

小鼠小肠类器官原代分离培养套装

Cat NO: IMV-MK01

产品描述

小鼠小肠类器官原代分离培养套装是一款用于建立和维持小鼠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，所培养的小鼠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，小鼠小肠类器官能部分重现小鼠肠上皮的特征，因此是肠道稳态和疾病机制研究的理想体外模型。

产品信息

表 1. 试剂盒

产品名称	产品规格	储存
小鼠小肠类器官完全培养基	100mL	2~8°C, 12 个月
	500mL	
小鼠肠道消化液	20mL	2~8°C, 18 个月
	100mL	
类器官专用基础培养基	200mL	2~8°C 避光, 18 个月
	500mL	
类器官冻存液	20mL	2~8°C, 36 个月
	100mL	
类器官传代消化液	20 mL	2~8°C, 18 个月
	100 mL	
活组织细胞保存液	100 mL	-20°C, 18 个月
	20 mL	

小鼠小肠类器官完全培养基内含：

小鼠小肠类器官基础培养基

小鼠小肠类器官培养因子 B (50X)

小鼠小肠类器官培养因子 C (250X)

表 2. 其他自备材料和试剂

产品货号	产品名称	品牌
IMV-A017	标准型基质胶	IMMOCELL
IMV-A003	抗细胞粘附润洗液	IMMOCELL
-	70 μ m 细胞滤网	SAINING
-	DPBS	IMMOCELL

小鼠小肠类器官完全培养基的制备

在无菌超净工作台中配制小鼠小肠类器官完全培养基。以配制 10 mL 小鼠小肠类器官完全培养基为例，如所需量不同，可相应调整用量。

1.冰上解冻小鼠小肠类器官培养因子 B (50x)，小鼠小肠类器官培养因子 C (250x)。

注意：解冻后，建议将小鼠小肠类器官培养因子 B (50x)、小鼠小肠类器官培养因子 C (250x) 分别分装后保存取用，避免反复冻融。

2.将 200 μ L 小鼠小肠类器官培养因子 B (50x)，40 μ L 小鼠小肠类器官培养因子 C (250x) 加至 9.76 mL 小鼠小肠类器官基础培养基中，充分混合，配制成 10 mL 小鼠小肠类器官完全培养基。

注意：配制后的小鼠小肠类器官完全培养基可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存，建议在两周内使用。此外，小鼠小肠类器官培养因子 B(50x)内含有细菌及真菌抗生素(50x)。

小鼠小肠类器官的建立与传代培养

原代小鼠小肠类器官的建立

准备适量标准型基质胶于冰上解冻

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胃端 3~10 cm 小肠组织，用镊子去除肠道外部的肠系膜、脂肪，放入 4 $^{\circ}$ C 预冷的含双抗的 DPBS 溶液中。

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肠绒毛，待肠绒毛被刮净后，将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复清洗 2 次。将清洗后的小肠组织剪碎至 2 mm 宽，转移至新的培养皿中，用 DPBS 清洗 2 遍。

3.消化：加入 10 mL 小鼠肠道消化液至清洗好的肠段中，置于 4℃或碎冰中孵育 30~60min，消化 30 min 左右可用移液器轻柔吹打肠段，取上清显微镜下观察，待上清出现完整隐窝即可终止消化，若无隐窝可适当延长消化时间。

4.清洗：消化完成后，将组织碎片转移到含 DPBS 的培养皿中清洗，重复 2 次以去除小鼠肠道消化液。

5.重悬：用 5 mL 移液管在预冷的 0.1%BSA 的 DPBS 的培养皿或 50mL 离心管中吹打、重悬组织碎片，使组织反复穿过移液管尖以产生机械剪切力从而使隐窝与基底层分离，取一部分悬液镜检，当可以看到大量的隐窝样结构后，停止吹打，并对吹打后的组织悬液进行 70 μm 滤网过滤。

6.收集：收集穿过滤网的组织悬液，300g 离心力 4℃离心 3min。

7.计数：弃上清，用 1mL 含有 0.1% BSA 的 DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μL 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液，300g 离心力 4℃离心 3min，弃上清后置于冰上。

8. 用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10 μL 基质胶悬液包含 70 至 100 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性。

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 μL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

10.将接种完成后的培养板至于 37℃二氧化碳恒温培养箱中，孵育 30 min 左右待基质胶凝固。

11.待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL，避免破坏已凝固结构。

12.将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养。

13.每 2~3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠小肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

小鼠小肠类器官的传代培养

1. 待小鼠小肠类器官培养到直径为 200~500 μm 大小时（或变黑不再增大时），即可进行小鼠小肠类器官的传代（每代约 5 天左右）。用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将小肠类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。

2.用经过润洗液润洗的枪头用力吹打重悬类器官悬浮液，多次吹打（5~10 次）使小肠类器官与基质胶分离吹，300g 离心 3 min。

3. 弃上清，加入 1 mL 类器官传代消化液重悬类器官沉淀，37℃二氧化碳培养箱消化 3~10 min，每 3 min 取少量悬液镜检观察类器官状态。

a) 若类器官已分散成碎片则可选择机械吹打分散类器官后直接 300g 离心 3 min，离心后用类器官专用基础培养基清洗 2 次。

b)若类器官比较完整可 300g 离心 3 min 后，弃上清，加入 5 倍于基质胶和小鼠小肠类器官混合物体积的类器官消化液，吹打混匀后置于 37℃培养箱中消化 2 min。加入 5 倍于消化液体积的基础培养基终止消化。离心后用 PBS 或基础培养基清洗 2 次。

4. 用适量的基质胶重悬清洗后的类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30 s 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。

5. 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 μ L 左右。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

6. 将接种完成后的培养板至于 37℃二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15 min 左右待基质胶凝固后取出。

7. 配制小鼠小肠类器官完全培养基。

8. 待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

9. 将细胞培养板放入 37℃培养箱中进行培养，密切观察小鼠小肠类器官的生长状态，每 3 天于倒置显微镜下拍照，记录多个视野中的小鼠小肠类器官的形态和分布。

类器官的冻存

1. 将消化完成后的细胞悬液，200 g ，离心 5 min，弃去上清。

2. 用基础培养基清洗两次后，加入 4℃预冷的类器官冻存液，轻轻吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中（冻存管内细胞悬液体积应大于 0.5 mL）。

注：每 1 mL 冻存液推荐冻存 1×10^6 个细胞或对应细胞量的类器官。

3. 将冻存管放入细胞冻存程序降温盒内（降温盒须提前平衡至室温），随后立即将降温盒

放入-80℃超低温冰箱中；也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4℃ 静置 10 min，-20℃ 保存 1 小时，-80℃ 保存过夜。

4. 次日或 12 小时后将冻存管于-80℃超低温冰箱转移至液氮中长期保存。

类器官的复苏

1. 提前在 37℃ 条件下预热类器官专用基础培养基。
2. 在 37℃ 的水浴中快速解冻细胞冻存管，当冻存管内冻存物仅剩些许冰渣残留时立即停止水浴并及时转移至洁净操作台。
3. 将细胞悬液转移至离心管中，缓缓加入 5-10 倍体积的类器官专用基础培养基，轻轻混匀。
4. 200 g，离心 3-5 min，弃上清，再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀。
5. 再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀，重复步骤 4。
6. 弃上清后所获细胞沉淀可用于后续类器官培养。