小鼠结肠类器官完全培养基

货号： ZQ-ORG081

【产品简介】

本产品专用于小鼠正常结肠组织来源的结肠类器官原代分离与稳定培养。支持小鼠结肠类器官的构建、扩增、冻存及复苏，能够稳定保留正常结肠上皮的细胞组成与隐窝结构特征，适用于肠道发育生物学、肠道疾病模型构建及药物筛选等科研目的。

组分	规格（100mL/500mL）	储存条件	运输条件	有效期
小鼠结肠类器官基础培养基 A	95mL/475mL	2 ~ 8℃，避光	冰袋	9 个月
小鼠结肠类器官添加物 B（20×）	5mL/25mL	-20℃，避光	干冰	9 个月
小鼠结肠类器官添加物 C（1000×）	100uL/500uL	-20℃，避光	干冰	9 个月

【使用方法】

一、小鼠结肠类器官完全培养基制备说明

1.试剂解冻：提前将小鼠结肠类器官基础添加物 B 和培养基添加物 C 置于冰上或 4℃冰箱缓慢融化。使用前轻柔颠倒混匀（切勿剧烈涡旋）。

2.无菌混合：在超净工作台中，将培养基添加物 B 和培养基添加物 C 分别按照稀释倍数加入 A 瓶中，充分混匀。此时，您已得到小鼠结肠类器官完全培养基。注：完培已包含双抗，如无特别需要不用额外添加。

3.提高类器官建成率：在建系/传代/复苏首日可每 10 mL 配置好的完全培养基中加入 10 μL 的 Starter 增强剂（ZQ-ORG019）。类器官成熟稳定生长后无需添加。

4.分装储存：建议按日常用量分装（如 10 mL/管），置于-20℃保存。开封后 4℃请于 2 周内用完，避免反复冻融。

二、小鼠结肠类器官构建

1.实验准备

(1) 基质胶置于冰上或 4℃提前解冻，每个胶滴 30~40 μL，根据所需种板数量进行适当调整用量。

(2) 提前将接种用的培养板及小鼠结肠类器官完全培养基置于 37℃预热 30 min。

2.样本处理（若新鲜样本无法立即处理或需要转运，请将组织样本浸没于组织样本保存液（ZQ-ORG011）中保持 2~8℃，48 h 内处理）

(1) 取材：采用颈椎脱臼法或其他符合伦理的人道方式处死小鼠。将小鼠仰卧固定，腹部消毒。

(2) 分离：用手术剪和镊子沿腹中线剪开皮肤和腹膜，暴露腹腔，在小鼠腹腔内找到结肠，用镊子轻轻提起，剪下完整结肠组织。

(3) 清洗：用手术剪将小鼠结肠组织剪切小块，组织清洗液（ZQ-ORG021）冲洗组织 3~5 次，至清洗液澄清，弃去清洗液。注：如有脂肪或系膜组织，应提前去除。

3.组织消化与收集（后续步骤均需要使用类器官防黏附润洗液（ZQ-ORG004）润洗枪头、移液管和离心管）

(1) 清洗：用手术剪将组织样本剪切小块，组织清洗液（ZQ-ORG021）冲洗样本 3~5 次，至清洗液澄清，弃去清洗液。

(2) 消化前准备：将组织转移至 60 mm 培养皿中，加入 50 μL 的胃肠组织消化液（ZQ-ORG015）冰上用无菌的组织剪将组织剪碎至 0.5~1 mm^3 左右大小碎块，将切碎的组织转移至防黏附润洗液润洗过的 15ml 离心管。

(3) 组织消化：剪碎后的组织中加入 5 mL 的胃肠组织消化液，4℃消化 30min。每隔 10 min 上下摇晃离心管。镜下观察，直至看到大部分细胞呈团块状（勿消化成单细胞状态），即可终止消化。

(4) 终止消化：加入 5~10 mL 类器官清洗液（ZQ-ORG017），终止消化。300 × g 离心 3 min，弃上清。

(5) 隐窝分离：加入 10 mL 类器官清洗液重悬细胞，用 10 mL 移液管反复吹打 30-50 次，使隐窝从组织碎片中释放出来。静置 1-2 分钟，使大块组织沉降。

(6) 细胞筛过滤：收集上清液（富含隐窝）过 100 μm 细胞筛网，滤液收集至新的离心管中；沉淀可重复吹打 2-3 次以收集更多隐窝。将滤液以 4℃、300 × g 离心 5 min，弃上清，获得隐窝沉淀。

(7) 红细胞裂解（可选）：观察沉淀，若沉淀较红则需进行红细胞裂解。加入 2 mL 红细胞裂解液（CSP212）重悬细胞，室温静置 3 min。加入 5 mL 类器官清洗液重悬细胞，终止裂解。300 × g 离心 3 min,弃上清，收集沉淀。

4.种板培养

(1) 计数：取 1 mL 类器官清洗液重悬细胞，利用细胞计数仪或手动计数板进行计数。取 10 μL 悬液与等体积台盼蓝混匀并加入计数板，置于显微镜或细胞计数仪观测和分析活细胞比例。300×g 离心 3 min，弃上清，收集组织细胞沉淀。

(2) 重悬：用预冷的移液器枪头，加入适量基质胶重悬沉淀。基质胶的用量为每个胶滴 30~40 μL。重悬过程应迅速（不超过 30 s）、轻柔避免产生气泡。推荐重悬密度为每个胶滴含有 1000~1500 个细胞团。基质胶体积比应不低于 70%以保证培养过程中基质胶的结构稳定。注：此步骤应迅速完成。

