

BiozellenCM® 小鼠表皮类器官培养基**(BiozellenCM® Mouse epidermal organoid Medium)**

Catalog No B-MN-00007-100、B-MN-00007-500

Specification 100ml、500ml

Storage -20℃、12个月

一、产品介绍

BiozellenCM® 小鼠表皮类器官培养基是一种化学成份明确的无血清培养基，用于从小鼠皮肤组织建立表皮类器官。该培养基能支持成年小鼠表皮角质细胞的长期扩增培养，保持小鼠毛囊间表皮的基底-顶端组织结构，可用于在体外研究表皮的动态平衡和相关疾病研究。

二、产品信息

组 成	产品号	规 格	储存温度&质保期
BiozellenCM® 小鼠表皮类器官基础培养基	B-MN-00007	100 mL/500mL	2-8℃，12个月
BiozellenCM® 小鼠表皮类器官培养基添加剂 A (50×)	B-MN-00007-A	2 mL/10mL	-20℃，12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 小鼠表皮类器官培养基添加剂 B (50×)	B-MN-00007-B	2 mL/10mL	-20℃，12个月，避免反复冻融

三、产品参数

产品名称	产品号	货 号
组织保存液	B-R-00005-100	100 mL/瓶
MAcreGel 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-00006-50	100 mL/瓶
中性蛋白酶	-	-
DMEM/F12 (含10%血清)	-	-
无菌PBS (1×)	-	-
100μm滤网	-	-

四、注意事项

- 首次使用时，请将解冻后的小鼠表皮类器官培养基添加剂A、B按比例添加到小鼠表皮类器官基础培养基中，配制小鼠表皮类器官培养基（请在试剂瓶上标注配制时间），充分混匀后置于 2-8℃保存，建议 2-3 周内使用完毕。
- 建议：如短时间内不能用尽，可将配制的小鼠表皮类器官培养基分装并贮存在-20℃冻存，保存期限不超过12 个月。
- 需要但不包含的其他配套使用试剂。

五、小鼠表皮类器官构建操作步骤

1. 将采集的皮肤组织至于无菌培养皿中，加入 PBS（含抗生素）漂洗2次。除去表面血液，75%酒精浸泡1-2min。再使用PBS（含抗生素）漂洗2次。
2. 将真皮层朝上，使用无菌手术刀刮擦皮肤的真皮面，以去除脂肪组织和肌肉。
3. 将组织表皮面朝上漂浮再培养皿中，加入含中性蛋白酶（2mg/mL），4℃过夜。
4. 将组织转移到一新的培养皿中，加入预冷的PBS覆盖，并使其表皮面朝上。使用显微解剖钳从真皮层剥离表皮，将表皮转移到一个有冷PBS的新培养皿中。
5. 分离的表皮剪碎后转移到含有3ml 0.25% 的胰蛋白酶的15ml离心管中，37℃孵育10min然后涡旋得到单细胞悬液。
6. 加入等体积的含血清（10-20%）DMEM/F12终止消化，使用 100 μm 细胞滤网过滤。
7. 将滤液以300 g 离心 5 min，小心吸弃上清。
8. 使用1mL 小鼠皮肤类器官培养基重悬细胞，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。

备注 1：活细胞总数（个）= 测读值（个/mL）× 5 mL × 活细胞比率 %

9. 计数后将细胞离心：300 g 离心 4 min，小心吸弃上清。
10. 细胞预冷：取少量类器官完全培养基（30-50μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。
11. 细胞接种：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的 MACreGel (B-P-00007-10) 小心混匀上述预冷的细胞悬液，以 30μL/滴接种至预热细胞孔板中。

备注 2：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 3：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。

12. 接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37℃，5% CO₂ 培养箱内孵育 10-15 min 使基质胶凝固。
13. 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。

备注 4：6 孔板建议加入 2.5mL，12 孔板建议加入1.2 mL，24孔板建议加入 600μL。

备注 5：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。

14. 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）。

六、小鼠表皮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℃ 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 50μm 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 μ L）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 MACreGel (B-P-00007-10，或Matrigel) 小心混匀上述预冷的细胞悬液，以 30 μ L/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（需确认小鼠表皮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°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）。

七、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