



# MasterAim®猪小肠类器官完全培养基

MasterAim® Porcine Intestinal Organoid Complete Medium

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案



杭州艾名医学科技有限公司

官网: www.aimingmed.com

地址: 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园10幢南座1层

电话: 0571 - 85352695

邮箱: info@aimingmed.com

## 产品介绍

MasterAim®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。MasterAim®猪小肠类器官完全培养基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

MasterAim®猪小肠类器官完全培养基包括: 猪小肠类器官基础培养基及添加物, 组分不单独售卖。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®猪小肠类器官完全培养基	10-100-332	1 盒	-20°C, 12个月
MasterAim®猪小肠类器官基础培养基	100-333	95 mL	-20°C, 12个月; 4°C, 3个月
MasterAim®猪小肠类器官培养基添加物	100-334	5 mL	-20°C, 12个月

## 相关产品

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®组织运输保存液	100-032	100 mL	-20°C, 12个月
MasterAim®肠类器官组织消化液 (500X)	100-237	50 mL	4°C, 12个月
MasterAim® Primary Enhancer	100-008	0.5 mL	-20°C, 12个月
MasterAim®抗粘附液	100-291	100 mL	4°C, 12个月
MasterAim®类器官冻存液	100-045	100 mL	-20°C, 12个月
DPBS平衡盐溶液 (无钙镁, 无酚红)	100-184	500 mL	AMB, 24个月
TrypLE	/	/	/
红细胞裂解液	/	/	/
基质胶	/	/	/

## MasterAim®猪小肠类器官完全培养基制备

1. 提前将MasterAim®猪小肠类器官基础培养基 (#100-333) 和MasterAim®猪小肠类器官添加物 (#100-334) 从-20°C取出，冰上放至融化。
2. 将猪小肠类器官添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为猪小肠类器官完全培养基。
3. 对于原代标本的培养，可以取10 mL配置好的完全培养基，加入100  $\mu$ L MasterAim® Primary Enhancer (#100-008)，即可使用。
4. 对于非原代标本的培养，使用MasterAim®猪小肠类器官完全培养基即可。

注：(1) 类器官完全培养基中不含有抗生素成分，请根据实验需求自行添加。

(2) 建议进行适当分装，-20°C储存，开封后，4°C保存使用，并于2周内用完，避免反复冻融。

## 猪来源的小肠类器官构建

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-PS (#100-184)，使用DPBS-PS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-PS反复轻轻洗涤肠段至清洗液澄清。

\*如新鲜标本无法立即处理，组织标本应浸泡在组织保存液中，建议使用MasterAim®组织运输保存液 (#100-032)，冰上运输尽快处理。

2. 准备装有15 mL预冷DPBS-PS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三次，静置后轻轻吸出上清液，加入15 mL预冷DPBS-PS。重复上述步骤15-20次，直至上清液澄清。

4. 消化液配制：准备50 mL DPBS-PS，加入100 $\mu$ L MasterAim®肠类器官组织消化液 (500X) (#100-237)，现配现用。

5. 清洗后的组织200 g，离心3 min，弃上清，向组织沉淀中加入MasterAim®肠类器官组织消化液25 mL (1x)，摇床室温消化15 - 20 min，取部分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）

6. 加入4 mL DPBS-PS终止消化，200 g，离心3 min，弃上清，加入DPBS-PS重悬。

7. 准备一支装有70  $\mu$ m滤网的50 mL洁净离心管，使用移液管将混悬液通过70  $\mu$ m滤网过滤（可适当倾斜或轻微碰撞过滤器，使其快速过滤），以去除多余的绒毛，收集滤液。丢弃滤网并将滤液放置于冰上，标记为“馏分1”。重复上述步骤，将组织片段重悬于10 mL预冷DPBS-PS中，滤网过滤后获得馏分2 - 4，放置于冰上。

8. 在2 - 8°C下将各馏分290 g，离心5 min，弃上清液，将沉淀保留在每个管中。将各试管中的沉淀重悬于10 mL预冷DPBS-PS中，分别转移到干净的15 mL离心管中，并标记对应的馏分序号，在2 - 8°C下200 g，离心3 min，弃上清，保留肠隐窝沉淀。

