

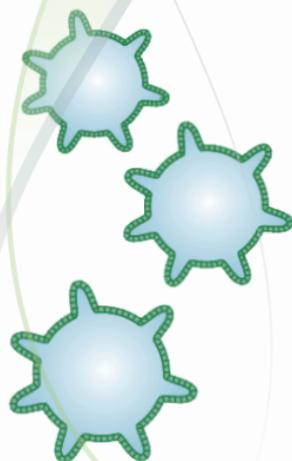


科途医学
K2 ONCOLOGY

中文版

OrganoPro™ 类器官培养基套装

用户手册



OrganoPro™ 人源宫颈癌类器官培养基

用户手册

Cat# KCC-100 (100mL 套装)

Cat# KCC-1000 (1000mL 套装)

V2.3 中文版

<http://www.K2Oncology.com>

1. 产品信息

下面列出的所有组分均为类器官培养基套装的组成部分 (Catalog # KCC-100 及 Catalog # KCC-1000)。

OrganoPro™ 人源宫颈癌类器官培养基套装 (Cat# KCC-100)

产品名称	货号	规格	储存温度	保质期
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Medium 人源宫颈癌类器官基 础培养基	KCC-100-M	100mL	2-8°C	12 个月
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Supplement A (50X) 人源宫颈癌类器官培养基添加 剂 A (50X)	KCC-100-A	2mL	-20°C	12 个月
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Supplement B (100X) 人源宫颈癌类器官培养基添加 剂 B (100X)	KCC-100-B	1mL	-20°C	12 个月

OrganoPro™ 人源宫颈癌类器官培养基套装 (Cat# KCC-1000)

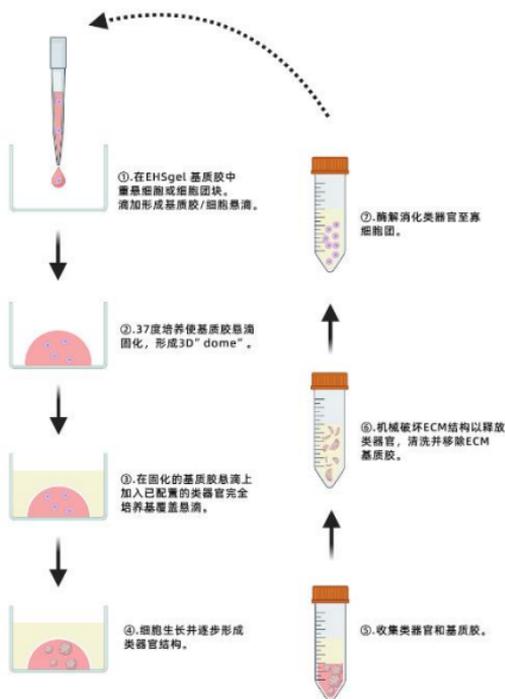
产品名称	货号	规格	储存温度	保质期
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Medium 人源宫颈癌类器官基 础培养基	KCC-1000-M	1000 mL	2-8°C	12 个月
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Supplement A (50X) 人源宫颈癌类器官培养基添加 剂 A (50X)	KCC-1000-A	10mL X2	-20°C	12 个月
OrganoPro™ Cervical Cancer Organoid Culture Supplement B (100X) 人源宫颈癌类器官培养基添加 剂 B (100X)	KCC-1000-B	10mL	-20°C	12 个月

2. 开展实验所需但未包含在本培养基套装内的其他

试剂或耗材

产品名称	建议供应商	货号
OrganoPro™ 常规手术组织保存液套装	K2 Oncology	K20-PFO
OrganoPro™ 常规组织酶解液试剂盒	K2 Oncology	K20-EMO
OrganoPro™ 类器官传代消化液	K2 Oncology	KOC-03-100
OrganoPro™ 类器官冻存液 II	K2 Oncology	KOC-02-100
EHSgel Basement Membrane Matrix, Phenol Red Free (EHSgel 基质胶-标准型-无 酚红)	K2 Oncology	KEF100-10
96 孔超低吸附微孔板	K2 Oncology	K20S-96-M
24 孔超低吸附微孔板	K2 Oncology	K20S-24-M
6 孔超低吸附微孔板	K2 Oncology	K20S-6-M
Fetal Bovine Serum (FBS)	-	-
Red Blood Cell Lysis Buffer	-	-
70-100µm 细胞筛网	-	-

3. 类器官建模及培养实验流程图



类器官培养流程图示

将消化后得到的单细胞或寡细胞团与液态 基质胶(ECM)混匀，以小液滴形式滴至细 胞培养皿，于37°C孵育，ECM固化后，再 覆盖以类器官完全培养基。细胞将在固态 “半球形”细胞外基质胶中生长增殖成具 有3D结构的类器官。



类器官显微镜明场照片，40X

4. 实验方法与步骤

4.1 类器官完全培养基配制

请在生物安全柜中无菌操作配置宫颈癌类器官完全培养基。以下以配置 100mL 类器官完全培养基为例来计算需加入的培养基添加剂，如需配置其他体积，请进行相应计算调整。

