

小鼠小肠类器官产品说明书

【产品名称】

小鼠小肠类器官

货号：3D500-LQG

【产品介绍】

类器官具有模拟体内环境的特点，在分子和细胞生物学分析方面应用广泛，为肿瘤研究、药物筛选、再生医学等领域提供了一个良好的解决方案。BDBIO 小鼠小肠类器官培养体系极大程度维持了来源于体内小肠组织的特征，为肠道稳态和疾病机制研究等提供理想的体外模型。

【产品用途】

BDBIO 小鼠小肠类器官适用于细胞治疗、药物研发、基因工程、免疫研究、组织再生等领域的研究。

【使用方法】

小鼠来源的小肠类器官构建

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 BDBIO 组织运输保存液（#3D400-100），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 100μL 肠类器官组织消化液（500X），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（1x），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 70μm 滤网的 50mL 洁净离心管，使用移液管将混悬液通过 70μm 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℃下将各馏分 290g，离心 5min，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 10mL 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℃下 200g，离心 3min，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 10μl 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℃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 板，则每孔可接种 50μL。
10. 将接种好的培养板放置在 37℃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℃预热的小鼠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℃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。

小鼠来源的小肠类器官传代

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 的体积) 室温消化 5-8min，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 50 μ L，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 5min 后，倒置培养板静置 25min，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 500 μ L 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。

小鼠来源的小肠类器官冻存

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 3min，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 5min，弃上清；加入 3mL DPBS-PS 重悬，200g，离心 5min，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 (20min) ， -20°C (2h) ， -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。
3. 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，推荐使用 BOBIO 抗粘附液效果更佳。

【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。