

Mouse Intestinal Organoid Medium Kit Pro

小鼠小肠类器官培养基套装 Pro

Kit Art.No: MA-0817H006LPR/MA-0817H006SPR5/MA-0817H006SPR



- ◇ 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期两年，注意避免反复冻融；
- ◇ 解冻后类器官完全培养基可在 4℃ 储存，建议在两周内使用；
- ◇ 类器官培养基中含有细菌及真菌抗生素。

1、产品描述

模基生物小鼠小肠类器官培养基套装 Pro (Mouse Intestinal Organoid Medium Kit Pro) 是一款用于建立和维持小鼠肠道成体干细胞来源的小肠类器官培养基套装。可较大程度维持小肠隐窝的活性，并提升小肠类器官的形成率，所培养的小鼠小肠类器官主要由小肠干细胞、快速扩增细胞、肠吸收细胞、潘氏细胞、杯状细胞和少量肠内分泌细胞组成，在自我更新能力、组织结构、细胞类型和功能方面，小鼠小肠类器官能部分重现小鼠肠上皮的特征，因此是肠道稳态和疾病机制研究的理想体外模型。

2、产品信息

产品名称	产品货号	规格	存储/运输	保质期
小鼠小肠类器官培养基套装 Pro	MA-0817H006LPR	500 mL	-20℃	24 个月
	MA-0817H006SPR5	100 mL*5		
	MA-0817H006SPR	100 mL		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
模基生物金牌基质胶	082701/082703/082755
上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L/MB-0818L03S
EDTA (0.5M, pH8.0)	-
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
0.1%BSA	-

产品名称	产品货号
DPBS (1X), 液体, 不含钙和镁	-
细胞过滤器 70 μ m	-
细胞培养板 96/48/24/12/6 孔	-
离心管 1.5/5/15/50 mL	-
细胞培养皿 6/10 cm	-

4、小鼠小肠类器官完全培养基使用说明

- 1、收到类器官培养基后，将培养基置于 4 °C 冰箱进行解冻。
- 2、待培养基完全解冻后上下颠倒充分混匀，在生物安全柜或洁净工作台中根据日常需求量进行分装，推荐分装成 10 mL/管。
- 3、分装后的培养基请密封后储存于 -20 °C，使用时取出分装的培养基放置室温平衡后即可使用。

5、小鼠小肠类器官的建立和传代培养

a) 原代小鼠小肠类器官的建立

- 1、实验前先将基质胶插碎冰里过夜解冻，同时取出培养基放置室温平衡；与细胞接触的离心管、试管或者塑料吸头需要用类器官培养防粘附润洗液润洗后使用；准备足量添加 1 %双抗的 DPBS 及添加 0.1 % BSA 的 DPBS；配制 5 mM EDTA 溶液于 6 cm 培养皿中：8 mL 预冷 DPBS 溶液加 80 μ L 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0)，置于冰上或冰箱中备用。
- 2、取 6 周左右的小鼠并断颈处死，背部朝下，腹部朝上，表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出近胃端 3~10 cm 肠组织，用镊子去除肠道外部的肠系膜、脂肪，放入 4 °C 预冷的含 1 %双抗的 DPBS 溶液中。
- 3、使用手术剪将肠管纵向剪开，用两只镊子将肠腔面展开朝上，一只手使用手术镊夹住肠组织一端，另一只手使用载玻片轻轻刮去肠腔表面肠绒毛，约 2~3 次可以把绒毛刮干净，待肠绒毛被刮净后，将肠组织在含双抗的 DPBS 培养皿中清洗两遍。将清洗后的小肠组织剪碎至 5 mm 宽，转移至新的培养皿中，用含双抗的 DPBS 清洗 2 遍。
- 4、将清洗好的肠段转移至含有 5 mM EDTA 的预冷 DPBS 中消化，置于 4 °C 孵育 30min，消化 28 分钟可用 1 mL 移液枪（减去尖头）轻柔吹打肠段 8 次，将整个 6 cm 皿置于显微镜下观察，待视野中出现完整隐窝即可终止消化，若无隐窝可适当延长消化时间。
- 5、消化完成后，将肠段转移到新的含 1 %双抗 DPBS 的 50ml 离心管中轻轻水平旋转（非上下颠倒），重复 2~3 次以去除 EDTA 和肠绒毛碎片，最后一次清洗的上清需完全去除。

以下步骤与细胞接触的耗材均需要润洗后使用：

6、向肠段组织沉淀加入预冷的 15 mL 0.1 % BSA 的 DPBS，用涡旋混合仪中间档或 2500 rpm 涡旋、重悬肠段 5 s，从而使隐窝与基底层分离(肉眼可以观测到有大量隐窝脱落)，取一部分悬液镜检，当可以看到大量的隐窝样结构后，吸取悬液使用 70 μ m 细胞滤网进行过滤。若隐窝数量较少可静置 30 s，待肠段沉降后吸取悬液进行过滤，再加入 15 mL 0.1 % BSA 的 DPBS 涡旋重悬肠段，继续收集悬液进行过滤。可重复收集悬液直至满足实验所需的隐窝数量。

7、收集穿过滤网的组织悬液，300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min。

8、弃上清，使用 1 mL 0.1 % BSA 的 DPBS 轻柔重悬隐窝沉淀，取 20 μ L 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液，300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min，弃上清后置于冰上。

9、用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10 μ L 基质胶悬液包含 30 至 50 个隐窝，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：基质胶稀释比例应在 70 % 以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性（不建议过高密度培养）。

