

小鼠结肠类器官完全培养基产品说明书

【产品名称】

序号	名称	货号	规格	保存温度/效期
1	小鼠结肠类器官完全培养基	3D307	500ml	-20°C/24 个月
			100ml	

【产品介绍】

小鼠结肠类器官培养试剂盒是用于扩增和分化小鼠结肠类器官的完全培养基。扩增的小鼠结肠类器官主要由结肠干细胞和结肠祖细胞组成，分化后的小鼠结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。结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，因此小鼠结肠研究的理想体外模型。

【使用方法】

小鼠结肠类器官完全培养基的说明

1. 收到类器官培养及后，将培养基置于 4°C 冰箱进行解冻。
2. 待培养基完全解冻后上下颠倒充分混匀，在生物安全柜中根据日常使用量进行分装，推荐分装成 10ml/管。
3. 分装后的培养基请密封后储存于 -20°C 冰箱，使用时取出复温即可使用。

原代小鼠结肠类器官的建立

1. 取样：小鼠断颈处死，表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出近盲肠端 3~5cm 结肠组织，用镊子去除肠道外部的肠系膜、脂肪。将组织样品保持在 4°C 预冷的含双抗的 DPBS 溶液中，直到分离开始。
2. 清洗：使用手术剪将肠管剪开，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，将肠组织置于新的含 DPBS 的

培养皿中清洗，重复清洗 2 次，将清洗后的结肠组织剪碎至 2-5mm 宽，转移至 50ml 离心管中，剧烈震荡 30s（垂直上下震荡 90 次，一上一下算一次，约 1s 三次），弃上清，重复三次。

3. 消化：加入 30ml 的 DPBS 溶液，再加入 150 μ l 0.5M EDTA，至 EDTA 的终浓度为 2.5mM。放在 4 $^{\circ}$ C 摇床，80rpm，消化 60min。
4. 清洗：消化完成后，静置待肠段沉淀，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。
5. 重悬：加入 30ml 预冷的含 0.1% BSA 的 DPBS，涡旋 30s，取上清 70 μ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复收集 2 次，记为馏分 2 和馏分 3。
6. 收集：300g，4 $^{\circ}$ C 离心 3min。
7. 计数：弃上清，根据沉淀量分别使用含 0.1% BSA 的 DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μ l 悬液进行精简和隐窝计数，计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液，300g 4 $^{\circ}$ C 离心 3min，弃上清后置于冰上待用。
8. 用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10 μ l 基质胶悬液包含 100-200 个隐窝，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型。
9. 将基质胶和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30 μ l 左右，避免悬液接触孔板侧壁。
注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。
10. 将接种完成后的培养板放于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 培养箱中，孵育 30min 待基质胶凝固。
11. 待基质胶完全凝固后，加入已经配制好的小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ l。
注意：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 24 孔板放于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 培养箱中培养，每隔 2-3 天更换一次培养基。
13. 密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠结肠类器官应在 5-7 天内建成。

小鼠结肠类器官的传代培养和分化

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养液的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5ml EP 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（5-10 次）使得结肠类器官与基质胶分离。
3. 用 300g 离心 3min。弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 200 μ l 类器官消化液并充分混匀，37 $^{\circ}$ C 条件下消化 1-3min。消化结束后加入 1ml 类器官基础培养基吹打混匀。300g 离心 3min，弃上清，再次加入 1ml 类器官基础培养基并混匀。
4. 300g 离心 3min，弃上清后置冰上。
5. 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。

6. 将基质胶和类器官的混合悬液加入 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。

7. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C 和 CO₂ 培养箱中，孵育 15min 左右待基质胶凝固。
8. 待基质胶完全凝固后，加入小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ l。
9. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 和 CO₂ 培养箱中，直到类器官需要进一步实验。

【注意事项】

1. 本产品使用过程中应注意无菌操作，避免污染。
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。

【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。