

人结直肠类器官培养基（分化）

货号：RPM0072K

规格：100 mL/500 mL

◆ 产品信息

ABclonal 人结直肠类器官培养基（分化）是是一款用于人结直肠类器官分化的完全培养基。在分化培养基的培养环境下，人结肠类器官中的结肠干细胞和祖细胞逐渐分化为不同类型的细胞，如吸收细胞、分泌细胞、杯状细胞等。这个分化过程对于研究结肠的发育、生理功能以及相关疾病的发生机制具有重要价值。

◆ 产品组成

货号	名称	规格	长期保存条件
RPM0072K	人结直肠类器官培养基（分化）	100 mL/500 mL	-80℃--20℃，效期 12 个月

◆ 人结直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。

◆ 类器官构建

Ø原代组织来源类器官构建需要的试剂准备（自备）

产品名称	推荐货号
基质胶（低生长因子，无酚红）	RPM0003
组织消化液（正常和肿瘤）（类器官构建专用）	RPM0066
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（可选）	-

DPBS（无钙镁，无酚红）	-
---------------	---

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 原代组织来源类器官的建立和传代培养

注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关的机构和政府法规。在收集主要人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

Ø 原代组织来源类器官的建立

详见 RPM0071K 人结直肠类器官培养基（扩增）说明书。

Ø 人结直肠类器官分化诱导

1. 使用人结直肠培养基（扩增）构建人结直肠类器官，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 3~10 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. 吸弃旧培养基，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°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），消化不充分可适当延长消化时间或吹打次数，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 °C 300 g 离心 5 min。

注：类器官消化液是类器官温和解离试剂，室温下仍具备解离效果（约为 37°C 条件下 50% 消化效果），请注意加入类器官消化液后 室温操作或 37°C 消化总时间控制在 20 min 以内，一定避免将类器官过度消化为单细胞。类器官形态和数量不同，类器官消化时间和吹打次数也需要适当调整。

3. 吸弃上清液，DPBS 清洗，转移至润洗过的 1.5 mL 离心管，4 °C 300 g 离心 5 min，去除残留的消化液，

并使用 DPBS 清洗。

4. 清洗完成后将离心沉淀中的细胞进行传代培养，在细胞沉淀中加入基质胶 (>70%) 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。接种密度按照基质胶体积，传代比例一般为 1:2~1:4；如遇类器官数量少，应适当降低传代比例至 1:0.5 或 1:1，在重悬基质胶后，可以首先接种 10 μL 显微镜下观察接种密度，如密度过高，可补加基质胶适当调整；接种密度如下图参考密度所示。

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**人结直肠类器官培养基（分化）**，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。