

适用项目：人类器官分化

一、产品简介

本产品专用于人正常小肠组织来源的小肠类器官的诱导分化。能够稳定诱导分化为多种正常小肠功能性细胞与隐窝结构特征，适用于肠道发育生物学、肠道疾病模型构建、药物筛选及转化医学等科研目的。

二、产品信息

产品名称	组分	货号	规格	储存条件
人小肠类器官完全培养基（分化）	人小肠类器官（分化）基础培养基 A	40-101D	95 mL	4℃，9 个月
	人小肠类器官（分化）添加物 B（20×）		5 mL	-20℃，9 个月
	人小肠类器官（分化）添加物 C（1000×）		100 μL	-20℃，9 个月
	人小肠类器官（分化）基础培养基 A	40-201D	475 mL	4℃，9 个月
	人小肠类器官（分化）添加物 B（20×）		25 mL	-20℃，9 个月
	人小肠类器官（分化）添加物 C（1000×）		500 μL	-20℃，9 个月

三、自备试剂、耗材和仪器

自备/选购配套试剂

组分	货号	规格	储存条件
人小肠类器官完全培养基（扩增）	40-101E	100 mL	-20℃，9 个月
	40-201E	500 mL	
减因子类器官基质胶（无酚红）	10-101	10 mL	-20℃，12 个月
类器官防黏附润洗液	20-103	100 mL	4℃，12 个月
	20-203	500 mL	
Starter 增强剂（1000×）	20-116	0.1 mL	-20℃，12 个月
类器官传代消化液	20-105	100 mL	4℃，12 个月
	20-205	500 mL	
类器官回收液	20-106	100 mL	4℃，12 个月
	20-206	500 mL	
类器官冻存液	20-104	100 mL	-20℃，12 个月
类器官清洗液	20-111	100 mL	4℃，12 个月
	20-211	500 mL	4℃，12 个月

自备耗材和仪器

- 生物安全柜、CO₂ 培养箱（37℃，5% CO₂）、离心机、水浴锅、倒置显微镜。
- 1.5 mL/15 mL/50 mL 离心管、无菌低吸附移液枪头（P1000/P200）。
- 24 孔或 48 孔组织培养板（TC-Treated）。



四、人小肠类器官完全培养基制备说明

- (1) 试剂解冻: 提前将人小肠类器官添加物 B 和添加物 C 置于冰上或 4°C 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, 您已得到人小肠类器官完全培养基。

***注意: 完全培养基中已含 1% Pen-Strep Solution, 无需另行添加。**

- (3) 提高类器官建成率: 在建系/传代/复苏首日可每 10 mL 配置好的扩增完全培养基中加入 10 μ L 的 Starter 增强剂 (20-116)。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°C 保存。开封后 4°C 请于 2 周内用完, 避免反复冻融。

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°C 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 (20-103) 润洗过的含有 5~10 mL 预冷类器官清洗液 (20-111) 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°C, 300 $\times$ g 离心 3 min。小心吸弃上清液, 重复清洗并离心 1 次。
- (4) 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 μ L。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。

***此步骤应迅速完成。**

- (5) 点胶: 用预冷的 P200 移液器, 吸取 30~40 μ L 基质胶-人小肠细胞团混合物, 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。
- (6) 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。
- (7) 启动培养: 沿孔壁缓慢加入 500 μ L 已配制的人小肠类器官完全培养基。建议在复苏后的首个 48 h 每 1 mL 配置好的扩增培养基中加入 Starter 增强剂 (20-116), 降低复苏初期的细胞应激, 提高类器官的生长速度。

***注意: 建议复苏后的小肠类器官稳定传代后再进行分化, 不建议直接在复苏当代次进行分化操作。**

六、人小肠类器官传代和分化

阶段一: 扩增传代 (使用扩增培养基)

***传代节点: 当类器官生长旺盛 (直径 > 100 μ m)、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。**

- (1) 破胶: 加入 1 mL 预冷的类器官清洗液 (20-111), 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 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, 注意不要吸到底部沉淀。
- (2) 消化: 加入 3 mL 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敲打底部沉淀。将离心管置于 37°C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中消化, 每隔 5 min 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 (20-111), 终止消化。
- (3) 收集: 离心管 300 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 收集组织细胞沉淀。
- (4) 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 μ L。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。

***此步骤应迅速完成。**

- (5) 点胶: 用预冷的 P200 移液器, 吸取 30~40 μ L 基质胶-人小肠细胞团混合物, 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。
- (6) 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。
- (7) 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 μ L 已配制好的类器官扩增完全培养基 (货号 40-101E/40-201E) (完全浸没胶滴)。
- (8) 将 24 孔板置于 37°C 二氧化碳培养箱中培养, 待新长出的类器官直径为 100-200 μ m 可进入以下阶段二 (分化诱导)。



阶段二：分化诱导（使用本产品——分化完全培养基）

***重要前提：分化必须在类器官稳定传代（至少 1 代）后进行，切勿在复苏后直接分化。分化诱导的核心机制是撤除高浓度扩增刺激因子，因此分化阶段不建议添加 Starter 增强剂（20-116）。**

- (9) 分化前清洗：吸去 24 孔板孔内全部扩增培养基。沿孔壁缓慢加入 500 μ L 预冷的类器官清洗液（20-111），轻轻水平摇晃培养板 3~5 次，使清洗液充分浸润胶滴表面，随后小心吸去清洗液。此步骤重复 1 次。
- (10) 加入分化完全培养基：沿孔壁缓慢加入 500 μ L 提前恢复至室温（约 20-25 $^{\circ}$ C）的人小肠类器官分化完全培养基（即本产品）。加入时务必避免冲散基质胶滴。
- (11) 分化培养周期：将培养板放回 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中连续培养。分化诱导通常需要 4~7 天。具体时长视类器官初始大小和分化进度而定。
- (12) 分化期间换液操作：分化期间每隔 48 小时进行一次全量换液。操作时，先吸去孔内旧培养基，再沿孔壁缓慢补加 500 μ L 新鲜预温（37 $^{\circ}$ C）的分化完全培养基。分化完成后可进行后续实验。

七、注意事项

- (1) 安全提示：本产品仅供科学研究使用，不可用于临床诊断或治疗。使用前请仔细阅读本说明书。
- (2) 正确储存：请严格按照推荐的温度储存培养基，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。
- (3) 无菌操作：本产品仅供类器官体外培养，实验室需具备培养条件，并且实验过程涉及的所有试剂和耗材必须保持无菌以防止污染。
- (4) 操作环境：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（20-101）并始终保持 4 $^{\circ}$ C 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。
- (5) 个人防护：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。使用过程中产生的废弃物应按照医疗垃圾处理标准妥善处理。
- (6) 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。

版本号：V1.1

发布日期：2026 年 4 月 20 日

免责声明：本产品仅用于科学研究用途。用户需自行承担使用产品的全部风险。生产商不对因使用本产品引起的任何间接或附带损害承担责任。建议使用者根据自身实验体系进行条件优化。

