

# NGC organoid™

## 人结直肠类器官培养基

Catalog Number:K212M02-1

**注意！** 本产品含有活性因子，请严格按照产品说明存放试剂，反复冻融或不适当保存将影响实验结果。

### 产品描述

本产品为人结直肠类器官的复苏、培养、传代及冻存提供了经过优化的、高效并稳定的整体解决方案。

本产品用于人结直肠类器官的建立和维持培养。

人结直肠类器官的分化需使用人结直肠类器官分化培养基(Catalog: K212M02-2)，可得到成熟的人结直肠类器官，含有肠上皮所有细胞类型。类器官作为新型 3D 体外研究模型，在发育生物学、基础研究和肿瘤精准治疗等方面具有很大的应用前景。

### 产品信息

货号	名称	组分	规格	保存
K211M01	结直肠癌类器官培养基	组分A	96 mL	2-8°C，避光保存，12个月
		组分B	4 mL	-75°C，避免反复冻融，12个月
		组分C	1mL	-75°C，避免反复冻融，12个月

### 试剂配制与分装

- 使用前将组分B和组分C置于2°C - 8°C冰箱2-3小时，待完全融化后，将组分B和组分C加入到组分A中，充分混匀，配制成完全培养基；
- 按照每次用量分装完全培养基；
- 标签上记录配制日期，于2°C - 8°C冰箱避光保存。

注：建议完全培养基在1-3个月内使用完；组分B和组分C请勿反复冻融；

### 仪器

- 水平转子离心机(可降至4°C)
- 生物安全柜/超净工作台
- CO<sub>2</sub>培养箱(5%CO<sub>2</sub>, 37°C)
- 低温操作台
- 冰箱 (2-8°C)
- 水浴锅/金属浴
- 移液器
- 细胞计数仪
- 倒置显微镜

本产品仅适用于科研，不可用于诊断或治疗领域

### 操作说明

#### 操作前准备

- 离心机温度设定为 4°C 预冷；
- 加样枪头-20 °C 预冷，于加样前取出；
- 24 孔板置于 37°C 恒温培养箱预热；
- 基质胶 (Catalog: D23016-0010) 置于冰上或 4°C 冰箱 2-3 h 融化；  
注：使用过程中保持基质胶在 4°C 以下（建议全程置于冰上，防止凝胶，基质胶凝胶后不可融化后使用；类器官冻存无需使用基质胶）；
- 离心管经专用润洗液 (Catalog: D23025-0050) 润洗后置于冰上预冷；
- 配制后分装的完全培养基 (Catalog: K212M02-1) 温度平衡至室温；  
注：如需对基质胶进行稀释，可将稀释用的培养基置于 4°C 预冷；
- DPBS 置于冰上预冷。

## 参考体积

孔板	基质胶	培养基
24孔培养板	50 $\mu\text{L}$ /孔	500 $\mu\text{L}$
48孔培养板	30 $\mu\text{L}$ /孔	300 $\mu\text{L}$
96孔培养板	5 $\mu\text{L}$ /孔	200 $\mu\text{L}$

## 基质胶稀释

注意！操作过程中，基质胶全程置于冰上操作，防止凝胶。

类器官培养中如需对基质胶进行稀释，可参考如下操作（以70%稀释为例）：

1. 取300  $\mu\text{L}$  4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷完全培养基到1.5 mL 预冷的离心管中；
2. 加入700  $\mu\text{L}$ 基质胶，轻柔吹打，混合均匀；
3. 稀释后的基质胶置于冰上备用。

## 组织处理

注意！类器官操作过程中，所有离心管、移液器吸头、一次性吸管、细胞筛网等接触到类器官的耗材，操作前均需专用润洗液（Catalog: D23025-0050）润洗，以减少细胞损失。

