

BiozellenCM® 人肠道类器官培养基
(BiozellenCM® Human Intestinal Organoid Growth Medium)

Catalog No B-MN-00003-100、B-MN-00003-500

Specification 100ml、500ml

一、产品介绍

BiozellenCM® 人肠道类器官培养基是一种化学成份明确的无血清培养基，用于从肠道组织样本建立人肠道类器官。人肠道类器官包含LGR5+干细胞、肠上皮细胞、杯状细胞和少量的肠内分泌细胞。因此，类器官在结构、细胞类型组成和自我更新等方面具有肠道上皮的生物特征，可用于肠道疾病模型，药物测试，以及肠道上皮功能等研究。

二、产品信息

组 成	货 号	规 格	储存温度&质保期
BiozellenCM® 人肠道类器官基础培养基	B-MN-00003	100 mL/500mL	2-8 °C，12个月
BiozellenCM® 人肠道类器官培养基添加剂 A (50×)	B-MN-00003-A	2 mL/10mL	-20°C，12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 人肠道类器官培养基添加剂 B (50×)	B-MN-00003-B	2 mL/10mL	-20°C，12个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 人肠道类器官培养基添加剂 C (100×)	B-MN-00003-C	1 mL/5 mL	-20°C，12个月，避免反复冻融

三、用前须知

1. 首次使用时，冰上解冻人肠道类器官培养基添加剂A、B和C，解冻后的添加剂或一次性配置并使用，或分装于-20°C冻存（不超过12个月）；

2. 人肠道类器官扩增培养基配置：按比例将 A、B 和 C 添加至人肠道类器官基础培养基中，混匀后置于 2-8 °C 保存，建议 2-3 周内使用。

（以 10mL 为例：200μL 添加剂 A + 200μL 添加剂 B + 100 μL 添加剂 C + 9.5 mL 人肠道类器官基础培养基）

3. 人肠道类器官维持培养基配置：按比例将 A 和 B 添加至人肠道类器官基础培养基中，混匀后置于 2-8 °C 保存，建议 2-3 周内使用。

（以 10mL 为例：200μL 添加剂 A + 200μL 添加剂 B + 9.6 mL 人肠道类器官基础培养基）。

四、需要但不包含的其他配套使用试剂

名 称	货 号	规 格
组织保存液	B-R-00005-100	100 ml/瓶
BiozellenGel 基质胶，低因子，无酚红	B-P-00007-10	10 ml/瓶
类器官传代消化液	B-R-00002-100	100 ml/瓶
类器官冻存液	B-R-00006-100	100 ml/瓶
PBS (含5mM EDTA) 缓冲液	-	-
无菌PBS (1×)	-	-
100μm滤网	-	-

五、人肠道类器官构建操作步骤

- 1. 组织运输：**将采集的组织放入装有组织保存液（B-R-00005-100）的采集管中，充分浸没并于低温（建议冰上）迅速运至实验室。
- 2. 组织前处理：**将组织置于6孔板中，加入PBS（含1%双抗和两性霉素B）漂洗5-10次。
- 3. 组织剪碎：**将剩余组织转移至10 cm的无菌培养皿中，剪碎至肉糜状（1-3 mm³）后移入50 mL离心管中。
- 4. 组织解离：**加入25 mL含5mM EDTA的PBS溶液中，冰上孵育30 min。
备注1：为充分解离，建议将冰盒放置于摇床上震荡解离（20rpm）。
- 5. 碎片沉降：**将离心管室温沉降约1min，待组织碎片沉降后，小心吸弃上清（无需吸干所有上清，可保留少量液体浸没组织碎片）。
- 6. 隐窝富集：**吸取5mL PBS缓冲液，用1mL移液枪反复吹打混匀（不少于10次），静置待组织碎片沉降到离心管底部。收集上清至一新的15mL离心管中。
- 7. 隐窝富集：**重复上述步骤1-2次（吸取5mL PBS缓冲液，用1mL移液枪反复吹打混匀（不少于10次），静置待组织碎片沉降到离心管底部。收集上清至上述新的15mL离心管中）。
- 8. 过滤：**将收集的15mL隐窝富集液通过100 μm细胞滤网过滤至新的50mL离心管中。
- 9. 隐窝计数：**取1mL过滤后的隐窝悬液，在显微镜下计数。计数完成过后以300 g离心4 min，吸弃上清。
- 10. 细胞预冷：**取少量类器官培养基（30-50μL）重悬离心收集的隐窝，并放置于冰上预冷。
- 11. 细胞接种：**（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的BiozellenGel（B-P-00007-10，或Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以30μL/滴接种至预热细胞孔板中。
备注3：接种密度推荐50-300个隐窝/30uL（仅供参考，可按实验需求进行调整）。
备注4：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。
- 12. 基质胶固化：**接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37℃，5% CO₂培养箱内孵育10-15 min使基质胶凝固。
- 13. 培养：**待基质胶凝固后，加入准备好的人肠道类器官扩增培养基至浸没基质胶滴（需确认人肠道类器官培养基中已加入添加剂A、B和C）。
备注5：6孔板建议加入2.5mL，12孔板建议加入1.2 mL，24孔板建议加入600μL。
备注6：加液时建议沿侧壁缓慢加入，请勿将培养基直接加到胶滴上。
- 14. 换液：**将接种孔板转移至37℃，5% CO₂培养箱内培养。观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。

六、人肠道类器官传代操作步骤

- 1. 收集：**用1 mL移液枪头捣碎并刮取基质胶团，并将胶滴与培养基一起转入15 mL离心管中（如孔内有细胞存留，可另吸取PBS涮洗孔板并转入离心管中）。300 g离心4 min，小心吸弃上清。
备注1：建议待大部分类器官的大小大于100 μm传代（传代标准仅供参考，可按实验需求调整）。
备注2：为避免枪头粘附性损耗，可用抗粘附液（B-R-00007-100）润洗移液枪头。
- 2. 消化：**加入5 mL类器官传代消化液（B-R-00002-100）于37℃消化5-10 min，期间颠倒混匀若干次。
备注3：在消化过程中，可使用移液器吹打混匀帮助消化。也可实时取少量消化悬液于显微镜下观察消化情况，当观察到较多的单细胞或直径在50μm以下的细胞簇后，即可认为消化完成。
- 3. 终止消化：**加入5-10 mL DMEM/F12（10 % FBS），于300 g离心4 min，小心吸弃上清。
- 4. 细胞漂洗：**取5-10 mL PBS重悬细胞，300 g离心4 min，小心吸弃上清。
- 5. 细胞预冷：**取少量类器官培养基（30-50μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。
- 6. 细胞接种：**（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的BiozellenGel（B-P-00007-10，或Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以30μL/滴接种至预热细胞孔板中。
备注4：传代比例一般1:2或1:3（传代比例仅供参考，可按实验需求调整）
备注5：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。

7. **基质胶固化**：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37°C，5% CO₂ 培养箱内孵育 10-15 min 使基质胶凝固。
8. **培养**：待基质胶凝固后，加入准备好的人肠道类器官维持培养基至浸没基质胶滴（需确认人肠道类器官培养基中已加入添加剂 A 和 B）。
9. **换液**：将已接种的孔板转移至 37°C，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。

七、友情提示

1. 本试剂仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂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。
3. 如遇到特殊样本或其他未涉及问题，请联系公司售后技术支持，我们将提供免费的技术咨询服务，再次感谢您的信任！

仅供研究使用