将人源宫颈癌类器官培养基添加剂 A (50X) 及人源宫颈癌类器官培养基添加剂 B (100X) 从-20°C取出后，在冰上进行解冻融化。人源宫颈癌类器官培养基添加剂 A (50X) 为不透明浅棕色液体，人源宫颈癌类器官培养基添加剂 B (100X) 为无色透明状液体。

在无菌条件下，将 2mL 人源宫颈癌类器官培养基添加剂 A (50X) 与 1mL 人源宫颈癌类器官培养基添加剂 B (100X) 加入 100mL OrganoPro™ 人源宫颈癌类器官基础培养基中，制备成人源宫颈癌类器官完全培养基。配置好的完全培养基，可以根据实验需要进行无菌分装后存放于 2-8°C 待用。

注意事项：

- OrganoPro™ 宫颈癌类器官完全培养基配置后，储存于 2-8°C，有效期为 6 个月。
- 宫颈癌类器官培养基添加剂 A（50X）及宫颈癌类器官培养基添加剂 B（100X）一旦解冻，请立即使用或分装后储存于-20°C。分装后的添加剂 A 和 B 再次解冻后，需立即使用，勿再次冷冻。避免多次冻融添加剂 A 和 B，如因冻融出现沉淀物，请勿使用，以免造成更大损失。
- 宫颈癌类器官基础培养基中已添加抗生素，以降低类器官建模及培养过程中细菌或真菌污染风险。

4.2 从宫颈癌组织样本建立类器官

- 4.2.1 宫颈癌组织样本采集后请按 OrganoPro™ 常规手术组织保存液套装（K2 Oncology, CAT#K2O-PFO）操作要求进

行组织洗涤及保存。

- 4.2.2 样本转移运输需全程保持 2-8°C，尽量缩短运输时间。
- 4.2.3 类器官建模前检查所获得的组织样本是否完全由上皮类组织组成。如参杂脂肪或肌肉组织，请使用手术剪刀和镊子尽可能多地去除这些非上皮组分。
- 4.2.4 使用 PBS 溶液冲洗组织两次。
- 4.2.5 在细胞培养皿中，使用手术剪刀或手术刀将组织切剪碎为 $<1\text{mm}^3$ 的小块。
- 4.2.6 使用 10mL OrganoPro™ 组织酶解液 (K2 Oncology, CAT# K2O-EMC) 重悬小组织块，转移至 24 孔超低吸附微孔板 (K2OS-24-M) 进行消化。组织酶解孵育过程在 37°C 下进行，酶解孵育时间通常为 30-60 分钟。监控消化过程，每 15 分钟使用 5mL 移液管上下吹吸混合 10 到 20 次，当大多数组织小块能够顺利通过 1mL 枪头时，组织酶解消化过程完成。

注意事项：组织酶解孵育时间因样本而异，对于酶解消化困难的样本可适当延迟至 1.5 小时。

- 4.2.7 当达到组织酶解终点时，向组织消化液中加入 FBS 进行终止，FBS 终止浓度为 5%。
- 4.2.8 终止酶解后，使用 70-100 μ m 细胞筛网对组织酶解液进行过滤。
- 4.2.9 将过滤后的细胞以 300g 离心 3 分钟。如可见红色沉淀物，吸弃上清，加入 2mL 红细胞裂解溶液在室温下孵育 3-5 分钟裂解红细胞。然后以 300g 再次离心 3 分钟。
- 4.2.10 吸弃上清，用 5mL 类器官基础培养基重悬细胞，然后以 300g，离心 3 分钟，重复此步骤两次。
- 4.2.11 吸弃上清，用基质胶重悬细胞沉淀（推荐使用 EHSgel 基质胶，K2 Oncology，CAT# KEF100-10），为防止基质胶凝固，应保持冰上操作。使用基质胶量取决于细胞沉淀的大小，大约每 1 万个细胞（ 10^4 细胞）使用 25 μ L 的基质胶

进行重悬。

注意事项：基质胶使用浓度不要低于 70%，否则可能会抑制基质胶固化液滴的形成。

- 4.2.12 使用已-20°C 预冷的 200 μ L 移液枪头，将重悬后的细胞基质胶复合物尽快滴在 24 孔细胞培养板的底部，每个孔约 30 μ L，滴于孔中心。过程中注意不要让基质胶接触到孔壁，避免基质胶在移液过程中凝结。
- 4.2.13 将培养板放入 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养，基质胶凝固时间约为 20-30 分钟。
- 4.2.14 确认基质胶凝固后，在生物安全柜中打开培养板，小心缓慢地向每个孔中加入 500 μ L 的类器官完全培养基，培养基加入时不要直接将培养基加于基质胶悬滴上。
- 4.2.15 将培养板放回 37°C、5%CO₂ 的培养箱中继续培养。
- 4.2.16 每隔 3-4 天小心吸取孔中的培养基，并更换为新鲜的预热类器官完全培养基。

