人肝胆管类器官培养基（扩增）

货号：RPM0082K

规格：100 mL/500 mL

◆ 产品信息

ABclonal 人肝胆管类器官培养基（扩增）是一款用于扩增人肝胆管类器官的完全培养基，扩增时的人胆管类器官主要由胆管细胞及其前体细胞组成。人类肝胆管类器官在细胞类型组成和胆汁转运等生理功能方面表现出了肝胆管组织的大部分特征，肝胆管类器官可以分化出肝样细胞，为人类肝胆发育和疾病的研究提供了前所未有的模型。

◆ 产品组成

货号	名称	规格	长期保存条件
RPM0082K	人肝胆管类器官培养基（扩增）	100 mL/500 mL	-80℃--20℃，效期 12 个月

◆ 人肝胆管类器官培养基使用和保存

收到货后 4℃保存，建议 1 个月内使用完毕，长期不用建议放于-80℃--20℃储存，避免反复冻融超过 2 次。

◆ 类器官构建

Ø原代组织来源类器官构建需要的试剂准备（自备）

产品名称	推荐货号
基质胶（低生长因子，无酚红）	RPM0003
组织消化液（正常和肿瘤）(类器官构建专用)	RPM0066
组织保存液（无血清）（类器官构建专用）	RPM0067
类器官消化液	RPM0068
类器官培养防粘连润洗液	RPM0069
类器官冻存液（无血清）	RPM0070

红细胞裂解液（可选）	-
DPBS（无钙镁，无酚红）	-

仪器：生物安全柜、CO_2恒温细胞培养箱、水平转子离心机（温度可调）、倒置显微镜、冰箱、冰盒、细胞计数仪、水浴锅

耗材：24 孔细胞培养板（TC 处理）、10 μL/200 μL/1 mL 吸头、15 mL/50 mL 离心管、100 μm 细胞筛网、一次性刀片和刀柄，灭菌剪刀/镊子、一次性巴氏滴管、6 cm 培养皿

Ø 原代组织来源类器官的建立和传代培养

注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关的机构和政府法规。在收集主要人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

Ø 原代组织来源类器官的建立

1. 原代组织样本应在离体 5 min 内放入装有预冷的组织保存液（2-8℃）的样本管中，样本被组织保存液完全覆盖，低温（2~8℃）48 h 内运输转移至实验室。

注：样本保存管使用泡沫与低温冰袋隔开，防止组织结冰损坏。

2. 实验前先将基质胶埋入冰上解冻 4~6 h，同时取出培养基放置室温平衡 15 min。

注：与细胞接触的离心管、试管或者枪头需要用润洗液润洗后使用。

3. 在洁净工作台中，将样本转移至培养皿中，评估获得的组织是否完全由上皮组成。使用灭菌的手术剪刀或手术刀和镊子去除脂肪和肌肉组织，以及组织表面坏死、纤维化或凝结血块杂志。

4. 转移到新的 15 mL 离心管,加入 5~8 mL 组织清洗液，使用涡旋仪震荡 3~6 s，去除干净清洗液，重复 3~5 次，注意消化道组织（如胃、肠组织等）应增加清洗次数 2~3 次，至清洗液澄清。

注：每次清洗后的上清液应去除干净，避免污染源残留。

5. 使用镊子将组织转移至 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 组织消化液，用灭菌的剪刀将组织剪碎为 0.5~2 mm^2 大小。

注：组织剪碎大小，吸取后不堵 1 mL 枪头为佳；如组织过大，可选取质地较好的部分，剪碎用时应控制在 10 min 以内。也可选择刀柄+一次行刀片进行组织切碎处理。

6. 将剪碎的组织用 5 mL 组织消化液重悬，并转移至 15 mL 离心管内，吹打重悬组织块。用胶带水平固定在

37℃，100 rpm 条件下的恒温摇床上，消化 15-40 min，每隔 10 min 观察组织消化情况，待组织块明显分散，悬液较浑浊时，取适量组织消化悬液镜检，待大部分组织块呈现絮状、或悬液中有较多组织细胞团，即可加入 2 倍体积（10 mL）DPBS 终止消化，若组织碎块较大或消化不完全可适当延长消化时间。

注：对于体积较小的组织样本，如穿刺样本，可减少消化时间到 15 min 以内，并不进行后续 100 μm 滤膜过滤，直接同组织块一起离心后接种培养，减少过程中细胞损耗，提高类器官构建成功率。

