

小鼠结肠类器官培养试剂盒（无血清）

货号：K2204-MC

产品说明：

小鼠结肠类器官培养试剂盒是一款用于扩增和分化小鼠结肠类器官的无血清培养基。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：

产品组成	货号	体积	储存条件及周期
bioGenous™ Mouse Colonic Organoid Basal Medium	K2204-MC-A100/A500	100 mL/500mL	4°C, 12 个月
bioGenous™ Mouse Colonic Organoid Supplement B(50x)	K2204-MC-B100/B500	2 mL/10mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
bioGenous™ Mouse Colonic Organoid Supplement C(250x)	K2204-MC-C100/C500	0.4 mL/2mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
bioGenous™ Mouse Colonic Organoid Supplement D(250x)	K2204-MC-D100/D500	0.4 mL/2mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	E219121	1 mL/2 mL	15 - 30°C, 5 年

小鼠结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™	防粘连洗脱液	E238002
bioGenous™	无血清类器官冻存液	E238023
bioGenous™	类器官培养基质胶	M315066
	DPBS (1X), 不含钙或镁	-
	70 µm cell strainer	-
	细胞计数板	
	24 孔细胞培养板	
	移液器和 0.2mL、1mL、5mL 移液管	
	15mL、50mL 离心管, 1.5mL EP 管	

小鼠结肠类器官完全培养基的制备

使用无菌操作技术配制小鼠结肠类器官的扩增或分化培养基。以配制 10 mL 为例配置小鼠结肠类器官扩增或分化培养基，如所需量不同，可相应调整用量。

- 冰上解冻小鼠肠道类器官补充剂 B (50 x)、小鼠肠道类器官补充剂 C (250 x) 和小鼠肠道类器官补充剂 D (250 x)。注意：各补充添加物解冻后，建议分别分装后保存取用，避免反复冻融。
- 小鼠结肠类器官的扩增培养基：将 200 µL 小鼠肠道类器官补充剂 B (50 x)，40 µL 小鼠肠道类器官补充剂 C (250 x) 和 40 µL 小鼠肠道类器官补充剂 D (250 x) 加至 9.72 mL 小鼠肠道类器官基础培养基中，充分混合，配制成 10 mL 小鼠结肠类器官扩增培养基。
- 小鼠结肠类器官的分化培养基：将 200 µL 小鼠肠道类器官补充剂 B (50 x)，40 µL 小鼠肠道类器官补充剂 C (250 x) 加至 9.76 mL 小鼠肠道类器官基础培养基中，充分混合，配制成 10 mL 小鼠结肠类器官分化培养基。注意：配制后的小鼠结肠类器官扩增或分化培养基可在 2 - 8°C 储存 10 天。此外，小鼠肠道类器官补充剂 B (50 x) 内含有细菌及真菌抗生素(50x)。

小鼠结肠类器官原代培养

- 依据所在单位批准的实验动物伦理及操作规范进行动物组织取材，取材后的组织须在 2 - 8°C 组织保存液或 DPBS 中迅速转运至洁净实验室进行组织处理和干细胞分离。
- 准备若干培养皿，加入 4°C 预冷的 DPBS 备用。
- 标准手术操作分离小鼠结肠组织，根据实验需求取总长度 3 - 10 cm 的结肠段，置于含 DPBS 的培养皿中。
- 于生物安全柜中使用移液管将结肠一端注入 DPBS 以冲洗肠内容物，冲洗后置于新的含 DPBS 的培养皿中，反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。
-

6. 使用手术剪将肠管剪开，肠腔面朝上，一只手持手术镊夹住肠组织一端，另一只手手持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。
7. 将清洗后的结肠组织剪碎至约 2 mm 长宽，并转移至 5 - 10 mL 含有 2 mM EDTA 的预冷 DPBS 中消化，4°C 孵育 30 min。
8. 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。
9. 用 5 mL 移液管在含冷的 DPBS 的培养皿或 50 mL 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，停止吹打并将吹打后的组织悬液通过 70 μ m 滤器过滤。
10. 收集滤液，300g，4°C 离心 3 min。
11. 弃上清，使用 1 mL 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，300 \times g，4°C 离心 3 min，弃上清后置于冰上预冷。
12. 用适量的类器官培养基质胶 (ECM) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 25 μ L ECM 悬液包含 50 - 300 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30 s 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。
13. 将 ECM 和组织细胞小心均匀混合以防止气泡产生并将悬液加入 24 孔板，25 μ L 每孔滴加在孔底中心，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。
14. 将接种完成后的培养板置于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 20 min 左右待 ECM 凝固后取出。
15. 提前配制小鼠结肠类器官扩增培养基。
16. 每孔沿孔壁加入 500 μ L 提前预热的小鼠结肠类器官扩增培养基，再向 24 孔板最外周孔中每孔加入 500 μ L 无菌水，置于 37°C 温箱、5% CO₂ 条件下培养。
注意：请沿孔壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。
17. 每 3 d 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，原代小鼠结肠类器官应在 5 - 7 d 内建成。

小鼠结肠类器官传代培养和分化

1. 用经过防粘连洗脱液 (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防粘连洗脱液润洗的 1.5 mL EP 管中。
2. 用经过防粘连洗脱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 ECM 分离。
3. 300 \times g，4°C 离心 3 min，弃上清，用经过防粘连洗脱液润洗的枪头加入 200 μ L 类器官消化液 (E238001) 并充分混匀，37°C 条件下消化 1 - 3 min，消化结束后加入 1 mL 上皮类器官基础培养基 (B213151) 吹打混匀。
4. 300 \times g，4°C 离心 3 min，弃上清，再次加入 1 mL 上皮类器官基础培养基，并混匀。
5. 300 \times g，4°C 再次离心 3 min，弃上清后置于冰上。
6. 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 30 s 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。
7. 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 30 μ L 左右。
注意：为防止 ECM 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°C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 20 min 左右待 ECM 凝固后取出。
9. 配制小鼠结肠类器官扩增培养基。
10. 待 ECM 完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠结肠类器官扩增培养基，24 孔板每孔 500 μ L。
11. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养，待新长出的类器官直径超过 100 μ m 后可进行分化实验。
12. 分化前需要吸去 24 孔板培养孔中的小鼠结肠类器官扩增培养基，并加入 500 μ L 提前配制的分化培养基，分化通常需要 4 d 以上时间，分化期间每隔 2 d 更换一次分化培养基，分化完成后可进行后续实验。

2024.03.26