

# HyCyte®人胰腺癌类器官培养基试剂盒 Pro 使用说明书

货号: PDOH-G103-100-KIT-Pro

## 产品信息

	组分名称	规格(mL)	储存条件与保质期
1	类器官培养基	100	2-8°C, 3 months或-20°C, 12 months
2	原代缓冲液	250	2-8°C或-20°C, 24 months
3	原代组织消化液	30	2-8°C或-20°C, 12 months
4	类器官传代消化液	30	2-8°C或-20°C, 12 months
5	组织保存液	100	2-8°C或-20°C, 12 months
6	PDO专研冻存液	20	2-8°C或-20°C, 12 months
7	传代缓冲液	250	2-8°C, 12 months
8	基质胶	5	-20°C, 12 months 或-80°C, 长期

## 收货和处理方法

海星生物寄送该试剂盒的方式为干冰运输, 收到产品后, 请先检查包装是否完整, 干冰是否充足, 试剂包装有无破损等情况, 并核对产品上的标签信息是否与发货清单一致。若有异常, 及时与我们联系。

1) 类器官培养基 在 2-8°C可保存 3 个月, 收到货后 4°C保存, 建议 1 个月内使用完毕, 长期不用建议放于 -20°C 储存, 避免反复冻融超过 2 次。

2) 组织保存液、原代组织消化液内含有维持细胞活性营养成分, 为了保持试剂营养成分的活性, 长期不用建议放于-20°C 储存, 避免反复冻融超过 2 次。

3) 基质胶的解冻、分装。

①解冻: 将基质胶小瓶置于冰中并在 4°C冰箱避光过夜融化。请勿用手直接触摸基质胶瓶身, 请勿放置于冰箱门上或者经常需要开启的冰箱。一旦基质胶被解冻, 请涡旋小瓶以确保基质胶分散均匀。

②分装: 使用预冷的移液管轻柔的吸取基质胶或涡旋小瓶以确保其分散均匀, 然后根据后续实验所需量进行分装, 然后置于-20°C或以下温度避光保存。吸取基质胶过程中, 如果吸头或移液管堵塞、吸取不精确时请更换吸头或移液管。分装及后续实验操作基质胶时必须在冰浴上进行。

为科研加速, 为工业赋能!



海星商城二维码



公众号二维码



## 使用方法

### 类器官原代培养

请提前准备以下试剂和耗材：

原代缓冲液（4°C预冷）、组织保存液 E、原代组织消化液（37°C）、基质胶（提前 24h 放入 4°C冰箱融化）、类器官培养基（室温或 37°C）、组织运输箱、冰袋、镊子（10 cm）、尖头眼科手术剪、一次性 60mm 培养皿、1.5mL、15mL、50mL 离心管、100 μm 滤膜、3mL 巴氏吸管/移液枪、24 细胞培养板、金属冰盒

1. 收到新鲜组织样本后，用原代缓冲液清洗 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）。

注意：若样本前期保存不当会导致细胞活性差、污染、正常细胞少等问题，降低构建成功率

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，并置于冷冻管架上保持 0-4°C。

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，因此重悬后的类器官可转移到 EP 管，并将 EP 管放置到金属冻存管架上以维持 0-4°C 的条件。

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 恢复至室温或预热的类器官培养基，置于 37 °C 培养箱中培养。

### 类器官复苏

请提前准备以下试剂和耗材：

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



传代缓冲液、类器官培养基、基质胶（提前一晚放入 4°C 冰箱融化）、24 孔板、冰盒、15mL 离心管、水浴锅、3mL 巴氏吸管/移液枪

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. 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，并置于冷冻管架上保持 0-4°C。  
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 恢复至室温或预热的类器官培养基，置于 37 °C 培养箱中培养。

## 类器官传代

请提前准备以下试剂和耗材：

传代缓冲液（4°C 预冷）、类器官传代消化液（室温或 37°C）、基质胶（提前一晚放入 4°C 冰箱融化）、类器官培养基（室温或 37°C）、15mL 离心管、24 孔板、冰盒

根据类器官培养时期或形态选择机械法或酶解法：

### 机械法（弥散型、囊型推荐使用）

1. 在显微镜下观察类器官的状态，当密度达到 500 个/孔或单个类器官体积在 100-200 μm 时进行传代。
2. 弃去旧培养基，每孔加入 1 mL 4 °C 预冷的传代缓冲液，使用 1000uL 枪头吹散或刮下基质胶，反复吹打 20-30 次，充分吹散类器官，收集至 15mL 离心管中，每管补充体积至 10 mL。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. 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，并置于冷冻管架上保持 0-4°C。

注意：有关基质胶重悬的操作建议在 0-4°C 条件下进行，因此重悬后的类器官可转移到 EP 管，并将 EP 管放置到金属冻存管架上以维持 0-4°C 的条件。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



5. 以 24 孔板为例，每孔加 25-30  $\mu\text{L}$  基质胶与类器官的混合物。
6. 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中 15-30 分钟，等待基质胶凝固。
7. 每孔加 750  $\mu\text{L}$  恢复至室温或预热的类器官培养基，置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。

#### 酶解法（实体型和混合型结构推荐使用）

1. 在显微镜下观察类器官的状态，当密度达到 500 个/孔或单个类器官体积在 100-200  $\mu\text{m}$  时进行传代。
2. 弃去旧培养基，每孔加入 1 mL 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的传代缓冲液，使用 1000  $\mu\text{L}$  枪头吹散或刮下基质胶，收集至 15 mL 离心管中，每管补充体积至 10 mL。将离心管放入 4  $^{\circ}\text{C}$  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 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。
5. 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。
6. 300 g 离心 5 分钟，弃上清。
7. 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，并置于冷冻管架上保持 0-4  $^{\circ}\text{C}$ 。

注意：有关基质胶重悬的操作建议在 0-4  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行，因此重悬后的类器官可转移到 EP 管，并将 EP 管放置到金属冻存管架上以维持 0-4  $^{\circ}\text{C}$  的条件。

8. 以 24 孔板为例，每孔加 25-30  $\mu\text{L}$  基质胶与类器官的混合物。
9. 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中 15-30 分钟，等待基质胶凝固。
10. 每孔加 750  $\mu\text{L}$  恢复至室温或预热的类器官培养基，置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。

#### 类器官冻存

请提前准备以下试剂和耗材：

传代缓冲液（4  $^{\circ}\text{C}$  预冷）、PDO 专研冻存液（4  $^{\circ}\text{C}$ ）、15 mL、冰盒、细胞冻存管、程序降温盒、移液枪

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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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 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  $1-5 \times 10^5$  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。

5. 将冻存管放入程序降温盒（提前平衡至室温或 4  $^{\circ}\text{C}$ ）中，转移至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中，24 小时后转移到液氮罐中保存。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



## | 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。
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. 传代类器官种植密度，以 24 孔板为例，每孔种植一个胶滴，细胞密度为 5000~10000 个/50μL 胶滴，较大的细胞团密度在 300~500 个/50μL 胶滴。
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。

## | 质量检测

细菌、真菌、支原体检测均为阴性。

## | 产品稳定性

针对该试剂盒各组分的稳定性研究表明，该产品的各项参数均符合 COA 上规定的质控标准。

## | 使用限制

本产品仅作科研实验使用，不支持临床等研究。

## | 厂家信息

生产厂家：苏州海星生物科技有限公司

生产地址：苏州市太仓市经济开发区岳阳路 100 号

官方网站：[www.cas9x.com](http://www.cas9x.com)

官方商城：[www.hycyte.com](http://www.hycyte.com)

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码

