人胃类器官培养基

货号：RPM0073K

规格：100 mL/500 mL

◆ 产品信息

ABclonal 胃类器官培养基是一种化学定义的细胞培养基，用于建立和维持成体干细胞来源的人胃上皮类器官。胃上皮细胞的自我更新是由干细胞及其前体细胞的增殖驱动的。人类胃上皮类器官在结构、细胞类型组成和自我更新方面表现出了胃上皮的大部分特征，为研究人胃上皮稳态和疾病提供了新的模型。

◆ 产品组成

货号	名称	规格	长期保存条件
RPM0073K	人胃类器官培养基	100 mL/500 mL	-80℃--20℃，效期 12 个月

◆ 人胃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。