

Vivogel™ Matrix For Organoid Culture 培养小鼠小肠类器官

应用指南

产品编号 #: VM004-10、VM004-PRF-10

产品规格: 10mL



应用简介

类器官是简化的三维（3D）器官模拟体，作为新一代体外医学研究模型，广泛应用于基础生物学、疾病建模、药物开发及再生医学领域。干细胞与祖细胞通过自组织及其分化后代形成类器官。得益于肠道上皮的快速自我更新能力，肠道类器官成为体外治疗研究中最常用的类器官类型。位于肠道隐窝底部的干细胞可通过增殖分化为肠上皮细胞、杯状细胞、潘氏细胞及肠内分泌细胞，这些细胞是肠道类器官发育的关键。成功的体外类器官培养需依赖能精准模拟天然细胞外基质理化特性的 3D 基质。

Vivogel™ Matrix for Organoid Culture 是小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV 型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。**Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 专为支持类器官生长与分化优化开发，每批次产品均通过质控检测，可形成类器官培养体系中常规应用的稳定三维穹顶结构。

本指南验证了 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 在类器官生长培养基中支持小鼠肠道类器官连续传代的能力。培养类器官呈现典型出芽形态，且分化细胞表达特异性表面标志物。

产品参数

浓度: 8-12 mg/mL

来源: 小鼠肉瘤组织

缓冲液: DMEM (含酚红) / DMEM (无酚红, PRF), 含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件: 长期保存需置于 -80°C; 4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装, 避免反复冻融。

操作指南

A.a. Vivogel™ Matrix 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Vivogel™ Matrix**。所有操作需在冰上进行, 并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意:** 所有接触 **Vivogel™ Matrix** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度, 解冻的 **Vivogel™ Matrix** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号 #
Vivogel™ Matrix For Organoid Culture	Vivomatter Biotech	VM004
IntestiCult Organoid™ 培养基(小鼠)	STEMCELL Technologies	06005
温和细胞解离液	STEMCELL Technologies	100-0485
DMEM/F-12 (HEPES)	Thermo Fisher Scientific	11330032
牛血清白蛋白 (BSA)	Thermo Fisher Scientific	B14
庆大霉素	Thermo Fisher Scientific	15750060
100 μm 过滤网	STEMCELL Technologies	27260
DPBS		
组织培养板/瓶		
50/15 mL 离心管		

B. 小鼠小肠类器官原代培养步骤

- 冰上解冻 1 管 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture**。
- 准备若干培养皿，加入 4°C 预冷的 DPBS 备用。
- 取小鼠小肠，根据实验需求取总长度约 5 厘米至 20 厘米的小肠段，置于含 DPBS 的培养皿中。
- 使用移液管或者注射器往小肠一端注入 DPBS 以冲洗肠内容物，冲洗后置于新的含 DPBS 的培养皿中，重复冲洗数次至内容物完全被冲洗干净，置于新的含 DPBS 的培养皿中。
- 使用手术剪将肠管剪开，肠腔面朝上，一只手使用手术镊夹住肠组织一端，另一只手使用手术刀片轻轻刮去肠腔表面肠绒毛，待肠绒毛被刮净后，将肠组织置于新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复清洗一次。
- 将清洗后的小肠组织剪碎至 2mm 宽，并转移至含有 5mmol/L EDTA 的预冷 DPBS 中消化，置于 4°C 孵育 30min。
- 消化完成后，将组织碎片转移到新的含 DPBS 的培养皿中清洗，重复一次以去除 EDTA。
- 用 5mL 移液管在含预冷的 DPBS 的培养皿或 50mL 离心管中吹打、重悬组织碎片，使组织反复穿过移液管以产生机械剪切力从而使隐窝与基底层分离，取一部分悬液镜检，当可以看到大量的隐窝样结构后，停止吹打，并对吹打后的组织悬液进行 100um 滤网过滤。
- 收集穿过滤网的组织悬液，150g-300g 离心力 4°C 离心 3min。
- 弃上清，使用 1mL DPBS 重悬组织沉淀，取 20uL 悬液进行镜检和隐窝计数，计数完成后吸取含所需隐窝量的悬液，150g-300g 离心力 4°C 离心 3min，弃上清。
- 用适量的基质胶（建议基质胶/培养基比例大于 7:3）重悬组织沉淀，推荐重悬密度每 10uL 基质胶悬液含 60 至 100 个隐窝，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。
- 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30uL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。
注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

13. 将铺子的培养板至于 37°C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15min 左右成胶。
14. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基。24 孔板每孔 500uL。
注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。
15. 将 24 孔板置于 37°C CO₂ 培养箱中培养。每 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。