9. 用1 mL DPBS-PS重悬隐窝沉淀，取混悬液镜下观察，计数10  $\mu$ L样本中隐窝数量后，离心管于200 g，离心5 min，弃上清。使用MasterAim®类器官培养基将隐窝密度重悬，按照 $0.8-2 \times 10^4$  个/mL的密度重悬于基质胶（BME或Matrigel）中（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。将基质胶重悬后的隐窝接种至37°C预热的细胞培养板中，注意枪尖不要接触至培养板的底部，胶滴应接种于培养孔的中心位置，若是24孔板，则每孔可接种50  $\mu$ L。

10. 将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。向每个孔中轻轻地加入500  $\mu$ L于37°C预热的MasterAim®猪小肠类器官完全培养基。

11. 将无菌DPBS-PS加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度，将培养板的盖子盖上，并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下进行培养。

12. 镜下观察类器官的培养情况，3 h后可观察隐窝是否存活。建议适时进行换液或传代（一般建议每2 - 3天进行全换液或半换液）。一般在接

种2 - 4 天开始出芽，5 - 7 天变成多裂状。在传代前，确保大部分类器官的大小大于100  $\mu\text{m}$ 。

## 猪来源的小肠类器官传代

1. 将培养类器官的24孔板取出，用移液器去除培养基，加入2 mL TrypLE，使用1 mL枪头将胶滴吹散。可根据类器官量适量增加TrypLE的体积) 室温消化5 - 8 min，或37°C培养箱消化5 min (避免消化过度，影响类器官生长)。
2. 将消化后的类器官悬液转入6 mL预冷的DPBS-PS中，可润洗培养孔 (需回收)，保证培养孔中的类器官都被收集起来。290 g，离心5 min，弃上清，收集类器官。
3. 隐窝计数：将离心收集的类器官沉淀重悬于1 mL DPBS-PS中，通过自动细胞计数板或者手动计数板计出隐窝的个数，一个胶滴大约需要200 - 500隐窝(若隐窝状态良好可进行1:3传代，若状态较差可进行1:1传代)。计数后，290 g，离心5 min，弃上清，收集类器官。
4. 将获取的隐窝沉淀根据计数结果重悬于基质胶 (Matrigel) 中。吸取50  $\mu\text{L}$ ，并加入到提前预热的24孔板 (提前预热半小时) 的中心部位。(不要将类器官接种到最外侧的孔中。)
5. 将接种好的培养板放置在37°C下静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。
6. 使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入500  $\mu\text{L}$ 于37°C预热的MasterAim®类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将适量DPBS-PS 加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。
7. 盖上培养板板盖，并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下进行培养。并每2-4 天进行一次培养基换液，观察生长情况，并进行拍照记录，直至下次传代。

注：所有接触类器官的移液管、枪头等类器官培养耗材均需进行润洗，以免在传代过程中出现样本的流失，推荐使用MasterAim®抗粘附液 (#100-291) 效果更佳。

## 猪来源的小肠类器官冻存

1. 观察类器官生长情况，当类器官活性良好，类器官大小大于200  $\mu\text{m}$ ，每个胶滴内隐窝数不低于150个时，即可进行冻存，类器官冻存量约为500个/管，若类器官数量较多时应注意分管冻存。
2. 小心吸走培养孔中的培养基，加入适量 TrypLE，吹散胶滴，37°C培养箱，孵育3 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至40 - 60  $\mu\text{m}$ 大小时，即可加入2-3倍消化液体积DPBS-PS终止消化，200 g，离心5 min，弃上清；加入3 mL DPBS-PS重悬，200 g，离心5 min，弃上清。
3. 加入MasterAim®类器官冻存液 (#100-045) 重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，每管1 mL；将冻存管置于程序降温盒中，进行梯度降温：4°C (20 min)，-20°C (2 h)，-80°C (过夜)，最后转移至液氮罐。

### 【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。