

类器官收货处理方法

收到类器官后请务必仔细阅读产品资料，了解类器官相关信息，如类器官形态、培养体系、培养方法等。海星生物寄送类器官的方式为干冰运输，收到类器官后，请先检查包装是否完整，干冰是否充足，冻存管有无破损等情况，并核对冻存管上的标签信息，冻存管数是否与发货清单一致。

低温保存的类器官非常脆弱，收到类器官如在 24 小时内复苏，可存放于-80°C冰箱；超过 24 小时请存放于液氮中。建议尽快复苏，具体复苏操作见“类器官复苏”。若复苏有异常，及时与我们联系。

类器官培养操作步骤

请提前准备以下试剂

试剂名称	保存条件	使用温度和注意事项
类器官培养基	4°C, 3 个月/-20°C, 12 个月	避免反复冻融, 室温或 37°C
原代缓冲液	4°C, 24 个月	4°C预冷
原代组织消化液	4/-20°C, 12 个月	37°C预热
类器官传代消化液	4/-20°C, 12 个月	37°C预热
组织保存液	4/-20°C, 12 个月	4°C预冷
PDO 专研冻存液	-20°C, 24 个月	4°C预冷
传代缓冲液	4°C, 24 个月	4°C预冷
基质胶	-20°C, 12 个月	使用分装, 提前放置 4°C冰箱融化

类器官复苏

1. 开启 37 °C水浴锅，提前将类器官冻存管从液氮中取出，放于-80 °C冰箱，让冻存管中液氮挥发。
2. 洁净工作台内准备 15 mL 离心管，往离心管中加入至少 10 mL 的传代缓冲液。
3. 从-80 °C冰箱中取出类器官，快速将冻存管置于 37 °C水浴锅内，快速晃动，使冻存液迅速融化。

注意：1) 融化过程中必须晃动冻存管，保证冻存液融化均匀，晃动时应避免水没过管盖增加污染风险。

2) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，可停止水浴，继续晃动冻存管至冰晶融化。

4. 用 75%酒精消毒冻存管表面。在洁净工作台内小心开盖，避免气泡溢出，转移类器官至预先准备的离

为科研加速，为工业赋能！



关注海星公众号



关注海星视频号



心管内。

5. 轻柔上下颠倒混匀后，300 g 离心 5 分钟，弃上清。

注意：用枪轻轻吸，避免直接倾倒。

6. 加入 10 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，轻柔重悬类器官沉淀。
7. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。
8. 尽量去除上清，观察收集到的细胞沉淀体积量，添加 25 倍细胞沉淀体积的基质胶重悬，充分混匀。
注意：一般接种大约 10000 个细胞在 40μL 的基质胶中，有关基质胶重悬的操作建议在 0-4°C 条件下进行。
9. 以 24 孔板为例，每孔加 25-30 μL 基质胶与类器官的混合物。
10. 放入 37 °C 培养箱中 15-30 分钟，等待基质胶凝固。
11. 每孔加 750 μL 类器官培养基，置于 37 °C 培养箱中培养。

类器官传代

1. 弃上清，收集类器官：

1) 当类器官密度达到冻存要求但体积较小时：

每孔加入 1 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，轻柔吹打基质胶。一般 6-8 个孔为一组，收集类器官于 15 mL 离心管，每管补充体积至 10 mL。进行步骤 2。

2) 当类器官数量较多或体积较大时：

a) 机械传代：每孔加入 1 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，使用移液枪吹打 20-30 次，一般 3 个孔为一组，收集类器官于 15 mL 离心管，每管补充体积至 10 mL。若观察到类器官分散均匀，即可进行步骤 2。

b) 消化液传代：若类器官没有被吹散，或类器官本身空腔比较大，首先去胶，进行步骤 2 和步骤 3，弃上清后，管底的类器官可以用消化液消化传代。加入 1-2 mL 类器官传代消化液，重悬后室温消化，每隔 1 分钟吹打一次，吹打时观察到无明显颗粒，或者在显微镜下观察直至出现 2-10 个细胞的细胞团时，即可停止。加入 3 倍类器官消化液体积的传代缓冲液终止消化。收集类器官于 15 mL 离心管。即可进行步骤 3。

2. 将离心管放入 4 °C 冰箱静置 15-30 分钟。

3. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。

注意：用枪轻轻吸，避免直接倾倒。

4. 加入 10 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，轻柔重悬类器官沉淀。
5. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。
6. 尽量去除上清，观察收集到的细胞沉淀体积量，添加 25 倍细胞沉淀体积的基质胶重悬，充分混匀。
注意：一般接种大约 10000 个细胞在 40μL 的基质胶中，有关基质胶重悬的操作建议在 0-4°C 条件下进行。
7. 以 24 孔板为例，每孔加 25-30 μL 基质胶与类器官的混合物。
8. 放入 37 °C 培养箱中 15-30 分钟，等待基质胶凝固。
9. 每孔加 750 μL 类器官培养基，置于 37 °C 培养箱中培养