C. 小鼠小肠类器官传代

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5mL EP 管中。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 150g-300g 离心力 4°C 离心 3min，弃上清，使用 DPBS 重悬底部类器官沉淀，150g-300g 离心力 4°C 再次离心 3min，弃上清后置于冰上。
4. 用适量的基质胶（建议基质胶/培养基比例大于 7:3）重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。
5. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30uL 左右。
6. 将接种完成后的培养板至于 37°C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15min 左右待基质胶凝固。
7. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基，24 孔板每孔 500uL。
8. 将 24 孔板置于 37°C CO₂ 恒温培养箱中培养。

D. 免疫细胞化学 (ICC) 染色

1. 移除培养基，并用 DPBS 洗涤含有小鼠肠道类器官的 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 三次。
2. 将类器官在 4%多聚甲醛（溶于 DPBS）中室温固定 1 小时。
3. 用 DPBS 洗涤孔板三次。
4. 向孔中加入含 1%牛血清白蛋白（BSA, Sigma-Aldrich）的 DPBS，并通过上下吹打破坏 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 的结构。将类器官及其碎片转移至 1.5 mL 离心管中。
5. 让类器官静置几分钟，或离心 5-10 秒以加速沉淀。弃去上清液，避免扰动类器官。
6. 加入 30%蔗糖溶液，将类器官样品脱水过夜。
7. 将脱水后的类器官包埋于 OCT 化合物（Tissue-Tek）中，置于 -80°C 保存。
8. 对类器官样品进行 8 μm 的冷冻切片。
9. 用含 0.1% Triton X-100 的 4%山羊血清（Thermo Fisher Scientific）对样品进行封闭和透化处理。
10. 将样品与小鼠小肠特异性表达蛋白一抗孵育过夜，如：Vimentin Cytoskeleton, Abcam; Lysozyme, Abcam; Chromogranin-A, Abcam; Mucin2, Abcam; Villin, Santa Cruz Biotechnology。
11. 与相应的二抗在避光条件下孵育 3 小时。
12. 用 DPBS 洗涤样品三次，并进行共聚焦成像（Leica TCS SP8）。

数据展示

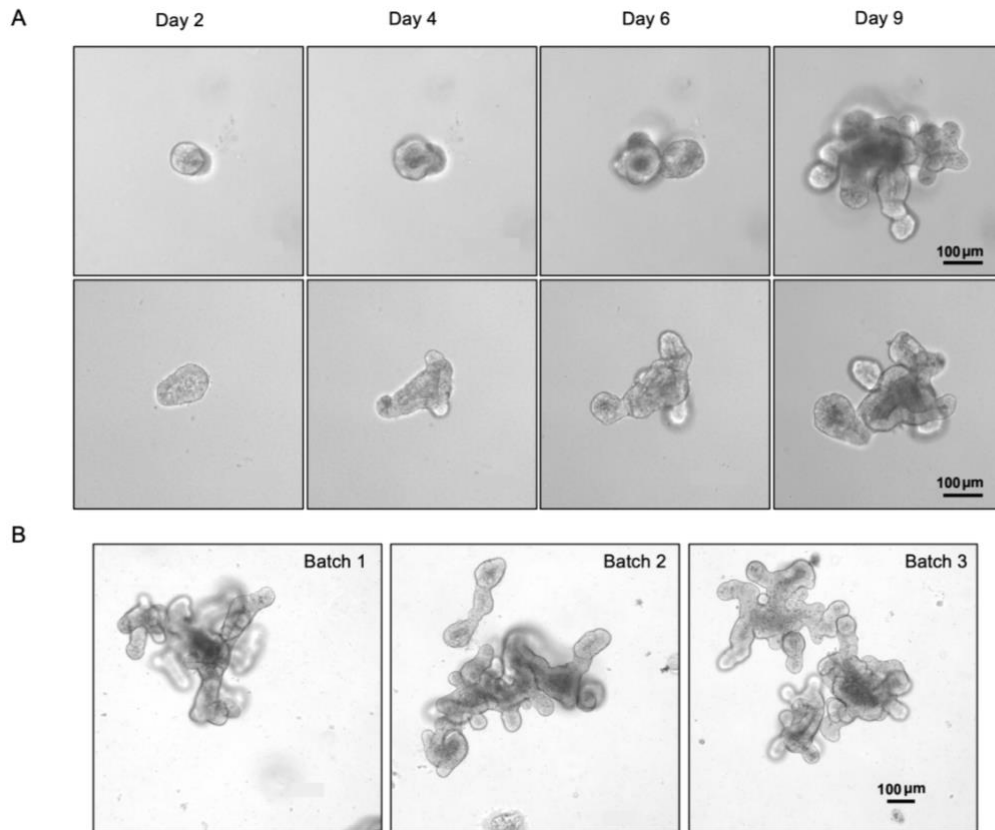


图 1. 在 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 中培养的小鼠小肠类器官。(A) 新鲜分离隐窝的原代培养图像 (典型出芽与管腔形态)。(B) 三个批次基质中传代培养的类器官 (Batch 1: 第 6 代; Batch 2: 第 10 代; Batch 3: 第 9 代)。

