

# 小鼠小肠类器官分离培养试剂盒/培养基

## Mouse Colonic Organoid Kit/ Medium

目录号: KOG03-MN /OG03-MN

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 Mouse Colonic Organoid Kit /Medium (小鼠小肠类器官分离培养试剂盒/培养基) 是一款用于建立和维持小鼠小肠类器官的完全培养基及试剂。小鼠小肠类器官主要由小肠干细胞和小肠祖细胞组成。小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, 重现了体内小肠上皮的特征, 因此是小鼠小肠研究的理想体外模型。

### 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-MN 小鼠小肠类器官分离培养试剂盒	组织消化液 D	OG-D3	1ml	1	4℃, 12 个月
	P1	OG-P1	5ml	1	-20℃, 12 个月, 避免反复冻融
	P3	OG-P3	0.5ml	1	-20℃, 12 个月, 避免反复冻融
	小鼠小肠类器官培养基	OG03-MN	20ml	5	-20℃, 12 个月, 避免反复冻融
	类器官传代消化液 B	OG-G2	1ml	1	4℃, 12 个月
	70um 细胞筛	OG-001	个	8	常温

### 小鼠小肠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、D/F12 培养基、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。

## 小鼠小肠类器官构建

### 预准备

1. 将小鼠小肠类器官培养基提前过夜解冻；
2. 将准备好的基质胶（推荐使用 Corning:356231）提前放置在 4℃ 冰箱提前过夜解冻；
3. 将 5ml P1 加入 500ml 不含 Ca<sup>+</sup>、Mg<sup>+</sup>的 PBS 中，配制成 Buffer P1，并先放于 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，并先放于 4℃ 冰箱预冷；  
将 24 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中预热 (5% CO<sub>2</sub>, 37° C)；
5. 将冰盒装满碎冰，巴氏吸管，枪头提前放于 4℃ 冰箱预冷。

### 小鼠小肠类器官构建操作

1. 以颈椎脱臼法处死 SPF 级 4-8 周龄小鼠，用 75%乙醇浸泡，转至无菌操作台；
2. 在小鼠的腹部的位置剪开外皮和内皮，在无菌状态下取 3-10cm 左右小肠断，置于 10cm 细胞培养皿中并加入 15ml Buffer P1，用镊子去除小肠肠表面黏膜与脂肪，将枪头插入肠内用 Buffer P1 将内容物冲洗出来，冲洗干净后使用眼科剪将小肠断纵向切开；
3. 将肠断腔面朝上，用 Buffer P1 反复冲洗，去除残留内容物，转移至新的 10cm 皿中加入 15ml Buffer P1，一只手手持手术镊夹住肠组织一端，另一只手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 Buffer P1 的培养皿中清洗，重复清洗一次；
4. 用眼科剪将小肠断剪成 3~5 mm 小块；
5. 将组织转入含 15ml Buffer P1 的 50 ml 离心管中，用预冷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 重复清洗 15-20 次，直至上清液清亮，去除 Buffer P1；
6. 将组织碎片用 20ml PBS 重悬，加入 100ul 组织消化液 D，在冰上孵育 30min，冰盒可放置于 20rpm 转速摇床上；
7. 取 4 支 50ml 离心管放置于超净工作台离心管架上，另取 4 个 70uM 细胞筛，打开包装后置于 50ml 离心管上；
8. 孵育完成后静置沉降，去除上清，加入 15ml 冰的 Buffer P3，用预冷巴氏吸管轻轻吹打 2-3 次，静置沉降，上清 70uM 细胞筛过筛，标记为 1，再次加入 15ml 冰的 Buffer P3，70uM 细胞筛过筛，标记为 2，再次加入 15ml 冰的 Buffer P3，70uM 细胞筛过筛，标记为 3。再次加入 15ml 冰的 Buffer P3，70uM 细胞筛过筛，标记为 4；
9. 将 4 管过筛后的细胞悬液用冰冻离心机 200g 4℃ 离心 5min 去除上清，再用预冷 10ml Buffer P3 重悬；
10. 从 1, 2, 3, 4 上清中吸取 20ul 到 10cm 培养皿中观察隐窝数量，取隐窝较多，细胞碎片较少的进行类器官培养（推荐重悬密度为每 10ul 悬液包含 200 至 600 个隐窝）；
11. 37℃ 静置 15min 凝固后加 500ul 小鼠小肠类器官培养基到 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。

### 小鼠小肠类器官传代

1. 在 20ml PBS 中加入 100ul 类器官消化液 B 配置成类器官传代消化液 B 工作液；
2. 小心吸出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，用移液枪吹散基质胶，转移到 15ml 离心管中；

3. 将离心管置于摇床室温孵育 15min;
4. 加入 10ml 预冷 Buffer P3 重悬, 300g 4℃离心 5min;
5. 去除上清, 以 1:2-1:5 传代, 加入相应体积的小鼠小肠类器官培养基与基质胶 1:1.5 重悬, 从 37℃培养箱中取出提前 2h 放入的 24 孔板, 每孔加 50ul 混合液, 放入 37℃培养箱 5min 后倒置凝固 20min ;
6. 凝固后加入 500ul 小鼠小肠类器官培养基到 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有限公司与广州沃亘生物技术有限公司联合研发