猪小肠类器官增殖培养试剂盒

货号：PN100201

产品描述

猪小肠类器官增殖培养基是一种可应用于猪小肠类器官扩增的完全培养基。在细胞外基质存在的条件下，培养基所含的特有组分能促使猪小肠细胞迅速生长成由猪小肠干细胞和猪小肠祖细胞组成猪小肠类器官，类器官形成过程平稳且迅速，为后续基于猪小肠类器官生理功能、疾病研究提供支持，并助力精准医学的蓬勃发展。

产品组分

产品名称	货号	规格	储存温度&保质期
猪小肠类器官增殖基础培养基 A	PN100201-A100	100 mL	2-8℃, 12 个月
猪小肠类器官增殖培养基添加物 B (50x)	PN100201-B1	1 mLX2	-20℃，避免反复冻融，12 个月
猪小肠类器官增殖培养基添加物 C (250x)	PN100201-C04	0.4 mL	-20℃，避免反复冻融，12 个月
猪小肠类器官增殖培养基添加物 D (2000x)	PN100201-D005	0.05 mL	-20℃，避免反复冻融，12 个月

产品应用

使用无菌操作技术配制猪小肠类器官增殖完全培养基。以下是准备 50 mL 完全培养基操作流程，如所需量不同，可相应调整用量。

1.冰上解冻猪小肠类器官增殖培养基添加物 B (50x)、猪小肠类器官增殖培养基添加物 C (250x)以及猪小肠类器官增殖培养基添加物 D (2000x)。

注意：1、解冻后，建议将类器官培养基添加物 B (50x)、类器官培养基添加物 C(250x)和以及猪小肠类器官增殖培养基添加物 D (2000x)分别分装后-20℃ 保存取用，避免反复冻融。

2、分装时需待溶液完全融化，确认其澄清、透明、无不溶物（如有上述异常可将溶液置于室温/37°C 并轻轻吹打），充分混匀后分装。

3、每次使用前也应注意将溶液完全融化、充分混匀。

2.将 1 mL 猪小肠类器官增殖培养基添加物 B (50x)、 0.2 mL 猪小肠类器官增殖培养基添加物 C (250x)和以及 0.025 mL 猪小肠类器官增殖培养基添加物 D (2000x)加至 48.775 mL 猪小肠类器官增殖基础培养基 A 中，充分混匀，配置成 50 mL 猪小肠类器官增殖培养基完全培养基。

注意：配制后的猪小肠类器官增殖培养基完全培养基可在 2-8°C 储存，建议在一周内使用。

使用时可选择性在猪小肠类器官增殖完全培养基中加入真菌或者细菌抗生素。

猪小肠类器官原代建立

1.取样：将获得的猪小肠组织置于**组织保存液（货号 BM1002）**中于 2-8℃储存，并在指定时间内处理，进行类器官建立。

2.清洗：去除组织保存液，将取下的猪小肠组织置于 2-8℃ 预冷的 PBS 中，用镊子去除小肠组织外表面的肠系膜、脂肪组织和淋巴结。接着用 10mL 注射器吸取 2-8℃ 预冷 PBS 冲洗肠道内部 2-3 次，以洗掉残留的粪便及粘液。最后用剪刀纵向剪开小肠，放入装有 10mL 2-8℃ 预冷 PBS 的 15mL 离心管中，上下振荡，清洗肠道，重复 3-10 次，直至 PBS 明显澄清。

3.消化：将 2 中完成清洗的猪小肠肠腔向上打开，然后用手术刀片轻轻刮去肠绒毛后剪碎至 2-5 mm 的小碎片，然后根据组织块大小加入 4-10 mL 用 2-8℃ 预冷 PBS 稀释至 5 mM 的 EDTA，置于 4℃ 冰箱静置消化 30-50 min。

4.清洗：用镊子将 3 中完成消化的猪小肠组织转移至装有 10 mL 2-8℃ 预冷 PBS 的 15mL 离心管中。接着用移液器反复吹打消化后的肠块，直至 PBS 明显浑浊。

注意：①提前用**抗黏附润洗液（货号 BM1006）**润洗 10mL 移液管，以免肠块粘在移液管壁上。②吹打完成后可吸取少量液体于显微镜下观察，以确保消化状态。

5.过滤：将 4 中所得悬液用 70 μm 滤网过滤至 15 mL 管，滤液即为分离得到的隐窝。将过滤所得的悬液以 250 g 离心力离心 3min 后弃上清，再用 1mL 2-8℃ 预冷的 PBS 重悬后转移到 1.5mL EP 管。

注意：滤网需要提前使用**抗黏附润洗液（货号 BM1006）**润洗

6.细胞接种：将 5 中的细胞悬液以 250 g 离心力离心 3min 后弃上清，置于冰上预冷，加入适量**类器官专用基质胶(货号 BM1001)**混匀（建议细胞量：20-40 个隐窝/μL），按照每孔 30-40μL 将细胞悬液点入 24 孔板中。将孔板置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中 15-30min，使基质胶凝固。待基质胶凝固完成，向每孔加入 500μL 猪小肠类器官增殖完全培养基。

注意：不要将培养基直接添加到基质胶胶滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。

7.培养：将上述培养板置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养，每 3 天换液，观察，拍照记录。

注意：基质胶体积/总体积≥70%

猪小肠类器官传代培养

8.收集：使用经**抗黏附润洗液（货号 BM1006）**润洗的 1mL 枪头小心刮取类器官，并将其转移至 1.5mL EP 管中。之后将收集到的液体以 300 g 离心力离心 3min 后弃上清。

注意：弃上清时请保留残留基质胶，防止带走未脱离基质胶的类器官。

9.消化：在上述 8 中所得的沉淀中加入 1mL 2-8℃预冷的 PBS，用 1mL 移液器上下吹打后，取少量悬液镜检观察类器官状态。根据类器官情况，可进行多次吹打，直至类器官悬液中有大量隐窝脱离形成的碎片。

10.清洗：将上述 9 中所得液体以 300 g 离心力离心 3min 后弃上清。PBS 重悬清洗 1 次。

11.细胞接种：完成清洗后将细胞悬液以 300 g 离心力离心 3min 后弃上清，置于冰上预冷，加入适量**类器官专用基质胶(货号 BM1001)**混匀（建议细胞量：200-2000 个/μL），按照每孔 30-40μL 将细胞悬液点入 24 孔板中。将孔板置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中 15-30min，使基质胶凝固。待基质胶凝固完成，向每孔加入 500μL 猪小肠类器官增殖完全培养基。

12.培养：将上述培养板置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养，每 3 天换液，拍照并观察记录。

猪小肠类器官的分化

13.待传代后新长出的猪小肠类器官直径超过 100 μm 后即可可进行分化实验。

14.分化前需要吸去 24 孔板培养孔中的**猪小肠类器官增殖完全培养基（货号 PN100201）**，并加入 500 μL **猪小肠类器官分化培养基（货号 PN100202）**。

分化通常需要 4 天以上时间，分化期间每隔 2 天更换一次分化培养基，分化完成后可进行后续实验。

注意事项

1、产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。

2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

3、本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。