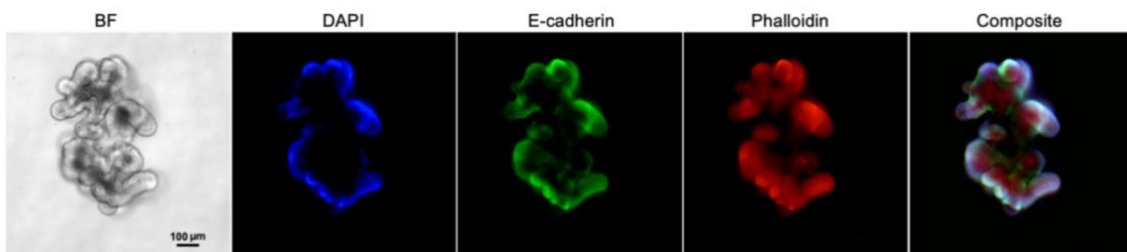


图 2. 在 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 中培养的小鼠小肠类器官全标本免疫荧光图像 (DAPI、E-cadherin、Phalloidin 染色)。

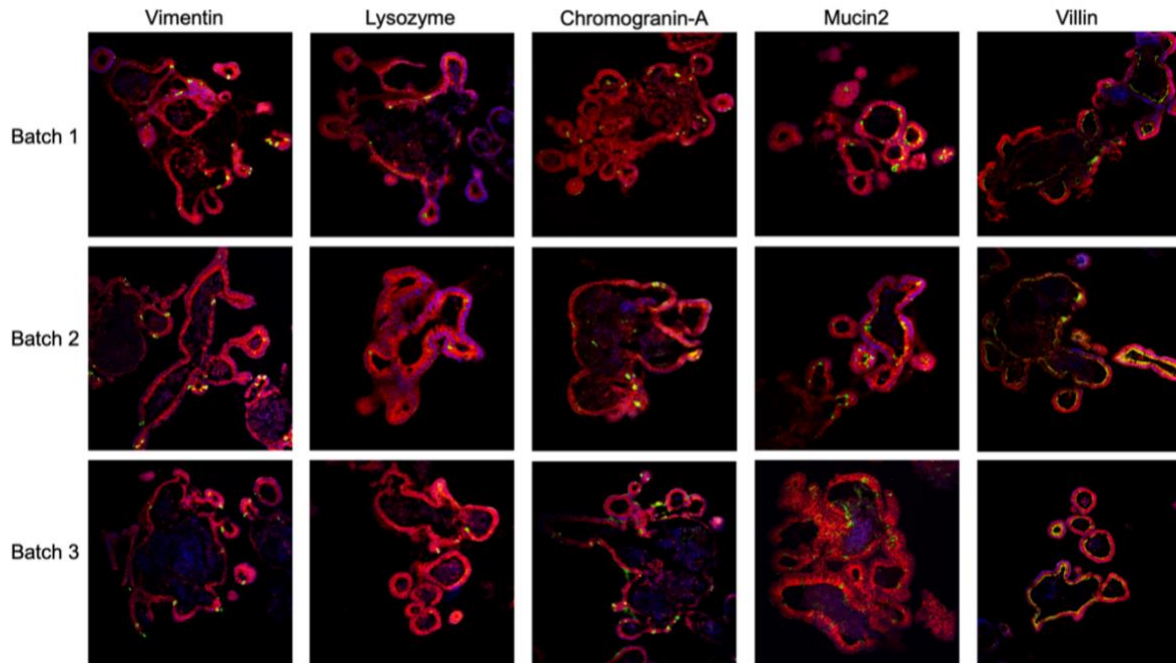


图 3. 在 **Vivogel™ Matrix for Organoid Culture** 中培养的三个不同批次 (Batch 1: 第 6 代; Batch 2: 第 10 代; Batch 3: 第 9 代) 小鼠小肠类器官的分化细胞分布情况。通过特异性标志物显示类器官中分化的肠道细胞, 包括间充质细胞 (vimentin)、潘氏细胞 (lysozyme)、肠内分泌细胞 (chromogranin-A)、杯状细胞 (mucin 2) 和肠上皮细胞 (villin)。蓝色: DAPI (细胞核), 红色: E-cadherin (细胞间连接), 绿色: 特异性标志物。