

## NGC organoid™ 人表皮类器官试剂盒说明书

Catalog Number # K212M11

### 产品描述

本试剂盒为类器官的复苏、培养及冻存提供了经过优化的、高效并稳定的整体解决方案。试剂盒为完全培养基，用于人表皮类器官培养。

### 产品信息

Kit Catalog	Component	Specifications	Storage & Stability
K212M11	人表皮类器官试剂盒	100mL	2-8℃，避光保存，3个月

### 需要准备的其它试剂

Manufacturer	Product Name	Catalog Number	Specifications
D1med™	皮肤组织消化液	K213M01	10mL
D1med™	专用润洗液	D23025-0050	50mL
D1med™	类器官消化液	D23031-0050	50mL
D1med™	类器官复苏液	D23040-0010	10mL
D1med™	类器官冻存液	D23046-0050	50mL
D1med™	类器官基质胶	D23016-0010	10mL
/	DPBS (1X), liquid	/	/

### 类器官复苏、传代、冻存

#### 使用前准备

##### A. 完全培养基分装

- 使用前按照每次用量分装完全培养基 (Catalog: K212M11);
- 在配制好的完全培养基标签上记录配制日期，于 2℃ - 8℃ 冰箱避光保存;

注：建议完全培养基在 1-3 个月内使用完；

##### B. 基质胶

使用前将基质胶 (Catalog: D23016-0010) 置于冰上或 2℃ - 8℃ 冰箱 2-3 小时解冻；

注：使用过程中保持基质胶在 4℃ 以下 (建议置于冰上保存)，温度升高会致基质胶凝固而不可使用。

##### C. 润洗

类器官操作过程中，所有离心管、枪头操作前均需润洗，避免类器官贴壁丢失；

### 类器官复苏

复苏操作从冻存管解冻至放入培养箱培养过程控制在 30 min 内，以确保足够的类器官存活。

- 准备低温、低速离心机一台，并将温度设定为 4℃ 预冷；
- 加样枪头提前放置 -20℃ 预冷，于加样前取出；24 孔板提前放入 37℃ 恒温培养箱预热；
- 基质胶提前放置冰上或 4℃ 冰箱解冻；
- 15mL 无菌离心管用润洗液 (Catalog: D23025-0050) 润洗后置于冰上预冷；
- 将完全培养基从冰箱中取出，将温度平衡至室温；

6. 将类器官从液氮存储管中取出，迅速将冻存管放入 37 °C 水浴快速晃动 1-2 min，待冻存管内大部分冰块融化后取出；

注：从液氮罐取出类器官时，请严格按照实验室生物安全管理规定，做好防冻伤防护措施；

7. 将冻存管放置于冰上，带入细胞间，用酒精棉球对管壁进行消毒后，在生物安全柜中将类器官悬液转移至预冷的 15 mL 离心管内，加入 5mL 类器官复苏液（Catalog: D23040-0010），使用润洗后的 1000  $\mu$ L 移液枪头轻轻吹打 10 次混匀；

8. 4 °C，300 x g 离心 5 min；离心后弃去上清保留沉淀。

注：离心后，仔细观察离心管底部，有一白色薄层沉淀，避免吸液时丢失类器官。

9. 向离心管中加入 600  $\mu$ L 预冷的基质胶（Catalog: D23016-0010），轻轻混匀 10-15 次；

注：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡；请根据细胞量适当调整密度；

10. 按照 50 $\mu$ L /孔的量，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状；

注：种板时操作确保迅速，避免基质胶温度升高而凝固；

11. 将培养板置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 20 min，放置过程中避免晃动培养板；

12. 孵育完成后取出培养板，每孔加入完全培养基 500  $\mu$ L；

13. 显微镜下观察类器官复苏情况，培养板放入 37 °C 细胞培养箱中继续培养；

14. 类器官换液：每 2-3 天更换一次新鲜培养基。

注：接种后每日观察，整个操作应遵守无菌操作规程。

### 类器官传代

类器官培养 6-7 天或者类器官直径大于 50  $\mu$ m，可进行传代培养，传代前从培养箱内取出 24 孔板，放置倒置显微镜下观察有无污染或异常。

1. 按“类器官复苏”步骤 1-5 准备操作材料；

2. 取 50 ml DPBS 放于冰上预冷；

3. 取出培养板，在生物安全柜中沿孔边缘吸去旧培养基。

4. 每孔加入 500  $\mu$ L PBS，反复吹打使基质胶从板底脱落，将类器官转移至 15ml 离心管，用预冷 DPBS 定容至 8 ml；

5. 使用 1000  $\mu$ L 枪头温和吹打混匀 20-30 次，使类器官从基质胶中洗脱出来；

6. 4 °C，400 x g，离心 5 min；

7. 离心结束弃上清及上层基质胶，保留细胞沉淀；向管内加入新的预冷 DPBS 6 mL，1000  $\mu$ L 枪头温和吹打混匀 20-30 次；

8. 4 °C，400 x g，离心 5 min；

9. 离心后弃去上清，保留细胞沉淀，向离心管中加入 2000  $\mu$ L 类器官消化液（Catalog: D23031-0050），37 °C 消化 7 min 后用 1000  $\mu$ L 枪头温和吹打混匀 10-20 次，再次 37 °C 消化 7 min，用预冷 DPBS 定容至 6 mL；

注：消化并吹打结束后可取样镜下观察类器官消化情况，以类器官消化成单个细胞为宜；弃上清时操作要小心，避免吸液时类器官丢失；

10. 4 °C，400 x g，离心 5 min；

11. 离心后弃去上清，保留底部细胞沉淀；

12. 按照 0.4-0.6 $\times 10^6$  / ml 的密度，加入适量的基质胶（Catalog: D23016-0010）并吹打混匀 10-15 次。

注：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡；

13. 按照 50  $\mu$ L /孔的量，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状；

注：种板时操作确保迅速，避免基质胶温度升高而凝固；

14. 将培养板置于 37 °C 恒温培养箱中 20 min，放置过程中避免晃动培养板。

15. 取出培养板，每孔加入完全培养基 500  $\mu$ L。

16. 显微镜下观察类器官种板情况，培养板放入 37 °C 细胞培养箱中继续培养。

### 类器官冻存

类器官培养 6-7 天或者类器官直径大于 50  $\mu\text{m}$ ，可进行类器官冻存，冻存前从培养箱内取出 24 孔板，放置倒置显微镜下观察有无污染异常。

步骤“1-11”请参考“类器官传代”相应过程。

12. 按照 0.5x10<sup>6</sup> cell/Vial（用户可根据需求决定冻存密度）向离心管中添加类器官冻存液（Catalog: D23046-0050）；

13. 充分混匀后，将悬液分装至细胞冻存管（1 mL/Vial）；

14. 放至程序性降温盒，并转移至-80℃冰箱，次日将类器官转移至液氮罐长期保存。

#### 说明：

本产品含有活性因子，请严格按照试剂盒说明存放试剂，反复冻融或不适当保存将影响类器官培养效果；

本产品仅适用于科研，不可用于诊断或治疗领域；

如有疑问请联系公司相关技术人员获取帮助，感谢您的使用。