

Mouse Colonic Organoid Complete Medium (小鼠结肠类器官完全培养基)

货号: MCCM-100

产品介绍

小鼠结肠类器官完全培养基是一款用于建立和维持小鼠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。小鼠结肠类器官在自我更新和分化能力、组织结构、细胞类型和功能方面，重现了体内结肠上皮的特征，因此是小鼠结肠研究的理想体外模型。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Mouse Colonic Organoid Complete Medium A	MCCM-100	100mL	4℃, 6 个月
Mouse Colonic Organoid Complete Medium B(50X)		1mL*2	-20℃, 1 年
Mouse Colonic Organoid Complete Medium C(100X)		1mL	-20℃, 1 年
Mouse Colonic Organoid Complete Medium D(250X)		0.4mL	-20℃, 1 年
EDTA (0.5M) PH 8.0	OET200	0.2mL	15-30℃, 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
红细胞裂解液	-	-
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

小鼠结肠类器官完全培养基的制备

使用无菌操作技术配制小鼠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. 冰上解冻小鼠结肠类器官完全培养基 B(50X)、小鼠结肠类器官完全培养基 C(100X)和小鼠结肠类器官完全培养基 D(250X)。

注意：分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 在 9.66 mL 小鼠结肠类器官完全培养基 A 中添加 200μL 小鼠结肠类器官完全培养基 B(50X)、100μL 小鼠结肠类器官完全培养基 C(100X)和 40μL 小鼠结肠类器官完全培养基 D(250X)。充分混合。

注意：如果不立即使用，在 2-8°C 下保存完全培养基不超过 2 周。Mouse Colonic Organoid Complete Medium A 含有细菌及真菌抗生素成分。

小鼠结肠类器官原代培养

1. 准备若干培养皿，加入 4°C预冷的 DPBS 备用。
2. 标准手术操作分离小鼠结肠组织，根据实验需求取总长度 3-10 cm 的结肠段，置于含 DPBS 的培养皿中。



3. 使用移液管或者注射器往结肠一端注入 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，置于新的含 DPBS 的培养皿中。
4. 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。
5. 将清洗后的结肠组织剪碎至 2mm 宽，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。
6. 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。
7. 用 5mL 移液管或剪去尖端的 1mL 枪头在含预冷的 DPBS 的培养皿中吹打、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。
8. 收集穿过滤网的组织悬液，300g 离心力 4℃ 离心 3min。如果细胞沉淀为红色，吸弃上清液后，加入 2mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 30s-1min，然后在 4℃ 下 300g 离心 3min。
9. 弃上清，使用 1mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬细胞沉淀，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，300g 离心力 4℃ 离心 3min，弃上清。
10. 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 30μL 基质胶悬液含 60 至 400 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。
11. 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。

12. 将铺好的培养板至于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15min 左右成胶。

13. 配制小鼠结肠类器官完全培养基。

14. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠结肠类器官完全培养基。24 孔板每孔 500μL。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

15. 将 24 孔板置于 37℃ 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。原



代培养的小鼠结肠类器官生长状态图如图 1A 所示。

小鼠结肠类器官传代培养

1. 吸弃原培养液，加入 4℃预冷的上皮类器官基础培养基 (OBM-500)，用经过类器官润洗液 (OMR-100) 润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养液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. 300g 离心力 4℃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后，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。也可以使用酶法进行类器官传代消化，即在加入 0.2ml 类器官传代消化液 (OPD-100) 重悬底部类器官沉淀，用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于 37℃ 下孵育，直到类器官消化完成。

注意：密切监测类器官消化情况，使用类器官传代消化液进行消化时需要将消化时间控制在最短时间内完成（不要超过 3min）。根据经验，如果可以观察到小的囊泡或小团细胞（由 10-50 个细胞组成），消化就完成了。

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℃条件下 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 30μL 左右。
7. 将接种完成后的培养板至于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15min 左右待基质胶凝固。
8. 配制小鼠结肠类器官完全培养基。
9. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠结肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500μL。
10. 将 24 孔板置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。传代后的小鼠结肠类器官生长状态如图 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 小鼠结肠类器官培养过程图

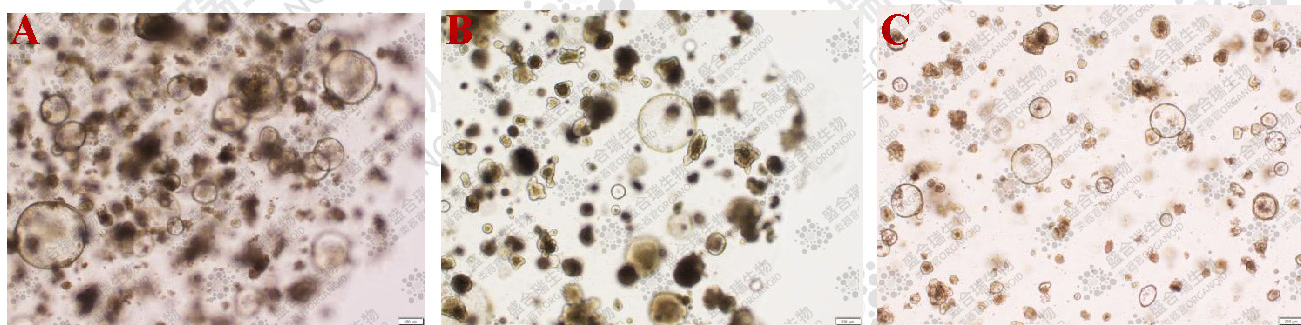


图 1 小鼠结肠类器官原代培养、传代和复苏后的生长状态例图

(A) 原代小鼠结肠类器官的生长状态 (P0)。类器官主要为囊泡结构。(B) 第一代小鼠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：200µm。

