

## 试剂配制

编号	成分		最终浓度	加入溶质质量（一瓶装）	加入溶剂体积	配制后浓度		分装	保 存 方 式
1	Advance DMEM/F12 medium		1X	已订购 1X 溶液，无需配制					4℃
2	ABS	Penicillin	100u/ml	已订购 100X 溶液，无需配制					4℃
		streptomycin	100µg/ml						
3	Glutamax		1X	已订购 100X 溶液，无需配制					4℃
4	HEPES		10mM	已订购 100X 溶液，无需配制					4℃
5	N2		1X	已订购 100X 溶液，无需配制					-20℃
6	B27		1X	已订购 50X 溶液，无需配制					-20℃
7	N-acetylcysteine		1mM	25g	306ml H2O	500mM	500X	无	-20℃
8	EGF		50ng/ml	500µg	20ml H2O	25µg/ml	500X	1ml/ 管 X 20 管	-20℃
9	R-spondin 1		500ng/ml	100µg	4ml H2O	25µg/ml	50X	1ml/ 管 X 4 管	-20℃
10	Noggin		100ng/ml	20µg	4ml H2O	5µg/ml	50X	1ml/ 管 X 4 管	-20℃
11	Wnt 3a		100ng/ml	10µg	1ml PBS	10µg/ml	100X	无	-20℃
12	Matrigel							1ml/管	-20℃
13	Collagenase IX		500U/ml	100mg (1mg=1200 U)	10ml PBS	10mg/ml (12000U/ml)	1 管 6000 U	0.5ml/ 管 X 20 管	-20℃
14	EDTA		5mM	已订购 100X 溶液，无需配制					常温
15	DMEM/1%FBS/500Collagease IX		--	500µl FBS	50ml DMEM	使用时，取 11.5ml DMEM/1%FBS 溶液， 现加一管(0.5ml) Collagenase IX			

## 50ml small intestine crypt culture medium

编号	成分及最终浓度	现有浓度	需加体积
1	Advance DMEM/F12 medium		45ml
2	ABS (100u/ml Penicillin + 100µg/ml streptomycin)	100X	500µl
3	Glutamax	100X	500µl
4	10mM HEPES	100X	500µl
5	1X N2	100X	500µl
6	1X B27	50X	1ml
7	1mM N-acetylcysteine	500X	100µl
8	50ng/ml EGF	10000X	5µl
9	500ng/ml R-spondin 1	50X	1ml
10	100ng/ml Noggin	50X	1ml
总计			50ml

## 50ml large intestine crypt culture medium

编号	成分及最终浓度	现有浓度	需加体积
1	Advance DMEM/F12 medium		45ml
2	ABS (100u/ml Penicillin + 100µg/ml streptomycin)	100X	500µl
3	Glutamax	100X	500µl
4	10mM HEPES	100X	500µl
5	1X N2	100X	500µl
6	1X B27	50X	1ml
7	1mM N-acetylcysteine	500X	100µl
8	50ng/ml EGF	10000X	5µl
9	500ng/ml R-spondin 1	50X	1ml
10	100ng/ml Noggin	50X	1ml
11	100ng/ml Wnt 3a	100X	500µl
总计			50ml

## 小肠、大肠隐窝提取培养步骤

### 试剂、材料准备

#### 试剂:

PBSI, ABS/PBS 全部置冰上预冷。

DMEM/1%FBS/500Collagease 溶液 37℃ 预热

Matrigel (已分装成 1ml/管) 实验当日从-20℃取出, 置 4℃解冻。

#### 材料:

小鼠, 小鼠解剖工具 1 套, 灌胃针 1 支, 塑料板 1 个, 针头 4 个, 10cm 培养皿 3 个, 盖玻片 1 个, 载玻片若干, 15ml 离心管若干, 50ml 离心管若干, 冰盒及冰, 移液枪及枪头, 25ml 移液管 (一次性) 若干, 100µm 滤网 2 个, 70µm 滤网 1 个, 24 孔板 (或 4 孔板) 1 个

用到 Matrigel 的材料都要预冷 (4℃)

### 提取培养步骤

1. 【处死】 颈椎脱臼处死小鼠。
2. 【固定、消毒】 用四个针头固定小鼠在塑料板上, 喷洒 75%酒精消毒。
3. 【取小肠】 解剖小鼠腹部, 找到胃, 剪开胃十二指肠连接部, 轻轻分离肠系膜, 从十二指肠开始向下取约 10cm 小肠, 放于含 ABS/PBS 溶液的培养皿内, 置于冰上。
4. 【取大肠】 剪开小鼠耻骨部位, 轻轻分离直肠。找到回盲部, 从回盲部开始轻轻分离大肠至肛门 (约 3-4cm), 剪下放于含 ABS/PBS 溶液的培养皿内, 置于冰上。
5. 【冲洗】 灌胃针 (或针筒) 吸取培养皿内的 ABS/PBS 溶液, 从肠子一端开口分别冲洗小肠和大肠。
6. 【剖开, 刮绒毛, 剪段】 培养皿置冰上操作。用小剪刀分别纵向剪开小肠和大肠, 铺平, 用盖玻片在表面轻刮绒毛。将肠子横切成约 5mm 小段, 分别转移至含 20ml ABS/PBS 溶液的 50ml 离心管 S1 和 L1 中。
7. 【摇洗】 将离心管 S1 和 L1 水平放在冰上, 置摇床上洗 5min X 3 次。丢弃溶液时可以用纸吸, 保留肠组织于原离心管内。  
小肠洗 2 遍即可, 大肠洗 3 遍。可用移液管吸除废液。

