

模基生物人结肠类器官培养基套装（分化）

产品描述

模基生物人结肠类器官培养基套装（分化）【Human Colonic Organoid Kit Plus (Differentiation)】是一款用于人结肠类器官分化的完全培养基。在分化培养基的培养环境下，人结肠类器官中的结肠干细胞和祖细胞逐渐分化为不同类型的细胞，如吸收细胞、分泌细胞、杯状细胞等。这个分化过程对于研究结肠的发育、生理功能以及相关疾病的发生机制具有重要价值

产品信息

产品名称	产品货号	规格	储存/运输	保质期
人结肠类器官培养基套装（分化）Plus	MA-0817H001DLP	500ml	-20℃	24 个月
	MA-0817H001DSP	100ml		

其他自备材料和试剂

英文名称	产品名称	产品货号
Mogengel Matrix	模基生物金牌基质胶	082701/082703/082755
Human Colonic Organoid Kit Plus (Expansion)	人结肠类器官培养基套装（扩增）	MA-0817H001HLP
Epithelial Organoid Basal Medium	上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
Anti-Adherence Rinsing Solution	类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L/S
Primary Tissue Storage Solution	活组织细胞保存液	MB-0818L04L
DPBS (1X)	磷酸盐缓冲液	-
Organoid Dissociation Solution	类器官消化液	MB-0818L01L
Penicillin-Streptomycin Liquid	青霉素-链霉素混合液	-
Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白	-
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	EDTA (0.5 M, pH 8.0)	-

其他自备耗材

英文名称	产品名称	规格
Cell Strainers	细胞过滤器	100 μm
Cell Culture Plates	细胞培养板	96/48/24/12/6 孔
Centrifuge Tubes	离心管	1.5/5/15/50mL
Cell Culture Dishes	细胞培养皿	6/10cm
	模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005



人结肠类器官培养基（分化）使用说明

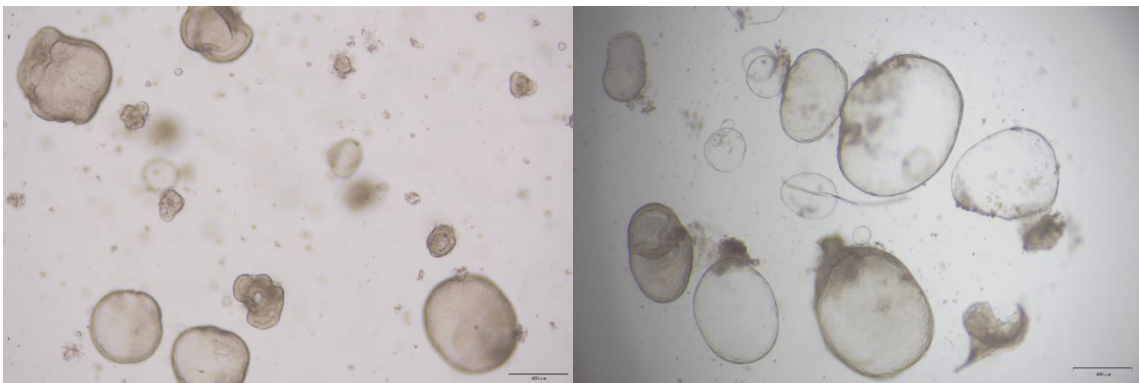
1. 收到类器官培养基后，将培养基置于 4℃ 冰箱进行解冻；
2. 待培养基完全解冻后上下颠倒充分混匀，在生物安全柜或洁净工作台中根据日常需求量进行分装，推荐分装成 10ml/管；
3. 分装后的培养基请密封后储存于 -20℃，使用时取出分装的培养基放置室温平衡后即可使用。

注意：

- ◇ 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；
- ◇ 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。

人结肠类器官的分化培养

人结肠类器官分化培养前需要经过原代建立扩增培养或者传代扩增培养至类器官大小为 600 μm 以上，如下图：



注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关的机构和政府法规。在收集主要人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

➤ 原代人结肠类器官的建立

1. 原代组织样本应在离体 5 min 内放入装有预冷的活组织保存液（2-8℃）的样本管中，样本需要被活组织保存液完全覆盖（如果样品已经放在其他缓冲液或培养基中，请用预冷的活组织保存液替换整个溶液）。低温（2~8℃）运输转移至实验室。
2. 实验前先将基质胶放置 4℃ 冰上解冻，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。



