

# 猪小肠类器官培养基套装

## 产品描述

KEL Biotech猪小肠类器官培养基套装 (Porcine Intestine Organoid Kit) 是一款用于建立和维持猪肠道成体干细胞来源的小肠类器官培养基套装, 该试剂盒提供了完整的从小肠隐窝分离及培养的全套试剂。猪小肠类器官培养体系模拟了细胞体内生长的微环境, 极大程度维持了来源于体内小肠组织的特征, 适用于猪小肠组织来源类器官的构建、维持培养及传代扩增。

## 产品信息

产品名称	产品货号	规格	储存条件及周期
KEL Biotech猪小肠类器官培养基套装	MA-0817H010S	100ml	4 °C, 3 months 或者 -20 °C, 1 year

## 其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
KEL Biotech金牌基质胶	082701/082703/082755
上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
类器官培养润洗液	MB-0818L03L/S
KEL Biotech基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
Fetal Bovine Serum (FBS)	-
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	-
DPBS (1X), 液体, 不含钙和镁	-
70 μm 细胞滤网	-

## 试剂到货处理:

- 猪小肠类器官培养基: 在 4 °C 可保存 3 个月, 收到货后 4 °C 保存, 建议 1 个月内使用完毕, 长期不用建议放于 -20 °C 储存, 避免反复冻融超过 2 次。
- 组织保存液、猪小肠原代组织消化液: 内含有维持细胞活性营养成分, 为了保持试剂营养成分的活性, 长期不用建议放于 -20 °C 储存, 避免反复冻融超过 2 次。



## 使用说明

### ➤ 猪来源的小肠类器官的建立

- 1.使用镊子去除肠道外部的肠系膜、血管和脂肪，将肠段放入 10 cm 培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入 2 mL 预冷 DPBS，使用 DPBS 轻轻冲洗肠段。用剪刀将肠段纵向切开，肠腔朝上打开，使用预冷 DPBS 反复轻轻洗涤肠段至清洗液澄清；
  2. 准备装有 15 mL 预冷 DPBS 的 50 mL 离心管，用镊子夹住肠段一端，悬挂于离心管口，将肠段剪成 2 - 5 mm 小段，使肠段落入管内液体中；
  3. 使用 10 mL 移液管轻轻上下吹打肠道片段数次，静置后轻轻吸出上清液，再次加入 15 mL 预冷 DPBS。重复上述步骤 2-3 次，直至上清液澄清；
  4. 消化：用 30 mL 的 DPBS 溶液重悬肠道组织，再加入 300  $\mu$ L 0.5M EDTA，至 EDTA 的终浓度为 5 mM。置于 4 $^{\circ}$ C/碎冰中，并放置于摇床上，80 rpm，震荡消化 30-60 min。消化途中取部分悬液于显微镜下观察肠隐窝情况。（该步骤的消化时间可能会根据标本的情况进行调整）；
  - 5.清洗：消化完成后，静置待肠段沉淀，弃上清。加入预冷 DPBS，轻柔摇匀，静置后弃上清，重复 2-3 次以去除 EDTA；
  - 6 重悬：加入 30 mL 预冷的含 0.1%FBS 的 DPBS，涡旋 30s，取上清 70  $\mu$ m 滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液，记为馏分 1。重复收集 2 次，记为馏分 2 和馏分3；
  - 7.收集：300g 离心力 4 $^{\circ}$ C离心 3min；
  - 8.计数：弃上清，根据沉淀量使用上皮类器官基础培养基重悬组织沉淀，取 10-20  $\mu$ L 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，300g 离心力 4 $^{\circ}$ C离心 3min，弃上清后置于冰上；
  - 9.用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10  $\mu$ L 基质胶悬液包含 100 至 200 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固；
- 注意：基质胶稀释比例应在 70%以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。
- 10.将基质胶和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30  $\mu$ L 左右，避免悬液接触孔板侧壁；
- 注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。
- 11.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 30 min 左右待基质胶凝固；
  - 12.待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的猪小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L，避免



破坏已凝固结构；

13. 将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养；

14. 每 2~3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。密切监测类器官生长状态，理想情况下，猪小肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

### 【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书；
2. 本产品仅适用于新鲜获取或在组织保存液中保存 24 h 内的新鲜标本；
3. 本产品培养结果会受到标本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。

