

# 使用说明书

Instruction Manual

TargetMol  
YOUR TARGET MOLECULES

## 人胆管癌类器官培养试剂盒

### Human Cholangiocarcinoma Organoid Kit

#### 产品描述

TargetMol 人胆管癌类器官培养试剂盒专为体外构建高保真胆管癌类器官模型而设计，提供优化配方与完整培养体系，可支持肿瘤细胞在三维环境中稳定生长与分化。该试剂盒操作简便、重复性高，能够有效维持肿瘤的异质性与分子特征，适用于药物筛选、机制研究及个体化治疗评估等多种应用场景。

#### 产品组成

100 mL 规格的产品组成如下：

产品编号	产品名称	产品包装
C2016-1	基础培养基 (Human Cholangiocarcinoma Organoid Basal Medium)	100 mL
C2016-2	培养基添加物 (Human Cholangiocarcinoma Organoid Supplement)	5 mL

#### 产品应用

用于体外构建人胆管癌类器官模型，支持药物筛选及肿瘤发生发展机制研究。

#### 完全培养基的配制

建议首次使用时将培养基添加剂全部加入基础培养基中，混匀后按每管 10–15 mL 分装，-20°C 保存，避免反复冻融。

#### 使用说明

##### 一、原代培养

- 准备 4°C 预冷的组织保存液 (1–2 mL) 取样瓶，取材后的胆管癌组织应立即置入取样瓶中，冰上快速转运至洁净实验室进行后续处理与细胞分离，并完成拍照及信息登记。
- 提前准备若干培养皿，加入 4°C 预冷的 PBS (含三抗) 备用。
- 在超净台内将取样瓶外表面消毒后，转移组织至培养皿中。使用新鲜组织清洗液 (1–3 mL) 清洗 2–3 次，去除可见非肿瘤组织后，用无菌手术剪将组织剪切为约 1–3 mm<sup>3</sup> 的小组织块。
- 加入人胆管癌原代组织消化液 (1–5 mL，依据组织量调整；约黄豆大小组织建议使用 1 mL)，于 37°C 条件下振荡消化 1–2 h，并实时观察消化进程。
- 取 10–20 μL 消化液于显微镜下观察，当可见较多单细胞或 <70 μm 细胞团时，加入 3 倍体积预冷 PBS (含三抗) 终止消化。  
**注：**若消化体系较为黏稠，可加入 DNase I 继续消化 3–5 min。
- 使用 100 μm 细胞筛网过滤，收集滤液后加入 3–5 mL 类器官单细胞清洗液，400 g 离心 5 min，弃上清；随后重复清洗 1 次。  
**注：**若细胞量较少，可省略重复清洗步骤。
- 如细胞沉淀中存在红细胞，加入快速红细胞裂解液，轻轻吹打混匀 5–8 次后置冰上裂解 2 min。加入 3–5 mL 类器官单细胞清洗液终止反应，400 g 离心 5 min，弃上清。

8. 基质胶重悬与铺板：进行细胞计数后，按每 2000–5000 个细胞加入 8–15  $\mu\text{L}$  基质胶，混匀后垂直滴加至预热的 96 孔板孔中心（全程冰上操作）。
9. 接种完成后，将 96 孔板倒置于 37°C 培养箱中固化 20–30 min，随后轻轻加入室温预平衡的人胆管癌类器官培养基进行培养。

注：a) 培养基置于 4°C 保存后应尽快使用，或提前分装并于 -20°C 冻存，避免反复冻融。

b) 培养基建议每 2–4 天更换一次（可半量或全量换液），以维持细胞因子活性并促进类器官生长与扩增。

## 二、类器官传代培养

1. 类器官建议每 1–4 周传代一次。吸去培养基后，使用预冷 PBS 清洗 2–3 次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  预冷的 TrypLE Express 酶，用 200  $\mu\text{L}$  移液枪轻柔吹打使其分散，室温孵育 1–5 min。随后再次轻柔吹打重悬，将细胞收集至 15 mL 离心管中，加入 5–10 mL 预冷 PBS，于 4°C 条件下 300–400 g 离心 5 min，弃去上清。

可选机械法传代（适用于类器官数量较少或需快速扩增的情况，机械法处理后类器官通常为小团块状态，重新铺板后有利于快速恢复与扩增）：吸去培养基后，用预冷 PBS 清洗 2–3 次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  预冷 PBS 或类器官传代消化液，用移液枪轻柔吹打使类器官分散，转移至 15 mL 离心管中。加入 5–10 mL 预冷 PBS，于 4°C 条件下 300–400 g 离心 5 min，弃去上清。

2. 收集的类器官沉淀加入适量基质胶重悬，推荐传代比例为 1:1 至 1:6。按原代接种方法操作，每孔加入 10–15  $\mu\text{L}$  基质胶铺板，于 37°C 培养箱中静置 10–15 min 完成凝胶化。随后取出培养板，在超净台中每孔加入 100–200  $\mu\text{L}$  人胆管癌类器官培养基，置于 37°C 培养箱中继续培养扩增。

## 三、类器官冻存

按“传代培养”步骤收集类器官细胞沉淀后，加入适量类器官冻存液，使用移液枪轻柔吹打重悬，转移至细胞冻存管中。将冻存管置于程序降温冻存盒中，先于 -80°C 冰箱过夜保存，随后转入液氮罐中进行长期保存。

注：冻存密度建议：以 96 孔板培养为例，每 2–4 孔类器官合并冻存为 1 管，每管体积约 1–2 mL。

## 四、类器官复苏

1. 从液氮罐中取出冻存的类器官细胞，立即置于 37°C 水浴中快速复苏，并轻轻水平晃动冻存管，使其在 1–2 min 内完全融解。

注：避免倒置冻存管，以防污染。

2. 融解完成后，使用移液枪轻柔吹打细胞 2–5 次，迅速转移至 15 mL 离心管中，加入 1–5 mL 类器官单细胞清洗液，300 g 离心 5 min，弃去上清。可重复清洗一次，以进一步去除冻存液残留。
3. 向细胞沉淀中加入适量人胆管癌类器官培养基重悬，转移至 1.5 mL 离心管中，300 g 离心 5 min，弃去上清。
4. 使用基质胶重悬细胞，并按原代接种方法进行铺板：每孔加入 10–15  $\mu\text{L}$  基质胶混悬液，于 37°C 培养箱中静置 10–15 min 完成凝胶化。随后取出培养板，在超净台内每孔加入 100–200  $\mu\text{L}$  人胆管癌类器官培养基，置于 37°C 培养箱中继续培养扩增。

## 储存条件

4°C 可保存三个月，-20°C 可保存一年。

## 注意事项

1. 注意无菌操作，防止微生物污染。
2. 组织消化要温和适度，避免过度消化影响细胞活性与类器官形成效率。
3. 使用新鲜配制的完全培养基，按时更换，避免反复冻融关键添加物。
4. 基质胶需全程低温操作，避免提前凝胶化，铺板后及时转入培养箱。
5. 本品仅适用于专业科研用途，严禁用于临床诊断、治疗、食品或药品领域，且不得存放于住宅等非专业场所。
6. 本产品对皮肤、眼睛和呼吸道有刺激性，为保障操作安全与人员健康，操作时请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。

