

bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Kit Plus (小鼠小肠类器官 Plus 版试剂盒)

货号: K2001P-MI

产品说明:

bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Kit Plus (小鼠小肠类器官 Plus 版试剂盒) 是一款用于建立和维持小鼠肠道成体干细胞来源小肠类器官的试剂盒, 该试剂盒提供了完整的从小肠隐窝分离、隐窝回收、隐窝活性分析及培养的全套试剂。可较大程度维持小肠隐窝的活性, 并提升小肠类器官的形成率, 所培养的小鼠小肠类器官主要由小肠干细胞、快速扩增细胞、肠吸收细胞、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, 小鼠小肠类器官重现了体内小肠上皮的特征, 因此是肠道稳态和疾病机制研究的理想体外模型。

产品信息:

产品组成	产品编号	体积	储存条件及周期
Intestine Crypt Dissociation Solution	K2001P-MI-I	20mL/100mL	2-8°C, 18 个月
Intestine Crypt Recovery Solution	K2001P-MI-II	100mL/500mL	2-8°C, 18 个月
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Basal Medium	K2001P-MI-A100/A500	100mL/500mL	2-8°C, 18 个月
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Supplement B(50x)	K2001P-MI-B100/B500	2mL/10mL	-20°C, 避免反复冻融, 18 个月
bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Supplement C(250x)	K2001P-MI-C100/C500	0.4mL/2mL	-20°C, 避免反复冻融, 18 个月
Trypan Blue Staining Solution(2x)	K601009	0.2mL/1mL	4-30°C, 24 个月

小鼠小肠类器官培养所需其他试剂耗材 (不包含在本试剂盒中):

供应商	试剂	货号
bioGenous™	Anti-Adherence Rinsing Kit	E238002
bioGenous™	Organoid Cryopreservation Medium	E238023
bioGenous™	Organoid Culture ECM (Reduced Growth Factor)	M315066
	DPBS (1x), liquid, contains no calcium or magnesium	-
	70 µm cell strainer	-
	细胞计数板	
	24 孔细胞培养板	
	移液器和 0.2mL、1mL、5mL 移液管	
	15mL、50mL 离心管, 1.5mL EP 管	

小鼠小肠类器官完全培养基的制备:

使用无菌操作技术配制小鼠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。

- 冰上解冻 Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50 x) 和 Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250 x)。
注意: 解冻后, 建议将 Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50 x) 和 Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250 x) 分别分装后保存取用, 避免反复冻融。
- 将 200µL Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50 x), 40µL Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250 x) 加至 9.76mL Mouse Intestinal Organoid Basal Medium 中, 充分混合, 配制成为 10mL 小鼠小肠类器官完全培养基。
注意: 配制后的小鼠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。Mouse Intestinal Organoid Supplement B(50x) 内含有细菌及真菌抗生素(50 x)。

