

## 类器官金牌基质胶

### 产品描述

模基生物类器官金牌基质胶是一种可溶性的基底膜基质胶，这种基质是通过基因编辑技术将多种表达胶原蛋白的基因序列插入到经永生化处理的小鼠肿瘤细胞体系中，并在实体肿瘤中抽提出来的。它的主要成分是层粘连蛋白，接着是胶原蛋白 IV、硫酸乙酰肝素蛋白多糖和巢蛋白。基底膜基质也含有转化生长因子 $\beta$ 、表皮生长因子、类胰岛素生长因子、成纤维细胞生长因子和在肿瘤中自然出现的其他生长因子。

### 推荐应用

此款基质胶是筛选出的确保能进行类器官培养的基质胶。如果遇到不能用其他类型的基质胶培养的一类器官，使用该系列基质胶可以保证实验的有效性和重现性。例如，小鼠肠道类器官、肺类器官、人脑类器官等。

### 产品信息

货号	产品名称	规格	储存/运输条件
082755	类器官金牌基质胶	10mL	-20°C
0827555	类器官金牌基质胶	5mL	-20°C
082755T	类器官金牌基质胶	1mL	-20°C

### 产品参数

来源：小鼠肿瘤

外观：①颜色：含酚红基质胶表现为黄色-粉红色，无酚红基质胶表现为半透明淡黄色；②形态：标准型基质胶 4°C 溶解后，呈透明流动液态状态；高浓度基质胶 0°C 溶解后，呈透明流动液态状态，4°C 久置呈半凝胶状。

浓度多样性：蛋白浓度范围在 8~26mg/mL 之间

内毒素：≤4.5EU/ mL



从左到右编号为1-5

注解：1和5为无酚红基质胶置于-80℃状态；2-4为含酚红基质胶4℃解冻不同时间，由于温度与瓶内微量二氧化碳作用使酚红产生的颜色变化，2为解冻20min状态；3为解冻10min状态；4为刚取出状态。

凝胶时间：室温条件下 5-30min 凝胶，温度 22℃ 至 37℃ 时成胶速度加快

2D/3D 应用非常广泛：干细胞研究(分化、维持)、肿瘤研究（侵袭）、3D 细胞培养（类器官、3D 细胞球）、体内植入（皮下成瘤、血管生成、栓塞）

## 产品质量控制规范

- 通过小鼠抗体产物（MAP）检测进行常规小鼠菌落病原体筛选
- 提取自不含 LDEV 的小鼠肿瘤细胞
- 对包括 LDEV 在内的多种病原体进行广泛的 PCR 检测，确保对生产过程中使用的原材料进行严格控制
- 对细菌、真菌和支原体进行检测，确保阴性
- 使用 BCA 方法测定蛋白浓度
- 使用血清学方法检测内毒素水平
- 在 37℃ 下进行 14 天的凝胶稳定性测试
- 每批次产品进行生物学功能验证（类器官培养与分化实验；皮下成瘤实验；干细胞培养；血管生成实验等）
- 对包括 LDEV 在内的多种病原体进行广泛的 PCR 检测，确保对生产过程中使用的原材料进行严格控制

## 使用注意事项

### 实验环境

- 环境温度：20–25℃；环境湿度：40–60%。
- 请穿戴个人防护装置，注意实验室安全。

### 温度控制

• 基质胶产品储存在-20℃时是稳定的。通过分装并一次性使用分装物来尽可能减少产品的冻融次数。在-20℃冰箱中储存分装物直到准备使用。请不要储存在无霜冰箱中。请务必保持产品的冻存状态。

• 因为模基生物类器官金牌基质胶 在 10°C以上会开始凝胶化。所以需谨记：模基生物类器官金牌基质胶 和所有与模基生物类器官金牌基质胶 接触的培养皿或培养基都应该预冷。在实验的全部过程中请务必保持模基生物类器官金牌基质胶 处于冰上。

## 避免污染

- 实验操作人员需严格区分实验操作台、清洁区和污染区，确保插取吸头、加样、丢弃吸头的动作呈单向流动。
- 实验后使用含 0.5% 次氯酸的消毒液对实验操作区消毒。

## 其他

- 请将基质胶产品小瓶淹没在碎冰中，并放置在 4°C冰箱里过夜解冻模基生物基质胶，蛋白浓度高时可能需要更多时间。请将模基生物类器官金牌基质胶 全程保持在冰上。无论是开盖取用产品或者对产品进行分装，请保持无菌操作。
- 操作过程中，需使用预冷的移液管轻柔地吹打混匀模基生物类器官金牌基质胶 以确保其均匀性。将模基生物类器官金牌基质胶 分装到离心管中，每当模基生物类器官金牌基质胶 堵塞吸头和/或移液管测量不精确时请更换吸头。如果将产品放置在 4°C的冰上 24-48 个小时，凝胶化的模基生物类器官金牌基质胶 可能会被重新水化。

