

Mouse Kidney Organoid Complete Medium (小鼠肾小管类器官完全培养基)

货号: MKCM-100

产品介绍

小鼠肾（小管）类器官完全培养基是一款专用于培养小鼠肾（小管）类器官的商品化培养基，可精准调控肾脏上皮细胞增殖与定向分化，高效诱导肾小管管腔结构形成，稳定维持类器官形态完整性与生理功能，用于肾脏发育机制、肾损伤修复、药物毒性筛选等体外模型研究，助力肾脏相关基础研究。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Mouse Kidney Organoid Complete Medium A	MKCM-100	100 mL	4°C, 6个月
Mouse Kidney Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Mouse Kidney 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
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)	-	-

小鼠肾（小管）类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备小鼠肾（小管）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 Kidney Organoid Complete Medium B (50×) 和 Mouse Kidney Organoid Complete Medium C (250×)。

注意：解冻后，建议将 Mouse Kidney Organoid Complete Medium B (50×) 和 Mouse Kidney 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 Kidney Organoid Complete Medium C (250×)，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 μL Mouse Kidney Organoid Complete Medium B (50×)，40 μL Mouse Kidney Organoid Complete Medium C (250×) 加至 9.76 mL Mouse Kidney Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 小鼠肾类器官完全培养基。

注意：配制好的小鼠肾类器官完全培养基可在 2-8 °C 储存不超过 1 周，建议现配现用。Mouse Kidney Organoid Complete Medium A 内含有细菌及真菌抗生素。

小鼠肾（小管）类器官原代培养

1. 准备若干培养皿，加入 4 °C 预冷的含有抗生素的 DPBS 备用。
2. 取小鼠肾组织，置于培养皿中用 DPBS 冲洗 2 次。
3. 使用外科剪刀或手术刀将组织切成 0.5-1 mm³ 的小碎块，放入 5 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 °C 消化 15-30 min。

注意：密切监测消化过程，每 10 分钟通过剧烈摇晃或上下吸取混合物来混合试管中的内容物。当大多数组织碎片能够通过 1 mL 移液管尖端时，消化过程就可以完成。为了防止过度消化，也可以在显微镜下观察消化情况。

5. 加入 10 mL（约 3~5 倍体积）上皮类器官基础培养基（OBM-500）来终止消化，并轻轻地上下晃动离心



管。

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 30 s-1 min，然后 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，300 g 离心 3 min，弃上清。
9. 吸弃上清液后，加入 1 mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，转移至 1.5 mL EP 管中，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. 将铺好的培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。

13. 配制小鼠肾类器官完全培养基。

14. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠肾类器官完全培养基，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。

15. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养。每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。

16. 密切监测类器官的形成。理想情况下，小鼠肾类器官可以在初次接种后 5~7 天进行首次传代。原代培养的小鼠肾类器官生长过程如图 1 所示。

小鼠肾 (小管) 类器官传代培养

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

1. 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，如果可以观察到大部分小细胞团（由10-50个细胞组成）出现，消化就完成了。建议优先采用机械吹打方式进行类器官传代消化，对于无法吹散的类器官进一步使用类器官传代消化液进行消化。

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）重悬沉淀。

注意：如类器官生长状态较好，传代比例推荐为1:3~1:5，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 μL左右。
8. 将接种完成后的培养板至于37 °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，加入配制好的小鼠肾类器官完全培养基，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。

10. 将24孔板置于37 °C CO₂培养箱中培养。传代后的小鼠肾类器官生长过程如图2所示。

小鼠肾（小管）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。具体的步骤如下：

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。

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 °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 kidney organoids were cultured with Mouse Kidney Organoid Complete Medium (MKCM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



附录1 小鼠肾（小管）类器官培养过程图

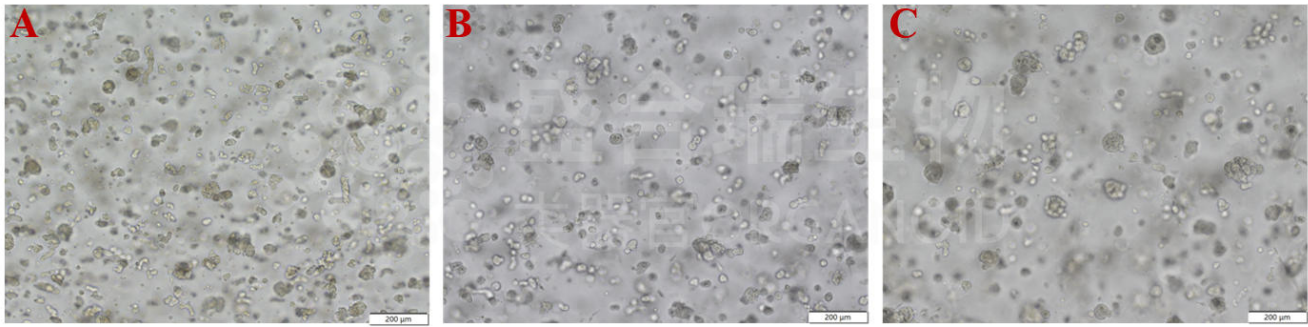


图1 小鼠肾（小管）类器官原代培养过程示例

(A) 小鼠肾（小管）类器官原代培养第0天时，可观察到活性小细胞团；(B) 接种后第2天时，可观察到3D细胞球；(C) 生长至第5天时，细胞球直径持续增大。比例尺：200 µm。

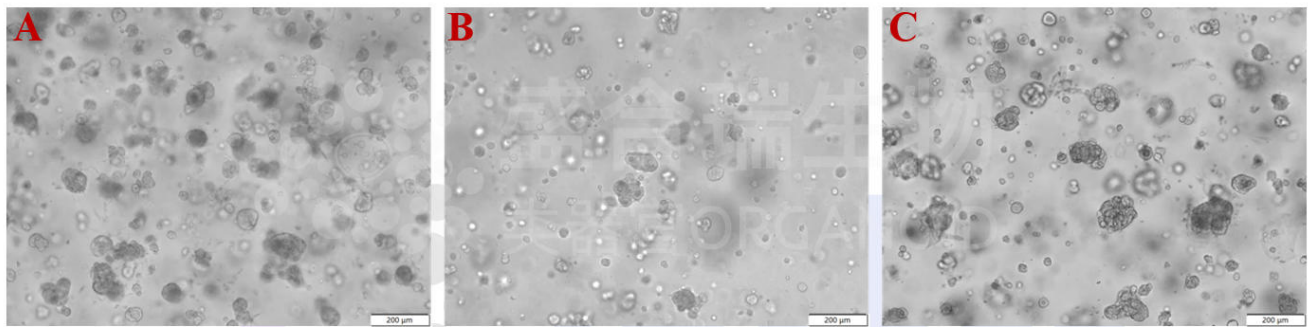


图2 小鼠肾（小管）类器官传代培养过程示例

(A) 经消化后的小鼠肾（小管）类器官在传代培养至第2天时，可看到明显的类器官球结构；(B) 传代后第4天，可见新形成的不规则细胞球；(C) 传代后第7天，细胞球直径明显增大。比例尺：200 µm。

