生长。

11. 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30 μL 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。

12. 将铺好的培养板至于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
13. 待基质胶完全凝固后，加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的小鼠食管类器官完全培养基，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。

14. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 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。
15. 密切监测类器官的形成。理想情况下，小鼠食管类器官可以在初次接种后 7 至 10 天之间进行首次传代。原代培养的小鼠食管类器官如图 1 所示。

小鼠食管类器官传代培养

当大部分类器官直径长至 100-200 μm 时，即可进行传代培养，具体步骤如下：

1. 吸弃原培养液，加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的培养基，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。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力吹打重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 在室温条件下 300 g 离心 3 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 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育，直到类器官消化完成。也可以采用机械吹打方式进行类器官传代消化，即在加入 1 mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬底部类器官沉淀后，



小心地将类器官悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏类器官。

注意：密切监测类器官消化情况，使用类器官传代消化液进行消化时需要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，如果可以观察到小细胞团（由 10-50 个细胞组成）的混合物，消化就完成了。

4. 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。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 吸弃上清液后，用适量的基质胶（OEM-10，>70% vol/vol）重悬组织沉淀。

注意：传代比例建议为 1:2-1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

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 μ L 左右。
8. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
9. 待基质胶完全凝固后，加入 37 $^{\circ}$ C 预热的小鼠食管类器官完全培养基，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。

10. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养。传代后的小鼠食管类器官生长情况如图 1B 所示。

小鼠食管类器官的冻存

当类器官平均直径长至 100-200 μ m，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 $^{\circ}$ 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，并将类器官和培养液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液，使得类器官与基质胶分离。

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。

- 3、在室温条件下 300 *g* 离心 3 min，弃上清。

- 4、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。

- 5、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。

- 6、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 $^{\circ}$ C 过夜，第二天取出放入液氮罐。

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

注意：-80 $^{\circ}$ 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 Esophageal organoids were cultured with Mouse Esophageal Organoid Complete Medium (MECM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



附录1 小鼠食管类器官培养过程例图

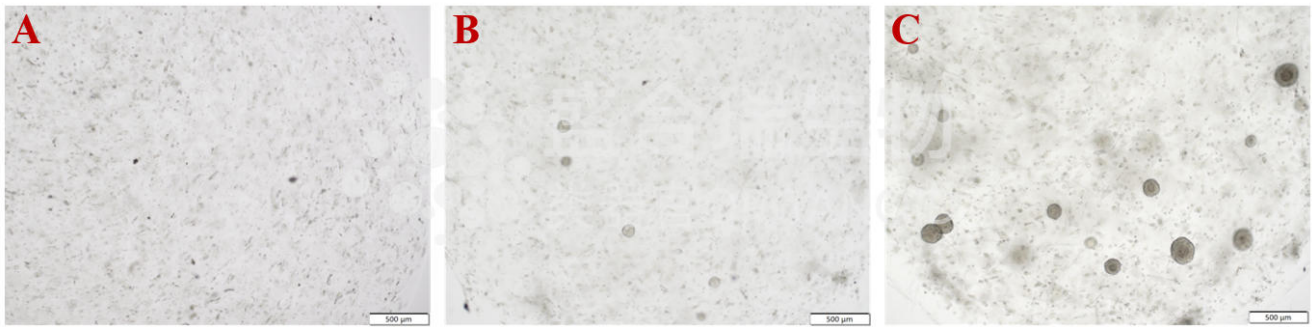


图1 小鼠食管类器官原代培养生长过程图

(A) 小鼠食管类器官原代培养第0天，以单细胞和较小细胞团为主；(B) 小鼠食管类器官原代培养至第6天时，开始出现明显的类器官球体结构；(C) 小鼠食管类器官原代培养至第8天时，类器官呈明显生长趋势。比例尺：500 µm。

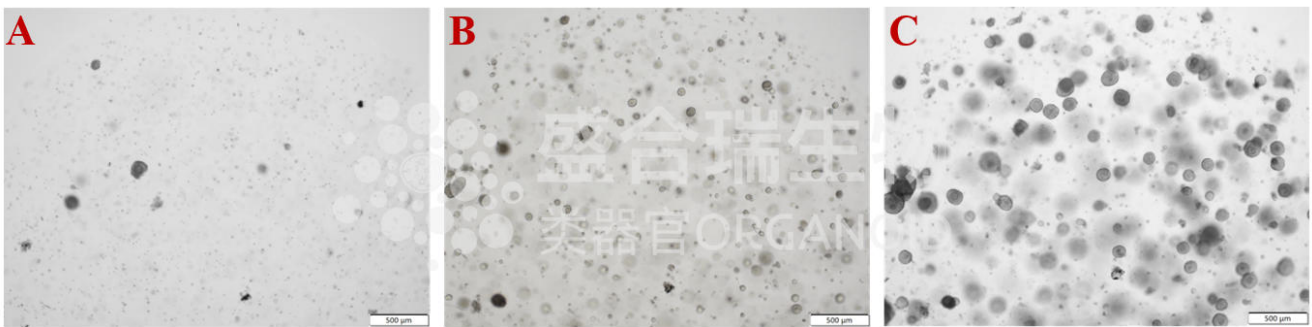


图2 小鼠食管类器官传代培养生长过程图

(A) 经消化后的小鼠食管类器官在传代培养至第0天时，出现明显的类器官球体结构；(B) 继续培养至第6天，类器官出现生长趋势，体积增大；(C) 当生长至第10天，类器官生长明显，直径达到200 µm。比例尺：500 µm。



