

猪小肠类器官完全培养基

【产品名称】

序号	产品名称	货号	规格	储存温度&质保期
1	猪小肠类器官基础培养基	3D341-100	95 mL	-20℃, 12 个月; 4℃, 3 个月
2	猪小肠类器官基础培养基		5 mL	-20℃, 12 个月

【产品介绍】

BDBIO 猪小肠类器官培养体系模拟了细胞体内生长的微环境，极大程度维持了来源于体内小肠组织的特征。适用于猪小肠组织来源类器官的构建、维持培养及传代扩增。

【产品用途】

适用于猪小肠组织来源类器官的构建、维持培养及传代扩增。

【使用方法】

猪小肠类器官完全培养基制备：

1. 提前将猪小肠类器官基础培养基和猪小肠类器官添加物从-20℃取出，冰上放至融化。
2. 将猪小肠类器官添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为猪小肠类器官完全培养基。
3. 对于原代标本的培养，可以取 10mL 配置好的完全培养基，加入 100μL Primary Enhancer，即可使用。
4. 对于非原代标本的培养，使用猪小肠类器官完全培养基即可。

猪来源小肠类器官构建：

1. 使用镊子去除肠道外部的肠系膜、血管和脂肪，将肠段放入10cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入2mL预冷DPBS-PS，使用DPBS-PS 轻轻冲洗肠段。用剪刀将肠段纵向切开，肠腔朝上打开，使用预冷DPBS-PS反复轻轻洗涤肠段至清洗液澄清。
*如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在组织保存液中，建议使用组织运输保存液，冰上运输尽快处理。
2. 准备装有15mL预冷DPBS-PS的50mL离心管，用镊子夹住肠段一端，悬挂于离心管口，将肠段剪成2-5mm小段，使肠段落入管内液体中。
3. 使用10mL移液管轻轻上下吹打肠道片段三次，静置后轻轻吸出上清液，加入15mL预冷DPBS-PS。重复上述步骤15-20次，直至上清液澄清。
4. 消化液配制：准备50mL DPBS-PS，加入100 μ L 肠类器官组织消化液（500 \times ），现配现用。
5. 清洗后的组织200g，离心3min，弃上清，向组织沉淀中加入肠类器官组织消化液25mL（1 \times ），摇床室温消化15-20min，取部分于显微镜下观察肠隐窝情况。（该步骤的消化时间可能会根据标本的情况进行调整）
6. 加入4mL DPBS-PS终止消化，200g，离心3min，弃上清，加入DPBS-PS重悬。
7. 准备一支装有70 μ m滤网的50mL洁净离心管，使用移液管将混悬液通过70 μ m滤网过滤（可适当倾斜或轻微碰撞过滤器，使其快速过滤），以去除多余的绒毛，收集滤液。丢弃滤网并将滤液放置于冰上，标记为“馏分1”。重复上述步骤，将组织片段重悬于10mL预冷DPBS-PS中，滤网过滤后获得馏分2-4，放置于冰上。
8. 在2-8 $^{\circ}$ C下将各馏分290g，离心5 min，弃上清液，将沉淀保留在每个管中。将各试管中的沉淀重悬于10 mL预冷DPBS-PS中，分别转移到干净的15mL离心管中，并标记对应的馏分序号，在2-8 $^{\circ}$ C下200g，离心3 min，弃上清，保留肠隐窝沉淀。
9. 用1mL DPBS-PS 重悬隐窝沉淀，取混悬液镜下观察，计数10 μ L样本中隐窝数量后，离心管于200g，离心5min，弃上清。使用类器官培养基将隐窝密度重悬，按照 $0.8-2 \times 10^4$ 个/mL的密度重悬于基质胶（BME或Matrigel）中（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。将基质胶重悬后的隐窝接种至37 $^{\circ}$ C预热的细胞培养板中，注意枪尖不要接触至培养板的底部，胶滴应接种于培养孔的中心位置，若是24孔板，则每孔可接种50 μ L。

10. 将接种好的培养板放置在37°C下静置5min后，倒置培养板静置25min，以待基质胶倒置凝固。向每个孔中轻轻地加入500μL于37°C预热的猪小肠类器官完全培养基。
11. 将无菌DPBS-PS加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度，将培养板的盖子盖上，并在37°C和5%CO₂下进行培养。
12. 镜下观察类器官的培养情况，3h后可观察隐窝是否存活。建议适时进行换液或传代（一般建议每2-3天进行全换液或半换液）。一般在接种2-4 天开始出芽，5-7 天变成多裂状。在传代前，确保大部分类器官的大小大于100μm。

猪来源小肠类器官传代：

1. 将培养类器官的24孔板取出，用移液器去除培养基，加入2mL TrypLE，使用1mL枪头将胶滴吹散。可根据类器官量适量增加TrypLE的体
1. 积) 室温消化5-8 min，或37°C培养箱消化5min（避免消化过度，影响类器官生长）。
2. 将消化后的类器官悬液转入6mL预冷的DPBS-PS中，可润洗培养孔（需回收），保证培养孔中的类器官都被收集起来。290g，离心5min，弃上清，收集类器官。
3. 隐窝计数：将离心收集的类器官沉淀重悬于1mL DPBS-PS中，通过自动细胞计数板或者手动计数板计出隐窝的个数，一个胶滴大约需要200-500隐窝(若隐窝状态良好可进行1:3传代，若状态较差可进行1:1传代)。计数后，290g，离心5min，弃上清，收集类器官。
4. 将获取的隐窝沉淀根据计数结果重悬于基质胶（Matrigel）中。吸取50μL，并加入到提前预热的24孔板（提前预热半小时）的中心部位。（不要将类器官接种到最外侧的孔中。）
5. 将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。
6. 使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入500μL于37°C预热的类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将适量DPBS-PS 加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。
7. 盖上培养板板盖，并在37°C和5%CO₂下进行培养。并每2-4天进行一次培养基换液，观察生长情况，并进行拍照记录，直至下次传代。

注：所有接触类器官的移液管、枪头等类器官培养耗材均需进行润洗，以免在传代过程中出现样本的流失，使用抗粘附液效果更佳。

猪来源小肠类器官冻存：

1. 观察类器官生长情况，当类器官活性良好，类器官大小大于200 μ M，每个胶滴内隐窝数不低于150个时，即可进行冻存，类器官冻存量约为500个/管，若类器官数量较多时应注意分管冻存。
2. 小心吸走培养孔中的培养基，加入适量 TrypLE，吹散胶滴，37°C培养箱，孵育3 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至40-60 μ m大小时，即可加入2-3倍消化液体积DPBS-PS终止消化，200g，离心5 min，弃上清；加入3mL DPBS-PS重悬，200g，离心5 min，弃上清。
3. 加入类器官冻存液重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，每管1mL；将冻存管置于程序降温盒中，进行梯度降温：4°C（20 min），-20°C（2 h），-80°C（过夜），最后转移至液氮罐。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本产品仅适用于新鲜获取或在组织保存液中保存 24 h 内的新鲜标本。
3. 本产品培养结果会受到标本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。
4. 类器官完全培养基中不含有抗生素成分，请根据实验需求自行添加。
5. 建议进行适当分装，-20°C储存，开封后，4°C保存使用，并于 2 周内用完，避免反复冻融。

【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。