

NGC organoid™

皮肤组织消化液

Catalog Number:K213M01

注意！ 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实验结果。

产品描述

本产品用于原代角质细胞的有效解离，进而快速获得细胞团或单细胞悬液，获得的细胞可用于后续类器官培养。

产品信息

货号	名称	规格	保存
K213M01	皮肤组织消化液 I	5 mL	-20℃, 避免反复冻融, 6个月
	皮肤组织消化液 II	5 mL	2-8℃, 避光保存, 6个月

试剂分装

A. 组织消化液准备

1. 使用前将皮肤组织消化液 I (Catalog: K213M01-001-0005) 从-20℃环境取出，放置室温使其融化，待完全溶解后上下颠倒瓶身数次，使液体充分混匀；

2. 5 mL皮肤组织消化液 I 加入基础培养基 (DMEM) 定容至12.5 mL，配置后在标签上记录配制日期，于2-8℃冰箱避光保存；

注：皮肤组织消化液 I 配制完成后，建议在1个月内使用完；

B. 配制含有5%FBS、1%青霉素-链霉素的DMEM中和液用于终止消化。

注：本实验所用离心管、枪头等，需提前使用专用润洗液进行润洗。

仪器

1. 水平转子离心机(可降至4℃)
2. 生物安全柜/超净工作台
3. CO₂培养箱(5%CO₂, 37℃)
4. 低温操作台
5. 冰箱 (2-8℃)
6. 水浴锅/金属浴
7. 移液器
8. 细胞计数仪
9. 倒置显微镜

操作说明

组织消化

注意！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、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: D23025-0100) 润洗，以减少细胞损失。

1. 将手术样本环形包皮组织展平于10 cm培养皿中，用含有1%青霉素-链霉素的DPBS溶液浸泡，反复漂洗，去除残留血液；
2. 剔除组织的皮下结构，如脂肪、血管等，漂洗数次；
3. 将组织均匀剪成0.5-1.5 cm左右大小方块状，再次漂洗，直至漂洗液清澈；
4. 将清洗后小块组织放入10 mL新鲜配置的皮肤组织消化液 I 中，表皮层朝下，置于4℃冰箱中过夜消化；
注：建议消化时间为12-14 h；
5. 消化过夜后，用无菌镊子轻轻牵拉，将包皮组织的表皮和真皮分离，收集表皮皮片；
6. 用无菌手术剪将表皮剪碎成糊状，置入培养皿中；
7. 加入3 mL皮肤组织消化液 II (Catalog: K213M01-002-0005)，于37℃的培养箱中消化10分钟；
8. 将培养皿置于显微镜下观察消化情况；

注：可轻拍皿壁，镜下见大量漂浮游离的细胞亮点，即证明消化过程完毕，否则可适当延长消化时间。

- 9. 消化完成后，加入3 mL含有5%FBS、1%青霉素-链霉素的DMEM中和液终止消化；
- 10. 反复轻柔吹打，使细胞团块分散；
- 11. 润洗液润洗40 μm 细胞筛网和收集细胞的50 mL离心管；
- 12. 40 μm细胞筛网过滤，过滤液收集至润洗后的50 mL离心管中；
- 13. 4℃，400 g，离心5 min；
- 14. 使用DPBS重悬细胞沉淀；
- 15. 4℃，400 g，离心5 min。

操作前准备

- 1. 离心机温度设定为 4℃预冷；
- 2. 加样枪头置于-20 °C预冷，于加样前取出；
- 3. 24 孔板置于 37℃恒温培养箱预热；
- 4. 基质胶（Catalog: D23016-0010）置冰于上或 4℃冰箱2-3 h融化；
注：使用过程中保持基质胶在4℃以下（建议置于冰上保存），温度升高会导致基质胶凝固而不可使用
- 5. 离心管经润洗液（Catalog: D23025-0100）润洗后置于冰上预冷；
- 6. 分装的人表皮类器官培养基（Catalog: K212M11）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℃预冷；
- 7. DPBS 置于冰上预冷。

相关试剂

货号	名称
K213M01	皮肤组织消化液
D23025-0100	专用润洗液
K212M11	人表皮类器官培养基
/	基础培养基（DMEM）
/	DPBS（1X），liquid
/	1%青霉素-链霉素
/	胎牛血清（FBS）

类器官培养

注意！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: D23025-0100）润洗，以减少细胞损失。

- 1. 沉淀中加入适量预冷的基质胶（Catalog: D23016-0010），轻轻混匀 10-15 次；
- 2. 取合适体积混合液至显微镜下观察密度；
- 3. 加入适量的基质胶调整密度，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；吹打时不要产生气泡；请根据细胞量适当调整密度；
- 4. 50 μL / 孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状；
- 5. 37℃、5% CO2培养箱中孵育 20 min，过程中避免晃动培养板；
- 6. 孵育结束后每孔加入500 μL人表皮类器官培养基（Catalog: K212M11）；
- 7. 37℃、5% CO2培养箱中继续培养，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。

相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	细胞计数板
24孔培养板	无菌手术剪
40 μm细胞筛网	一次性镊子
10 cm培养皿	

