MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版）

MasterAim® Mouse Intestinal Organoid Complete Medium（Budding）

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®小鼠小肠类器官完全培养基适用于小鼠小肠组织来源类器官（出芽版）的构建、维持培养及传代扩增，可以从小鼠小肠组织快速生成小肠类器官（出芽版），极大程度维持了来源于体内小肠组织的特征，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

产品信息

MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基包括：小鼠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®小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版）	10-100-374	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®小鼠小肠类器官基础培养基（出芽版）	100-375	95 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®小鼠小肠类器官培养基添加物（出芽版）	100-376	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；4°C，2周
MasterAim®肠类器官组织消化液（250X）	100-552	50 mL	AMB，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	4°C，12个月
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
Pen-Strep Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
MasterAim® Express 酶（1X），含酚红	100-546	100 mL	4°C，24个月
红细胞裂解液	100-547	100 mL	4°C，24个月
Matrigel，GFR	Corning,356231	10 mL	-20°C，24个月

MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®小鼠小肠类器官基础培养基（出芽版）（#100-375）**和 **MasterAim®小鼠小肠类器官培养基添加物（出芽版）（#100-376）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基配制：将小鼠小肠类器官培养基添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版）。

3. 原代标本培养：取10 mL配置好的完全培养基（出芽版），加入100 µL **MasterAim®Primary Enhancer（#100-008）**，即可使用。

4. 维持培养：对于非原代标本的培养，使用MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版）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，推荐使用Pen-Strep Solution，工作浓度为1%。

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

（3）所有移液管、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。

小鼠来源的小肠类器官构建

1. 样本处理：将组织标本转移到10 cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入10 mL **DPBS-PS**，去除肠道外部的膜、血管和脂肪。

注：DPBS-PS为添加1% Pen-Strep Solution的**DPBS(#100-184)**。*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. 样本清洗：使用1 mL枪头插入肠腔，推出小肠内容物，用清洗液冲洗小肠内部3-5次，直至将小肠内部残物全部冲出；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。

3. 消化前样本准备：用镊子夹住肠段一端，悬挂于离心管口，将肠段剪成1 - 2 mm小段，使肠段落入管内液体中。用抗粘附液预先润湿10 mL移液管，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，重新加入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24.9 mL DPBS-PS，加入100 µL **MasterAim®肠类器官组织消化液（250X）（#100-552）**，现配现用。

5. 组织消化：清洗后的组织300g，离心5 min，弃上清，向组织沉淀中加入25 mL **MasterAim®肠类器官组织消化液（1X)**，冰上消化30 min，期间每隔5 min可上下摇晃离心管，每隔10 min取部分组织显微镜下观察肠隐窝情况，若能明显看到组织内部隐窝处于较松软状态，且组织悬液中也含有少量隐窝，即可终止消化（注：不要消化到单细胞状态，该步骤的消化时间可能会根据情况进行调整）。

7. 终止消化：加入10 mL DPBS-PS终止消化，300g，离心5 min，弃上清。

8. 收集细胞：准备一支装有70 µm滤网的50 mL洁净离心管(用抗粘附液预先润洗)，将组织片段重悬于10 mL预冷DPBS-PS中，使用移液管(用抗粘附液预先润洗)将混悬液通过70 µm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。

9. 选取馏分：在2 - 8℃下将各馏分300g，离心5 min，弃上清液，将沉淀保留在每个管中。将各离心管中的沉淀重悬于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。镜下观察细胞富集情况，选取合适的馏分，在2 - 8℃下300g，离心5 min，弃上清，保留肠隐窝沉淀。

10. 接种：用1 mL DPBS-PS 重悬隐窝沉淀，取混悬液镜下观察，计数10 µL样本中隐窝数量后，离心管于200g，离心5 min，弃上清。

11. 根据计数结果，使用MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基 (出芽版) 将隐窝沉淀重悬，制成隐窝悬液，再加入2倍体积的基质胶混合均匀。将基质胶重悬后的隐窝（推荐接种密度为3 - 4 隐窝/µL，可按照实验需求进行调整），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 μL。将接种好的培养板放置在37℃培养箱中静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。

12. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入600 μL于37℃预热的MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版），请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

13. 培养：盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。镜下观察类器官的培养情况，3 h后可观察隐窝是否存活，一般在接种2 - 4 天开始出芽，5 - 7 天变成多裂状。建议适时进行换液或传代（一般建议每3 - 4天进行全换液或半换液）。

小鼠来源的小肠类器官传代

1. 传代标准：在传代前，确保大部分类器官的直径大于100 μm。传代窗口期一般为7 - 10天，传代比例一般为1:4或1:6。

2. 消化：将培养类器官的24孔板取出，用移液器去除培养基，每孔加入0.5 mL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红（#100-546）**，使用1 mL枪头将胶滴吹散（可根据类器官量适量增加**MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**的体积）。37℃培养箱消化5 - 10 min（注：不要消化到单细胞状态，避免消化过度，影响类器官生长），显微镜下观察类器官消化情况，待大部分类器官消化至20 - 50 μm大小时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

3. 收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润洗离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）重悬，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后，300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 接种：以24孔板为例，参考接种密度2 - 4 隐窝/μL（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。首先根据计数结果，使用完全培养基将获取的类器官沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶，充分混合。吸取50 μL细胞悬液，并加入到37℃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）。将接种好的培养板放置在37℃培养箱中静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。

6. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入600 μL于37℃预热的MasterAim®小鼠小肠类器官完全培养基（出芽版），请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

7. 培养：盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。每3 - 4天进行一次全换液，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。

小鼠来源的小肠类器官冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分类器官的直径大于100 μm，数量不低于300个时，即可进行冻存。

2. 消化：小心吸走培养孔中的培养基，每孔加入0.5 mL **MasterAim® Express 酶（1X），含酚红**，吹散胶滴，37℃培养箱消化5 - 10 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至20 - 50 μm大小时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

3. 收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润洗离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，弃上清。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）重悬，通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞个数。计数后，300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 冻存：根据类器官计数结果，加入适量**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，推荐每管冻存300个类器官（细胞量约为$3*10^5$个），冻存数量过少可能会影响类器官的复苏，每管1 mL，若细胞量较多时应注意分管冻存；将冻存管置于程序降温盒中，-80℃过夜保存（或进行梯度降温，4℃放置20 min，-20℃放置2 h，-80℃放置过夜），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。