

## 小鼠结肠类器官培养试剂盒

Cat NO: IMV-NM19

### 产品描述

小鼠结肠类器官培养基套装 (Mouse Colonic Organoid Kit) 是一款用于扩增和分化小鼠结肠类器官的完全培养基。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

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格
IMV-NM19LBM	小鼠结肠类器官基础培养基	500mL
IMV-NM19SBM		100mL
IMV-NM19L1	小鼠结肠类器官培养因子 B	10mL
IMV-NM19S1		1mL
IMV-NM19L2	小鼠结肠类器官培养因子 C	1mL
IMV-NM19S2		0.4mL

### 小鼠结肠类器官完全培养基使用说明

- 收到类器官培养基后，将培养基置于四度冰箱进行解冻；
- 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀，在无菌的生物安全柜或超净工作台中将培养基进行分装，推荐分装成 10ml 规格；
- 将分装后的培养基储存于-20℃，使用时拿出分装后的培养基解冻后即可使用。

#### 注意：

- 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期两年，注意避免反复冻融；
- 解冻后类器官完全培养基可在 4℃ 储存，建议在两周内使用；



- 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。

## 小鼠结肠类器官的建立与传代培养

### 原代小鼠结肠类器官的建立

1.取样：小鼠断颈处死，表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出近盲肠端 3~5cm 结肠组织，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，接着将结肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗。将清洗后的肠组织剪碎至 2-5mm 宽，随后转移至 50ml 离心管中，剧烈震荡 30s(垂直上下震荡 90 次一上一下算一次，约 1s 三次) 弃上清，重复 3 次。

3.消化：加入 30 mL 的 DPBS 溶液中再加入 150  $\mu$ L 0.5M EDTA，至 EDTA 终浓度为 2.5mM。置 4℃ 摇床上，80rpm，消化 60 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 30 mL 预冷的含 1%FBS 的 DPBS，涡旋 30s，取上清 70  $\mu$ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复收集 2 次，记为馏分 2 和馏分 3。

6.收集：300g 离心力 4℃ 离心 3min。

7.计数：弃上清，根据沉淀量使用 DPBS 重悬组织沉淀，取 20  $\mu$ 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，300g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清后置于冰上。

8.用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10  $\mu$ L 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 30s 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。**

9.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 30  $\mu$ L 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。**



10. 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 30 min 左右待基质胶凝固。

11. 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L，避免破坏已凝固结构。

12. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养。

13. 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，小鼠结肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

### 小鼠结肠类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将结肠类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。

2. 用经过润洗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基质胶分离。

3. 300 $\times$ g，4°C 离心 3 min，弃上清，用经过润洗液润洗的枪头加入 200  $\mu$ L 类器官消化液并充分混匀，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 3min，弃上清后置于冰上。

6. 用适量的基质胶重悬类器官沉淀，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。**

7. 将基质胶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  $\mu$ L 左右。

**注意：为防止基质胶室温凝固，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 30 min 左右待基质胶凝固后取出。

9. 待基质胶完全凝固后，沿孔壁加入提前预热的小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L。

10. 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养，直到类器官需要进一步的实验。