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，均为丹望医疗及其子公司所有。

NGC organoid™

人表皮类器官培养基

Catalog Number:K212M11

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

本产品为人表皮类器官的复苏、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。

本产品用于人表皮类器官的建立和维持培养。

人类器官重组表皮模型需使用人类器官重组表皮培养基(Catalog: K212M12)。

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
K212M11	人表皮类器官培养基	组分A	96 mL	2-8℃，避光保存,12个月
		组分B	4 mL	-20℃，避免反复冻融，12个月
		组分C	1mL	-20℃，避免反复冻融，12个月

试剂分装

- 使用前将组分B 和组分C 置于2℃ - 8℃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℃ - 8℃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℃)
- 生物安全柜/超净工作台
- CO₂ 培养箱(5%CO₂, 37℃)
- 低温操作台
- 冰箱（2-8℃）
- 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℃预冷；
- 加样枪头4℃预冷，于加样前取出；
- 24 孔板置于37℃恒温培养箱预热；
- 基质胶（Catalog: D23016-0010）置于冰上或 4℃冰箱2-3 h融化；
注：使用过程中保持基质胶在4℃以下（建议置于冰上保存），温度升高会导致基质胶凝固而不可使用；类器官冻存无需使用基质胶；
- 离心管经专用润洗液（Catalog: D23025-0100）润洗后置于冰上预冷；
- 配制后分装的培养基（Catalog: K212M11）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℃预冷；
- DPBS 置于冰上预冷。

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，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: D23025-0100）润洗，以减少细胞损失。

1. 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；
2. 将冻存管放置于冰上，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 5 mL 类器官复苏液（Catalog: D23040-0100），使用润洗后的 1 mL 移液枪头轻轻吹打 10 次混匀；
3. 4℃，400 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；
4. 使用预冷的完全培养基将基质胶（Catalog: D23016-0010）稀释到 70%；
5. 向离心管中加入 50 μL 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；
6. 取 2 μL 混合液于载玻片，显微镜下计数；
7. 根据镜检结果，加入适量稀释的基质胶，轻轻混匀 10-15 次；
注：类器官复苏可适当提高密度；如冻存时为每支 0.5×10⁶ 个细胞，复苏时一般使用 400-600 μL 基质胶；
8. 50 μL / 孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状；
9. 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 10-15 min，过程中避免晃动培养板；
10. 孵育结束后每孔加入 500 μL 人表皮类器官培养基（Catalog: K212M11）；
11. 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养，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。

相关试剂

货号	名称
K212M11	人表皮类器官培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23040-0100	类器官复苏液
D23025-0100	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	

类器官传代

注意！类器官培养 6-7 天或者类器官直径大于 50 μm，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，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: D23025-0100）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 500 μL 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，用预冷 DPBS 定容至 8 mL；
注：无菌一次性吸管使用前需润洗；
3. 吹打混匀，使类器官从基质胶中洗脱出来；
4. 4℃，400 g，离心 5 min；
5. 离心后弃上清，保留沉淀；加入新的预冷 DPBS 6 mL，1 mL 枪头吹打混匀 20-30 次；
6. 4℃，400 g，离心 5 min；
7. 离心后弃上清，保留沉淀，向离心管中加入 2 mL 类器官消化液（Catalog: D23031-0100），37℃ 消化 7 min 后用 1 mL 枪头吹打混匀 10-20 次，再次 37℃ 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消化情况，以类器官消化成单个细胞为宜；弃上清时小心操作，避免吸液时类器官丢失；
8. 4℃，400 g，离心 5 min；
9. 离心后弃上清，保留底部沉淀；
10. 使用预冷的完全培养基将基质胶（Catalog: D23016-0010）稀释到 70%；
11. 向沉淀中加入适量预冷的稀释后的基质胶，轻轻混匀 10-15 次；
12. 取合适体积混合液至显微镜下观察；
13. 按照每微升基质胶 400-600 个细胞的密度，加入适量的稀释后的基质胶调整密度，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；吹打时不要产生气泡；请根据细胞量适当调整密度；
14. 50 μL / 孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球形状；
15. 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 20 min，过程中避免晃动培养板；
16. 孵育结束后每孔加入 500 μL 人表皮类器官培养基（Catalog: K212M11）；
17. 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养，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。

相关试剂

货号	名称
K212M11	人表皮类器官培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23031-0100	类器官消化液
D23025-0100	专用润洗液
/	DPBS

相关耗材

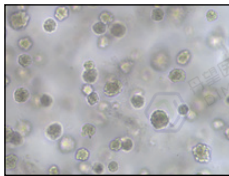
名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	24孔培养板
无菌一次性吸管	

类器官冻存

注意！类器官培养3-5天或者类器官直径50 μm左右，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: D23025-0100）润洗，以减少细胞损失。

1. 请参考“类器官传代”1-9对类器官进行消化收集；
2. 按照 0.5×10^6 / mL 的密度，（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: D23046-0100）；
3. 充分混匀后，将悬液分装至细胞冻存管（1 mL/管）；
4. 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。



人表皮类器官

相关试剂

货号	名称
D23046-0100	类器官冻存液
D23025-0100	专用润洗液
/	DPBS

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。