

bioGenous™ iPSC-derived Human Intestinal Organoid (iHIO)

货号: O2305-HI

产品描述: bioGenous™ iPSC-derived Human Intestinal Organoid (iHIO) 是由人诱导多能干细胞通过定向分化培养得到的肠道类器官，该类器官具有类似肠道的结构和细胞组成，在体外培养条件下可稳定传代扩增、冻存及复苏。

物种: 人

细胞来源: ATCC-DYR0100 hiPSC, ACS-1011

生物安全等级: BSL-1

批次: 详见冻存管标识

冻存量: $\geq 10^5$ 个细胞/mL

支原体检测结果: 阴性

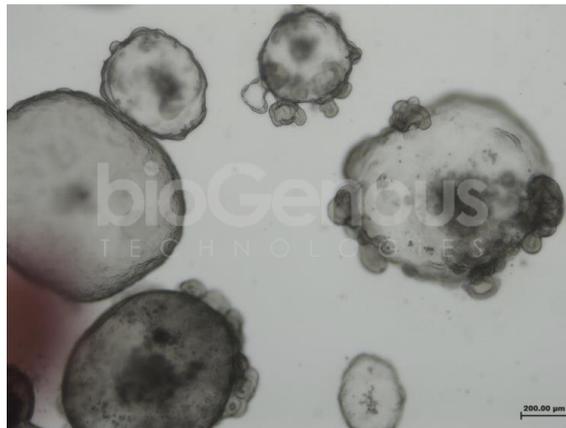
产品用途: 仅限科研使用

建议复苏培养体系: 每管复苏 2-4 孔 (24 孔板, 25 μ L 体系)

参考传代培养周期: 7-10 天/代

形态: 囊泡状类器官，培养成熟可分化出隐窝样结构

参考培养图片:



比例尺, 200 μ m

人肠道类器官 iHIO 鉴定报告

iHIO 构建流程图：

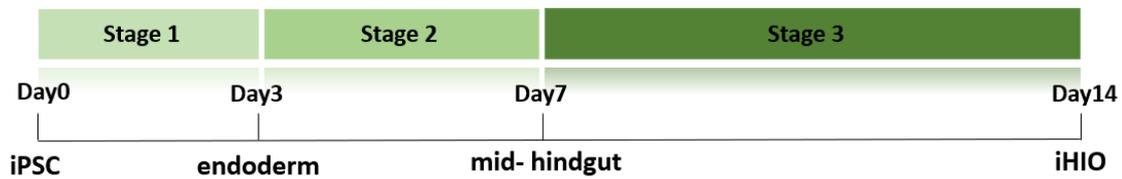


图 1 人肠道类器官 iHIO 构建流程图

人肠道类器官 iHIO 构建分为三个阶段，第一阶段将 iPSC 诱导分化至内胚层，第二阶段将内胚层诱导分化为中后肠球体，第三阶段使用 bioGenous™ Human Intestinal Organoid Kit 将中后肠球体培养为人肠道类器官。

