

## 模基生物小鼠小肠类器官培养基套装

### 产品描述

模基生物小鼠小肠类器官培养基套装 (Mouse Intestine Organoid Kit Plus) 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。

### 产品信息

产品名称	产品货号	规格	储存/运输	保质期
小鼠小肠类器官培养基套装	MA-0817H006LP	500ml	-20°C	24 个月
	MA-0817H006SP	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
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
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	70 $\mu$ m
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

### 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 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。

## 小鼠小肠类器官的建立与传代培养

### ➤ 原代小鼠小肠类器官的建立

1. 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。
2. 取样:小鼠断颈处死,表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出近胃端 3~10 cm 小肠组织,用镊子去除肠道外部的肠系膜、脂肪,放入 4℃ 预冷的含双抗的 DPBS 溶液中。
3. 清洗:使用手术剪将肠管剪开,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肠绒毛,待肠绒毛被刮净后,将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗,重复清洗 2 次。将清洗后的小肠组织剪碎至 5mm 宽,转移至新的培养皿中,用 DPBS 清洗 2 遍。
4. 消化:将清洗好的肠段转移至 50mL 离心管中,加入 30 mL 的 DPBS 溶液中再加入 300μL 0.5M EDTA,至 EDTA 终浓度为 5 mM。置 4℃ 摇床上,80rpm,消化 30 min。
5. 消化结束后,待肠段沉降离心管底部,吸弃上清,加入 5mL DPBS,使用宽口移液管吹打肠段,肉眼观察到大量的绒毛脱落,取上清显微镜下观察,待上清出现完整隐窝即可终止消化,若无隐窝添加 EDTA 至终浓度为 5 mM 适当延长消化时间。
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 70μm 滤网过滤,收集穿过滤网的组织悬液。若需要大量培养可重复收集 2 次。
8. 收集:300g 离心力 4℃ 离心 3min。
9. 吸弃上清液并将沉淀重悬于含 0.1%BSA 的 DPBS 中,取悬液进行隐窝计数。



10. 300g 离心力 4℃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 70 个隐窝应接种在 10 μL 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 μL/孔，48 孔板接种 10~20 μL/孔，24 孔板接种 20~30 μL/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℃和 5% CO<sub>2</sub> 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 μL/孔，48 孔板加入 250 μL/孔，24 孔板加入 500 μL/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 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 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。理想情况下，小鼠小肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

## ➤ 小鼠小肠类器官的传代培养

1. 待类器官培养到直径为 600 μm 大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约 5 天）。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. 弃上清，加入 1mL 基础培养基再次吹打类器官 5~10 次，取少量悬液镜检观察类器官状态：
  - a) 若类器官已分散成碎片则可选择机械吹打分散类器官后直接 300g 离心 3 min，离心后上皮类器官基础培养基清洗 2 次。
  - b) 若类器官比较完整可 300g 离心 3 min 后，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℃培养箱中消化 2 分钟。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 300g 离心 3 分钟。
4. 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。



5. 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。

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  $\mu$ L/孔，48 孔板接种 10~20  $\mu$ L/孔，24 孔板接种 20~30  $\mu$ L/孔)。大约 30 个类器官团块接种在 10  $\mu$ 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。

7. 将培养板放入 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。

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  $\mu$ L/孔，48 孔板加入 250  $\mu$ L/孔，24 孔板加入 500  $\mu$ 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。

9. 将培养板置于 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中。

10. 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。

11. 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。

更新时间：2024 年 12 月 19 日