## 8. 【处理小肠】

- (1) 离心管 S1 内加 5mM EDTA/PBS 溶液 20ml。ABS/PBS 20mL 加 0.5MEDTA(100X)200uL。冰中横放 40min。
- (2) 丢弃离心管 S1 内 EDTA/PBS 溶液，加入预冷 ABS/PBS 溶液，冲洗一遍，再加入预冷 ABS/PBS 溶液 20ml。
- (3) 用手剧烈振荡 8-10 次（次数因人而异）。此时可见液体浑浊，部分小肠片段浮于液面。
- (4) 用移液管吸除浑浊液体，切勿吸去小肠片段。再加入 20ml 预冷 ABS/PBS 溶液，上下轻轻颠倒 2 次，移液管吸除液体，反复 4-5 次直至液体清凉。（此步为除去小肠绒毛。）
- (5) 离心管 S1 加入预冷 PBS 溶液 20mL，用手剧烈振荡 20 次，可见液体再次浑浊（次数因人而异，此步为分离隐窝）。
- (6) 将离心管 S1 内液体分别于 100 $\mu$ m、70 $\mu$ m 滤网过滤，保留滤液于另一 50ml 离心管 S2 内。
- (7) 将离心管 S2 置 69g，4℃离心 5min。丢弃上清液，用移液管吸取预冷 ABS/PBS 溶液 20mL，吹打成悬浮液，再次 69g，4℃离心 5min，丢弃上清液。（此步为除去单个细胞杂质）。
- (8) 用移液管吸取预冷 ABS/PBS 溶液 10mL 置于 S2 中，吹打成悬浮液，取 10uL 液体置于玻片上，显微镜计数隐窝数量。估计隐窝总体数量，按实验目的选取一定数量的隐窝予 15mL 离心管 S3 中。（离心取样中会有丢失，取样要多 25%）。
- (9) 将离心管 S3200g，4℃离心 4min。
- (10) 枪头、24 孔板预冷（4℃），以下步骤于超净台冰上操作。
- (11) 丢弃上清液，吸取一定量 S1 培养基稀释沉淀，可再次取 10uL 液体计数隐窝数量，根据技术结果调整溶液体积，加入 Matrigel，使培养基与 Matrigel 比例为 4:6，200crypt/50 $\mu$ l。
- (12) 按 50 $\mu$ l/孔滴入 24 孔板（或 4 孔板）内，注意保持“水滴状”。
- (13) 将 24 孔板置于 37℃培养箱内 20min 后，加入 500 $\mu$ l/孔的 S1 培养基。

## 【处理大肠】

- (1) 离心管 L1 内加 12ml DMEM/1%FBS/500Collagease 溶液，置 37℃水浴 50min，每 5mins 上下剧烈颠倒振荡 10 下（或与水浴摇床中）。
- (2) 用一次性滴管吹打 120-150 次后，将离心管 L1 内液体于 100 $\mu$ m 滤网过滤，保留滤液于一 50ml 离心管 L2 内。
- (3) 将离心管 L2 置 60g，4℃离心 5min。丢弃上清液，加入 PBS 溶液 20ml 稀释沉淀。
- (4) 再次将离心管 L2 置 60g，4℃离心 5min。丢弃上清液，用 25ml 移液管吸取 PBS 溶液定容至 10ml，吹打成悬浮液。
- (5) 用移液管吸取预冷 ABS/PBS 溶液 10mL 置于 S2 中，吹打成悬浮液，取 10uL 液体置于玻片上，显微镜计数隐窝数量。估计隐窝总体数量，按实验目的选取一定数量的隐窝予 15mL 离心管 L3 中。（离心取样中会有丢失，取样要多 25%）。
- (6) 将离心管 S3200g，4℃离心 4min。
- (7) 枪头、24 孔板预冷（4℃），以下步骤于超净台冰上操作。
- (8) 丢弃上清液，吸取一定量 S1 培养基稀释沉淀，可再次取 10uL 液体计数隐窝数量，根据技术结果调整溶液体积，加入 Matrigel，使培养基与 Matrigel 比例为 4:6，200crypt/50 $\mu$ l。
- (9) 按 50 $\mu$ l/孔滴入 24 孔板（或 4 孔板）内，注意保持“水滴状”。
- (10) 将 24 孔板置于 37℃培养箱内 20min 后，加入 500 $\mu$ l/孔的 L1 培养基。

9. 【培养】 隐窝培养过程中，每三日换一次培养基。一般小肠 3 小时候可见 spheres，一天后出 budding。大肠一日后成 spheres。