## 操作说明

### 分装操作说明

基质胶产品储存在-20°C时是稳定的。通过分装并一次性使用分装物来尽可能减少产品的冻融次数。以下为实验操作者进行分装操作说明。

- 1.将基质胶置于预冷盒或碎冰中，放入 4°C冰箱，过夜解冻。
- 2.将无菌离心管、无菌枪头等接触基质胶的耗材放预冷盒中或冰箱中预冷，分装前将融化好的基质胶表面清洁后放入预冷盒或碎冰上。
- 3.在洁净工作台中，用 1mL 移液枪吸取 250µL 基质胶到离心管里(或根据每次用量多少进行分装)，标注好信息，操作过程中尽量保持低温，缩短操作时间。
- 4.分装完成后放冰盒中，防止倾倒，并于冰箱保存。分装后放置于-20°C冰箱中储存备用。请不要储存在自动除霜的冰箱中储存。使用前将基质胶插入预冷盒或碎冰中，并放置于 4°C 冰箱中，在冰上过夜解冻，使基底膜基质胶在稳定的低温环境中缓慢充分融化。

### 使用方法说明

## 包被涂层方法

模基生物类器官金牌基质胶可以以几种方式使用。薄层凝胶法适用于在凝胶顶部接种细胞，厚层凝胶法允许您在三维基质内培养细胞，薄层包被法(不凝胶化)给您提供了复杂的蛋白质层，您可以在其上培养细胞。您的选择基于您想要实现的最终结果，无论是细胞生长、附着还是分化。

### 一、薄层凝胶法

- 1.依照推荐的方法解冻模基生物基底膜基质。使用预冷的移液管，将模基生物 基底膜基质混合至均匀。
- 2.将培养板放置在冰上，以  $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  向生长表面加入模基生物 基底膜基质。
- 3.将培养板放置在  $37^\circ\text{C}$ ，30 分钟。
- 4.如果有必要的话，请在使用无血清培养基轻柔漂洗前吸出未结合的材料。请确保移液器的吸头不要刮擦包被的表面。培养板现在可以使用了。

### 二、薄层包被法

- 1.依照推荐的方法解冻模基生物基底膜基质。使用预冷的移液管，将模基生物 基底膜基质混合至均匀。
- 2.使用无血清培养基将模基生物基底膜基质稀释到需要的浓度。对于您的实验应用，您应该完成以经验为主的研究来确定您的最适包被浓度。
- 3.向被包被的容器中加入稀释的模基生物 基底膜基质。加入的量应该足以容易地覆盖整个生长表面。在室温下培养 1 个小时。
- 4.吸出未结合的材料并使用无血清培养基轻柔地漂洗。培养板现在可以使用了。

### 三、厚层凝胶法

- 1.依照推荐的方法解冻模基生物基底膜基质。使用预冷的移液管，将模基生物 基底膜基质混合至均匀。
- 2.将培养板放置在冰上。向模基生物基底膜基质中加入细胞并使用预冷的移液管悬浮。以  $150\text{-}200\mu\text{l}/\text{cm}^2$  向生长表面加入模基生物 基底膜基质。
- 3.将培养板放置在  $37^\circ\text{C}$ ，30 分钟。现在可以添加培养基了。细胞也可以培养在这一凝胶的顶部。

### 细胞复苏：

使用细胞复苏溶液在冰上 7 小时内解聚模基生物基底膜基质能够实现将生长在模基生物基底膜基质上的细胞最有效地复苏，或者使用中性蛋白酶，考虑到连续培养，中性蛋白酶作为一种金属酶可以分散细胞。

## 应用操作说明

以下以小鼠小肠类器官原代建立实验为例来进行模基生物类器官金牌基质胶的应用实验操作说明。

## 一、实验目的

- 1.1 熟练掌握小鼠小肠类器官原代建立技术。
- 1.2 了解掌握小鼠多种组织来源类器官原代建立技术。
- 1.3 观察记录小鼠小肠原代类器官生长、扩增过程中类器官形态的变化。

## 二、实验原理

本实验策略采取从成体干细胞中建立和维持小鼠小肠类器官的方法。小鼠小肠类器官主要由干细胞、肠祖细胞和肠绒毛细胞、潘氏细胞、杯状细胞和少量肠内分泌细胞组成，在自我更新能力、组织结构、细胞类型和功能方面，小鼠小肠类器官重现了体内小肠上皮的特征，因此是肠道稳态和疾病机制研究的理想体外模型。