内胚层及中后肠分化效果 qPCR 鉴定：

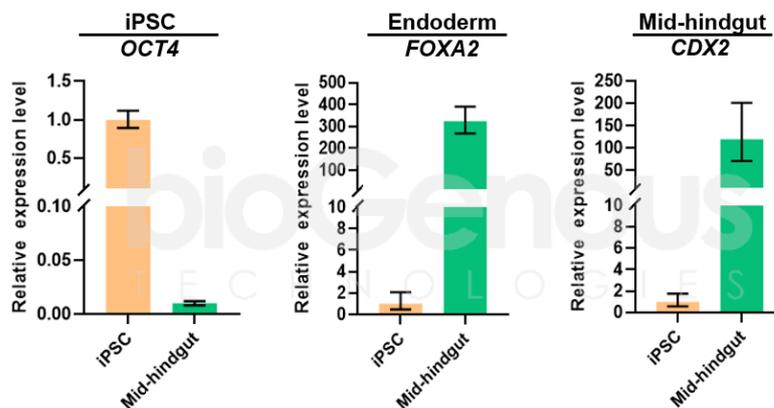


图 2 OCT4、FOXA2、CDX2 mRNA 表达量

iPSC 诱导分化为中后肠球体后，多能干细胞标志物 OCT4 表达量显著下降，内胚层标志物 FOXA2 及中后肠标志物 CDX2 表达量显著升高。

iHIO qPCR 鉴定：

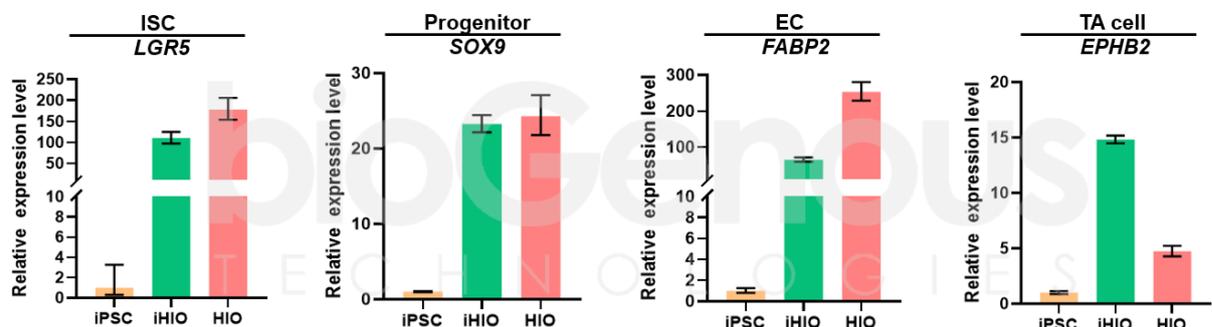


图 3 LGR5、SOX9、FABP、EPHB2 mRNA 表达量

iHIO qPCR 鉴定结果显示，iPSC 诱导分化至人小肠类器官后，肠道多谱系标志物表达水平均显著升高，且与人成体干细胞来源的肠道类器官趋势一致。LGR5 为肠道干细胞 (ISC) 标志物，SOX9 为肠道前体细胞标志物，FABP2 为肠上皮细胞 (EC) 标志物，EPHB2 为肠道快速增殖细胞 (TA) 标志物。HIO 为人成体干细胞来源的肠道类器官。

iHIO HE 鉴定:

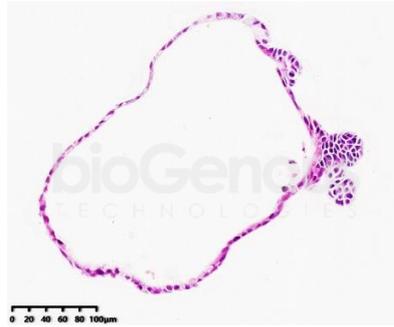


图 4 iHIO 切片 HE 染色示意图

iHIO 切片 HE 染色可见细胞规则排布，可见空腔和隐窝样结构。比例尺，100 μ m.

iHIO IF 鉴定:

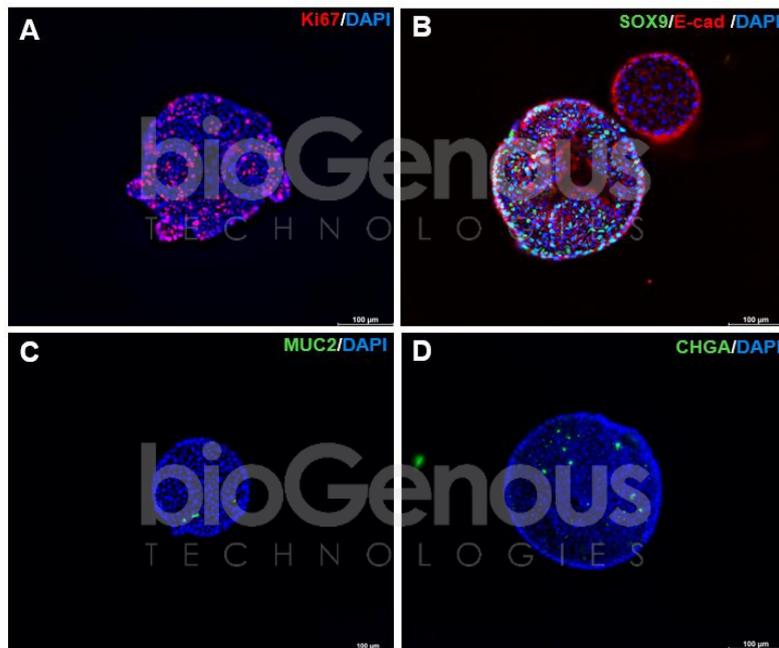


图 5 iHIO 整体免疫荧光染色示意图

iHIO 整体免疫荧光染色可见肠道多谱系标志物表达。A 图中 Ki67 (红色) 标记增殖细胞。B 图中 E-cad (红色) 为上皮细胞膜蛋白，Sox9 (绿色) 为肠道前体细胞标志物。C 图中 MUC2 (绿色) 标记肠道杯状细胞 (goblet cell)。D 图中 CHGA (绿色) 标记肠内分泌细胞 (EEC)。DAPI 标记细胞核。比例尺，100 μ m.

人肠道类器官 iHIO 培养操作说明

实验仪器、材料

仪器：生物安全柜、细胞培养箱、低温水平式离心机、倒置显微镜、低温冰箱

材料：细胞培养板（规格为 6 孔、24 孔）、离心管（规格为 1.5 mL、15 mL 和 50 mL）、移液器（规格为 2.5 μ L、10 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L 和 5000 μ L）、无菌吸头（规格为 10 μ L、200 μ L 和 1000 μ L）

实验试剂

Manufacturer	Materials	Catalog#
bioGenous™	Human Intestinal Organoid Kit	K2002-HI
bioGenous™	Epithelial Organoid Basal Medium	B213151
bioGenous™	Anti-Adherence Rinsing Kit	E238002
bioGenous™	Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free)	E238023
bioGenous™	Organoid Dissociation Solution	E238001
bioGenous™	Organoid Culture ECM (Reduced Growth Factor)	M315066

实验内容与方法

iPSC-HIO 复苏

- 1、准备实验：准备好基础培养基和 37°C 水浴锅，将基础培养基在 37°C 的水浴锅中预热。
- 2、迅速解冻：从液氮罐中取出冻存管，立即放入 37°C 水浴锅中，快速晃动使其尽快融化，在冰块完全融化前停止水浴，将 iHIO 冻存悬液转移至 15mL 离心管中，缓缓加入 5-10 倍体积经 37°C 预热的 Epithelial Organoid Basal Medium 稀释冻存悬液。
- 3、清洗收集：将解冻后的 iHIO 悬液以 300g 离心 3min，充分去除上清液，加入 1mL Epithelial Organoid Basal Medium 重悬，转移到 1.5mL 离心管中，300g 离心 3min。
- 4、基质胶 3D 包裹：弃去上清，保留沉淀，在类器官沉淀中加入相对应量的 Organoid Culture ECM，并在冰上混匀（注意：混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15s 内），混匀后置于冰上。
- 5、种板培养：用移液枪吸取 Organoid Culture ECM 与类器官的混悬液加至细胞培养板中，混合悬液须点至培养板底部中央位置，避免其接触培养孔侧壁。
- 6、持续培养：将培养板放入 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 20min，待基质胶完全凝固至不再流动后，沿孔壁缓缓加入 Human Intestinal Organoid Kit，每 2-3 天更换一次完全培养基。
- 7、后续实验观察：将细胞培养板放入培养箱中进行培养，每 2 天于倒置显微镜下观察 iHIO 的生长状态并拍照，记录多个视野中 iHIO 的形态和分布。一般情况下，在倒置显微镜下观察到透亮的细胞为活细胞，而不透光且表面皱缩的细胞为死细胞或者活力较低的细胞。待上述类器官生长到所需的数量和大小时，可进行 iHIO 的传代和冻存。