小鼠小肠类器官原代培养

- 依据所在单位批准的实验动物伦理及操作规范牺牲小鼠。
- 准备若干细胞培养皿, 加入适量 4°C 预冷的 DPBS 备用, 准备适量 Organoid Culture ECM (M315066, 以下简称 ECM) 于冰上解冻。
- 标准手术操作取小鼠小肠, 根据实验需求取总长度约 3-20 cm 的小肠段, 置于含 DPBS 的培养皿中。
- 使用移液管或者注射器往小肠一端注入 DPBS 以冲洗肠内容物, 冲洗后置于新的含 DPBS 的培养皿中, 重复冲洗数次至内容物完全被冲洗干净, 将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中。
- 使用手术剪将肠管剪开, 肠腔面朝上, 一只手使用手术镊夹住肠组织一端, 另一只手使用手术刀片轻轻刮去肠腔表面绒毛, 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 2mm 宽，并转移至含有 4 mL 小鼠隐窝分离液的培养皿中，置于 4℃ 冰箱孵育 30min。
7. 孵育完成后，将小肠组织片段转移到新的含有 3-4 mL 小肠隐窝回收液的培养皿中轻轻清洗，并重复此步骤一次，将小肠组织片段转移到含有 5mL 小肠隐窝回收液的 15mL 或 50mL 离心管中。
8. 用 5mL 移液管轻柔吹打组织碎片，使组织反复穿过移液管管口以产生机械剪切力从而使小肠隐窝与小肠基层分离，吹打 5-10 次后可取少量悬液镜检，当可以看到大量的隐窝样结构后，停止吹打，并对吹打后的组织悬液进行 70μm 滤网过滤。
9. 收集穿过滤网的组织悬液，150g 离心力 4℃ 离心 3min。
10. 弃上清，使用 1-3mL 小肠隐窝回收液重悬组织沉淀，吹匀后取 10μL 悬液与等体积 Trypan Blue Staining Solution 混匀加入计数板，置于显微镜或细胞计数仪中下观测和计数活细胞比例和完整隐窝数量，蓝色细胞为死细胞，透亮未着色的细胞为活细胞（示例见图 1B），计算细胞活率（细胞活率=活细胞个数/总细胞个数×100%），如果活力大于 80% 代表分离效果较好，活力低于 30% 代表分离过程中组织损伤较大可能会导致较低的原代建成率，提示应减少步骤 8 过程的吹打力度和次数，分离完整的隐窝常呈条状（长约 75μm-100μm，宽约 25μm-40μm），原代分离的腺窝示例如图 1A 所示。
11. 活力分析完成后取所需隐窝或细胞总量的组织细胞悬液于 150g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清后置于冰上（此步骤不宜超过 5 分钟）。
12. 用适量的 ECM 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10μL ECM 悬液包含 200 至 600 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间应不超过 30s 以避免 ECM 过早凝固。
注意： ECM 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 ECM 的结构稳定性。
13. 将 ECM 和组织细胞的混合悬液点入 24 孔细胞培养板底部正中央，每孔 30μL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。
注意： 为防止 ECM 室温凝固，此步骤应尽快完成。
14. 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 15min 左右待 ECM 凝固。
15. 配制小鼠小肠类器官完全培养基。
16. 待 ECM 完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔细胞培养板每孔 500μL。
注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。
17. 将 24 孔细胞培养板置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。
18. 每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏 ECM。
19. 密切监测类器官生长状态，理想情况下，小鼠小肠类器官应在 5 至 7 天内长成，原代培养的小鼠小肠类器官的培养示例如图 2 所示。

小鼠小肠类器官传代培养

20. 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit (E238002) 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 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的 1.5mL EP 管中。
21. 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与 ECM 分离。
22. 150g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清，使用 DPBS 重悬底部类器官沉淀，150g 离心力 4℃ 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。
23. 用适量的 ECM 重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免 ECM 过早凝固。
注意： ECM 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 ECM 的结构稳定性。
24. 将 ECM 和类器官的混合悬液点入 24 孔细胞培养板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30μL 左右。
注意： 为防止 ECM 室温凝固，此步骤应尽快完成。
25. 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 15min 左右待 ECM 凝固。
26. 配制小鼠小肠类器官完全培养基。
27. 待 ECM 完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔细胞培养板每孔 500μL。
28. 将 24 孔细胞培养板置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养，传代后小鼠小肠类器官的培养示例如图 3 所示。

Last updated on 20th March 2023

附图:

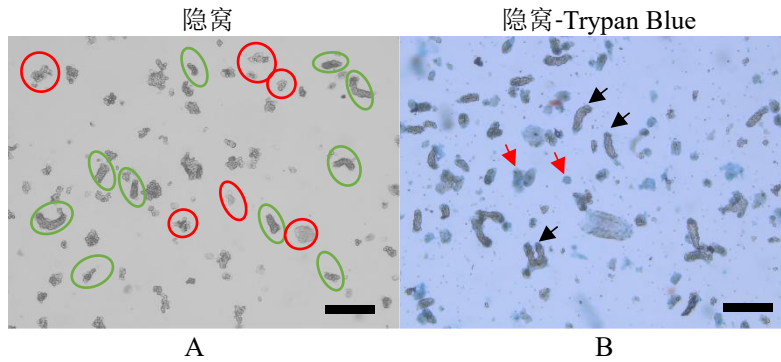


图 1、使用 Mouse Intestinal Organoid Kit Plus 试剂盒分离的原代小肠腺窝示例图。图 1A，绿色圈出的是标准形态的隐窝，红色圈出的则是其他杂细胞团块；图 1B，黑色箭头处是活力较好的隐窝，红色箭头处是死的或状态不好的隐窝及细胞团块（比例尺：200 μ m）。

