

Beef Large Intestine Organoid Medium Kit Plus

## 牛大肠类器官培养基套装 Plus

Kit Art.No: MA-0817H014LP / MA-0817H014SP5 / MA-0817H014SP



- ◇ 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

模基生物牛大肠类器官培养基套装 Plus ( Beef Large Intestine Organoid Medium Kit Plus) 是一款用于扩增和分化牛大肠类器官的完全培养基。扩增时的牛大肠类器官主要由结肠干细胞和结肠祖细胞组成，分化后的牛大肠类器官由结肠吸收细胞、杯状细胞和少量肠内分泌细胞组成。牛大肠类器官在自我更新和分化能力、组织结构、细胞类型和功能方面，重现了体内结肠上皮的特征，因此是牛大肠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
牛大肠类器官培养基套装 Plus	MA-0817H014LP	500mL	-20℃	24 个月
	MA-0817H014SP5	100mL*5		
	MA-0817H014SP	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
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
胎牛血清	-
磷酸盐缓冲液	-
细胞过滤器 100μm	-
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、牛大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、牛大肠类器官的建立与传代培养

##### a) 原代牛大肠类器官的建立

- 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大肠组织，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 0.5~2mm<sup>2</sup> 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，待悬液中有较多细胞团即可终止消化，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 100μm 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 25 $\mu$ L 基质胶中或 50 个细胞团接种在 25 $\mu$ 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。

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 3~10 $\mu$ L/孔，48 孔板接种 10~20 $\mu$ L/孔，24 孔板接种 20~30 $\mu$ L/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%CO<sub>2</sub> 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 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。

12、将培养板置于 37℃ 和 5%CO<sub>2</sub> 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，牛大肠类器官应在 7~14 天内建成。

## **b) 牛大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，并将牛大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 200 $\mu$ L 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 $\mu$ 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置于 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大肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 $\mu$ 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。

V2.3 版

更新时间：2026/02/03