(3) 点胶：用预冷的移液器，吸取 30~40 μL 基质胶-小鼠结肠细胞团混合物，垂直、快速地接种在预热的培养板孔中央。确保枪头尖端不接触孔底。重复此操作，为每个孔点胶。

(4) 固化：将培养板小心转移至培养箱中，正置孵育 3 min，随后倒置孵育 20~30 min，使基质胶聚合成固体圆顶，以防组织团沉降接触孔底。

(5) 补液：基质胶固化后，从培养箱中取出培养板。沿着 24 孔板孔壁一侧，缓慢地向每个孔中加入 500 μL 已配制好的完全培养基（完全浸没胶滴）。注：切勿将培养基直接吹打在基质胶穹顶上，以免使其破裂。

5.类器官培养与维护

(1) 培养：将培养板放入 37℃，5% CO_2的恒温培养箱中培养。

(2) 观察：每天在显微镜下观察类器官的生长情况并拍照记录，一般在接种 3-4 天后，可观测到类器官形成。

(3) 换液：每 2~3 天更换一次培养基。用移液器小心吸弃旧培养基（同样沿孔壁操作）。加入 500 μL 新鲜的完全培养基。

三、小鼠结肠类器官传代培养

1.破胶：加入 1 mL 预冷的类器官清洗液，用润洗过的枪头轻轻吹打，将基质胶穹顶吹散、溶解。将悬液收集至离心管，300 × g 离心 5 min，弃上清，注意不要吸到底部沉淀。

2.消化：加入 3mL 类器官消化液（若类器官数量较多，可适当增加类器官消化液用量），用润洗过的枪头轻轻吹打底部沉淀。将离心管置于 37℃，5% CO_2的恒温培养箱中消化，每隔 5min 显微镜下观察类器官消化情况，待大部分类器官消化至 10-50 个细胞团（避免消化过度，影响类器官生长）时，加入 2 倍消化液体积类器官清洗液，终止消化。

3.收集与种板：离心管 300 × g 离心 3 min，弃上清，收集组织细胞沉淀。剩余步骤同“种板培养”（2）-（5）。

注意传代节点：当类器官生长旺盛（直径＞100 μm）、密度过高（通常培养 5-10 天后）或培养基明显变黄时，需要进行传代。传代比例 1:2~1:3。

四、类器官冻存

观察类器官生长情况，确保类器官活性良好，多数类器官直径＞100 μM。使用 1 mL 类器官冻存液（ZQ-ORG002）重悬类器官沉淀，重悬动作需轻柔。将混悬液转入冻存管，立即放入程序降温盒。将降温盒置于-80℃冰箱过夜。长期储存：24 小时后，迅速将冻存管转移至液氮中长期保存。切勿在-80℃长期存放，否则会导致活性显著下降和复苏失败。

五、类器官复苏

1.快速融化：从液氮罐中取出冻存管，迅速投入 37℃水浴锅中。轻微摇动冻存管，使其在 1-2 min 内迅速融化，待管内尚存一小块冰晶时即可取出。

2.清洗与稀释：在超净工作台中，用润洗过的枪头将冻存管内的类器官悬液转移至防黏附润洗液润洗过的含有 5~10 mL 预冷类器官清洗液的 15 mL 离心管中。轻轻吹打混匀，使冻存液得到充分稀释。

3.离心收集：4℃，300 × g 离心 3 min。小心吸弃上清液，重复清洗并离心 1 次。

4.重悬与接种：参照“种板培养”步骤。

5.启动培养：沿孔壁缓慢加入 500 μL 已配制的小鼠结肠类器官完全培养基。建议在复苏后的首个 48 h 每 1 mL 配置好的完全培养基中加入 1uL Starter 增强剂，降低复苏初期的细胞应激，提高类器官的生长速度。

【注意事项】

1. 本品仅限科研实验用途，不用于临床诊断及治疗;
2. 操作过程需遵循无菌规范，避免污染，操作时需做好个人防护，身着合适的实验服并佩戴一次性口罩和手套；
3. 组织样本在采集过程中应遵循全程冰上操作；运输应使用组织运输保存液并始终保持 4℃运输环境。样本处理时应使用预冷的处理试剂以维持细胞活性；
4. 请按标签所示温度进行保存，不宜长时间置于室温。建议将培养基进行小规格分装，使用时解冻，以保障活性与效果；
5. 本产品培养结果会受到组织采集过程、组织样本质量等因素影响；同时也受到技术人员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术发展局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况；
6. 请在产品有效期内使用。

【企业质量体系】

上海中乔新舟生物有限公司已取得 ISO 9001、GBT13485 医疗器械质量管理体系认证，全流程质量管控合规可靠。

【文献奖励】

科研论文引用中乔新舟产品并成功见刊，可享文献奖励。

- 发表[中文论文]请标注：小鼠结肠类器官完全培养基(ZQ-ORG081)由**上海中乔新舟生物科技有限公司**提供;
- 发表[英文论文]请标注：Mouse Colon Organoid Complete Medium(ZQ-ORG081) were kindly provided by **Shanghai Zhong Qiao Xin Zhou Biotechnology Co.,Ltd.”或“ZQXZbio”**

获取详情方式

- 关注【中乔新舟】公众号，在菜单栏点击**快速查询**，选择**文献奖励**，即可查看文献奖励详细规则;
- 咨询官方客服，获取文献奖励详细规则。

****活动最终解释权归中乔新舟生物所有****

专注于细胞培养
ZQXZBIO® 中乔新舟®