7. 4℃ 250 g 离心 3 min，弃上清，加入 DPBS 重悬，使用一次性巴氏滴管吹打组织沉淀 10~20 次充分释放组织中的细胞，使用 100 μm 细胞过滤器过滤，DPBS 冲洗滤膜残留细胞。

8. 收集滤液并在 4℃下以 250 g 离心 3 min。在可见的红色沉淀的情况下，吸弃上清液，加入 2 mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 2 min，加入 2 倍以上体积 DPBS 终止裂红，4℃ 250 g 离心 3 min。

注：如红细胞过多，可增加裂解时间，同时手动摇晃离心管加速裂解过程。

9. 吸弃上清液并将沉淀重悬于 DPBS，取样细胞计数*，4℃ 250 g 离心 3 min。

注：细胞计数注意筛选直径，8~12 μm 常见为淋巴细胞，12~35 μm 直径常见为肿瘤细胞，呈现簇状细胞团为佳；细胞计数可选用 AOPI 进行死活荧光染色，对比台盼蓝计数更有效和准确。

10. 吸弃上清液，大约 50000~100000 个活细胞应接种在 50 μL 基质胶中（注意细胞活率过低时，按照总细胞密度 100000 进行接种），使用预冷的润洗液润洗枪头，加入基质胶（>70%）并在冰上混匀，混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 s 内，混匀后及时置于冰上，做好温度控制。

注：基质胶应保存在冰上以防止其凝固，基质胶比例应>70%（基质胶体积/总体积），比例过低会导致基质胶液化无法凝固，以及后续培养过程中因基质胶结构不稳固而散开。

11. 将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μL/孔，48 孔板接种 10~20 μL/孔，24 孔板接种 30~50 μL/孔）。

注：96 孔板、48 孔板点胶较为困难，可倾斜孔板点胶；基质胶粘稠，小于 10 μL 胶滴容易造成误差，注意进行药敏检测时，孔间操作一致性。

12. 将培养板放入 37℃和 5% CO_2 的培养箱中 20-30 min，待基质胶凝固。

13. 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μL/孔，48 孔板加入 250 μL/孔，24 孔板加入 500 μL/孔）。

注：培养基请注意沿壁缓慢加入，避开凝固的胶滴，以免破坏结构；培养基应恢复至室温，避免过冷导致基质胶重新液化或结

构不稳定。

14. 将培养板置于 37 ℃和 5% CO_2 的恒温培养箱中。

15. 每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。

16. 密切监测类器官生长状态，理想情况下，类器官应在 3-14 天内建成。

Ø 原代组织来源类器官的传代培养

1.待类器官培养到直径为 100~500 μm 大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约 3~10 天）。以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用。

2.吸弃旧培养基，加入适量类器官消化液（每 50 μL 胶滴使用 500 μL），吹打重悬基质胶，在原孔板中进行消化，37℃ 5~10 min 后，取出使用润洗的枪头吹打 5~10 次，镜下观察，类器官解离成簇状细胞团（5~30 个细胞成团为佳），消化不充分可适当延长消化时间或吹打次数，加入 2 倍以上消化液体积的 DPBS 终止消化，转移至润洗过的 15 mL 离心管中，4℃ 300 g 离心 5 min。

注：类器官消化液室温下仍具备解离效果（约为 37℃条件下 50%消化效果），请注意加入类器官消化液后 室温操作或 37℃消化总时间控制在 20 min 以内，一定避免将类器官过度消化为单细胞。类器官形态和数量不同，类器官消化时间和吹打次数也需要适当调整。

3.吸弃上清液，DPBS 清洗，转移至润洗过的 1.5 mL 离心管，4℃ 300 g 离心 5 min，去除残留的消化液，并使用 DPBS 清洗。

4.清洗完成后将离心沉淀中的细胞进行传代培养，在细胞沉淀中加入基质胶（>70%）并在冰上混匀（注意，混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 s 内），混匀后置于冰上。

注：基质胶稀释比例应在 70%以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。

5.将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，形成胶滴，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μL/孔，48 孔板接种 10~20 μL/孔，24 孔板接种 30~50 μL/孔）。

注：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

6. 将培养板放入 37℃和 5% CO_2 的培养箱中 20-30 min，让基质胶凝固。

7. 待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μL/孔，48 孔板加入 250 μL/孔，24 孔板加入 500 μL/孔）。

注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。

8. 将培养板置于 37 ℃和 5% CO_2 的恒温培养箱中。

9.每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。

注：如遇培养基变黄应立即更换，换液周期最多不可超过 4 天。

10.密切监测类器官生长状态，直到类器官需要进行下一步实验。