为科研加速，为工业赋能！



关注海星公众号



关注海星视频号



类器官冻存

1. 当类器官密度达到冻存要求时，弃去培养基，每孔加入 1 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，轻柔吹打基质胶，收集类器官于 15 mL 离心管。
2. 将离心管放入 4 °C 冰箱静置 15-30 分钟。
3. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。
注意：用枪轻轻吸，避免直接倾倒。
4. 加入 10 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，轻柔重悬类器官沉淀。
5. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。
6. 加入 1 mL 类器官冻存液，轻柔重悬后转入细胞冻存管中。
**注意：1) 每 1 mL 冻存液推荐冻存数量为 1×10^3 - 1×10^7 个对应细胞数量的类器官。
2) 冻存结构紧密的类器官，可使用类器官消化液适当消化后再使用传代缓冲液清洗 2 次后进行冻存。**
7. 将冻存管放入程序降温盒（提前平衡至室温或 4 °C）中，转移至 -80 °C 冰箱中，24 小时后转移到液氮罐中保存。

类器官原代培养

1. 收到新鲜组织样本后，用无菌 1xPBS 清洗 3-5 次以去除样本表面血液，放入 4 °C 预冷的组织保存液中保存运输（72 小时以内）。
2. 将预处理的组织转移至洁净实验室进行组织处理和细胞分离，拍照并登记信息。
3. 准备若干培养皿，往培养皿中加入 4 °C 预冷的原代缓冲液备用。
4. 将组织放入培养皿中，原代缓冲液清洗 3-5 次，洗去杂质。使用眼科剪或手术刀将组织切割成体积约为 1~3 mm 的组织块（建议放入 1.5 mL EP 管剪碎组织）。
5. 往剪碎后的组织块中加入约 3 mL 的原代组织消化液，37 °C 摇床中震荡消化，消化过程中随时观察组织消化情况。
6. 取少量消化液在显微镜下观察，当在镜下观察到较多的 70 μm 以下的细胞簇或单个细胞后，加入 3 倍体积原代缓冲液终止消化。
7. 使用 100 μm 孔径的筛网过滤，将细胞滤液置于离心机中以 300 g 离心 5 分钟，弃去上清，加入原代缓冲液再次重悬，再次 300g 离心 5 分钟后弃去上清（沉淀过少或无红细胞时进入步骤 9）。
8. 若细胞沉淀含有红细胞，弃上清后加入 1 mL 红细胞裂解液，裂解 1-2 分钟后稀释至 10 mL，再次以 300 g 离心 5 分钟。
9. 尽量去除上清，观察收集到的细胞沉淀体积量，添加 25 倍细胞沉淀体积的基质胶重悬，充分混匀。
注意：一般接种大约 10000 个细胞在 40μL 的基质胶中，有关基质胶重悬的操作建议在 0-4°C 条件下进行。
10. 以 24 孔细胞培养板为例，每孔点 25-30 μL 组织基质胶混合物进行铺板。
11. 放入 37 °C 培养箱中 15-30 分钟，等待基质胶凝固。
12. 每孔加 750 μL 类器官培养基，置于 37 °C 培养箱中培养

为科研加速，为工业赋能！



关注海星公众号



关注海星视频号



其他注意事项

1. 培养容器 37 °C提前预热，能够使基质胶添加后迅速凝固，防止基质胶散开和类器官贴壁。添加基质胶后可倒置培养容器，使基质胶形成 3D 突起状胶状物，有利于类器官生长。
2. 添加培养基时不要直接滴加到胶上，防止对基质胶的破坏，如果基质胶飘起来，则需要离心重新混合基质胶再铺板。
3. 基质胶不能过度稀释，以防不能很好凝结为固态。
4. 类器官培养的时候，培养一段时间再传代，过早传代会降低类器官的活率。
5. 定期做支原体等污染的检测。
6. 消化液消化类器官，最好不要超过 15 分钟，镜下实时监测，出现 2-10 个细胞的细胞团时，则消化完全。当类器官出现囊状或葡萄状的形态时，再用机械吹打代替消化液消化。
7. 类器官传代 2-3 天，此时冻存后复苏会有比较好的复苏率。
8. 冻存时，若出现单个细胞或过大的分化完全的细胞团，复苏率会降低。

为科研加速，为工业赋能！



关注海星公众号



关注海星视频号



CRISPR/Cas9细胞基因编辑

载体构建/病毒包装 分子诊断标准品/突变基因标准品/融合基因标准品

稳转细胞株 HyCyte™干细胞/原代细胞 HyCyte™培养试剂盒