10、将基质胶和隐窝的混合悬液点入培养孔板底部正中央，使用枪头稍微摊平悬液，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μ L/孔，48 孔板接种 10~20 μ L/孔，不建议更大体积胶体种板，否则中心类器官会获得不到更多营养而状态不好，胶滴体积最大不超过 25 μ L。）

11、将接种完成后的培养板倒置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15 min 以上。

12、待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的小鼠小肠类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μ L/孔，48 孔板加入 250 μ L/孔），将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养。

13、每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠小肠类器官应在 5 天内建成。

b) 小鼠小肠类器官的传代培养

1、待原代构建的小鼠小肠类器官培养 4-5 天时可进行类器官的传代。为避免传代时类器官损失，以下操作用到的耗材均需用润洗液润洗后使用。

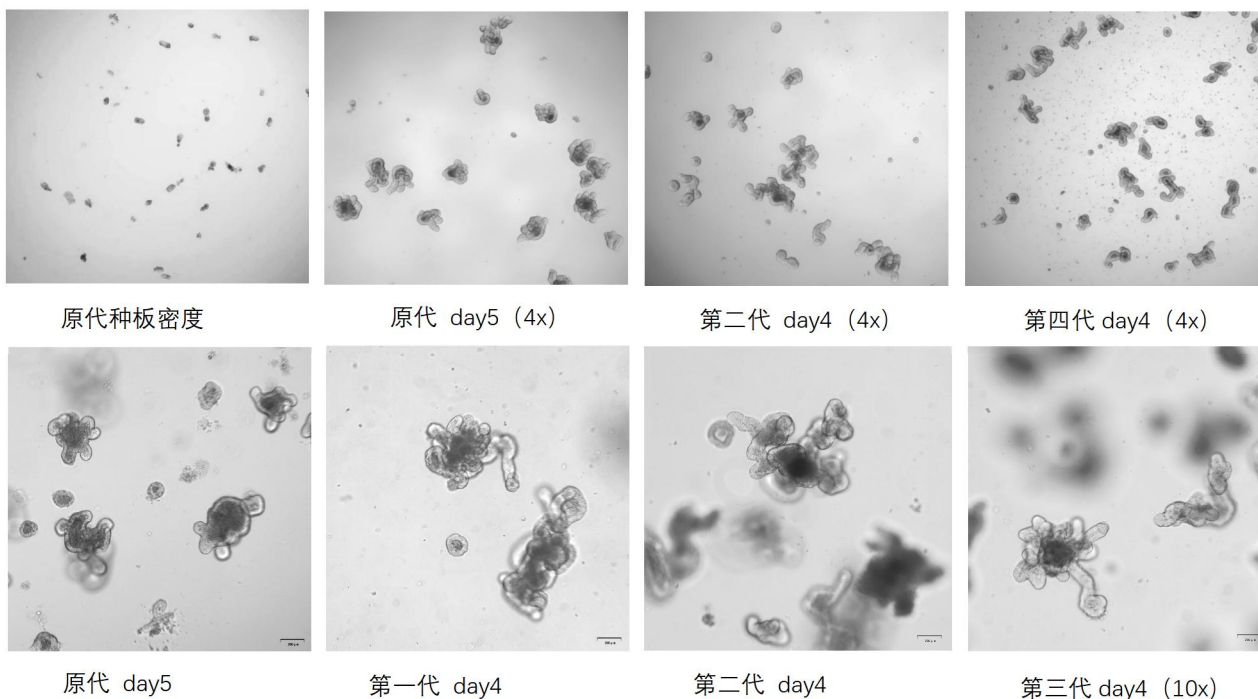
2、吸弃旧培养基，加入等体积上皮类器官基础培养基，用细胞刮刀或者移液管吸头尖端轻轻刮下（或吹打）基质胶和类器官混合物，转移至 1.5 mL 离心管中（每管最多收集 2~3 孔类器官，避免体积过大不利于传代），吹打 5~10 次，使类器官和基质胶分离，300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min。

3、去除上清液，加入 1 mL 上皮类器官基础培养基再次吹打类器官 50~100 次，整管镜检，观察到隐窝基本脱落后，则可直接 300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min。

Ps：若类器官比较完整可重复以上步骤。

4、将沉淀用冰的上皮类器官基础培养基清洗 2 遍。

- 5、将基质胶 (>70%) 加入细胞沉淀中并在冰上混匀 (注意, 混匀吹打的动作要轻柔, 切忌产生大量气泡, 常温混匀则需要控制在 15 秒内)。
- 6、将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央, 使用枪头稍微摊平悬液, 注意避免悬液接触孔板侧壁。(推荐: 96 孔板接种 3~10 μL /孔, 48 孔板接种 10~20 μL /孔)。密度大约 30-40 个类器官团块接种在 10 μL 基质胶中。注意: 为防止基质胶室温凝固, 此步骤应尽快完成。
- 7、将培养板倒置放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 的培养箱中 15~30 分钟, 使基质胶凝固。
- 8、待基质胶完全凝固后, 沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基, 避免破坏已凝固结构。(推荐: 96 孔板加入 100 μL /孔, 48 孔板加入 250 μL /孔)。
- 9、将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 的恒温培养箱中。
- 10、每 2 天更换一次培养基, 小心地从孔中吸出培养基, 并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。
- 11、密切监测类器官生长状态。切记, 传代类器官生长控制在 4 天左右。



小鼠小肠类器官种板及培养图

V2.0 版

更新时间: 2026/7/23