

牛乳腺类器官培养基&试剂盒使用说明书

目录号: COCM01 (100mL/500mL)

COCM01-KIT (100mL/500mL)

试剂盒产品信息

	产品组成	规格	储存条件及周期
1	牛乳腺类器官培养基 A	100 mL	4 °C, 3 months 或者 -20 °C, 1 year
2	原代缓冲液 B	250 mL	4/-20 °C, 2 year
3	原代组织消化液 C	30 mL	4/-20 °C, 1 year
4	类器官消化液 D	30 mL	4/-20 °C, 1 year
5	组织保存液 E	100 mL	4/-20 °C, 1 year
6	类器官冻存液 F	20 mL	4/-20 °C, 2 year
7	传代缓冲液 G	250 mL	4/-20 °C, 2 year
8	低因子无酚红基质胶	5ml	-20°C, 1 year -80°C, 长期

备注: 基质胶仅试剂盒 Pro 版含有, 以上所有成分都可单独购买。

试剂到货处理:

1. 牛乳腺类器官培养基 A 在 4 °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 E、原代组织消化液 C 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。

操作步骤与方法:

1 组织前处理

1.1 实验材料

需提前准备原代缓冲液 B (4 °C 预冷)、组织保存液 E、取样管、组织运输箱、冰袋。

1.2 组织的获取与运输

组织的取样与运输是类器官构建成功的第一个环节也是最容易忽视的环节,若组织前期保存不当会导致细胞活性差、污染、正常细胞少等问题,降低类器官构建成功率。

组织应在离体的 30 min 内放入组织保存液 E,原代缓冲液 B 清洗 3-5 次,将组织表面血液冲洗干净,放入组织保存液 E 中,取样管于 4 °C 低温保存运输 (72 h 内)。

2 类器官原代培养 (以 24 孔板为例)

2.1 实验材料

需提前准备原代缓冲液 B (4 °C)、原代组织消化液 C (37 °C)、基质胶 (提前 24 h 放入 4 °C 冰箱融化)、牛乳腺类器官培养基 A (室温或 37 °C)、镊子 (10 cm)、尖头眼科手术剪/手术刀片、一次性 60 mm 培养皿、1.5 mL/15 mL/50 mL 离心管、100 μ m 细胞滤网、3 mL 巴氏吸管/1000ul 移液枪、24 孔细胞培养板、金属冰盒。

2.2 牛乳腺类器官构建

2.2.1 组织的处理

取材后的牛乳腺组织建议在 2 – 8 °C 条件下保存运输,快速转运至洁净实验室进行牛乳腺类器官构建实验流程,组织拍照并登记详细信息。

2.2.1.1 组织的清洗

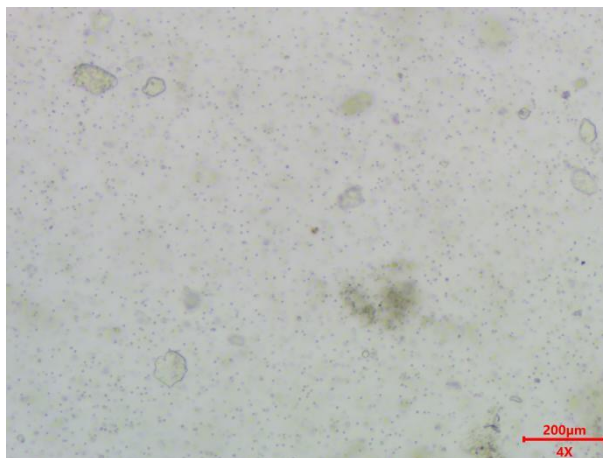
取样管消毒后,在超净台中将组织取出来,放入培养皿中,加入原代缓冲液 B,用 3 mL 巴氏吸管或 1000ul 移液枪吹打清洗,重复清洗操作三次及以上。

2.2.1.2 组织的解离与消化

用眼科剪或手术刀片去除组织杂质,镊子转移至 1.5 mL EP 管中,用眼科剪进一步将组织机械解离成体积约为 1~3 mm³ 的组织块,转移至 15 mL EP 管中,加入 5 mL 原代组织消化液 37 °C

