

# 人肠道类器官分离培养试剂盒/培养基

## Human Intestinal Organoid Kit/ Medium

目录号: KOG03-HN/OG03-HN

注: 涉及初级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。在收集原始人体组织材料之前, 必须获得所受试者的知情同意。

### 产品介绍

Kinlogix Human Intestinal Organoid Kit /Medium (人肠道类器官分离培养试剂盒/培养基) 是一款用于建立和维持源自成体干细胞的人肠道类器官的完全培养基及试剂。人肠道类器官在结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面显示出肠上皮的所有特征, 可应用于生理学、疾病模型、致病基因研究、药物筛选与开发、再生医学等领域。

### 产品信息

产品名称	产品组成	组分货号	规格	数量	储存及效期
KOG03-HN 人肠道类器官 分离培养试剂 盒	组织消化液 D	OG-D4	1ml	1	-20°C, 12 个月, 避免反复冻融
	P1	OG-P1	5ml	1	-20°C, 12 个月, 避免反复冻融
	P3	OG-P3	0.5ml	1	-20°C, 12 个月, 避免反复冻融
	人肠道类器官培养基	OG03-HN	20ml	5	-20°C, 12 个月, 避免反复冻融
	类器官传代消化液 B	OG-G2	1ml	1	4°C, 12 个月
	70um 细胞筛	OG-002	个	4	常温

### 人肠道类器官构建还需另外准备的试剂及耗材:

基质胶、不含 Ca<sup>+</sup>、Mg<sup>+</sup>的 PBS、24 孔细胞培养板(非 TC 处理)、50ml 离心管、1.5ml 离心管、1ml 枪头、200ul 枪头、35mm 细胞培养皿、巴氏吸管、眼科剪、眼科镊、冰盒。

### 人肠道类器官构建

#### 预准备

1. 将人肠道类器官培养基提前解冻;

2. 将准备好的基质胶（推荐使用 Corning:356231）提前放置在 4℃ 冰箱过夜解冻；
3. 将 2.5ml P1 加入 250ml 不含 Ca<sup>+</sup>、Mg<sup>+</sup>的 PBS 中，配制成 *Buffer P1*，并放于 4℃ 冰箱预冷；
4. 将 0.25ml P3 加入 250ml 不含 Ca<sup>+</sup>、Mg<sup>+</sup>的 PBS 中，配制成 *Buffer P3*，并放于 4℃ 冰箱预冷；
5. 将 24 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中预热 (5% CO<sub>2</sub>, 37℃)；
6. 将冰盒装满碎冰，巴氏吸管，枪头提前放于 4℃ 冰箱预冷。

## 人肠道类器官构建操作

1. 收集人正常肠道组织样本，马上置于组织保护液（OG-005）中，4℃ 保存；
2. 在 35mm 皿中加入预冷的 *Buffer P1*，将人正常肠道组织组织样本取出，剔除表面黏膜与脂肪组织以及坏死组织，用手术剪刀或者手术刀将人正常肠道组织样本剪为 3-5mm<sup>3</sup> 小碎片；
3. 将组织碎片转入含 15ml *Buffer P1* 的 50 ml 离心管中，用巴氏吸管轻轻吹打清洗，静置待组织碎片沉淀后去上清，重新加入 15ml *Buffer P1*，如此重复清洗 10 次，直至上清液清亮，去除 *Buffer P1*；
4. 将组织碎片用 10ml PBS 重悬，加入 50ul 组织消化液 D，在冰上孵育 30min，冰盒可放置于 20rpm 转速摇床上；
5. 孵育完成后的组织碎片静置沉降，去除上清，加入 15ml *Buffer P3*，用巴氏吸管轻轻吹打重悬 2-3 次，取上清悬液用 70um 细胞筛过筛，过筛后取 20ul 细胞悬液进行镜检和隐窝计数；
6. 用冰冻离心机以 200g 离心力 4℃ 离心 5min，弃上清后置于冰上，
7. 根据沉淀量加入相应体积的人肠道类器官培养基与基质胶 1:1.5 重悬混匀（推荐重悬密度为每 10ul 混匀液包含 200 至 600 个隐窝），此步操作需全程置于冰上；
8. 从 37℃ 培养箱中取出提前 2h 放入的 24 孔板，用预冷的枪头取混匀液按每孔 50ul 种入（建议点入 24 孔板每孔底部正中央，避免混匀液接触孔板侧壁），放入 37℃ 培养箱 5min 后倒置凝固 25min；
9. 凝固后每孔加入 500ul 人肠道类器官培养基到 24 孔板，置于细胞培养箱中进行培养，每天观察类器官生长情况，每天更换培养液。

## 人肠道类器官传代

1. 将 250ul *类器官传代消化液 B* 加入 49.75ml 不含 Ca<sup>+</sup>、Mg<sup>+</sup>的 PBS 中，配置成工作液，4℃ 保存 3 个月；
2. 小心吸去孔中的类器官培养基，每孔加入 1ml 类器官传代消化液 B 工作液，用移液枪轻柔吹散基质胶，收集悬液转移到 50ml 离心管中；
3. 将离心管置于摇床室温孵育 15min；
4. 加入等体积 6 预冷 *Buffer P3* 重悬，300g 4℃ 离心 5min，去除上清置于冰上；
5. 用 *人肠道类器官培养基* 重悬（推荐传代比例为 1:2-1:5），将悬液和基质胶以 1: 1.5 比例混匀（此步操作需全程置于冰上），用预冷的枪头取混匀液按每孔 50ul 种入提前预热的 24 孔板中；
6. 凝固后每孔加入 500ul 人肠道类器官培养基到 24 孔板，置于细胞培养箱中进行培养，每天观察类器官生长情况，每天更换培养液。

本产品由广州科珞捷生物技术有限公司与广州沃亘生物科技有限公司联合研发