MasterAim®人结肠类器官完全培养基

MasterAim® Colorectal 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®人结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结肠组织的特征。MasterAim®人结肠类器官完全培养基适用于人结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®人结肠类器官完全培养基包括：人结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®人结肠类器官完全培养基	10-100-548	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®人结肠类器官基础培养基	100-549	98 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®人结肠类器官培养基添加物	100-550	2 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®组织消化 I	100-047	100 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®组织消化液II	100-048	50 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®Primary Enhancer（1000X）	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
Pen-Strep Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
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®人结肠类器官完全培养基制备

1. 提前将**MasterAim®人结肠类器官基础培养基（#100-549）**、**MasterAim®人结肠类器官添加物（#100-550）**从-20℃取出，冰上放至融化。

2. 将人结肠类器官添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为人结肠类器官完全培养基。

3. 对于原代标本的培养，可每 10 mL 配置好的完全培养基加入终浓度为0.5X-1X的**MasterAim®Primary Enhancer（#100-008）**。

4. 对于非原代标本的培养，使用MasterAim® 人结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。

人来源的结肠类器官构建

1. 样本处理：将肠段组织标本转移至10 cm培养皿中（培养皿置于冰盒上），使用剪刀、镊子去除肠道组织多余脂肪，加入10 mL预冷**DPBS-PS**，使用DPBS-PS 轻轻冲洗肠段。

*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）**，4℃运输尽快处理。DPBS-PS为添加1% Pen-Strep Solution的**DPBS(#100-184)。**

2. 样本清洗：准备装有10-15 mL预冷DPBS-PS的50 mL离心管，将结肠组织转移至离心管中，反复涮洗10次以上，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3.消化前样本准备：清洗完成后，将结肠组织分批次转移至1.5 mL EP管中进行剪切，剪切至0.5 - 1 mm^3的大小（剪切时可加入适量**MasterAim组织消化液Ⅰ（#100-047）**），使用MasterAim组织消化液Ⅰ将切碎的组织转移至15 mL的离心管（用抗粘附液预先润洗）中。

4. 消化阶段Ⅰ：加入4 mL MasterAim组织消化液Ⅰ（根据结肠组织大小可适当调整用量），37℃水浴锅震荡消化50 - 70 min，消化35分钟可取出观察组织消化情况，后续每隔15 min观察是否有大量的细胞漏出，该步骤的消化时间可能会根据组织的情况进行调整。当有细胞大量漏出，且组织块中大部分细胞已经被消化出来时，即可终止消化。

5. 终止消化阶段Ⅰ：加入2倍MasterAim组织消化液Ⅰ使用体积的DPBS-PS终止消化，300 g，离心5 min，弃上清。

6. 消化阶段Ⅱ：加入3-5 mL **MasterAim组织消化液Ⅱ（#100-048）**，37℃水浴锅震荡消化10 - 15 min。镜下观察到大部分细胞呈小细胞团块（20-30个单细胞组成的小细胞团块）即可终止消化阶段Ⅱ（注：不要消化到全部呈单细胞状态）。

7. 终止消化阶段Ⅱ：加入2倍MasterAim组织消化液Ⅱ使用体积的DPBS-PS终止消化，300 g，离心5 min，弃上清。

8. 收集细胞：加入10 mL DPBS-PS对细胞进行重悬，使用**MasterAim抗粘附液（#100-291）**预先润洗一个100 μm的细胞筛网和50 mL离心管，将细胞悬液使用该细胞筛网过滤，将滤液进行离心，300g，5 min，弃上清。

9. （可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色），加入红细胞裂解液进行裂红（具体方法参考产品说明书）后，300 g，离心5 min，弃上清。

10. 计数：使用1 mL DPBS-PS重悬细胞沉淀，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后300 g，离心5 min，去上清，收集细胞沉淀。

11. 接种：按照4000 - 6000 cells/μL的密度接种（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细胞沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶，充分混合，将重悬后的细胞悬液接种至37℃预热的细胞培养板中。注意枪尖不要接种至

培养板的底部，胶滴应接种于培养孔的中心位置（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。

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®人结肠类器官完全培养基，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-PS。

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，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）。一般在接种3 - 4天后，可观测到类器官形成。

人来源的结肠类器官传代

1. 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（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30 - 40 µm大小时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

2. 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），使用适量DPBS-PS清洗孔板2-3遍，保证培养孔中的类器官都被收集起来。300 g，离心5 min，去上清，收集类器官。

3. 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，300 g，离心5 min，去上清，收集类器官。

4. 接种：以24孔板为例，参考接种密度400 cells/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℃下静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。

5. 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®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。

6. 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。

人来源的结肠类器官冻存

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，，每个胶滴内类器官数量不低于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（#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（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30 - 40 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），使用适量DPBS-PS清洗孔板2-3遍，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重悬沉淀，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：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，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；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。