# 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

艾名医学 AIMINGMED

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（250X） | 100-552 | 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℃取出，4℃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 µL **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，推荐工作浓度为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。

## 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100µL **MasterAim®肠类器官组织消化液（250X）（#100-552）**，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 µm滤网的50 mL洁净离心管，使用移液管将混悬液通过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。

8. 在2 – 8℃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℃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 µl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3-4个隐窝/µL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℃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 µL。

10. 将接种好的培养板放置在37℃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600 µL于37℃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℃和5%CO2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 μm。

## 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℃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100 - 200隐窝(若隐窝状态良好可进行1:3或1:6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 μL，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℃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600 μL于37℃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℃和5%$CO_2$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 μM，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℃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 μm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，-80℃过夜保存（或进行梯度降温，4℃放置20min，-20℃放置2h，-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。