

Mouse Intestinal Organoids_small intestine crypt isolation & culture

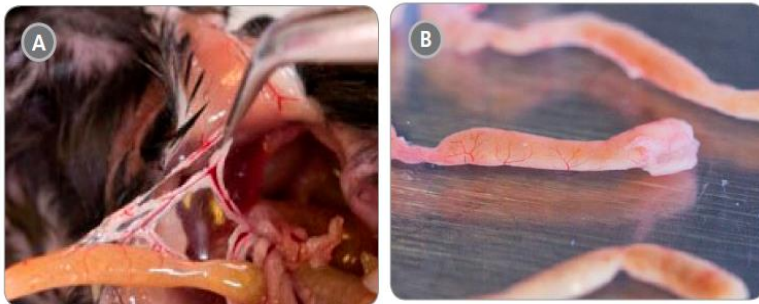
20191021 Daun

Materials

1. **DMEM/F-12(15mM HEPES)**: F-12 DW에 녹인 후 DMEM과 1:1 로 섞은 후 filtering 해서 사용
2. **Cell dissociation buffer**: 1mM EDTA in PBS
3. **Complete Intesticult Medium** (stem cell #06005, 1kit)-사용전에 1% P/S 넣어서 사용
4. **Matrigel (corning 356231)**- 10ml짜리를 500ul씩 분주하여 -20℃ 보관, 사용하기 하루 전에 냉장보관.
5. **24 well plate**: 적어도 사용하기 30분 전에 37℃ 도에 warming 한다
6. 0.1% BSA in PBS

Method

1. Mouse small intestine 분리: 위아래에서 맹장위까지 cutting
2. 벤치안으로 가져와서 pbs 들어있는 dish에 넣어주고 external membrane 과 fat을 제거해준다

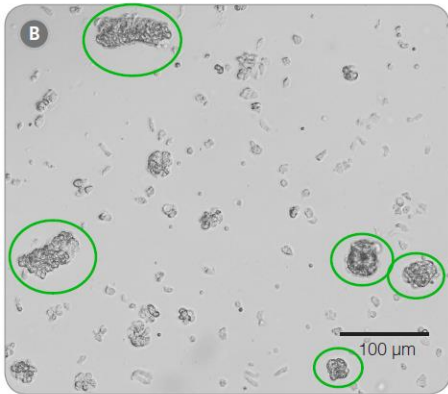


3. 세로로 장을 갈라서 열어주고 cold pbs를 사용하여 3회 washing 해준다 (dish를 이동해가면서 washing)

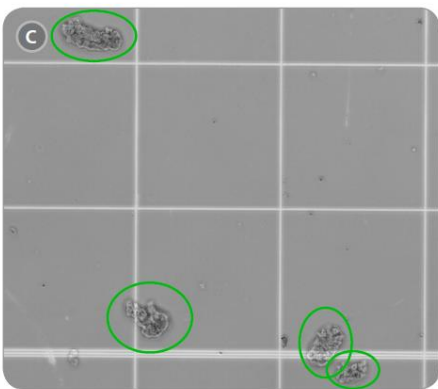


4. 50ml conical tube에 15ml ice PBS 넣어주고 장을 최대한 작게 잘라주면서 넣어준다 (Pipette aid 로 Pipetting 할 수 있을 정도의 사이즈로 잘라준다)
5. 미리 wet 하게 만들어 둔 tip을 사용하여 3번 정도 up and down, 장이 중력으로 가라앉도록 두고 그 후 sup 제거
6. 4-5번 과정을 sup 이 clear 해 질 때까지 반복 (15번 정도)
7. Sup을 제거하고 Dissociation buffer 25ml 넣어준 뒤 15min shaking
8. 중력으로 장 가라 앉히고, sup 제거

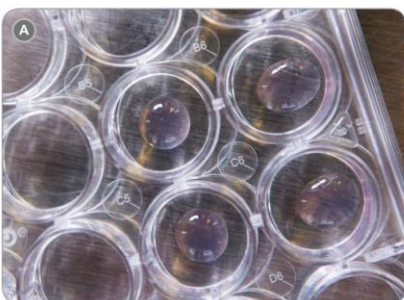
9. 10ml 0.1% BSA solution 넣어주고 up & down 3번
10. Intestinal piece는 가라앉히고 sup 만 걸어서 strainer에 거른다 (Fraction 1)
11. 9-10번 과정 반복하여 Fraction 5번까지 얻음.
12. Fraction을 1ml씩 따서 6well plate에 넣어준 뒤 현미경으로 관찰하여 cell 은 적고 crypt는 많은 Fraction을 고른다 (Fraction 4-5 선택)



13. Fraction 4-5 번은 모아서 290g, 5min, 4°C centri
14. Sup 제거 후 0.1% BSA 10ml에 suspension 해준 후 200g, 3min centri, sup 제거
15. Crypt pellet을 DMEMF/12 5ml에 suspension 해준 후 crypt counting (대략 total 10^4 crypts/ml 나옴)



16. 200g, 5min centri 후, 50ul/well에 2400개의 crypt 가 들어갈 수 있도록 계산하여 complete medium에 suspension.
17. Matrigel 과 crypt를 1:1 로 섞어준 뒤 (버블이 안 생기도록 조심해서) 50ul씩 pre-warm 24 well plate에 넣어준다.
18. 37°C 10min incubation



19. 750ul complete media를 well에 넣어주고 나머지 비어 있는 well 에는 PBS 1ml을 넣어준다.