

Human Colonic Organoid Complete Medium (人结肠类器官完全培养基)

货号: HCCM-100

产品介绍

人结肠类器官完全培养基是一款用于建立和维持人体肠道成体干细胞来源结肠类器官的完全培养基。结肠上皮的自我更新是由位于隐窝中的干细胞及其祖细胞的增殖驱动的。人结肠类器官在结构、细胞类型组成和自我更新动力学方面显示出与结肠上皮的一致性, 因此在人结肠发育和疾病研究中具有广阔的应用前景。人结肠类器官还可以通过结肠上皮的体外扩增应用于再生生物学中。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human Colonic Organoid Complete Medium A	HCCM-100	100mL	4°C, 6 个月
Human Colonic Organoid Complete Medium B(50X)		1mL*2	-20°C, 1 年
Human Colonic Organoid Complete Medium C(250X)		0.4mL	-20°C, 1 年
Human Colonic Organoid Complete Medium D(100X)		1mL	-20°C, 1 年
EDTA (0.5M) PH 8.0	OET200	0.2mL	15-30°C, 5 年

其他需准备的试剂信息



试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHRbio	OEM-10
上皮类器官基础培养基	SHRbio	OBM-500
类器官传代消化液	SHRbio	OPD-100
类器官润洗液	SHRbio	OMR-100
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

人结肠类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制人结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。

1. 冰上解冻 Human Colonic Organoid Complete Medium B(50X)、Human Colonic Organoid Complete Medium C(250X)和 Human Colonic Organoid Complete Medium D(250X)。

注意：解冻后，建议将 Human Colonic Organoid Complete Medium B(50X)、Human Colonic Organoid Complete Medium C(250X)和 Human Colonic Organoid Complete Medium D(250X)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 200 μ L Human Colonic Organoid Complete Medium B(50X)、40 μ L Human Colonic Organoid Complete Medium C(250X)和 100 μ L Human Colonic Organoid Complete Medium D(100X)加到 9.66 mL Human Colonic Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10mL 人结肠类器官完全培养基。

注意：配制后的人结肠类器官完全培养基可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存，建议在两周内使用。Human Colonic Organoid Complete A 内含有细菌及真菌抗生素。



人结肠类器官原代培养

注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关机构和政府法规。在收集人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

1. 将组织从 4℃ 样本保存液 (SPS-100) 中取，评估所获得的组织块是否由上皮细胞组成，是否含有脂肪或肌肉组织。如果含有脂肪或肌肉组织，需在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和钳子尽可能移除非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，立即继续下一步。
 2. 用上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 或 DPBS 冲洗肠组织，直到上清液澄清。
 3. 使用外科剪刀或手术刀在细胞培养皿中将组织切成小块，并转移至含有 5mmol/L (终浓度，需要将原液稀释 100 倍后使用) EDTA 的预冷 DPBS 中消化，置于 4℃ 孵育 30min。
 4. 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。
 5. 用 5mL 移液管在含预冷的 DPBS 的培养皿或 50mL 离心管中吹打、重悬组织碎片，使组织反复穿过移液管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，并对吹打后的组织悬液进行 100μm 滤网过滤。
 6. 收集穿过滤网的组织悬液，150g-300g 离心力 4℃ 离心 3min。
 7. 弃上清，使用 1mL DPBS 重悬组织沉淀，取 20μL 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取含所需隐窝量的悬液，150g-300g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清。
 8. 用适量的基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 10μL 基质胶悬液含 200 至 600 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。
 9. 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30μL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。
- 注意：**为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。
10. 将铺好的培养板至于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15min 左右成胶。
 11. 配制人结肠类器官完全培养基。



12. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的人结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

13. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养。每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。

14. 密切监测类器官的形成。理想情况下，人结肠类器官可以在初次接种后 5-8 天之间进行首次传代。原代培养的人结肠类器官例图如图 1A 所示。

人结肠类器官传代培养

1. 吸弃原培养液，加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的培养基，用经过润洗液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润洗液润洗的 1.5mL EP 管中。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 在室温或 4 $^{\circ}$ C 条件下 150g-300g 离心 3min，弃上清，加入 1mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬底部类器官沉淀，小心地将类器官悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏类器官。
4. 加入 1mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 洗涤沉淀一次，室温或 4 $^{\circ}$ C 条件下 150g-300g 离心 3min，弃上清后置于冰上。
5. 用适量的基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。
6. 将基质胶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 μ L 左右。
7. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15-25min 待基质胶凝固。
8. 配制人结肠类器官完全培养基。
9. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的人结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。
1. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养。传代后的人结肠类器官例图如图 1B 所示。

注意事项



1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。



附录 1 人结肠类器官培养过程图



图 1 人结肠类器官原代培养、传代和复苏后的生长状态例图

(A) 原代人结肠类器官的生长状态 (P0)。类器官主要为囊泡结构，直径约为 80-100 μ m。(B) 第一代人结肠类器官的生长状态 (P1)，传代后的类器官有出芽结构。(C) 复苏后的类器官表现出稳定的增长趋势。

比例尺：100 μ m。