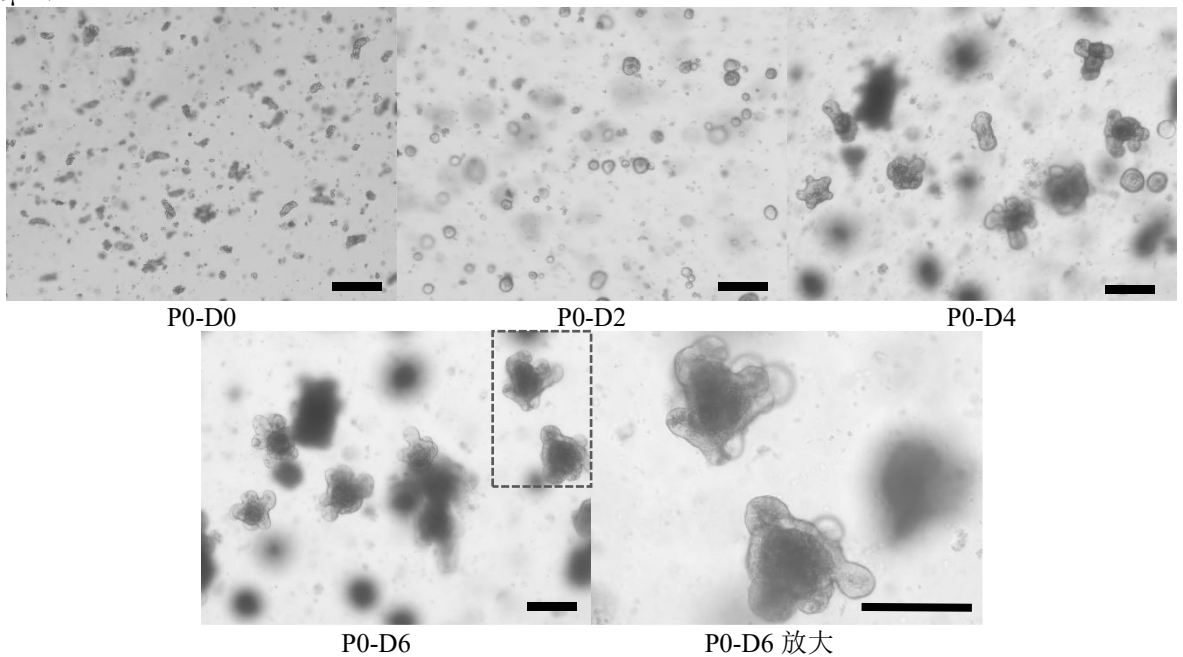


图 2、使用 Mouse Intestinal Organoid Kit Plus 试剂盒培养的原代小肠类器官第 0、2、4、6 天及第 6 天放大示例图（比例尺：200 μ m）。

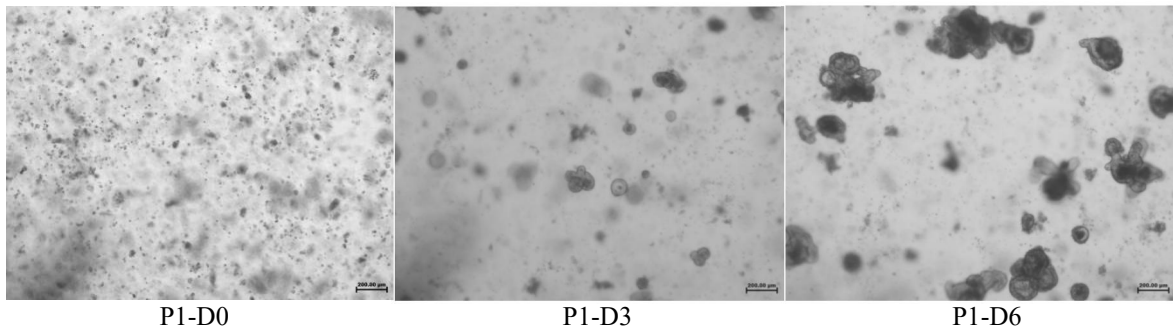


图 3、使用 Mouse Intestinal Organoid Kit Plus 试剂盒培养的传代小肠类器官第 0、3、6 天示例图（比例尺：200 μ m）。