震荡消化 35-45 min。消化过程每 10 min 显微镜下观察组织消化情况，取少量消化液在显微镜下观察，观察到较多的 70 μm 以下的细胞簇或单个细胞后进行下一步操作。组织消化程度见图 1。

若组织量太少或活检组织用 1 mL 原代组织消化液 C 在 1.5 mL EP 管消化。



图一 组织消化成较多细胞簇或较多单细胞

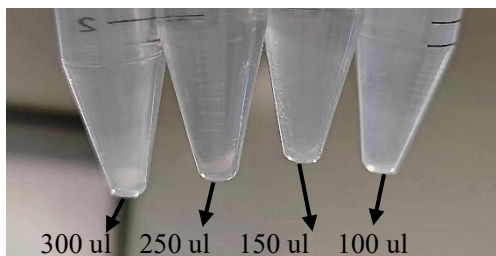
2.2.1.3 组织的过滤

消化完成后，组织涡旋仪涡旋 20s，加入 3 倍体积的原代缓冲液 B 终止消化，消化组织混合液通过 100 μm 孔径的细胞筛网过滤，继续用 10-20ml 原代缓冲液 B 漂洗组织，达到收集更多组织团块细胞，300 g 富集离心 5 min 后弃上清；用 8-10ml 原代缓冲液 B 重悬离心沉淀（去除更多杂质），300 g 富集离心 5 min 后弃上清。

若细胞沉淀含有红细胞，加入 1-2 mL 红细胞裂解液 1-2 min 后，稀释至 10 mL，300 g 富集离心 5 min 后弃上清。沉淀过少或无红细胞时直接进行类器官培养。

2.2.1.4 类器官培养

观察离心收集的细胞沉淀体积量，添加 25 倍体积的基质胶重悬，形成 3D 培养空间结构，重悬过程中避免产生气泡。细胞沉淀体积量见图 2，按照如图细胞沉淀量分别加入 300 μL 、250 μL 、150 μL 、100 μL 基质胶。



图二 细胞沉淀体积量

24 孔细胞培养板按照 25 μL -30 μL /孔点胶，基质胶全程维持在 0-4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下操作。细胞培养板

放置 37 °C 培养箱中 10-15 min，待基质胶凝固后，24 孔细胞培养板每孔添加 750 μ l 牛乳腺类器官培养基 A（室温）放置 37 °C 培养箱培养。

3 类器官传代培养（以 24 孔板为例）

3.1 实验材料

传代缓冲液 G（4 °C）、类器官消化液 D（室温或 37 °C）、基质胶（提前 24 h 放入 4 °C 冰箱融化）、牛乳腺类器官培养基 A（室温或 37 °C）、1.5 mL/15 mL 离心管、24 孔细胞培养板、冰盒。

3.2 类器官传代

选择合适的类器官进行传代，一般为生长一周左右，显微镜 10X 下可看到超过 20 个的类器官，或大小 100-200 μ m 的类器官。

吸掉培养基，每孔添加等体积的传代缓冲液 G，移液枪轻柔吹散基质胶，收集于 15 mL 离心管中，每 6-8 孔转移至一个离心管，4 °C 静置 10-15 min。

3.2.1 类器官消化

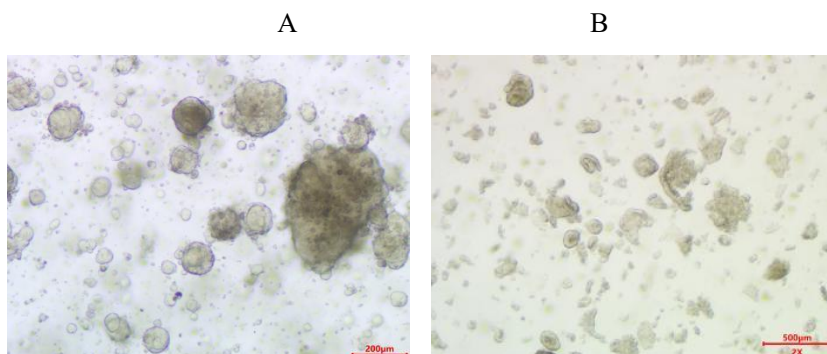
根据类器官的生长情况来决定是否需要消化传代。**离心后若管底沉淀少、未见细胞、基质胶未分层等情况，可再次重悬，提高离心力，再次离心。**