1. 将组织样本在生物安全柜内，去除组织表面坏死、纤维化或凝结血块等杂质；
2. 50 mL离心管内加入20 mL 75%酒精，使用一次性镊子将组织块转移至离心管内，摇晃10-15s（不可超过15s），快速灭菌；
3. 将组织块使用一次性镊子转移至50 mL离心管内，加入20 mL DPBS，摇晃1 min，可更换DPBS，清洗至液体澄清；
4. 将组织样本转移至10 cm培养皿，使用无菌手术刀将组织均匀切割为3mm\*3mm左右的小块；
5. 使用一次性吸管转移至新的50 mL离心管，加入20 mL预冷DPBS清洗1 min，可更换DPBS，清洗至液体澄清后弃上清；
6. 将清洗完成后的组织块转移至50 mL离心管内，加入10 mL组织消化液（Catalog: D23013-0050）摇匀，置于37 $^{\circ}\text{C}$ 消化20-40 min；  
注：可每隔10 min取20  $\mu\text{L}$ 消化液显微镜下观察判断组织消化情况；
7. 加入3倍体积的DPBS终止消化，并使用移液器或者无菌一次性吸管吹打悬液20-50次至无明显组织块；  
注：移液器吸头或者无菌一次性吸管使用前需润洗；
8. 润洗液润洗100  $\mu\text{m}$  细胞筛网和收集细胞的50mL离心管；
9. 使用100  $\mu\text{m}$  细胞筛网过滤消化后的细胞悬液，至润洗后的50 mL离心管内；
10. 向组织消化的离心管内再次加入20 mL DPBS，吹打10-30次后将细胞悬液再次经100  $\mu\text{m}$  细胞筛网过滤至离心管内，DPBS定容至40 mL；
11. 4 $^{\circ}\text{C}$ ，300 Xg，离心5 min，弃去上清，保留细胞沉淀；
12. 向沉淀中加入1 mL DPBS混匀，取合适体积混合液至细胞计数仪计数，计算总细胞数量及活率；
13. DPBS定容至5 mL；
14. 4 $^{\circ}\text{C}$ ，300 Xg，离心5 min，离心后弃上清；
15. 使用预冷的完全培养基将基质胶（Catalog: D23016-0010）稀释到70%；
16. 沉淀中加入稀释的基质胶，并调节至每微升基质胶含100-1000细胞/细胞团；

17. 吹打使类器官与基质胶混合，类器官基质胶混合液以50  $\mu\text{L}$ /孔滴加至24孔培养板孔中心；  
注：混合过程中勿产生气泡；
18. 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育10-15 min；
19. 孵育结束每孔加入500  $\mu\text{L}$ 人结直肠类器官扩增培养基（Catalog: K212M02-1）；
20. 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养，每2-3天更换一次新鲜培养基。

## 相关试剂

货号	名称
K212M02-1	人结直肠类器官扩增培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23013-0050	组织消化液
D23025-0050	专用润洗液
/	DPBS
/	75%酒精

## 相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	无菌手术刀
24孔培养板	一次性镊子
100 $\mu\text{m}$ 细胞筛网	细胞计数板
10 cm培养皿	无菌一次性吸管

## 类器官传代

注意！类器官培养6-7天或者类器官直径大于200  $\mu\text{m}$ ，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。

类器官操作过程中，类器官操作过程中，所有离心管、移液器吸头、一次性吸管等接触到类器官的耗材，操作前均需专用润洗液（Catalog: D23025-0050）润洗，以减少细胞损失。

1. 取出培养板，在生物安全柜中沿孔边缘吸去培养基；
2. 每孔加入预冷的500  $\mu\text{L}$  DPBS，使用移液器吸头划胶使基质胶从板底脱落，使用无菌一次性吸管将类器官转移至15 mL离心管；  
注：无菌一次性吸管、移液器吸头、离心管等使用前需润洗；
3. 吹打混匀，使类器官从基质胶中洗脱出来，用预冷DPBS定容；
4. 4 $^{\circ}\text{C}$ ，300 x g，离心5 min；
5. 离心结束弃上清，保留沉淀；向管内加入新的预冷DPBS 6 mL，吹打混匀20-30次；
6. 4 $^{\circ}\text{C}$ ，300 x g，离心5 min；
7. 离心后弃上清，保留沉淀，向离心管中加入1 mL类器官消化液（Catalog: D23031-0050），37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3-5 min后用1 mL枪头吹打混匀10-20次，用预冷DPBS终止消化并定容至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，以类器官碎片小于30  $\mu\text{m}$ 为宜；弃上清时小心操作，避免吸液时类器官丢失；

- 4℃, 300 x g, 离心 5 min, 离心后弃去上清, 保留底部沉淀;
- 使用预冷的完全培养基将基质胶 (Catalog: D23016-0010) 稀释到 70%;
- 按照 10-15 类器官/ $\mu\text{L}$  的密度, 加入适量稀释的基质胶并吹打混匀 10-15 次;  
注: 此步骤尽可能迅速, 避免基质胶因温度升高而凝固; 吹打时请勿产生气泡; 请根据细胞量适当调整密度;
- 50  $\mu\text{L}$  / 孔, 将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状;
- 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 10-15 min, 过程中避免晃动培养板;
- 孵育结束后每孔加入 500  $\mu\text{L}$  人结肠类器官扩增培养基 (Catalog: K212M02-1);
- 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养, 每 2-3 天更换一次新鲜培养基。

