

NGC ORGANOID[®] 结直肠癌类器官培养基 ALL IN ONE

Catalog: D611M01

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

本产品为结直肠癌类器官的复苏、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。

本产品用于结直肠癌类器官的建立和维持培养。

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

名称	货号	规格	保存
结直肠癌类器官培养基	D611M01	100 mL	-20℃及以下，避免反复冻融，12 个月

配制与分装

将本品于 2~8℃ 下完全融化后，即可直接使用。

注：若融化后的培养基预计在 3 个月内无法全部用完，建议按单次使用量进行分装冻存。

示例：若单次仅需 10 mL 培养基，则取首次融化后的培养基，分装至 10 支 15 mL 离心管中，每管 10 mL。其中 1 管（现用）继续存放于 2~8℃；其余 9 管置于 -20℃ 及以下条件冷冻保存，避免反复冻融。

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. 细胞计数器
9. 倒置显微镜

操作说明

操作前准备

离心机温度设定为 4℃ 预冷；

1. 加样枪头-20℃ 预冷，于加样前取出；
2. 24 孔板置于 37℃ 恒温培养箱预热；

3. 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。

4. 离心管经专用润洗液 (Catalog: D23025-0100) 润洗后置于冰上预冷；

5. 完全培养基 (Catalog: D611M01) 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。

6. DPBS 置于冰上预冷。

体积参考

孔板	基质胶	培养基
24 孔培养板	50 μL/孔	500 μL
48 孔培养板	20 μL/孔	300 μL
96 孔培养板	5 μL/孔	200 μL

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 μL 4℃ 预冷完全培养基到 1.5 mL 预冷的离心管中；
2. 加入 700 μL 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: D23025-0100）润洗，以减少细胞损失。

1. 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. 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: D23013-0100）摇匀，置于 37°C 消化 20-40 min；
注：可每隔 10 min 取 20 μ L 消化液显微镜下观察判断组织消化情况；
7. 加入 2 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 μ m 细胞筛网和收集细胞的 50mL 离心管；
9. 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 DPBS，吹打 10-30 次后将细胞悬液再次经 100 μ m 细胞筛网过滤至离心管内，DPBS 定容至 40 mL；
11. 4°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；4°C，300 Xg，离心 5 min，离心后弃上清；
14. 沉淀中加入 70% 基质胶，调节至每微升基质胶含 100-1000 细胞/细胞团；
15. 吹打使类器官与基质胶混合，类器官基质胶混合液以 50 μ L/孔滴加至 24 孔培养板孔中心；
注：混合过程中勿产生气泡；
16. 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 15-30 min；
17. 孵育结束后每孔加入 500 μ L 结直肠癌类器官培养基 (Catalog: D611M01)；
18. 37°C、5% CO₂ 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
D611M01	结直肠癌类器官培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23013-0100	组织消化液
D23025-0100	专用润洗液
/	DPBS
/	75%酒精

相关耗材

名称	名称
15 mL\50 mL 离心管	无菌手术刀
24 孔培养板	一次性镊子
100 μ 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 μ m，可进行传代培养，传代前从培养箱内取出 24 孔板，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: D23025-0100）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；每孔加入预冷的 500 μ 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；
2. 用预冷 DPBS 定容，吹打混匀，使类器官从基质胶中洗脱出来；
3. 4°C，300 x g，离心 5 min；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；4°C，300 x g，离心 5 min；
4. 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: D23013-0100)，37°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 μ m 为宜；弃上清时小心操作，避免吸液时类器官丢失；
5. 4°C，300 x g，离心 5 min，离心后弃去上清，保留底部沉淀；
6. 将基质胶 (Catalog: D23016-0010) 稀释到 70%；
7. 按照 10-15 类器官/ μ L 的密度，加入适量基质胶并吹打混匀 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；
8. 50 μ L/孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球状；
9. 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 15-30 min，过程中避免晃动培养板；
10. 孵育结束后每孔加入 500 μ L 结直肠癌类器官培养基 (Catalog: D611M01)；
11. 37°C、5% CO₂ 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
D611M01	结直肠癌类器官培养基
D23016-0010	类器官标准基质胶
D23013-0100	组织消化液
D23025-0100	专用润洗液
/	75%酒精

相关耗材

名称	名称
15 mL\50 mL 离心管	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: D23025-0100) 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. 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 15 mL 离心管内，加入 5 mL 预冷的类器官复苏液 (Catalog: D23040-0100)，使用润洗后的 1 mL 移液器轻轻吹打 10 次混匀；

3. 4℃，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；

4. 向离心管中加入 50 μL 70% 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；

5. 取 2 μL 混合液于载玻片，显微镜下计数；

6. 根据镜检结果，加入适量基质胶，吹打混匀 10-15 次，建议按照 10-15 类器官/μL 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 μL 基质胶，2-4 个孔 (24 孔板)；

7. 50 μL / 孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球状；

8. 37℃、CO₂ 培养箱中孵育 15-30 min，过程中避免晃动培养板；

9. 孵育结束后每孔加入 500 μL 结直肠癌类器官培养基 (Catalog: D611M01)；显微镜下观察类器官复苏情况；

10. 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
D611M01	结直肠癌类器官培养基
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
15 mL\50 mL 离心管	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 μm，可进行类器官冻存，冻存前从培养箱内取出 24 孔板，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. 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 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；

注：无菌一次性吸管、移液器吸头、离心管等使用前需润洗；

3. 用预冷 DPBS 定容，吹打混匀，使类器官从基质胶中洗脱出来；

4. 4℃，300 x g，离心 5 min；

5. 离心后弃去上清，保留底部沉淀；

6. 加入类器官冻存液 (Catalog: D23046-0100)，按照密度 4000 类器官/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)；

7. 充分混匀后，将悬液分装至冻存管，每管 500 μL (约 2000 类器官/管)；

8. 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。

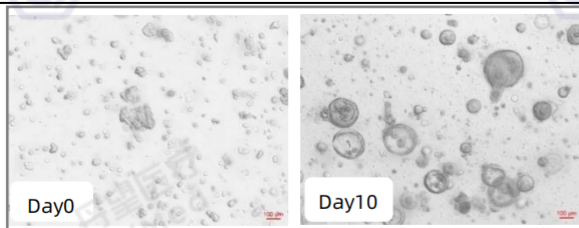
相关试剂

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

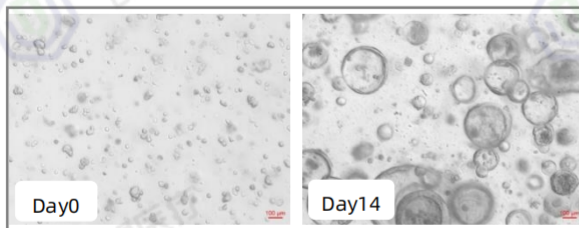
相关耗材

名称	名称
离心管 15 mL\50 mL	无菌一次性吸管
冻存管	

P0



P1



P2

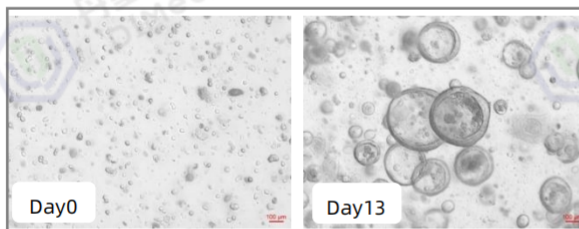


图 1. 患者组织来源结直肠癌类器官在 P0、P1、P2 代的明场图像

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。