

## 小鼠胃类器官培养基

货号: RPM0092K

规格: 100 mL/500 mL

### ◆ 产品信息

ABclonal 胃类器官培养基是一种化学定义的细胞培养基, 用于建立和维持成体干细胞来源的小鼠胃上皮类器官。胃上皮细胞的自我更新是由干细胞及其前体细胞的增殖驱动的。小鼠类胃上皮类器官在结构、细胞类型组成和自我更新方面表现出了胃上皮的大部分特征, 为研究小鼠胃上皮稳态和疾病提供了新的模型。

### ◆ 产品组成

| 货号       | 名称        | 规格            | 长期保存条件                |
|----------|-----------|---------------|-----------------------|
| RPM0092K | 小鼠胃类器官培养基 | 100 mL/500 mL | -80°C--20°C, 效期 12 个月 |

### ◆ 小鼠胃类器官培养基使用和保存

收到货后 4°C 保存, 建议 1 个月内使用完毕, 长期不用建议放于 -80°C--20°C 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、CO<sub>2</sub>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  $\mu$ L/200  $\mu$ L/1 mL 吸头、15 mL/50 mL 离心管、100  $\mu$ m 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

### Ø 原代组织来源类器官的建立

1. 原代组织样本应在离体 5 min 内放入装有预冷的组织保存液 (2-8°C) 的样本管中, 样本被组织保存液完全覆盖, 低温 (2~8°C) 48 h 内运输转移至实验室。

注: 样本保存管使用泡沫与低温冰袋隔开, 防止组织结冰损坏。

2. 实验前先将基质胶埋入冰上解冻 4~6 h, 同时取出培养基放置室温平衡 15 min。

注: 与细胞接触的离心管、试管或者枪头需要用润洗液润洗后使用。

3. 在洁净工作台中, 将样本转移至培养皿中, 评估获得的组织是否完全由上皮组成。使用灭菌的手术剪刀或手术刀和镊子去除脂肪和肌肉组织, 以及组织表面坏死、纤维化或凝结血块杂质。

4. 转移到新的 15 mL 离心管, 加入 5~8 mL 组织清洗液, 使用涡旋仪震荡 3~6 s, 去除干净清洗液, 重复 3~5 次, 注意消化道组织 (如胃、肠组织等) 应增加清洗次数 2~3 次, 至清洗液澄清。

注: 每次清洗后的上清液应去除干净, 避免污染源残留。

5. 使用镊子将组织转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 200  $\mu$ L 组织消化液, 用灭菌的剪刀将组织剪碎为 0.5~2 mm<sup>2</sup> 大小。

注: 组织剪碎大小, 吸取后不堵 1 mL 枪头为佳; 如组织过大, 可选取质地较好的部分, 剪碎用时应控制在 10 min 以内。也可选择刀柄+一次性刀片进行组织切碎处理。

6. 将剪碎的组织用 5 mL 组织消化液重悬, 并转移至 15 mL 离心管内, 吹打重悬组织块。用胶带水平固定在 37°C, 100 rpm 条件下的恒温摇床上, 消化 15-40 min, 每隔 10 min 观察组织消化情况, 待组织块明显分散, 悬液较浑浊时, 取适量组织消化悬液镜检, 待大部分组织块呈现絮状、或悬液中有较多组织细胞团, 即

可加入 2 倍体积 (10 mL) DPBS 终止消化, 若组织碎块较大或消化不完全可适当延长消化时间。

注: 对于体积较小的组织样本, 如穿刺样本, 可减少消化时间到 15 min 以内, 并不进行后续 100  $\mu$ m 滤膜过滤, 直接同组织块一起离心后接种培养, 减少过程中细胞损耗, 提高类器官构建成功率。

7. 4°C 250 g 离心 3 min, 弃上清, 加入 DPBS 重悬, 使用一次性巴氏滴管吹打组织沉淀 10~20 次充分释放组织中的细胞, 使用 100  $\mu$ m 细胞过滤器过滤, DPBS 冲洗滤膜残留细胞。

8. 收集滤液并在 4°C 下以 250 g 离心 3 min。在可见的红色沉淀的情况下, 吸弃上清液, 加入 2 mL 红细胞裂解液重悬沉淀, 在室温下裂解红细胞 2 min, 加入 2 倍以上体积 DPBS 终止裂红, 4°C 250 g 离心 3 min。

注: 如红细胞过多, 可增加裂解时间, 同时手动摇晃离心管加速裂解过程。

9. 吸弃上清液并将沉淀重悬于 DPBS, 取样细胞计数\*, 4°C 250 g 离心 3 min。

注: 细胞计数注意筛选直径, 8~12  $\mu$ m 常见为淋巴细胞, 12~35  $\mu$ m 直径常见为肿瘤细胞, 呈现簇状细胞团为佳; 细胞计数可选用 AOPI 进行死活荧光染色, 对比台盼蓝计数更有效和准确。

10. 吸弃上清液, 大约 50000~100000 个活细胞应接种在 50  $\mu$ L 基质胶中 (注意细胞活率过低时, 按照总细胞密度 100000 进行接种), 使用预冷的润洗液润洗枪头, 加入基质胶 (>70%) 并在冰上混匀, 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, 混匀后及时置于冰上, 做好温度控制。

注: 基质胶应保存在冰上以防止其凝固, 基质胶比例应>70% (基质胶体积/总体积), 比例过低会导致基质胶液化无法凝固, 以及后续培养过程中因基质胶结构不稳固而散开。

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

注: 96 孔板、48 孔板点胶较为困难, 可倾斜孔板点胶; 基质胶粘稠, 小于 10  $\mu$ L 胶滴容易造成误差, 注意进行药敏检测时, 孔间操作一致性。

12. 将培养板放入 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 20-30 min, 待基质胶凝固。

13. 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  $\mu$ L/孔, 48 孔板加入 250  $\mu$ L/孔, 24 孔板加入 500  $\mu$ L/孔)。

注: 培养基请注意沿壁缓慢加入, 避开凝固的胶滴, 以免破坏结构; 培养基应恢复至室温, 避免过冷导致基质胶重新液化或结构不稳定。

14. 将培养板置于 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中。
15. 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。
16. 密切监测类器官生长状态, 理想情况下, 类器官应在 3-14 天内建成。

#### Ø 原代组织来源类器官的传代培养

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 3~10 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。

6. 将培养板放入 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。