

Mouse middle Ear Organoid Complete Medium (小鼠中耳类器官完全培养基)

货号: MmECM-100

产品介绍

小鼠中耳类器官完全培养基是一款用于扩增和分化小鼠中耳类器官的商品化培养基，能够在气液-界面 (ALI) 或 3D 基质胶包裹体系中将小鼠中耳上皮组织来源的干细胞诱导分化形成小鼠中耳类器官。分化好的小鼠中耳类器官包含基底细胞、纤毛细胞、黏液分泌细胞等，因此在结构、细胞类型组成上表现出中耳上皮的所有特征，在中耳发育和疾病的研究中具有良好的应用前景。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution A	MmETD-50	50 mL	4°C, 6个月
Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution B (25×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium A	MmEeCM-50	50 mL	4°C, 6个月
Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium B (20×)		1.25 mL×2	-20°C, 1年
Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium C (250×)		0.2 mL	-20°C, 1年
Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium A	MmEdCM-50	50 mL	4°C, 6个月
Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium B (20×)		1.25 mL×2	-20°C, 1年
Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium C (250×)		0.2mL	-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
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
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50
鼠尾胶原I	Corning	354236
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

小鼠中耳类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备小鼠中耳组织消化液、小鼠中耳类器官扩增培养基及小鼠中耳类器官分化培养基。以下是准备 10 mL 小鼠中耳组织消化液、10 mL 小鼠中耳类器官扩增培养基及 10 mL 小鼠中耳类器官分化培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

(1) 小鼠中耳组织消化液

1. 冰上解冻 Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution B (25×)。

注意：解冻后，建议将 Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution B (25×) 按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 400 μ L Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution B (25×) 加至 9.6 mL Mouse middle Ear Tissue Digestion Solution A 中，充分混合，配制成 10 mL 小鼠中耳组织消化液。

注意：配制后的完全组织消化液可在 2-8 °C 储存，建议 24 小时内使用，或 -20 °C 储存 1 月。

(2) 小鼠中耳类器官扩增培养基

1. 冰上解冻 Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium B (20×) 和 Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium C (250×)。



注意: 解冻后, 建议将Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium B (20×)和Mouse middle Ear Organoid expansion 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 middle Ear Organoid expansion 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 500 μ L Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium B (20×), 40 μ L Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium C (250×)加至 9.46 mL Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 小鼠中耳类器官扩增培养基。

注意: 配制后的小鼠中耳类器官扩增培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存不超过1周, 建议现配现用。Mouse middle Ear Organoid expansion Complete Medium A内含有细菌及真菌抗生素。

(3) 小鼠中耳类器官分化培养基

1. 冰上解冻Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium B (20×)和Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium C (250×)。

注意: 解冻后, 建议将Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium B (20×)和Mouse middle Ear Organoid differentiation 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 middle Ear Organoid differentiation 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 500 μ L Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium B (20×), 40 μ L Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium C (250×)加至 9.46 mL Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 小鼠中耳类器官分化培养基。

注意: 配制后的小鼠中耳类器官分化培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存不超过1周, 建议现配现用。Mouse middle Ear Organoid differentiation Complete Medium A内含有细菌及真菌抗生素。

小鼠中耳上皮细胞原代培养

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 6 只小鼠中耳组织, 置于培养皿中用 DPBS 冲洗 2 次。
3. 将中耳上皮组织放入中耳消化液 (MmETD-50) 中37 $^{\circ}$ C消化5h, 然后转入4 $^{\circ}$ C消化过夜。
4. 第2天转移至基础培养基+10%FBS溶液中吹打使上皮结构脱落。
5. 使用 100 μ m 滤网过滤, 收集滤液。
6. 在4 $^{\circ}$ 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。

7. 吸弃上清后, 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。
8. 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, 在4 °C下, 300 *g*离心3 min。
9. 去除成纤维细胞: 弃上清后, 将细胞沉淀接种至24孔板中, 每孔接种20000-50000个细胞, 添加500 μ L培养基, 使用培养基为基础培养基+10%FBS。

注意: 一般6只鼠的组织消化下的细胞可接种2-4个孔。成纤维细胞较上皮细胞更快速贴壁, 因此通过差速贴壁的时间差来去除成纤维细胞。

10. 培养3-4 h后收集未贴壁细胞接种至新的24孔板中, 每孔添加500 μ L已配制的小鼠中耳扩增培养基培养, 隔天换液。
11. 大约培养3-5天可长满培养板底, 然后收集继续进行3D扩增或分化培养。原代培养的小鼠中耳上皮细胞生长过程如图1所示。

小鼠中耳类器官扩增培养

1. 取培养好的小鼠中耳上皮细胞, 加入类器官传代消化液 (OPD-100), 37 °C消化1-2 min后, 加入1 mL上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 终止消化后, 用移液器反复吹打使细胞脱落。
2. 收集消化好的细胞悬液, 室温条件下300 *g*离心3 min。
3. 弃上清, 转入1.5 mL EP管中加入1mL上皮类器官基础培养基 (OBM-500), 300 *g*离心3 min。
4. 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 μ L基质胶悬液含200-500个细胞, 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: 24孔板每孔推荐接种一个30 μ L基质胶滴, 可根据活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, 否则影响后续观察以及类器官生长。

