

Goat Intestine Organoid Kit Plus

羊小肠类器官培养基套装 Plus

Kit Art.No: MA-0817H018LP / MA-0817H018SP



- ◇ 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

模基生物羊小肠类器官培养试剂盒（Goat intestine Organoid Kit Plus）是一款用于建立和维持羊肠道成体干细胞来源的小肠类器官培养基套装，该试剂盒提供了完整的从小肠隐窝分离、隐窝回收、隐窝活性分析及培养的全套试剂。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，所培养的羊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，羊小肠类器官能部分重现羊肠上皮的特征，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
羊小肠类器官培养基套装 Plus	MA-0817H018LP	500 mL	-20℃	24 个月
	MA-0817H018SP	100 mL		

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
活组织细胞保存液	MB-0818L04L
类器官消化液	MB-0818L01L
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005

产品名称	产品货号
牛血清白蛋白 (BSA)	-
磷酸盐缓冲液 (DPBS)	-
青霉素-链霉素混合液	-
EDTA(0.5M,pH8.0)	-
载玻片	-
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、羊小肠类器官培养基使用说明

- 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 10 mL/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、羊小肠类器官的建立与传代培养

a) 原代羊小肠类器官的建立

1、 从羊的回肠距离盲肠交界处 20 cm 的位置取得 10 cm 回肠样本，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。准备足量的含双抗的 DPBS 溶液和足量的无菌含 0.1%BSA 的 DPBS 溶液。

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。将清洗后的肠组织转移至 50 mL 离心管中，剧烈震荡 30 s (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、 清除绒毛：在超净工作台内，取出步骤 4) 中的回肠组织。用镊子将肠组织转移至放入装有 20 mL 含双抗 DPBS 的培养皿中，绒毛侧朝上展开，用载玻片一端按压固定组织，用另一个载玻片轻轻刮除绒毛层（如图 1），然后使用解剖镜观察绒毛的刮除情况，当解剖镜下观察到乳突状绒毛断裂时判定合格，可进行后续操作。



图 1: 刮除绒毛

6、 消化：将步骤 5) 中的回肠组织转移至新的离心管中，加入 35 mL 的 DPBS 溶液中再加入 350 μ L 0.5M EDTA，至 EDTA 终浓度为 5 mM。置 4 $^{\circ}$ C 摇床上，80rpm，孵育 30min。

7、 清洗：消化完成后，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。

8、 机械刮离：解离后的肠组织转移到含有 20 mL 含 0.1%BSA 的 DPBS 的培养皿中，绒毛侧朝上展开，使用载玻片一端按压固定组织，使用另一个载玻片快速刮擦组织 10~20 次，然后移除肠组织。（注意避免用力过度出现组织絮状黏连，使用解剖镜检查隐窝分离情况，以避免用力过轻导致隐窝分离效果不佳，镜下可见纯净的隐窝，结构完整，密度大，乳突状绒毛杂质少，为最优的分离效果。）

9、 收集：使用润洗过的枪头收集培养皿中包含隐窝和组织碎片的液体转移到 50 mL 离心管中。培养皿加入 10 mL 含 0.1%BSA 的 DPBS 反复清润洗后转移至上述离心管中，重复 2~3 次。将离心管静置 30 秒后收集上清液，去除离心管底部大块组织沉淀，再将上清液 50 g 离心 3 min，弃掉上清液后，用 10 mL 的含 0.1%BSA 的 DPBS 进行重悬。使用宽口枪头吸取 10 μ L 重悬后的液体，然后在 4 倍镜下观察隐窝的完整性和数量，接下来所有涉及隐窝操作的流程都要使用宽口枪头。

10、 根据计数结果计算所需的隐窝数量，吸取隐窝悬液至润洗过的 1.5 mL 离心管中，300 g 离心力 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min，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 50~100 个隐窝应接种在 25 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°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 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%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。

b) 羊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 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 1.5 mL 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，300 g 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 μL 混合液镜检是否消化成 300 μm 左右类器官团块。

注：以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 μm 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 250 g 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 3~10 μL /孔，48 孔板接种 10~20 μL /孔，24 孔板接种 20~30 μL /孔）。大约 50 个类器官团块接种在 25 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。

8、将培养板放入 37°C 和 5%CO₂ 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 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。

10、将培养板置于 37°C 和 5%CO₂ 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。

V1.0 版

更新时间：2026/1/27