当类器官数量不足或体积较小时，300 g 离心 5 min 弃上清弃。

当类器官数量较多或体积较大时，300 g 离心 5 min 弃上清，可选择消化液消化或机械消化。

消化液消化：加入 1-2 mL 类器官消化液 D，将细胞沉淀吹散后，室温消化 2-4 min，每隔一分钟吹打一次，每次吹打 15 下，显微镜下观察，直至消化至（图 A-B）状态时即可停止。添加 3 倍类器官消化液体积的传代缓冲液 G 终止消化，300 g 离心 5 min 弃。

机械消化：加入 1 mL 传代缓冲液 G，1 mL 枪头吹打 20-30 次，直至吹打至（图 C-D）状态时即可停止，加入 10 mL 传代缓冲液，300 g 离心 5 min。



图三 类器官传代消化程度图

3.2.2 传代类器官培养

观察离心收集的类器官沉淀体积量，若沉淀很少可预留 1 倍沉淀体积的上清液点胶，沉淀很多上清可吸净，添加 25 倍类器官沉淀体积的基质胶量重悬类器官。基质胶体积量可参考“类器官原代培养操作图二”。

24 孔细胞培养板按照 25ul-30ul/孔点胶，**基质胶全程维持在 0-4 °C 条件下操作**。细胞培养板放置 37 °C 培养箱中 10-15 min，待基质胶凝固后，24 孔细胞培养板每孔添加 750μl 牛乳腺类器官培养基 A（室温）放置 37 °C 培养箱培养。

4 类器官冻存（以 24 孔板为例）

4.1 实验材料

传代缓冲液 G（4 °C）、类器官冻存液 F（4 °C）、15 mL 离心管、细胞冻存管、程序降温盒、移液枪。

4.2 类器官冻存

暂不使用的类器官应冻存，放于低温环境保存。

吸掉培养基，每孔添加等体积的传代缓冲液 G，移液枪轻柔吹散基质胶，收集于 15 mL 离心管中，每 6-8 孔转移至一个离心管，4 °C 静置 10-15 min。300 g 离心 5 min 弃上清，每三个孔加入 2 mL 类器官冻存液 F，轻柔吹打混匀，转至细胞冻存管中，每管 1 mL。

做好标记信息，放入程序降温盒中，移至 -80 °C 冰箱中，48 h 后，放入液氮罐中保存。或放入 4 °C 冰箱 40 min 后，放入 -20 °C 冰箱中 2 h，移至 -80 °C 冰箱中，48 h 后，放入液氮罐中保存。

5 类器官复苏培养（以 24 孔板为例）

5.1 实验材料

传代缓冲液 G、牛乳腺类器官培养基 A、基质胶（提前 24 h 放入 4 °C 冰箱融化）、24 孔细胞培养板、冰盒、15mL 离心管、水浴锅、3mL 巴氏吸管/移液枪。

5.2 类器官复苏培养

从低温环境中取出冻存的类器官，快速置于 37 °C 水浴锅中融解，水浴融解过程中，需轻轻摇动冻存管，以确保冻存液在短时间内完全融解。将解冻后的类器官快速转移至 15 mL 离心管，使用移液枪轻柔吹打 6-8 次，300 g 离心 5 min 弃上清；添加适量传代缓冲液 G 重悬，移入 1.5 mL 离心管 300 g 离心 5 min，弃上清。

按每管冻存管添加 120ul 基质胶重悬，24 孔细胞培养板按照 25ul-30ul/孔点胶，基质胶全程维持在 0-4 °C 条件下操作。细胞培养板放置 37 °C 培养箱中 10-15 min，待基质胶凝固后，24 孔细

胞培养板每孔添加 750 μ l 牛乳腺类器官培养基 A（室温）放置 37 °C 培养箱培养。

6 基质胶使用

在 2-8 °C 环境条件下，基质胶过夜解冻。当使用基质胶时，请将其放在冰盒以防止过早凝固。
基质胶在 37 °C 下 20 分钟内形成凝胶。

6.1 基质胶特点：

- 4 °C 连续 14 天仍可保持较好的流动性
- 放入 37 °C 培养箱中 10-15 min 即可凝固
- 培养过程中不易破损，去胶干净不粘培养板

运用范围：

For Laboratory Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.