

模基生物人结直肠类器官培养试剂盒

产品描述

厦门模基生物人结直肠类器官培养试剂盒是一种化学定义的细胞培养基，用于建立和培养成人干细胞衍生的人结肠类器官。通过位于隐窝的干细胞及其祖细胞的增殖来驱动结肠上皮细胞的自我更新，使人类结肠类器官显示出所有的特征。在结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面，结肠上皮的影响很大。人类结肠发育和疾病的研究前景是前所未有的，人类结肠类器官也可能应用于再生生物学中的结肠上皮的体外扩张。

产品信息

Organoid Kit	Art.No.	Components	Specification	Art.No.
人结直肠	MA-0817H001L	人结直肠类器官基础培养基	500mL	MG2003-HC-A500
		人结直肠类器官培养因子 B (50x)	10mL	MG2003-HC-B500
		人结直肠类器官培养因子 C (250x)	2mL	MG2003-HC-C500
		人结直肠类器官培养因子 D (250x)	2mL	MG2003-HC-D500
	MA-0817H001S	人结直肠类器官基础培养基	100mL	MG2003-HC-A100
		人结直肠类器官培养因子 B (50x)	2mL	MG2003-HC-B100
		人结直肠类器官培养因子 C (250x)	0.4mL	MG2003-HC-C100
		人结直肠类器官培养因子 D (250x)	0.4mL	MG2003-HC-D100

其他自备材料和试剂

MG&ABW 基质胶

上皮类器官基础培养基

类器官消化液

润洗液

类器官冷冻保存培养基(无血清)

DPBS (1X)，液体，不含钙和镁

胎牛血清(FBS)

EDTA

人结直肠类器官扩增培养基和稳态培养基的制备

采用无菌技术制备人结肠类器官扩增培养基和稳态培养基。在人结肠类器官扩增培养基中生长的类结肠器官绝大多数由 LGR5 干细胞，循环转运扩增(TA)细胞，早期肠细胞和少量杯状细胞组成。在人结肠类器官稳态培养基中生长的类结肠器官含有 LGR5 干细胞、TA 细胞、早期和成熟肠细胞、杯状细胞、M 细胞和肠内分泌细胞，以及少量簇状细胞。

以下是准备 10mL 完全培养基的示例，如所需量不同，可相应调整用量。

1.冰上解冻人结直肠类器官培养因子 B、人结直肠类器官培养因子 C、人结直肠类器官培养因子 D。

注意：解冻后，建议将人结直肠类器官培养因子 B、人结直肠类器官培养因子 C、人结直肠类器官培养因子 D 分别分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 配制人结肠类器官扩增培养基，专门用于原代培养和复苏。添加 200 μ L 人结直肠类器官培养因子 B (50x)、40 μ L 人结直肠类器官培养因子 C (250x)、40 μ L 人结直肠类器官培养因子 D (250x)、至 9.72 mL 人结肠类器官基础培养基中，混合均匀。

3.配制人结肠类器官扩增培养基，专门用于培养传代。添加 200 μ L 人结直肠类器官培养因子 B (50x)、40 μ L 人结直肠类器官培养因子 C (250x)至 9.76 mL 人结肠类器官基础培养基中，混合均匀。

注意：配制后的人结肠类器官扩增培养基和稳态培养基可在 2-8°C 储存，建议在两周内使用。人结直肠类器官培养因子 B(50x) 内含有细菌及真菌抗生素(50x)。

人结肠类器官的原代建立

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。

从初级组织中建立类器官

1. 使用离心管将原代人结肠组织收集在冰冷的原代组织储存液中，将组织样本保存在 4°C，直到开始分离。

2. 评估获得的组织碎片是否完全由上皮组织组成。如果存在脂肪或肌肉组织，请在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和镊子尽可能多地去除这些非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，请立即继续下一步。

3.用上皮类器官基础培养基或 DPBS 冲洗结肠组织，直到上清澄清。

4. 在腺窝结构分离之前，将基质胶解冻并保持低温。加入 5 mL FBS 至 45 mL 上皮类器官基础培养基中制备 10%FBS 培养基。

5. 将组织在细胞培养皿中使用外科剪刀或手术刀切成 5mm³ 的小碎片。

注：分离的样品必须足够小，能够通过 10ml 移液管的尖端。

6.将分离的样品放入一个 15 毫升的离心管中，管中含有 10ml 预冷的 DPBS。

7.用 10ml 移液管清洗样品至少 10 次。

注：在接下来的步骤中，使用 10%FBS 培养基润洗 10ml 移液管的内表面以避免样品粘在移液管壁上。

8. 让管子静止不动，直到样品沉淀到底部。用 10ml 移液管吸出上清液，加入 10mL 预冷 DPBS。

9. 重复步骤 7 和 8 3-5 次，直到上清完全清澈。

注：彻底清洗样品是避免细菌污染的关键。

10. 向试管中加入 10ml 预冷 DPBS，并加入 2.5 mM EDTA。把管子放在摇床上，在 4°C 的温度下轻轻摇动 40 分钟。

11. 用 EDTA 处理后，保持试管静止，直到样品沉淀到试管底部，然后用 10ml 移液管取上清液，加入 10ml 预冷 DPBS。

12. 让管子静止不动，直到样品沉淀到底部。用 10ml 移液管吸出上清。

13. 加入 10ml 预冷 DPBS，用 10ml 移液管上下吹吸至少 10 次。隐窝结构会通过移液吸头释放到上清液中。将含有分离的隐窝的上清液放入新的 15ml 管中。

14. 加入 10ml 预冷 DPBS，用 10ml 移液管上下吹吸至少 10 次。允许组织碎片在正常重力下沉至少 30 秒钟。隐窝被通过移液释放到上清液中。将含有分离的隐窝的上清液放入一个新的 15ml 管中。

15. 在 4°C、400g 条件下离心 3 分钟。吸出并丢弃上清。

16. 将沉淀重悬在 1ml DPBS 中，并将隐窝悬浮液转移到新的 1.5 mL 管中。滴 20 μ L 隐窝重悬液到培养皿中。在立体显微镜下计数隐窝的数量并计算隐窝的总数。

17. 在 4°C、400g 条件下离心 3 分钟。吸出并丢弃上清。

18. 吸取上清，将沉淀重悬于基质胶中。基质胶应保存在冰上以防止固化。推荐重悬密度为每 25 μ L 基质胶悬液包含 100 - 500 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。

19. 将基质胶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，30 μ L 每孔滴加在孔底中心，避免悬液接触孔板侧壁。

注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

20. 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 15 -25min 左右待基质胶凝固后取出。

21. 每孔沿孔壁加入 500 μ L 提前预热的人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。

22. 每 3 d 更换一次培养基，从孔中小心地吸出培养基，并用新鲜的、预热过的有机完全培养基替换，更换培养基时应避免破坏基质胶。

23. 密切监测类器官生长状态，理想情况下人类结肠类器官应在 5 - 8 天内建成。

人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，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗的 1.5 mL EP 管中。
2. 用经过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×g, 4℃离心 3 min, 弃上清, 用经过润洗的枪头加入 200 μL 类器官消化液并充分混匀, 37℃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×g, 4℃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×g, 4℃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 Matrigel 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 μL 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℃二氧化碳恒温培养箱中, 孵育 15 min 左右待基质胶凝固后取出。

9. 配制人结肠类器官完全培养基。

10. 待基质胶完全凝固后, 沿孔壁加入提前预热的人结肠类器官完全培养基, 24 孔板每孔 500 μL。

11. 将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养, 待长出新的类器官之后可进行后续实验。