

模基生物猪小肠类器官培养试剂盒

产品描述

厦门模基生物猪小肠类器官培养试剂盒是一款用于建立和维持猪小肠干细胞来源类器官的完全培养基。生长在该完全培养基中的猪小肠类器官主要由肠干细胞、肠祖细胞和肠绒毛细胞、潘氏细胞、杯状细胞和少量肠内分泌细胞组成，在自我更新能力、组织结构、细胞类型和功能方面，猪小肠类器官重现了体内小肠上皮的特征，因此是肠道体外研究的理想体外模型。

产品信息

Organoid Kit	Art.No.	Components	Specification	Art.No.
猪小肠类器官培养试剂盒	MA-0817H010S	猪小肠类器官基础培养基	500mL	MG2269-PI-A500
		猪小肠类器官培养因子 B (50x)	10mL	MG2269-PI-B500
		猪小肠类器官培养因子 C (250x)	2mL	MG2269-PI-C500
		EDTA (0.5 M, pH 8.0)	2mL	E21912
	MA-0817H010L	猪小肠类器官基础培养基	100mL	MG2269-PI-A100
		猪小肠类器官培养因子 B (50x)	2mL	MG2269-PI-B100
		猪小肠类器官培养因子 C (250x)	0.4mL	MG2269-PI-C100
		EDTA (0.5 M, pH 8.0)	1mL	E21911

其他自备材料和试剂

ABW &模基生物基质胶

组织消化液

上皮类器官基础培养基

类器官冷冻保存培养基(无血清)

DPBS (1X)，液体，不含钙和镁

猪小肠类器官完全培养基的制备

使用无菌操作技术配制猪小肠类器官完全培养基。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 Porcine Intestinal Organoid Supplement B (50x)和 Porcine Intestinal Organoid Supplement C (250x)。

注意：解冻后，建议将 Porcine Intestinal Organoid Supplement B (50x)和 Porcine Intestinal Organoid Supplement C (250x) 分别分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 200uLPorcine Intestinal Organoid Supplement B (50x)，40uL Porcine Intestinal Organoid Supplement C (250x) 加至 9.76mL Porcine Intestinal Organoid Basal Medium 中，充分混合，配制成 10mL 猪小肠类器官完全培养基。

注意：配制后的猪小肠类器官完全培养基可在 2-8°C 储存，建议在两周内使用。Porcine Intestinal Organoid Supplement B(50x)内含有细菌及真菌抗生素(50x)。

猪小肠类器官原代培养

1. 依据所在单位批准的实验动物伦理及操作规范进行动物组织取材，取材后的组织须在 2 - 8°C 组织保存液或 DPBS 中迅速转运至洁净实验室进行组织处理和干细胞分离。

2. 准备若干培养皿，加入 4°C预冷的 DPBS 备用。

3. 标准手术操作分离猪肠组织，根据实验需求取总长度 1 - 10 cm 的小肠段，置于含 DPBS 的培养皿中。

4. 于生物安全柜中使用移液管将小肠一端注入 DPBS 以冲洗肠内容物，冲洗后置于新的含 DPBS 的培养皿中，反复冲洗数次至内容物完全被冲洗干净，置于新的含 DPBS 的培养皿中。

5. 使用手术剪将肠管剪开，肠腔面朝上，一只手持手术镊夹住肠组织一端，另一只手持手术刀片轻轻刮去肠腔表面肠绒毛，待肠绒毛被刮净后，将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复清洗一次。

6. 将清洗后的小肠组织剪碎至约 2 mm 长宽，并转移至 5 - 10 mL 含有 2 mM EDTA 的预冷 DPBS 中消化，4°C孵育 30 min。

7. 消化完成后，将组织碎片转移到新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复一次以去除 EDTA。

8. 用 5 mL 移液管在含冷的 DPBS 的培养皿或 50 mL 离心管中吹打、重悬组织碎片，使组织反复穿过移液管尖以产生机械剪切力从而使隐窝与基底层分离，取一部分悬液镜检，当可以看到大量的隐窝样结构后，停止吹打并将吹打后的组织悬液通过 70 μ m 滤器过滤。

9. 收集滤液，300 $\times$ g，4°C离心 3 min。

10. 弃上清，使用 1 mL DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μ 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，300 $\times$ g，4°C离心 3 min，弃上清后置于冰上预冷。

11. 用适量的模基生物专用类器官基质胶重悬组织沉淀，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。

12. 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，25 μL 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。

13. 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 min 左右待基质胶凝固后取出。

14. 提前配制猪小肠类器官完全培养基。

注意：原代或细胞分选后的类器官建立，需要在前 2 d 的培养体系中加入 10 μM 的二氢氯化物。

15. 每孔沿孔壁加入 500 μL 提前预热的猪小肠类器官完全培养基，再向 24 孔板最外周孔中每孔加入 500 μL 无菌水，置于 37°C温箱、5% CO_2 条件下培养。

注意：请沿孔壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

16. 每 3 d 更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。

17. 密切监测类器官生长状态，理想情况下应在 5 - 7 d 内建成。

猪小肠类器官传代培养

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 μL 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 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°C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. 配制猪小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猪小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL 。

11. 将 24 孔板置于 37°C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。