

# 小鼠小肠类器官（扩增）培养基

Cat NO: IMV-NM01

## 产品描述

小鼠小肠类器官培养基套装（Mouse intestine Organoid Medium Set）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，该套装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。

小鼠小肠类器官完全培养基分“**扩增培养基**”和“**分化培养基**”两种，可按实验需搭配。

① **扩增培养基**：培养形成空泡、囊状类器官，扩增能力更强的形态，用于前期培养扩增。② **分化培养基**：用于扩增完成后，将类器官分化到更成熟的出芽状，具体使用方法见说明书详情。

## 产品信息

表 1.培养基组成信息

产品货号	产品名称	产品规格
IMV-NM01	小鼠小肠类器官（扩增）培养基	500 mL
IMV-NM01		100 mL

## 小鼠小肠类器官（扩增）培养基使用说明

- 收到类器官培养基后，将培养基置于四度冰箱进行解冻；
- 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀，在无菌的生物安全柜或超净工作台中将培养基进行分装，推荐分装成 10ml 规格；
- 将分装后的培养基储存于-20℃，使用时拿出分装后的培养基解冻后即可使用。

### 注意：

- 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期一年，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。

## 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

### 原代小鼠小肠类器官的建立

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℃ 预冷的含双抗的类器官专用基础培养基（可用 PBS 代替）。

**注意：如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在类器官组织保存液中，冰上运输尽快处理。**

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或载玻片轻轻刮去肠腔表面肠绒毛，待肠绒毛被刮净后，将肠组织置于类器官专用基础培养基中清洗，重复清洗 2 次。将清洗后的小肠组织剪碎至 2 mm 宽，转移至新的类器官专用基础培养基中，清洗多次，直至上清液澄清。

**注意：原代分离过程中清洗所用的类器官专用基础培养基（或 PBS）应加入 1% 双抗，从而减少后续污染的可能。**

3. 消化：加入 10 mL 小鼠肠道消化液，置 37℃ 摇床上，80 rpm，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. 离心：消化完成后，250 g，离心 5 min，弃去消化液。

5. 重悬：加入类器官专用基础培养基，用 10 mL 移液管轻轻吹打、重悬组织碎片，吹打后的组织悬液进行 70 $\mu$ m 滤网过滤。

6. 收集：收集穿过滤网的组织悬液，250 g，4℃，离心 3 min。

7. 计数：弃上清，使用类器官专用基础培养基重悬组织沉淀，取 20  $\mu$ L 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，250 g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清后置于冰上。

8. 铺胶：用适量类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀（推荐加入 10 倍沉淀体积），置于冰上预冷，加入适量基质胶（IMV-A017）混匀配置成 70% 胶浓度的细胞-培养基-基质胶混合液，点入 24 孔板底部正中央，每孔 30-50  $\mu$ L 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

**注意：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡。**

9.凝胶：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 15-30 min 待基质胶凝固。

10.加入培养基：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  $\mu$ L，避免破坏已凝固结构。

11.后续培养：将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养。每 3~4 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 7-10 天内建成。

### 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  $\mu$ m 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. 去胶：用经过类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗的枪头吹打刮取类器官，并将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。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，多次吹打（5~10 次）使小肠类器官与基质胶分离吹，250 g 离心 3 min。

**注意：移取类器官前枪头都应用类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗，以减少类器官损失。后续不再特意注明。**

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 250g 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  $\mu\text{L}$  左右。

**注意：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡。**

6. 凝胶：将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}\text{C}$  二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15-30 min 左右待基质胶凝固。

7. 加入培养基：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  $\mu\text{L}$ ，避免破坏已凝固结构。

8. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  二氧化碳培养箱中培养，每 3~4 天更换培养基，直到类器官需要进一步的实验。