附录2 小鼠食管类器官鉴定图

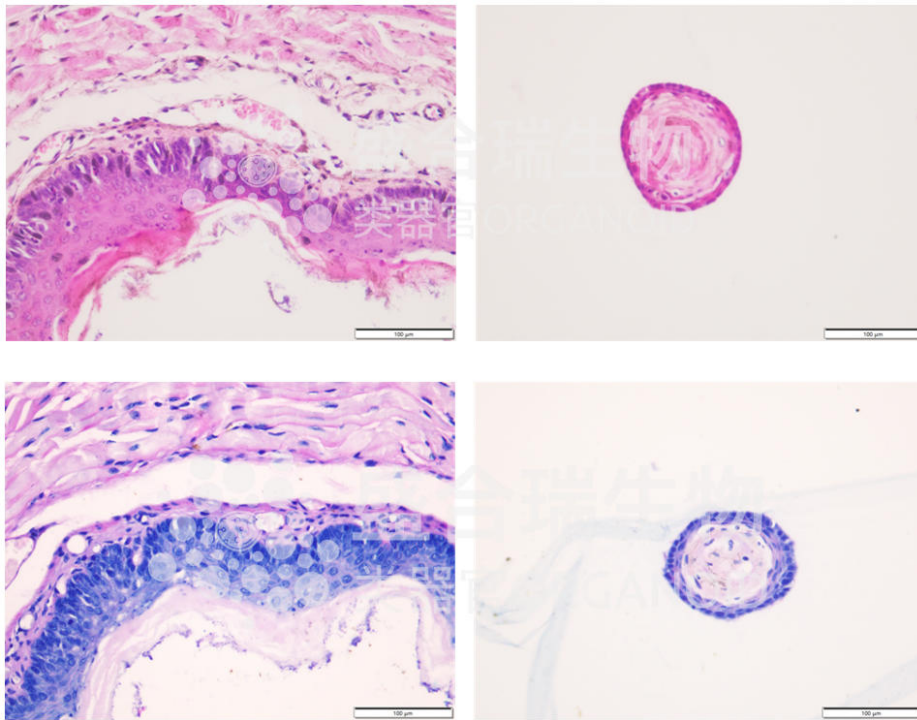


图3 小鼠食管类器官 HE 及 AB-PAS 染色

HE 染色结果表明，小鼠食管组织 (A) 和类器官 (B) 内细胞的排布，细胞核、细胞质颜色以及核质比均近似，且结构相近。AB-PAS 染色结果表明，小鼠食管组织 (C) 和类器官 (D) 内细胞核呈深蓝色，均为 AB-PAS 阳性。这些染色结果说明类器官成功模拟了来源组织的结构和生理特征。比例尺：100 μm。

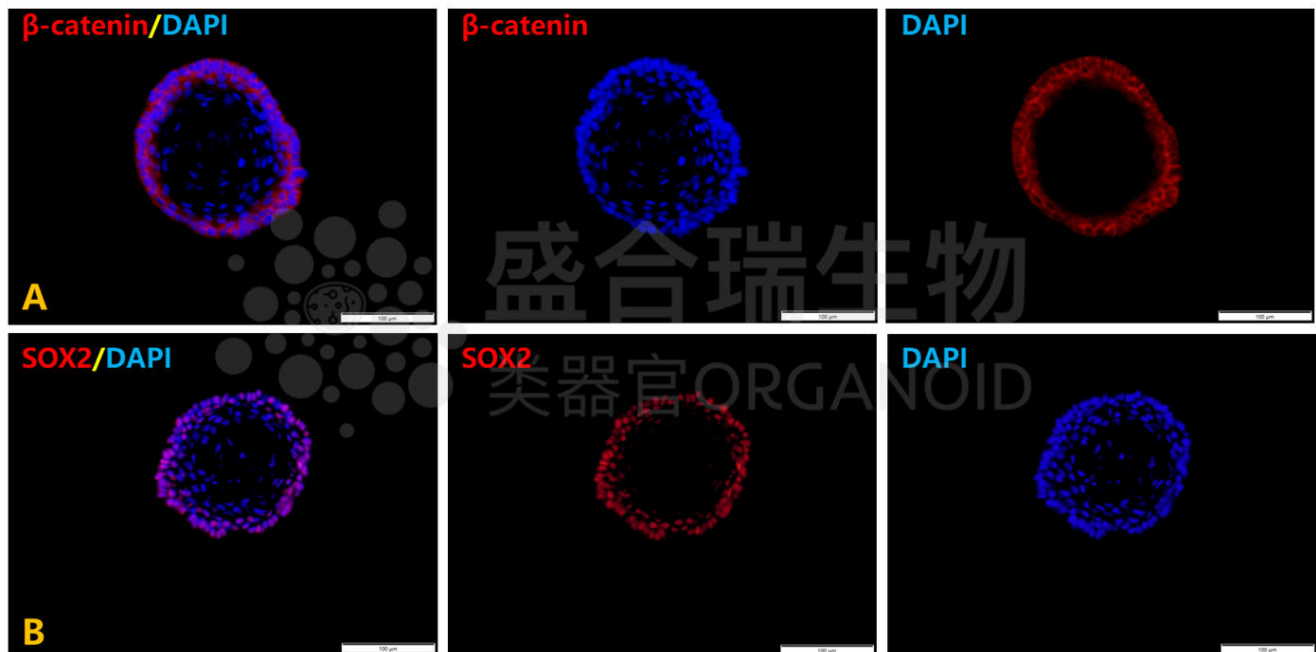


图4 小鼠食管类器官免疫荧光染色

β-catenin (红色) 为上皮细胞黏附标记物，SOX2 (红色) 为干细胞标志物，DAPI (蓝色) 标记细胞核。比例尺：100 μm。

