

## NGC organoid™ 结直肠癌类器官试剂盒说明书

Catalog Number# K21101 & K211M01

### 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。试剂盒包含 3 个组分，分别为结直肠癌类器官培养基组分 A、B 和 C，3 个组分混合后可配制完全培养基，用于结直肠癌类器官培养。肿瘤类器官作为新的肿瘤体外疾病模型，在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

Kit Catalog	Component	Catalog Number	Specifications	Storage & Stability
K21101	结直肠癌类器官培养基组分 A	120-A101-0050	48mL	2-8°C, 避光保存, 12 个月
	结直肠癌类器官培养基组分 B	120-A102-0050	2mL	-75°C以下, 避免反复冻融, 12 个月
	结直肠癌类器官培养基组分 C	120-A103-0050	0.5mL	-75°C以下, 避免反复冻融, 12 个月
K211M01	结直肠癌类器官培养基组分 A	120-A101-0100	96mL	2-8°C, 避光保存, 12 个月
	结直肠癌类器官培养基组分 B	120-A102-0100	4mL	-75°C以下, 避免反复冻融, 12 个月
	结直肠癌类器官培养基组分 C	120-A103-0100	1mL	-75°C以下, 避免反复冻融, 12 个月

### 需要准备的其它试剂

Manufacturer	Product Name	Catalog Number	Specifications
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	/	/

### 使用前准备

#### A. 完全培养基配制

1. 使用前将组分 B 和组分 C 置于 2°C - 8°C 冰箱 2-3 小时融解，待完全溶解后，将组分 B 和组分 C 加入基础培养基（组分 A）中，充分混匀；

注：组分 B 和组分 C 请勿反复冻融；

2. 在配制好的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 个月内使用完；

#### B. 基质胶

使用前将基质胶置于冰上或 2°C - 8°C 冰箱 2-3 小时解冻；

注：使用过程中保持基质胶在 4°C 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。

1. 准备低温、低速离心机一台，并将温度设定为 4°C 预冷；

2. 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；
3. 基质胶提前放置冰上或4℃冰箱解冻（参考“使用前准备B”）；
4. 15mL 无菌离心管用润洗液（Catalog: D23025-0050）润洗后置于冰上预冷；
5. 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℃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P1000移液枪头轻轻吹打10次混匀；
8. 4℃，250 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400 ul 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50ul/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℃恒温培养箱中孵育10 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 ul；
13. 显微镜下观察类器官复苏情况，培养板放入37℃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200um，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50ml 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500ul 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8ml；
5. 使用P1000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℃，200 x g，离心5min；
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 6mL，P1000枪头温和吹打混匀20-30次；
8. 4℃，200 x g，离心5min；
9. 离心后弃去上清，保留细胞沉淀，向离心管中加入1000μL类器官消化液（Catalog: D23031-0050），37℃消化3-4min后用P1000枪头温和吹打混匀10-20次，用预冷DPBS定容至6mL。  
*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30um为宜；弃上清时操作要小心，避免吸液时类器官丢失。*
10. 4℃，200 x g，离心5min。
11. 离心后弃去上清，保留底部细胞沉淀。
12. 按照10-15 organoids/μL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50ul/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℃恒温培养箱中10 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 μL。
16. 显微镜下观察类器官种板情况，培养板放入37℃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 200um，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或异常。

步骤“1-11”请参考“类器官传代”相应过程。

12. 按照 1000 Organoids/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: D23046-00）；

13. 充分混匀后，将悬液分装至细胞冻存管（1mL/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。