## 相关试剂

货号	名称
K212M02-1	人结肠类器官扩增培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23031-0050	类器官消化液
D23025-0050	专用润洗液
/	DPBS

## 相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	24孔培养板
无菌一次性吸管	

### 类器官复苏

注意! 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。

类器官操作过程中, 类器官操作过程中, 所有离心管、移液器吸头、一次性吸管等接触到类器官的耗材, 操作前均需专用润洗液 (Catalog: D23025-0050) 润洗, 以减少细胞损失。

- 取出类器官后, 迅速将冻存管放入 37℃ 水浴快速晃动 1-2 min, 待冻存管内大部分冰块融化后取出;
- 将冻存管放置于冰上, 用酒精棉球对管壁消毒后, 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 5 mL 类器官复苏液 (Catalog: D23040-0010), 使用润洗后的 1 mL 移液枪头轻轻吹打 10 次混匀;
- 4℃, 300 x g 离心 5 min; 离心后弃上清保留沉淀;  
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;
- 使用预冷的完全培养基将基质胶 (Catalog: D23016-0010) 稀释到 70%;
- 向离心管中加入 50  $\mu\text{L}$  稀释的基质胶, 轻轻混匀 10-15 次;  
注: 此步骤尽可能迅速, 避免基质胶因温度升高而凝固; 吹打时请勿产生气泡;
- 取 2  $\mu\text{L}$  混合液于载玻片, 显微镜下计数;

- 根据镜检结果, 加入适量稀释基质胶, 吹打混匀 10-15 次, 建议按照 10-15 类器官/ $\mu\text{L}$  的密度;  
注: 类器官复苏可适当提高密度; 如冻存时为每支 2000 类器官, 复苏时一般使用 100-200  $\mu\text{L}$  基质胶, 2-4 个孔 (24 孔板);
- 50  $\mu\text{L}$  / 孔, 将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状;
- 37℃、 $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 10-15 min, 过程中避免晃动培养板;
- 孵育结束后每孔加入 500  $\mu\text{L}$  人结肠类器官扩增培养基 (Catalog: K212M02-1);
- 显微镜下观察类器官复苏情况;
- 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养, 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。

## 相关试剂

货号	名称
K212M02-1	人结肠类器官扩增培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23040-0050	类器官复苏液
D23025-0050	专用润洗液

## 相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	24孔培养板
载玻片	

### 类器官冻存

注意! 类器官培养 3-5 天或者类器官直径大于 80  $\mu\text{m}$ , 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。

类器官操作过程中, 类器官操作过程中, 所有离心管、移液器吸头、一次性吸管等接触到类器官的耗材, 操作前均需专用润洗液 (Catalog: D23025-0050) 润洗, 以减少细胞损失。

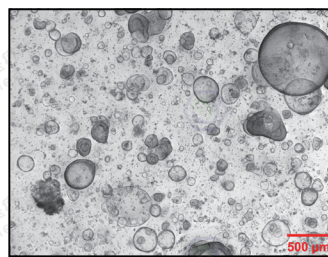
- 取出培养板, 在生物安全柜中沿孔边缘吸去培养基;
- 每孔加入预冷的 500  $\mu\text{L}$  DPBS, 使用移液器吸头划胶使基质胶从板底脱落, 使用无菌一次性吸管将类器官转移至 15 mL 离心管;  
注: 无菌一次性吸管、移液器吸头、离心管等使用前需润洗;
- 吹打混匀, 使类器官从基质胶中洗脱出来, 用预冷 DPBS 定容;
- 4℃, 300 x g, 离心 5 min;
- 离心结束弃上清, 保留沉淀;
- 加入类器官冻存液 (Catalog: D23046-0050), 按照密度 4000 类器官/ $\text{mL}$  冻存液, 轻轻吹打混匀; 将细胞悬液分配至冻存管中 (用户可根据需求调整冻存密度);
- 充分混匀后, 将悬液分装至冻存管, 每管 500  $\mu\text{L}$  (约 2000 类器官/管);
- 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。

注: 如冻存时类器官密度在 85% 以上, 可一个孔 (24 孔板) 冻存一支; 如类器官密度较稀, 可 2-3 个孔 (24 孔板) 冻存一支。



## 相关试剂

货号	名称
D23046-0050	类器官冻存液
D23025-0050	专用润洗液
/	DPBS



扩增期人结直肠类器官

## 相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	无菌一次性吸管
冻存管	

本文件中的信息如有更改，恕不另行通知。

使用本产品即表示您接受所有条款和条件。

丹望医疗保留所有权利。除非另有说明，均为丹望医疗及其子公司所有。