

类器官冻存液（无血清）

货号：RPM0070

规格：100 mL

◆ 产品描述

本产品是一款高效的类器官冻存液，不含血清及动物来源蛋白，含 10% DMSO（二甲基亚砜），适用于多种组织来源的类器官、原代细胞或细胞系的超低温存储，可有效减少低温冻存对类器官存活率的影响。

◆ 产品参数

货号	名称	规格	保存条件
RPM0070	类器官冻存液（无血清）	100 mL	2-8℃，效期 3 年

◆ 注意事项

1. 本产品仅供科研使用，不可用于诊断或治疗领域。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

◆ 应用方法

类器官的冻存

1. 实验准备：观察类器官状态，代次为 3~5 代最佳，避免选择已分化、代次过大进行冻存。若是状态较差，可更换完全培养基培养至类器官状态良好时冻存。准备好细胞冻存程序降温盒置于室温平衡温度。以下步骤与细胞接触的离心管、试管或者塑料吸头需用类器官培养防粘连润洗液（推荐货号：RPM0069）润洗后使用。
2. 冻存前处理：在镜下观察 24 孔板中的类器官，选取直径大于 100 μm 、形态饱满、边缘清晰、增殖旺盛的孔进行冻存。避免选取出现大量碎片、中心发黑的类器官。吸弃旧培养基，向每孔中加入 500 μL 预冷的 DPBS，轻轻晃动培养板，然后吸弃。向每孔中加入 500 μL 的类器官消化液（推荐货号：RPM0068），1 mL 枪头轻柔地吹打 5-10 次，在孔板中 37℃ 孵育 5-10 min。再次使用 1 mL 枪头吹打 5-10 次，镜下观察到细胞团后，加 2 倍体积（1 mL）DPBS 终止消化。收集孔中所有液体，4℃ 下，1000 g 离心 5 min，弃上清液，

注意不要触及管底的细胞团沉淀。用预冷的 DPBS 重新重悬再洗一次。向沉淀中加入少量预冷的 DPBS 轻柔吹打，使细胞团重悬成均匀的悬液。计数后按照 $3-5 \times 10^5$ 细胞/支或传代前状态良好类器官 3-6 个 50 μ L 胶滴/支分装至冻存管。

3. 添加冻存液：向准备冻存的类器官中加入 500~1000 μ L 预冷的冻存液 (1×10^5 个/mL)，吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中。

4. 程序降温 and 长期保存：将低温冻存管放入细胞冻存程序降温盒内，随后迅速将细胞冻存程序降温盒放入 -80°C 超低温冰箱中，24 h 后将冻存管转移至液氮 (-196°C) 中长期保存。也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4°C 静置 10 min， -20°C 保存 1 h， -80°C 保存过夜，再转移至液氮中长期保存。

类器官的复苏

1. 水浴锅 37°C 预热、离心机 4°C 预冷、基质胶插入碎冰中 4°C 解冻、DPBS 4°C 预冷、培养基平衡到室温，从液氮中取出类器官冻存管，立即投入 37°C 水浴锅中，轻轻晃动至仅剩米粒大小冰晶（整个过程 ≤ 90 s）。

2. 从水浴中取出冻存管，用 75%乙醇棉球彻底擦拭管外壁后移入超净台。吸出全部细胞悬液到预先用类器官培养防粘附润洗液（推荐货号：RPM0069）润洗的 15 mL 离心管中，缓慢加入 10 mL DPBS 培养基， 4°C 250 g 离心 5 min，弃上清。

3. 向细胞沉淀中加入 1 mL 预冷的 DPBS，用 200 μ L 枪头轻轻吹打（避免产生气泡）重悬细胞，取样计数后在 4°C 下，250 g 离心 5 min，弃上清。

4. 重悬按照 $2-5 \times 10^4/50$ μ L 胶滴或参考冻存前的胶滴数量，按照体积比 1:1 或 1:2，在冰上使用基质胶轻柔重悬，避免气泡。

注：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

5. 接种 24 孔板每孔的中央位置滴一滴（50 μ L）结直肠癌类器官-基质胶混合物，迅速放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中，孵育 20-30 min 等待基质胶完全凝固，沿着孔壁缓慢地加入 500 μ L 结直肠癌培养基。

6. 培养 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置培养，24 h 后镜检并换液，后续按常规传代培养。