3. 在洁净工作台中，将样本转移至培养皿中，评估获得的组织是否完全由上皮组成。如果存在脂肪或肌肉组织，请在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和镊子尽可能多地去除这些非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，请立即继续下一步。
4. 将组织样本转移至装有预冷含双抗 DPBS 的培养皿中，肠腔面朝上，一只手使用手术镊夹住肠组织一端，另一只手使用手术刀片轻轻刮去肠腔表面粘液或残留的粪便，接着将结肠组织置于新的含双抗 DPBS 的培养皿中清洗 2-3 次。将清洗后的肠组织剪碎至约 2mm*5 mm 大小，随后转移至 50ml 离心管中，剧烈震荡 30s (垂直上下震荡 20 次一上一下算一次，约 1s 三次) 弃上清，重复 3 次。
5. 消化：加入 30 mL 的 DPBS 溶液中再加入 300 μ L 0.5M EDTA，至 EDTA 终浓度为 5 mM。置 4 $^{\circ}$ C 摇床上，80rpm，消化 20~30 min (视样本量而定，可在消化 20 分钟时吹打混匀后镜下观察消化情况，若观察到完整的隐窝结构即可进行下一步操作)。
6. 清洗：消化完成后，静置待肠段沉淀，弃上清。加入预冷 DPBS，轻柔摇匀，静置后弃上清，重复 2 次以去除 EDTA。
7. 重悬：加入 30 mL 预冷的含 0.1%BSA 的 DPBS，涡旋 10s，取上清 100 μ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，重复收集 2 次。
8. 收集：300g 离心力 4 $^{\circ}$ C 离心 3min。
9. 吸弃上清液并将沉淀重悬于上皮类器官基础培养基中，取悬液进行隐窝计数。
10. 300g 离心力 4 $^{\circ}$ C 离心 3min，吸弃上清液，根据培养需求取适量细胞沉淀加入基质胶 (>70%) 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)，混匀后置于冰上。注：基质胶应保存在冰上以防止其凝固。尽快进行该过程。大约 50 个隐窝应接种在 25 μ L 基质胶中。不要过度稀释基质胶 (基质胶比例应>70% (基质胶体积/总体积))，因为这可能会抑制固体液滴的正确形成。
11. 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 μ L/孔，48 孔板接种 10~20 μ L/孔，24 孔板接种 20~30 μ L/孔)。
12. 注意：一旦类器官重悬于基质胶中，尽快进行种板，因为基质胶可能会在试管或移液器吸头中凝固。
13. 将培养板放入 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。
14. 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 μ L/孔，48 孔板加入 250 μ L/孔，24 孔板加入 500 μ L/孔)。注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。
15. 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 的恒温培养箱中。
16. 每隔 2~3 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。



17. 密切监测类器官生长状态。

➤ 人结肠类器官的传代培养

1. 待类器官培养到直径为 $600\ \mu\text{m}$ 大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约 1 周）。以下操作与细胞接触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 1.5mL 离心管中（每管最多收集 2~3 孔类器官，避免体积过大消化效率低），吹打 5~10 次，使类器官和基质胶分离， 300g 离心 3 分钟。
3. 去除上清液加入 5 倍于基质胶和类器官混合物体积的类器官消化液，吹打混匀后置于 37°C 培养箱中消化 3 分钟。取出吹打混匀，取 $10\ \mu\text{L}$ 混合液镜检是否消化成 $300\ \mu\text{m}$ 左右类器官团块。

注：一下步骤重悬沉淀需要控制吹打力度及次数，是类器官团块控制在大小 $300\ \mu\text{m}$ 左右。

4. 消化完成后，加入 5 倍体积上皮类器官基础培养基轻柔吹打混匀以终止消化反应，然后 250g 离心 3 分钟。
5. 吸弃上清液，用上皮类器官基础培养基清洗 2 次以去除残留的消化液。最后一次清洗可将类器官合并收集在同一个离心管中。
6. 清洗完成后将离心沉淀中的细胞进行传代培养，在细胞沉淀中加入基质胶（>70%）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），混匀后置于冰上。

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。

7. 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 $3\sim 10\ \mu\text{L}$ /孔，48 孔板接种 $10\sim 20\ \mu\text{L}$ /孔，24 孔板接种 $20\sim 30\ \mu\text{L}$ /孔）。大约 50 个类器官团块接种在 $25\ \mu\text{L}$ 基质胶中。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

8. 将培养板放入 37°C 和 5% CO_2 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。
9. 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 $100\ \mu\text{L}$ /孔，48 孔板加入 $250\ \mu\text{L}$ /孔，24 孔板加入 $500\ \mu\text{L}$ /孔）。注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。
10. 将培养板置于 37°C 和 5% CO_2 的恒温培养箱中。
11. 每隔 2~3 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。
12. 密切监测类器官生长状态，直到类器官需要进行下一步实验。



人结肠类器官的分化培养

待类器官扩增至 500 μ m 以上，吸去培养孔中的人结肠类器官（扩增）培养基，并加入人结肠类器官（分化）培养基，分化通常需要 4 天以上时间，分化期间每隔 2 天更换一次分化培养基，分化完成后可进行后续实验。

更新日期：2024 年 12 月 19 日

