



安徽科兔生物技术有限公司
Anhui Ketu Biotechnology Co.,LTD

KT-基质胶-A

【产品名称】 通用名称: KT-基质胶-A。

【包装规格和货号】 10mL: CG-JZ-01。

【预期用途】 KT-基质胶是一种现成可用的溶解型基底膜, 其主要来源于 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 鼠瘤, 经过优化后专门用于支持类器官的生长和分化。

【主要组成成分】 层粘连蛋白、IV 型胶原、桥粒蛋白和硫酸肝素蛋白聚糖等。

【储存条件及有效期】

-20°C或者-80°C保存, 有效期24个月。 生产日期及失效日期见标签。

【使用方法】(供参考)

小鼠小肠类器官原代培养步骤:

- 冰上解冻1管KT-基质胶-A。
- 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。

服务热线: 400-079-0900 | 官方网址: www.ketubio.com

安徽·合肥 合肥综合性国家科学中心大健康研究院1号楼4-5层



KT-基质胶-A

- 弃上清，使用1mL DPBS重悬组织沉淀，取20 μ L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 $^{\circ}$ C离心3min，弃上清。
- 用适量的基质胶重悬组织沉淀，推荐重悬密度每10 μ L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30 μ L左右，避免悬液接触孔板侧壁。

NOTE：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

- 将铺子的培养板至于37 $^{\circ}$ C CO₂恒温培养箱中，孵育15min左右成胶。
- 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500 μ L。

NOTE：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

- 将24孔板置于 37 $^{\circ}$ 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

小鼠小肠类器官传代

- 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1.5mLEP管中。
- 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。
- 150g-300g离心力4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C再次离心3min，弃上清后置于冰上。
- 用适量的基质胶重悬类器官沉淀，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。
- 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30 μ L左右。
- 将接种完成后的培养板至于37 $^{\circ}$ C CO₂恒温培养箱中，孵育15min左右待基质胶凝固。
- 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500 μ L。
- 将24孔板置于37 $^{\circ}$ C CO₂恒温培养箱中培养。

免疫细胞化学（ICC）染色

- 移除培养基，并用DPBS洗涤含有小鼠肠道类器官的KT-基质胶-A三次。
- 将类器官在4%多聚甲醛（溶于DPBS）中室温固定1小时。
- 用DPBS洗涤孔板三次。



安徽科兔生物技术有限公司
Anhui Ketu Biotechnology Co.,LTD

I KT-基质胶-A

- 向孔中加入含 1%牛血清白蛋白（BSA）的 DPBS，并通过上下吹打破KT-基质胶-A的结构。将类器官及其碎片转移至1.5 mL离心管中。
- 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。
- 加入30%蔗糖溶液，将类器官样品脱水过夜。
- 将脱水后的类器官包埋于OCT化合物（Tissue-Tek）中，置于-80℃保存。
- 对类器官样品进行8μm的冷冻切片。
- 用含0.1% Triton X-100的4%山羊血清对样品进行封闭和透化处理。
- 将样品与小鼠小肠特异性表达蛋白一抗孵育过夜，如：Vimentin Cytoskeleton；Lysozyme；Chromogranin-A；Mucin2等。随后与相应的二抗在避光条件下孵育3小时。
- 用DPBS洗涤样品三次，并进行共聚焦成像。

【注意事项】

- ◇ 本品为一次性加样使用科研试剂产品，请勿重复使用，过期产品请勿使用。
- ◇ 试验过程存在潜在污染性，处理试剂和样本时需戴一次性手套，操作后应彻底洗手。
- ◇ 按需从-20/-80℃解冻分装的KT-基质胶。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KT-基质胶的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的KT-基质胶将在10℃以上的温度下快速固化。

【实验方法的局限性】 本产品涉及的检测结果仅供科学研究，不具备医学诊断价值。

【基本信息】

生产企业名称：安徽科兔生物技术有限公司

住所：合肥综合性国家科学中心大健康研究院1号楼5楼

售后服务单位名称：安徽科兔生物技术有限公司

联系方式：400-079-0900

生产地址：合肥综合性国家科学中心大健康研究院1号楼5楼

【版本信息】

R01