5. 将悬液点入 24 孔板底部正中央, 每孔 30 μ 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。

6. 将铺好的培养板置于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中, 孵育 15-25 min 左右成胶。
7. 配制小鼠中耳类器官扩增培养基。
8. 待基质胶完全凝固后, 加入已配制好的小鼠中耳类器官扩增培养基, 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。隔天更换一次培养基, 更换培养基时应避免破坏基质胶。
10. 密切监测类器官的形成。理想情况下, 小鼠中耳类器官可以在接种后3天左右形成。扩增培养的小鼠中耳类器官3D生长如图2A所示。



小鼠中耳类器官传代与分化培养

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 3min, 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 3 min)。根据经验, 如果可以观察到小块细胞 (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) 重悬细胞沉淀。

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 °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, 加入配制好的小鼠中耳类器官扩增培养基, 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 °C CO₂ 培养箱中培养。隔天更换一次培养基, 更换培养基时应避免破坏基质胶。
11. 密切监测类器官的形成。一般在培养 3 天后即可继续传代或分化处理。传代培养的小鼠中耳类器官 3D 生长如图 2B 所示。
12. 如继续分化处理, 弃掉原孔培养基, 每孔加入 500 μ L 小鼠中耳类器官分化培养基, 隔天换液, 分化 14 d 左右即可收样进行后续检测。分化完成的小鼠中耳类器官 3D 生长如图 2C 所示。

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 middle ear organoids were cultured with Mouse middle Ear Organoid Complete Medium (MmECM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



附录1 小鼠中耳上皮培养过程图

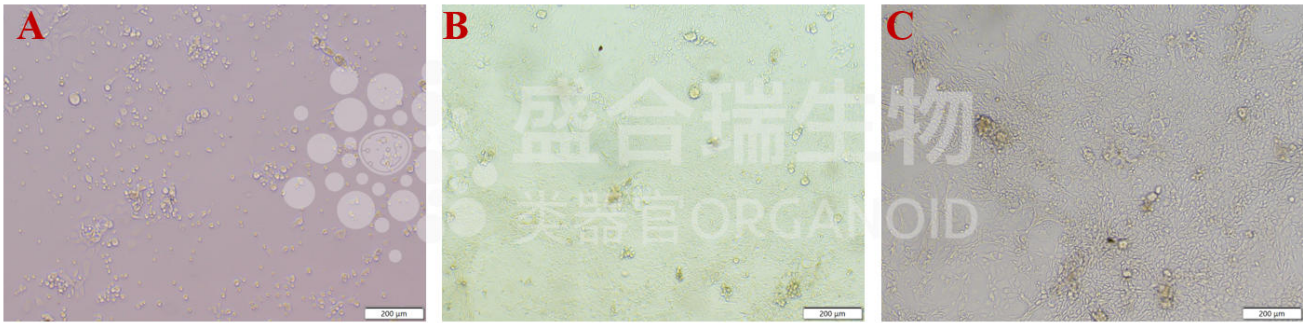


图1 小鼠中耳上皮细胞原代 (P0) 培养过程示例图

(A) 接种第1天可见有细胞贴壁；(B) 生长至第3天时，可观察到上皮细胞成片生长；(C) 继续生长至第5天，基本铺满整个孔底。比例尺：200 µm。

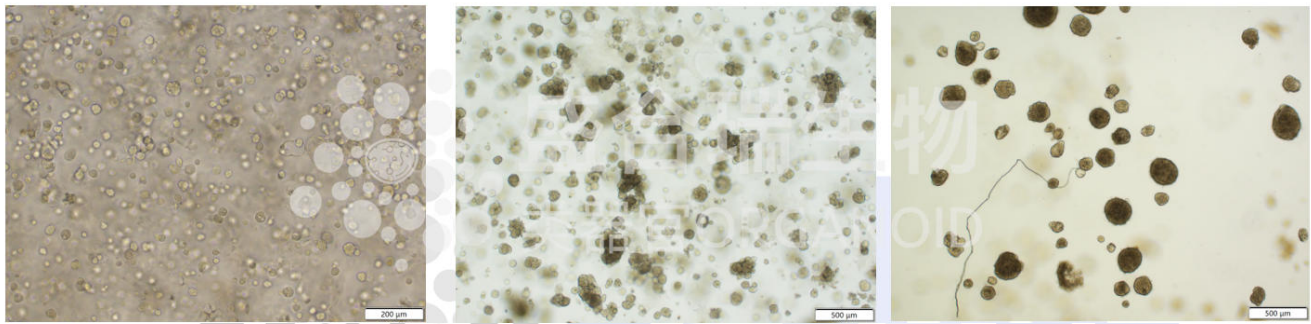


图2 小鼠中耳类器官3D培养生长、传代与分化图示例图

(A) 小鼠中耳类器官3D培养以囊泡状球体居多。比例尺：200 µm。(B) 小鼠中耳类器官传代后正常生长，呈泡状和实体混合结构。比例尺：500 µm。(C) 小鼠中耳类器官分化后以实体结构为主。比例尺：500 µm

