NGC organoid ™

肝内胆管癌类器官培养基

Catalog Number:K211M04/K211L04

⚠ 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

本产品为肝内胆管癌类器官的复苏、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。

本产品用于肝内胆管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

货号	名称	组分	规格		保存
			100 mL	500 mL	
K211M04（100mL） K211L04（500mL）	肝内胆管癌类器官培养基	组分A	96 mL	480 mL	2-8℃，避光保存，12个月
		组分B	4 mL	20 mL	-20℃及以下，避免反复冻融，12个月
		组分C	1 mL	5 mL	-20℃及以下，避免反复冻融，12个月

配制与分装

1. 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 分别摇匀，然后加入到组分A中，充分混匀，配制成完全培养基；
2. 按照每次使用量分装完全培养基；
3. 标签上记录配制日期，于-20℃及以下避光保存。

注：建议分装至15 mL离心管中，每管10 mL。其中1管（现用）存放于2~8℃（一个月内用完）；其余置于-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. CO_2培养箱(5%CO_2, 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

操作前准备

1. 离心机温度设定为 4℃预冷；
2. 加样枪头-20 ℃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；
5. 离心管经专用润洗液（Catalog: D23025-0100）润洗后置于冰上预冷；
6. 完全培养基（Catalog: K211M04/K211L04）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；
7. 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 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. 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: D23013-0100）摇匀，置于37℃消化20-40 min；

   注：可每隔10 min取20 μL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 μm 细胞筛网和收集细胞的50mL离心管；
9. 使用100 μm 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 μm 细胞筛网过滤至离心管内，DPBS定容至40 mL；
11. 4℃，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℃，300 Xg，离心5 min，离心后弃上清；
15. 将基质胶（Catalog: D23016-0010）稀释到70%；
16. 沉淀中加入基质胶，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 μL/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℃、5% CO_2培养箱中孵育15-30 min；
19. 孵育结束每孔加入500 μL肝内胆管癌类器官培养基（Catalog: K211M04/K211L04）；
20. 37℃、5% CO_2培养箱中继续培养，每2天更换一次新鲜培养基。

相关试剂

货号	名称
K211M04/K211L04	肝内胆管癌类器官培养基
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
离心管 15 mL\50 mL	无菌手术刀
24孔培养板	一次性镊子
100 μm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 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，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℃，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: D23031-0100），37℃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 μm 为宜；弃上清时小心操作，避免吸液时类器官丢失；

8. 4 ℃，300 x g，离心 5 min，离心后弃去上清，保留底部沉淀；
9. 将基质胶（Catalog: D23016-0010）稀释到70%；
10. 以 10-15 类器官/μL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；
11. 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；
12. 37℃、5% CO_2培养箱中孵育 15-30 min，过程中避免晃动培养板；
13. 孵育结束后每孔加入500 μL肝内胆管癌类器官培养基（Catalog: K211M04/K211L04）；
14. 37℃、5% CO_2培养箱中继续培养，每2天更换一次新鲜培养基。

相关试剂

货号	名称
K211M04/K211L04	肝内胆管癌类器官培养基
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. 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: D23040-0100），使用润洗后的1 mL 移液枪头轻轻吹打 10 次混匀；
3. 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；
4. 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 15-30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100-200μL基质胶，2-4个孔(24孔板)；
8. 50 μL /孔，将基质胶与类器官悬液滴加至 24 孔板中心成半球状；
9. 37℃、CO_2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 μL肝内胆管癌类器官培养基 （Catalog: K211M04/K211L04）；
11. 显微镜下观察类器官复苏情况；
12. 37℃、5% CO_2培养箱中继续培养，每2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
K211M04/K211L04	肝内胆管癌类器官培养基
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
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 μm，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。

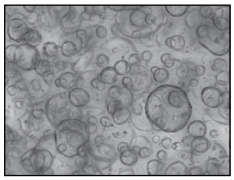
1. 取出培养板，在生物安全柜中沿孔边缘吸去培养基；
2. 每孔加入预冷的 500 μL DPBS，使用移液器吸头划胶使基质胶从板底脱落，使用无菌一次性吸管将类器官转移至 15 mL 离心管；

   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



肝内胆管癌类器官

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。