## 三、实验仪器、材料、试剂

- 1、**仪器**：生物安全柜、细胞培养箱、低温水平式离心机、倒置显微镜、低温冰箱、摇床
- 2、**材料**：细胞培养板（规格为 24 孔、48 孔和 96 孔）、离心管（规格为 1.5 mL、15 mL 和 50 mL）、细胞培养皿（直径规格为 2.5 cm、6 cm 和 10 cm）、移液器（规格为 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L 和 5000  $\mu$ L）、无菌吸头（规格为 10  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L）、无菌镊子、无菌组织剪、70 $\mu$ m 细胞过滤器、手术刀片
- 3、**实验试剂**：小鼠小肠类器官培养试剂盒、EDTA (0.5M, pH 8.0)、润洗液、基础培养基、基质胶、DPBS

## 四、实验内容与方法

### 4.1 实验前准备：

- 小鼠小肠类器官培养试剂盒、基质胶 4 $^{\circ}$ C化冻
- 小鼠小肠类器官完全培养基的制备：将 200 $\mu$ L Mouse Intestinal Organoid Supplement B (50x), 40 $\mu$ L Mouse Intestinal Organoid Supplement C (250x) 加至 9.76mL Mouse Intestinal Organoid Basal Medium 中，充分混合，配制成 10mL 小鼠小肠类器官完全培养基。室温平衡，可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存，建议在两周内使用。
- 准备足量添加 1%双抗的 DPBS
- 准备足量添加 0.1%BSA 的 DPBS
- 配制 5mM EDTA 溶液：4mL 预冷 DPBS 溶液加 40 $\mu$ L 0.5M EDTA 溶液 pH8.0，置冰上备用。

**4.2 取样**：小鼠断颈处死，表面喷洒酒精杀菌。在无菌条件下取出近胃端 3~10cm 肠组织，用镊子去除肠道外部的肠系膜、脂肪，放入 4 $^{\circ}$ C预冷的含双抗的 DPBS 溶液中。

- 4.3 清洗:** 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 2 次。将清洗后的小肠组织剪碎至 2mm 宽, 转移至新的培养皿中, 用 DPBS 清洗 2 遍。
- 4.4 消化:** 将清洗好的肠段转移至含有 5mmol/L EDTA 的预冷 DPBS 中消化, 置于 4°C 孵育 20~30min, 消化 20 分钟可用移液器轻柔吹打肠段, 取上清显微镜下观察, 待上清出现完整隐窝即可终止消化, 若无隐窝可适当延长消化时间。
- 4.5 清洗:** 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 2 次以去除 EDTA。
- 4.6 重悬:** 用 5mL 移液管在预冷的 0.1%BSA 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尖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 70 $\mu$ m 滤网过滤。
- 4.7 收集:** 收集穿过滤网的组织悬液, 300g 离心力 4°C 离心 3min。
- 4.8 计数:** 弃上清, 使用 1mL 0.1%BSA 的 DPBS 重悬组织沉淀, 取 20 $\mu$ L 悬液进行镜检和隐窝计数, 计数完成后吸取包含所需隐窝量的悬液, 300g 离心力 4°C 离心 3min, 弃上清后置于冰上。
- 4.9** 用适量的 Matrigel Matrix 重悬组织沉淀, 推荐重悬密度为每 10 $\mu$ L Matrigel Matrix 悬液包含 70 至 100 个隐窝, 重悬后置于冰上, 重悬时间不超过 30s 以避免 Matrigel Matrix 过早凝固。
- 注意: Matrigel Matrix 稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中 Matrigel Matrix 的结构稳定性。
- 4.10** 将 Matrigel Matrix 和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央, 每孔 30 $\mu$ L 左右, 避免悬液接触孔板侧壁。
- 注意: 为防止 Matrigel Matrix 室温凝固, 此步骤应尽快完成。
- 4.11** 将接种完成后的培养板至于 37°C 二氧化碳恒温培养箱中, 孵育 15min 左右待 Matrigel Matrix 凝固。
- 待 Matrigel Matrix 完全凝固后, 沿壁缓慢加入已配制好的小鼠小肠类器官完全培养基, 24 孔板每孔 500 $\mu$ L, 避免破坏已凝固结构。
- 4.12** 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养。
- 4.13** 每 3 天更换一次培养基, 更换培养基时应避免破坏 Matrigel Matrix。
- 4.14** 密切监测类器官生长状态, 理想情况下, 小鼠小肠类器官应在 5 至 7 天内建成。

