

Calf Intestine Organoid Kit Plus

牛小肠类器官培养基套装 Plus

Kit Art.No: MA-0817H012LP / MA-0817H012SP



- ◇ 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。

1、产品描述

模基生物牛小肠类器官培养基套装 Plus (Calf Intestine Organoid Kit Plus) 一款用于建立和维持牛小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，所培养的牛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，牛小肠类器官能部分重现肠上皮的特征，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
牛小肠类器官培养基套装 Plus	MA-0817H012LP	500mL	-20℃	24 个月
	MA-0817H012SP	100mL		

3、其他自备试剂和耗材

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
组织消化液	MB-0818L06L
红细胞裂解液	MB-0818L08L / MB-0818L08S
活组织细胞保存液	MB-0818L04L

产品名称	产品货号
类器官消化液	MB-0818L01L
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
胎牛血清	-
磷酸盐缓冲液	-
细胞过滤器 100 μ m	-
细胞培养板 96/48/24/12/6 孔	-
离心管 1.5/5/15/50mL	-
细胞培养皿 6/10cm	-

4、使用说明牛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℃ 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。

5、牛小肠类器官的建立与传代培养

a) 原代牛小肠类器官的建立

- 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：在无菌条件下取出牛小肠组织，放入 4℃ 预冷的上皮类器官基础培养基或含双抗的 DPBS 中，清洗组织 2 次。
- 3、 使用镊子将组织转移至 1.5mL 离心管中，在冰上用无菌的组织剪将组织剪碎为 0.5~2mm²大小（能够通过 10mL 移液管的尖端）。注：以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用。
- 4、 将清洗后的组织用 50 倍组织体积的组织消化液重悬，吹打重悬组织块。于 37℃，100rpm 条件下的恒温摇床中，水平振荡消化 30 分钟，每隔 10 分钟观察组织消化情况，待组织块明显分散，悬液较浑浊时，取适量组织消化悬液镜检，待悬液中有较多胆管结构即可终止消化，若组织碎块较大或消化不完全可适当延长消化时间。消化期间可以使用不同规格（顺序从大到小如 10mL、5mL、1mL）的移液管吹打组织消化悬液，帮助充分消化。当大多数组织片段能够通过 1mL 移液器吸头时，消化过程即完成。
- 5、 将 FBS 加入组织消化混合物中，最终浓度为 2%，使用 100 μ m 的细胞过滤网，过滤收集上清，4℃ 下以 250g 离心 3 分钟。

6、在可见的红色沉淀的情况下，吸弃上清液，加入 2mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 1 分钟，并在 4℃ 下以 250g 离心 3 分钟。（可选做）

7、吸弃上清液并将沉淀重悬于上皮类器官基础培养基中，在 4℃ 下以 250g 离心 3 分钟，再次重复此步骤以完全去除消化液和 FBS，在离心前可取适量的悬液进行细胞活性检测。

8、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 10,000 个细胞应接种在 25μL 基质胶中或 50 个管状结构接种在 25μL 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。

9、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 3~10μL/孔，48 孔板接种 10~20μL/孔，24 孔板接种 20~30μL/孔）。

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。

10、将培养板放入 37℃ 和 5%CO₂ 的培养箱中 15-25 分钟，让基质胶凝固。

11、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 100μL/孔，48 孔板加入 250μL/孔，24 孔板加入 500μL/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。

12、将培养板置于 37℃ 和 5%CO₂ 的恒温培养箱中。

13、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。

14、密切监测类器官生长状态，理想情况下，牛小肠类器官应在 7-14 天内建成。

b) 牛小肠类器官的传代培养

1、用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将牛小肠类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5mLEP 管中。

2、用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，多次吹打使得类器官与基质胶分离。

3、300g，4℃ 离心 3min，弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 200μL 类器官消化液并充分混匀，37℃ 条件下消化 1-3min，消化结束后加入 1mL 上皮类器官基础培养基吹打混匀。

4、300g，4℃ 离心 3min，弃上清，再次加入 1mL 上皮类器官基础培养基并混匀。

5、300g，4℃ 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。

6、用适量的基质胶重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 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。

7、将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30 μ L 左右。注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

8、将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 30min 左右待基质胶凝固后取出。

9、待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的牛小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

10、将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验。

V2.0 版

更新时间：2025/7/28