

小鼠小肠类器官培养基

货号：RPM0056K

规格：100 mL/500 mL

◆ 产品信息

ABclonal 小鼠小肠类器官生长培养基是一种无血清可应用于细胞或组织来源的小肠类器官的建立和长期培养过程，在细胞外基质存在的条件下，培养基所含特有组分及丰富的细胞因子能促使隐窝细胞迅速生长并形成小肠类器官，类器官形成过程平稳且迅速，同时保持较高的小肠细胞特性和活力，为后续基于小肠类器官的生理功能、疾病研究和精准医学提供支持。

◆ 产品组成

货号	名称	规格	长期保存条件
RPM0056K	小鼠小肠类器官培养基	100 mL/500 mL	-80℃--20℃，效期 12 个月

◆ 小鼠小肠类器官培养基使用和保存

收到货后 4℃保存，建议 1 个月内使用完毕，长期不用建议放于-80℃--20℃储存，避免反复冻融超过 2 次。

*注意：1. 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期 3 个月，注意避免反复冻融；2. 配置后的小鼠小肠类器官完全培养基可在 2-8℃ 存储，建议在两周内使用；3. 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。

◆ 类器官构建

Ø原代小鼠小肠类器官的试剂准备（自备）

产品名称	推荐货号
基质胶（低生长因子，无酚红）	RPM0003
组织保存液（无血清）（类器官构建专用）	RPM0067
类器官消化液	RPM0068
类器官培养防粘连润洗液	RPM0069
类器官冻存液（无血清）	RPM0070

红细胞裂解液	-
EDTA	-
DPBS	-

仪器：生物安全柜、CO₂恒温细胞培养箱、水平转子离心机（温度可调）、倒置显微镜、冰箱、冰盒、细胞计数仪、水浴锅

耗材：24 孔细胞培养板（TC 处理）、10 μL/200 μL/1 mL 吸头、15 mL/50 mL 离心管、100 μm 细胞筛网、一次性刀片和刀柄，灭菌剪刀/镊子、一次性巴氏滴管、6 cm 培养皿

Ø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。在无菌条件下取出胃幽门下 3-10 cm 的小肠组织，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 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，接着将小肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗。将清洗后的肠组织剪碎至 2~5 mm 宽，随后转移至 50 mL 离心管中，剧烈震荡 5 s（垂直上下震荡 15 次一上一下算一次，约 1 s 三次）弃上清，重复 3 次。
3. 消化：在 15 mL 离心管中，加入 10 mL 的 DPBS 溶液中再加入 100 μL 0.5 M EDTA，至 EDTA 终浓度为 5 mM，置于冰上，消化 15~30 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 EDTA。
5. 重悬：加入 10 mL 预冷的含 1%FBS 的 DPBS，手动震荡 10 次，自然沉降 20s，取上清 100 μm 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复重悬沉淀，收集上清过滤收集，记为馏分 2，并分别进行后续实验。

注意：一般取馏分 2 进行后续实验，馏分 1 含有较多细胞碎片。收集：300 g 离心力 4℃离心 3 min。

6. 计数：弃上清，根据沉淀量使用 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，300 g 离心力 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min，弃上清后置于冰上。
7. 用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 50 μL 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 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。
8. 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 50 μL 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。
9. 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 30 min 左右待基质胶凝固。
10. 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。
11. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养。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。

Ø 小鼠小肠类器官的传代培养

1. 待类器官培养到直径为 100~500 μm 大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约 3~6 天）。以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用。
2. 吸弃培养基，加入适量类器官消化液（每 50 μL 胶滴使用 500 μL ），吹打重悬基质胶，在原孔板中进行消化，37 $^{\circ}\text{C}$ 5~10 min 后，取出，使用润洗的枪头吹打 5~10 次，镜下观察，类器官解离成簇状细胞团（5~30 个细胞成团为佳），加入 2 倍以上消化液体积的 DPBS 终止消化，转移至润洗过的 15 mL 离心管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 300 g 离心 5 min。
3. 吸弃上清液，DPBS 清洗，转移至润洗过的 1.5 mL 离心管，4 $^{\circ}\text{C}$ 300 g 离心 5 min，去除残留的消化液，并使用 DPBS 清洗。

4. 吸弃上清液，细胞沉淀中加入基质胶 (>70%)，按照胶滴数量 1:3~1:6 扩增培养，传代接种密度不可过高，并在冰上混匀（注意，混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 s 内），混匀后置于冰上。

注：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. 将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，形成胶滴，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μL /孔，48 孔板接种 10~20 μL /孔，24 孔板接种 30~50 μL /孔）。

注：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

6. 将培养板放入 37°C 和 5% CO_2 的培养箱中 20~30 min，让基质胶凝固。

7. 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μL /孔，48 孔板加入 250 μL /孔，24 孔板加入 500 μL /孔）。

注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。

8. 将培养板置于 37 °C 和 5% CO_2 的恒温培养箱中。

9. 每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。

注：如遇培养基变黄应立即更换，换液周期最多不可超过 4 天。

10. 密切监测类器官生长状态，直到类器官需要进行下一步实验。