

BiozellenCM® 人肺气道类器官培养基 (BiozellenCM® Human Airway Organoid Growth Medium)

Catalog No B-MN-00002-100、B-MN-00002-500

Specification 100ml、500ml

一、产品介绍

BiozellenCM® 人肺气道类器官培养基是一种化学成份明确的无血清培养基，用于从肺组织或肺支气管上皮细胞建立人肺气道类器官。人肺气道类器官包含基底细胞、纤毛细胞、分泌细胞和少量的神经内分泌细胞。因此，类器官在结构、细胞类型组成和自我更新等方面具有气道上皮的生物特征，可用于肺部疾病模型，药物测试，以及气道上皮功能等研究。

二、产品信息

组 成	货 号	规 格	储存温度&质保期
BiozellenCM® 人肺气道类器官基础培养基	B-MN-00002	100 mL/500mL	2-8 °C，12个月
BiozellenCM® 人肺气道类器官培养基添加剂 A (50×)	B-MN-00002-A	2 mL/10mL	-20°C，12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 人肺气道类器官培养基添加剂 B (50×)	B-MN-00002-B	2 mL/10mL	-20°C，12个月，避免反复冻融

三、用前须知

- 首次使用时**，请将解冻后的人肺气道类器官培养基添加剂A、B按比例添加到人肺气道类器官基础培养基中，配制人肺气道类器官培养基（请在试剂瓶上标注配制时间），充分混匀后置于 2-8 °C保存，建议 2-3 周内使用完毕。
- 建议**：如短时间内不能用尽，可将配制的人肺气道类器官培养基分装并贮存在-20°C冻存，保存期限不超过 12 个月。

四、需要但不包含的其他配套使用试剂

名 称	货 号	规 格
组织保存液	B-R-00005-100	100 ml/瓶
组织消化液	B-R-00009-50	50ml/瓶
BiozellenGel 基质胶，低因子，无酚红	B-P-00007-10	10 ml/瓶
类器官传代消化液	B-R-00002-100	100 ml/瓶
类器官冻存液	B-R-00006-100	100 ml/瓶
DMEM/F12 (含10%血清)	-	-
无菌PBS (1×)	-	-
100µm滤网	-	-

五、人肺气道类器官构建操作步骤

- 组织运输**：将采集的组织放入装有组织保存液（B-R-00005-100）的采集管中，充分浸没并于低温（建议冰上）迅速运送至实验室。
- 组织前处理**：将组织至于 6 孔板中，加入 PBS（含 1% 双抗和两性霉素 B）漂洗两次。
- 组织剪碎**：将剩余组织转移至 10 cm 的无菌培养皿中，剪碎至肉糜状（1-3 mm³）后移入15 mL离心管中。

4. 组织消化：加入 5 mL 组织消化液（B-R-00009-100），37°C 恒温消化 30-60min。每间隔5-10min上下颠倒混匀。

备注 1：当大部分组织碎片能通过 1 mL 移液枪头或镜下观察到大部分细胞呈细胞团块时，即可终止消化。

5. 终止消化：加入 5 mL DMEM/F12（含 10% FBS）混匀后，300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。

6. 细胞过滤：加入 5 mL PBS 重悬细胞，使用 100 μm 细胞滤网过滤，再吸取 5 mL PBS 冲洗滤网，将滤出液 300 g 离心 4 min，吸弃上清。

7. （选做）如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色）加入 1 mL 红细胞裂解液（B-R-00003-100），轻轻涡旋或颠倒混匀，室温静置 5 min。300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。

8. 细胞计数：使用 5 mL PBS 重悬细胞，吸取少量悬液通过自动细胞计数仪或手动计数板计算细胞总数和活细胞比率。计数后，300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。

备注 2：活细胞总数（个）= 测读值（个/mL）× 5 mL × 活细胞比率 %

9. 细胞预冷：取少量类器官培养基（30-50 μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。

10. 细胞接种：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的 BiozellenGel（B-P-00007-10，或 Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以 30 μL/滴接种至预热细胞孔板中。

备注 3：接种密度推荐 $1-5 \times 10^4$ 活细胞/μL（仅供参考，可按实验需求进行调整）。

备注 4：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于 70%。

11. 基质胶固化：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱内孵育 10-15 min 使基质胶凝固。

12. 培养：待基质胶凝固后，加入准备好的类器官培养基至浸没基质胶滴（需确认人肺气道类器官培养基中已加入添加剂 A 和 B）。

备注 5：6 孔板建议加入 2.5 mL，12 孔板建议加入 1.2 mL，24 孔板建议加入 600 μL。

备注 6：加液时建议沿侧壁缓慢加入，请勿将培养基直接加到胶滴上。

13. 换液：将已接种的孔板转移至 37°C，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每 2-3 天全换或半换液）。

备注 7：一般在接种后一周内即可观测到类器官形成。

*** 肺组织样本也可预先通过 2D 培养成支气管上皮细胞，并经过消化重悬后进行基质胶接种操作（从步骤 10 开始），同样可获得肺气道类器官。**

六、人肺气道类器官传代操作步骤

1. 收集：用 1 mL 移液枪头捣碎并刮取基质胶团，并将胶滴与培养基一起转入 15 mL 离心管中（如孔内有细胞存留，可另吸取 PBS 涮洗孔板并转入离心管中）。300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。

备注 1：建议待大部分类器官的大小大于 100 μm 传代（传代标准仅供参考，可按实验需求调整）。

备注 2：为避免枪头粘附性损耗，可用抗粘附液（B-R-00007-100）润洗 移液枪头。

2. 消化：加入 5 mL 类器官传代消化液（B-R-00002-100）于 37°C 消化 5-10 min，期间颠倒混匀若干次。

备注 3：在消化过程中，可使用移液器吹打混匀帮助消化。也可实时取少量消化悬液于显微镜下观察消化情况，当观察到较多的单细胞或直径在 50 μm 以下的细胞簇后，即可认为消化完成。

3. 终止消化：加入 5-10 mL DMEM/F12（10 % FBS），于 300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。

4. 细胞漂洗：取 5-10 mL PBS 重悬细胞，300 g 离心 4 min，小心吸弃上清

5. 细胞预冷：取少量类器官培养基（30-50 μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。

6. 细胞接种：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的 BiozellenGel（B-P-00007-10，或 Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以 30 μL/滴接种至预热细胞孔板中。

备注 4：传代比例一般 1:2 或 1:3（传代比例仅供参考，可按实验需求调整）

备注 5：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于 70%。

7. 基质胶固化：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱内孵育 10-15 min 使基质胶凝固。

8. 培养：待基质胶凝固后，加入准备好的类器官培养基至浸没基质胶滴（需确认人肺气道类器官培养基中已加入添加剂 A 和 B）。

9. 换液：将已接种的孔板转移至 37℃，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。

七、人肺气道类器官分化操作步骤

1. 参照上述传代操作进行细胞接种后，加入适量的鼻粘膜类器官基础培养基（B-MN-00001），置于37℃，5%CO₂培养箱中培养。
2. 第4天，去除基础培养基，将培养基更换为添加10uM DAPT的PneumaCult-ALI培养基（Stemcell）6-10 天后进行鉴定。

八、友情提示

1. 本试剂仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂培养结果会收到标本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。
3. 如遇到特殊样本或其他未涉及问题，请联系公司售后技术支持，我们将提供免费的技术咨询服务，再次感谢您的信任!

仅供研究使用