

小鼠结肠类器官原代分离培养套装

Cat NO: IMV-MK19

产品描述

小鼠结肠类器官原代分离培养套装是一款用于扩增和分化小鼠结肠类器官的完全培养基。扩增时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，因此是小鼠结肠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
小鼠结肠类器官完全培养基	100mL	2~8℃，12 个月
	500mL	
小鼠肠道消化液	20mL	2~8℃，18 个月
	100mL	
类器官专用基础培养基	200mL	2~8℃避光，18 个月
	500mL	
类器官冻存液	20mL	2~8℃，36 个月
	100mL	
类器官传代消化液	20 mL	2~8℃，18 个月
	100 mL	
活组织细胞保存液	100 mL	-20℃，18 个月
	20 mL	

小鼠结肠类器官完全培养基内含：

小鼠结肠类器官基础培养基

小鼠结肠类器官培养因子 B (50X)

小鼠结肠类器官培养因子 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

小鼠结肠类器官完全培养基使用说明

1. 收到类器官培养基后，将培养基置于四度冰箱进行解冻；
2. 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；
3. 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℃，有效期两年，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。

小鼠结肠类器官的建立与传代培养

原代小鼠结肠类器官的建立

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盲肠端 3~5cm 结肠组织，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 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粘液或残留的粪便，接着将结肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗。将清洗后的肠组织剪碎至 2-5mm 宽，随后转移至 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 3 次。

3. 消化：加入 10 mL 小鼠肠道消化液，至 EDTA 终浓度为 2.5mM。置 4℃ 摇床上，80rpm，消化 30-60 min。

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 次以去除小鼠肠道消化液。

5.重悬：加入 30 mL 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 离心力 4℃离心 3min。

7.计数：弃上清，根据沉淀量使用 DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μ 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，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 μ L 基质胶悬液包含 100 至 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 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结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L，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，小鼠结肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

小鼠结肠类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将结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重悬类器官悬浮液，多次吹打使得类器官与基质胶分离。

3. 300 $\times$ g，4℃离心 3 min，弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 1 mL 类器官传代消化液并充分混匀，37℃条件下消化 3~10 min，每 3 min 取少量悬液镜检观察类器官状态。

4. 消化结束后加入 1 mL 上皮类器官基础培养基吹打混匀，300 $\times$ g，4℃离心 3 min，弃上清，再次加入 1 mL 类器官专用基础培养基重悬。

5. 300 $\times$ g，4℃再次离心 3min，弃上清后置于冰上。

6. 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 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。

7. 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 μL 左右。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

8. 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 左右待基质胶凝固后取出。

9. 待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL 。

10. 将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验。

类器官的冻存

1. 将消化完成后的细胞悬液，200 μL ，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 μL ，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。