4.2.17 在显微镜下观察类器官的生长状态，理想情况下，患者来源的宫颈癌类器官细胞 7~14 天左右即可进行传代。

4.3 类器官的传代与扩增

4.3.1 小心吸弃类器官培养基上清，避开类器官基质胶悬滴，吸取时注意不要将悬滴吸起。

4.3.2 使用 200 μ L 移液器轻缓吹吸，破坏类器官基质胶悬滴，并将类器官基质胶悬浮液转移至 15 mL 无菌离心管中。

4.3.3 将各孔类器官基质胶悬滴均转移至 15ml 离心管后，向原培养板每孔中加入少量基础培养基（例如 24 孔板每孔 125 μ L，6 孔板每孔 250 μ L），将残留的类器官基质胶转移至 15mL 无菌离心管中。

4.3.4 使用 5ml 移液管将类器官/基质胶/培养基混合物上下移液吹吸 20~30 次，以完全破坏 ECM 结构。在这一步骤

中，充分机械破坏 ECM 结构，将类器官细胞从 ECM 中释放出来非常关键。

4.3.5 300g 离心 3 分钟，吸弃上清，加入 5mL PBS 溶液，吹吸混匀，300g 离心 3 分钟。

4.3.6 吸弃上清，将沉淀物重悬于 1-2 mL 的类器官传代消化液（K2 Oncology, Cat# KOC-03-100）中，上下吹吸数次，置 37°C 孵育，直到类器官细胞团打散。类器官酶解消化过程中，每 2-3 分钟使用移液管上下移液吹吸 5-10 次，并在倒置显微镜下密切观察消化过程，严格把握类器官酶解消化时间。

注意事项：某些类器官模型不应被完全消化酶解成单个细胞，否则它们传代后的类器官结构形成能力将受损。如果有可用的模型特定信息，请参考该信息。否则，一般来说，酶解消化至可观察到寡细胞团（由 10-30 个细胞组成），则酶解消化过程完成。对某些类器官模型而言，酶

解消化过长时间 (>15 分钟) 可能会导致类器官细胞传代后生长不良甚至停止生长。

4.3.7 类器官酶解消化到达终点后, 加入 5mL 类器官基础培养基, 吹吸混匀, 300g 离心 3 分钟。

4.3.8 吸弃上清, 将类器官沉淀物重悬于基质胶中, 并按照步骤 4.2.11 至 4.2.17 的描述进行传代培养。

4.4 类器官的冻存

4.4.1 将待冻存的类器官细胞按实验步骤 4.3.1 至 4.3.7 从类器官基质胶悬滴中收集类器官并去除 ECM。

4.4.2 如果从多孔收获并冻存类器官, 则将多个清洗管中的沉淀加入类器官基础培养基重悬后集中到一个 15ml 离心管中, 吹吸混匀, 300g 离心 3 分钟。

- 4.4.3 每 1×10^6 个活细胞（根据细胞计数）或每 100 至 200 μL 类器官/基质胶悬滴，用 0.5-1 mL 类器官冻存液（K2 Oncology, Cat# KOC-02-100）重新悬浮沉淀。
- 4.4.4 使用移液管将类器官重悬液按 0.5mL/Vial 分装至已贴标签的细胞冻存管中。
- 4.4.5 将冻存管转移至程序降温盒中进行程序降温后转移至液氮罐中长期保存。类器官冻存时，程序降温速度以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 为宜。

4.5 类器官的复苏

- 4.5.1 从液氮罐中取出冻存的类器官细胞，快速置于 37°C 水浴锅中，在握住盖子的同时，轻轻摇晃瓶子。注意冻存管不要完全浸入水中。

- 4.5.2 用 70%酒精从对冻存管进行消毒，然后将其转移至生物安全柜中。
- 4.5.3 使用移液器逐滴将冻存管中的细胞溶液转移到含有 10mL 类器官基础培养基的无菌离心管中，用额外的 1mL 类器官基础培养基冲洗冻存管，并将冲洗液加入离心管中。
- 4.5.4 300g 离心 3 分钟，小心地吸弃上清，注意不要吸取到类器官细胞沉淀，将离心管保持在室温下。
- 注意事项：**在离心后可能存在一层混浊的液体 ECM。如果在倒置显微镜下未观察到 ECM 层中有大量的类器官细胞，应将其吸弃。反之，则需进行额外的清洗。额外的清洗步骤为加入 10 毫升类器官基础培养基，然后重复步骤 4.5.3 和 4.5.4。
- 4.5.5 将细胞沉淀使用基质胶重悬，参照步骤 4.2.11 至 4.2.17 进行类器官培养。

如有更多问题请联系:

info@K2Oncology.com

<http://www.K2Oncology.com>

K2 ONCOLOGY

地址:

总部: 北京经济技术开发区经海五路88号九城科技园三区3号楼4层/5层

动物实验中心: 河北省廊坊市固安县肽谷生物医药园1号楼A1-1-4室

医学检验所: 浙江省湖州市吴兴区红丰路1366号南太湖科创中心6幢10楼1001

电话: 400-160-9699

Email: info@K2Oncology.com

网址: <http://www.K2Oncology.com>