

小鼠小肠类器官培养试剂盒（无血清）

货号：K2001-MI

产品说明：

bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Kit（小鼠小肠类器官试剂盒）是一款用于建立和维持小鼠肠道成体干细胞来源小肠类器官的无血清培养基。生长在该完全培养基中的小鼠小肠类器官主要由干细胞、肠祖细胞和肠绒毛细胞、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，小鼠小肠类器官重现了体内小肠上皮的特征，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：

产品组成	货号	体积	储存条件及周期
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Basal Medium	K2001-MI-A100/A500	100mL/500mL	2-8°C, 12 个月
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Supplement B(50x)	K2001-MI-B100/B500	2mL/10mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Supplement C(250x)	K2001-MI-C100/C500	0.4mL/2mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
EDTA (0.5M, pH 8.0)	E219121	0.2mL/1mL	15-30°C, 5 年

小鼠小肠类器官培养所需其他试剂耗材（不包含在本试剂盒中）：

供应商	试剂	货号
bioGenous™	Anti-Adherence Rinsing Kit	E238002
bioGenous™	Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free)	E238023
bioGenous™	Organoid Culture ECM(Reduced Growth Factor)	M315066
	DPBS (1X), liquid, contains no calcium or magnesium	-
	70 µm cell strainer	-

小鼠小肠类器官完全培养基的制备：

使用无菌操作技术配制小鼠小肠类器官完全培养基。以下是准备 10mL 完全培养基的示例，如所需量不同，可相应调整用量。

- 冰上解冻 Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50x)和 Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250x)。
注意：解冻后，建议将 Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50x)和 Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250x) 分别分装后保存取用，避免反复冻融。
- 将 200uL Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50x)，40uL Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250x) 加至 9.76mL Mouse Intestinal Organoid Basal Medium 中，充分混合，配制成 10mL 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°C 储存，建议在两周内使用。Mouse Intestinal Organoid Supplement B(50x)内含有细菌及真菌抗生素(50x)。

小鼠小肠类器官原代培养

- 依据所在单位批准的实验动物伦理及操作规范牺牲小鼠。
- 准备若干培养皿，加入 4°C 预冷的 DPBS 备用。
- 标准手术操作取小鼠小肠，根据实验需求取总长度约 3 厘米至 20 厘米的小肠段，置于含 DPBS 的培养皿中。
- 使用移液管或者注射器往小肠一端注入 DPBS 以冲洗肠内容物，冲洗后置于新的含 DPBS 的培养皿中，重复冲洗数次至内容物完全被冲洗干净，置于新的含 DPBS 的培养皿中。
- 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粘膜，待肠粘膜被刮净后，将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复清洗一次。
- 将清洗后的小肠组织剪碎至 2mm 宽，并转移至含有 5mmol/L EDTA 的预冷 DPBS 中消化，置于 4°C 孵育 30min。
- 消化完成后，将组织碎片转移到新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复一次以去除 EDTA。
- 用 5mL 移液管在含冷的 DPBS 的培养皿或 15mL 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 70µm 滤网过滤。
- 收集穿过滤网的组织悬液，150g 离心力 4°C 离心 3min。
- 弃上清，使用 1mL DPBS 重悬组织沉淀，取 20uL 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，150g 离心力 4°C 离心 3min，弃上清后置于冰上。

11. 用适量的 bioGenous™ Organoid Culture ECM (M315066) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10uL ECM 悬液包含 200 至 600 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免 ECM 过早凝固。
注意： ECM 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 ECM 的结构稳定性。
12. 将 ECM 和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30uL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。
注意： 为防止 ECM 室温凝固，此步骤应尽快完成。
13. 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵 20min 左右待 ECM 凝固。
14. 配制小鼠小肠类器官完全培养基。
15. 待 ECM 完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500uL。
注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。
16. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养。
17. 每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏 ECM。
18. 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。

小鼠小肠类器官传代培养

19. 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit (E238002) 润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的 1.5mL EP 管中。
20. 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与 ECM 分离。
21. 150g 离心力 4°C 离心 3min，弃上清，使用 DPBS 重悬底部类器官沉淀，150g 离心力 4°C 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。
22. 用适量的 ECM 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 ECM 过早凝固。
注意： ECM 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 ECM 的结构稳定性。
23. 将 ECM 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 30uL 左右。
注意： 为防止 ECM 室温凝固，此步骤应尽快完成。
24. 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15min 左右待 ECM 凝固。
25. 配制小鼠小肠类器官完全培养基。
26. 待 ECM 完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500uL。
27. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养。

Last updated on 27th March 2024