iHIO 传代

- 1、iHIO 收集：待 iHIO 培养至 200 μ M 以上，即可进行传代操作。吸去孔中培养基加入等体积的基础培养基，用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头轻轻刮下基质胶和 iHIO 的混合物，转移至 1.5mL 离心管中，吹到 5-10 次，使 iHIO 与基质胶分离，300g 离心 3min，离心后，培养基、基质胶与类器官沉淀从上至下分为三层，去除上层培养基与基质胶。
- 2、iHIO 消化：加入 5 倍类器官沉淀的 Organoid Dissociation Solution 重悬沉淀，室温消化 1-2min，然后加入 5 倍消化悬液体积的 Epithelial Organoid Basal Medium 重悬终止消化；也可直接在 1.5mL 离心管中加入 1mL Epithelial Organoid Basal Medium 重悬，机械吹打 20-50 下进行消化；300g 离心 3min。

- 3、iHIO 清洗: 吸去上清液, 加入 1mL Epithelial Organoid Basal Medium 重悬, 300g 离心 3min, 去除残留消化液, 若使用机械消化法则可省略该步骤。
- 4、台盼蓝计数: 将清洗后的细胞沉淀用 1mL Epithelial Organoid Basal Medium 重悬, 取 18 μ L 悬液与 2 μ L 台盼蓝染液混匀后进行活细胞检测及计数。
- 5、基质胶 3D 包裹: 弃去上清, 保留沉淀, 在类器官沉淀中加入相对应量的 Organoid Culture ECM, 并在冰上混匀 (注意: 混匀吹打的动作要轻柔, 切忌产生大量气泡, 常温混匀则需要控制在 15s 内), 混匀后置于冰上。
- 6、种板培养: 用移液枪吸取 Organoid Culture ECM 与类器官的混悬液加至细胞培养板中, 混合悬液须点至培养板底部中央位置, 避免其接触培养孔侧壁。
- 7、持续培养: 将培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 20min, 待基质胶完全凝固至不再流动后, 沿孔壁缓缓加入 Human Intestinal Organoid Kit, 每 2-3 天更换一次完全培养基。
- 8、后续实验观察: 将细胞培养板放入培养箱中进行培养, 每 2 天于倒置显微镜下观察 iHIO 的生长状态并拍照, 记录多个视野中 iHIO 的形态和分布。

iHIO 冻存

- 1、准备实验: 将细胞冻存程序降温盒平衡至室温, 保证在使用时降温盒中异丙醇恢复至常温。
- 2、iHIO 收集: 待 iHIO 培养至 100-200 μ M 左右, 即可进行冻存操作。吸去孔中培养基加入等体积的 Epithelial Organoid Basal Medium, 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头轻轻刮下基质胶和 iHIO 的混合物, 转移至 1.5mL 离心管中, 吹到 5-10 次, 使 iHIO 与基质胶分离, 300g 离心 3min, 离心后, 培养基、基质胶与类器官沉淀从上至下分为三层, 去除上层培养基与基质胶。
- 3、iHIO 清洗: 吸去上清液, 加入 1mL DPBS 重悬, 300g 离心 3min, 去除残留培养基。
- 4、添加冻存液: 吸去上清液, 向准备冻存的 iHIO 沉淀中加入 1mL 预冷的 Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free) 重悬, 吹打混匀后迅速转移至低温冻存管中。
- 5、将低温冻存管放入细胞冻存程序降温盒内, 随后迅速将细胞冻存程序降温盒放入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中, 24h 后将冻存管转移至液氮 (-196 $^{\circ}$ C) 中长期保存。