

bioGenous™ Porcine Intestinal Organoid Kit (猪小肠类器官培养试剂盒)

货号: K2269-PI

产品说明:

bioGenous™ Porcine Intestinal Organoid Kit (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:

产品组成	货号	体积	储存条件及周期
bioGenous™ Porcine Intestinal Organoid Basal Medium	K2269-PI-A100/A500	100 mL/500 mL	4°C, 12 个月
bioGenous™ Porcine Intestinal Organoid Supplement B(50x)	K2269-PI-B100/B500	2 mL/10 mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
bioGenous™ Porcine Intestinal Organoid Supplement C(250x)	K2269-PI-C100/C500	0.4 mL/2 mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	E219121	1 mL/2 mL	15 - 30°C, 5 年

猪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 Solution	E238002
bioGenous™	Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free)	E238023
bioGenous™	Epithelial Organoid Basal Medium	B213151
bioGenous™	Organoid Dissociation Solution	E238001
bioGenous™	Y-27632 dihydrochloride	C629401
Corning®	Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix	356231
	DPBS (1x), liquid, contains no calcium or magnesium	-
	70 µm cell strainer	-

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, 以配制 10 mL 为例, 如所需量不同, 可相应调整用量。

- 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。
- 将 200 µL Porcine Intestinal Organoid Supplement B (50x), 40 µL Porcine Intestinal Organoid Supplement C (250x) 加至 9.76 mL Porcine Intestinal Organoid Basal Medium 中, 充分混合, 配制成 10 mL 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

- 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。
- 准备若干培养皿, 加入 4°C 预冷的 DPBS 备用。
- 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。
- 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。
- 使用手术剪将肠管剪开, 肠腔面朝上, 一只手手术镊夹住肠组织一端, 另一只手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。
- 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。
- 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。
- 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 μm 滤器过滤。

9. 收集滤液，300 \times g，4 $^{\circ}$ C离心 3 min。
10. 弃上清，使用 1 mL DPBS 重悬组织沉淀，取 20 μL 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 $^{\circ}$ C离心 3 min，弃上清后置于冰上预冷。
11. 用适量的 Matrigel 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 25 μL Matrigel 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 Matrigel 过早凝固。
注意：Matrigel 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 Matrigel 的结构稳定性。
12. 将 Matrigel 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 Matrigel 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 $^{\circ}$ C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15 min 左右待 Matrigel 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 Y27632。
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 $^{\circ}$ 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 Matrigel。
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 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 1.5 mL EP 管中。
2. 用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头用力重悬类器官悬液，多次吹打使得类器官与 Matrigel 分离。
3. 300 \times g，4 $^{\circ}$ C离心 3 min，弃上清，用经过 Anti-Adherence Rinsing Kit 润洗的枪头加入 200 μL Organoid Dissociation Solution (E238001) 并充分混匀，37 $^{\circ}$ C 条件下消化 1 - 3 min，消化结束后加入 1 mL Epithelial Organoid Basal Medium 吹打混匀。
4. 300 \times g，4 $^{\circ}$ C离心 3 min，弃上清，再次加入 1 mL Epithelial Organoid Basal Medium 并混匀。
5. 300 \times g，4 $^{\circ}$ C再次离心 3min，弃上清后置于冰上。
6. 用适量的 Matrigel 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 Matrigel 过早凝固。
注意：Matrigel 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 Matrigel 的结构稳定性。
7. 将 Matrigel 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 Matrigel 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 $^{\circ}$ C 二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15 min 左右待 Matrigel 凝固后取出。
9. 配制猪小肠类器官完全培养基。
10. 待 Matrigel 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 $^{\circ}$ 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。

Last updated on 19th June 2022