

BiozellenCM® 人肝胆管类器官扩增培养基
(BiozellenCM® Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium)

Catalog No B-MN-00005-100、B-MN-00005-500

Specification 100ml、500ml

一、产品介绍

BiozellenCM® 人肝胆管类器官扩增培养基是一种化学成份明确的无血清培养基，用于从肝胆组织建立人肝胆管类器官。经扩增培养基获得的类器官绝大多数由胆管细胞组成。因此，类器官在结构、细胞类型组成和自我更新等方面具有肝胆管上皮的生物特征，可用于肝脏发育、疾病模型，以及肝毒性评价等研究。

二、产品信息

组 成	货 号	规 格	储存温度&质保期
BiozellenCM® 人肝胆管类器官基础培养基	B-MN-00005	100 mL/500mL	2-8 °C，12个月
BiozellenCM® 人肝胆管类器官扩增培养基添加剂 A (50×)	B-MN-00005-A	2 mL/10mL	-20°C，12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 人肝胆管类器官扩增培养基添加剂 B (50×)	B-MN-00005-B	2 mL/10mL	-20°C，12个月，避免反复冻融
BiozellenCM® 人肝胆管类器官扩增培养基添加剂 C (100×)	B-MN-00005-C	1 mL/5 mL	-20°C，12个月，避免反复冻融

三、用前须知

- 首次使用时，冰上解冻人肝胆管类器官扩增培养基添加剂A、B和C，解冻后的添加剂或一次性配置并使用，或分装于-20°C冻存（不超过12个月）；
- 人肝胆管类器官初始生长培养基配置：按比例将 A、B 和 C 添加至人肝胆管类器官基础培养基中，混匀后置于 2-8 °C保存，建议 2-3 周内使用；（以 10mL 为例：200μL 添加剂 A + 200μL 添加剂 B + 100 μL 添加剂 C + 9.5 mL 人肝胆管类器官基础培养基）
- 人肝胆管类器官扩增培养基配置：按比例将添加 A 和 B 至人肝胆管类器官基础培养基中，混匀后置于 2-8 °C保存，建议 2-3 周内使用。（以 10mL 为例：200μL 添加剂 A + 200μL 添加剂 B + 9.6 mL 人肝胆管类器官基础培养基）

四、需要但不包含的其他试剂与耗材

名 称	货 号	规 格
组织保存液	B-R-00005-100	100 ml/瓶
组织消化液	B-R-00009-50	50 ml/瓶
BiozellenGel 基质胶，低因子，无酚红	B-P-00007-10	10 ml/瓶
类器官传代消化液	B-R-00002-100	100 ml/瓶
类器官冻存液	B-R-00006-100	100 ml/瓶
DMEM/F12（含10%血清）	-	-
无菌PBS（1×）	-	-
100μm滤网	-	-

五、人肝胆管类器官构建操作步骤

For Research Use Only

1. 组织运输：将采集的组织放入装有组织保存液（B-R-00005-100）的采集管中，充分浸没并于低温（建议冰上）迅速运至实验室。

2. 组织前处理：将组织至于6孔板中，加入PBS（含1%双抗和两性霉素B）漂洗两次。

3. 组织剪碎：将剩余组织转移至10 cm的无菌培养皿中，剪碎至肉糜状（1-3 mm³）后移入15 mL离心管中。

4. 组织消化：加入5 mL组织消化液（B-R-00009-50），37℃恒温消化30min。每间隔5-10min上下颠倒混匀。

备注1：当大部分组织碎片能通过1 mL移液枪头或镜下观察到大部分细胞呈细胞团块时，即可终止消化。

5. 终止消化：加入5 mL DMEM/F12（含10% FBS）混匀后，300 g离心4 min，小心吸弃上清。

6. 细胞过滤：加入5 mL PBS重悬细胞，使用100 μm细胞滤网过滤，再吸取5 mL PBS冲洗滤网，将滤出液300 g离心4 min，吸弃上清。

7. （选做）如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色）加入1 mL红细胞裂解液（B-R-00003-100），轻轻涡旋或颠倒混匀，室温静置5 min。300 g离心4 min，小心吸弃上清。

8. 细胞计数：使用5 mL PBS重悬细胞，吸取少量悬液通过自动细胞计数仪或手动计数板计算细胞总数和活细胞比率。计数后，300 g离心4 min，小心吸弃上清。

备注2：活细胞总数（个）= 测读值（个/mL）× 5 mL × 活细胞比率 %

9. 细胞预冷：取少量类器官扩增培养基（30-50 μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。

10. 细胞接种：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的BiozellenGel（B-P-00007-10，或Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以30 μL/滴接种至预热细胞孔板中。

备注3：接种密度推荐 $1-5 \times 10^4$ 活细胞/uL（仅供参考，可按实验需求进行调整）。

备注4：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。

11. 基质胶固化：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37℃，5% CO₂培养箱内孵育10-15 min使基质胶凝固。

12. 培养：待基质胶凝固后，加入准备好的肝胆管类器官初始生长培养基至浸没基质胶滴（需确认人肝胆管类器官扩增培养基中已加入添加剂A、B和C）。将已接种的孔板转移至37℃，5% CO₂培养箱内培养。

备注5：6孔板建议加入2.5 mL，12孔板建议加入1.2 mL，24孔板建议加入600 μL。

备注6：加液时建议沿侧壁缓慢加入，请勿将培养基直接加到胶滴上。

13. 换液：1周后吸弃培养基，更换为肝胆管类器官扩增培养基（需确认人肝胆管类器官扩增培养基中已加入添加剂A、B），并继续放置在CO₂培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代。

六、人肝胆管类器官传代操作步骤

1. 收集：用1 mL移液枪头捣碎并刮取基质胶团，并将胶滴与培养基一起转入15 mL离心管中（如孔内有细胞存留，可另吸取PBS涮洗孔板并转入离心管中）。300 g离心4 min，小心吸弃上清。

备注1：建议待大部分类器官的大小大于100 μm传代（传代标准仅供参考，可按实验需求调整）。

备注2：为避免枪头粘附性损耗，可用抗粘附液（B-R-00007-100）润洗移液枪头。

2. 消化：加入5 mL类器官传代消化液（B-R-00002-100）于37℃消化5-10 min，期间颠倒混匀若干次。

备注3：在消化过程中，可使用移液器吹打混匀帮助消化。也可实时取少量消化悬液于显微镜下观察消化情况，当观察到较多的单细胞或直径在50 μm以下的细胞簇后，即可认为消化完成。

3. 终止消化：加入5-10 mL DMEM/F12（10% FBS），于300 g离心4 min，小心吸弃上清。

4. 细胞漂洗：取5-10 mL PBS重悬细胞，300 g离心4 min，小心吸弃上清。

5. 细胞预冷：取少量肝胆管类器官扩增培养基（30-50 μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。

6. 细胞接种：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的BiozellenGel（B-P-00007-10，或Matrigel）小心混匀上述预冷的细胞悬液，以30 μL/滴接种至预热细胞孔板中。

备注4：传代比例一般1:2或1:3（传代比例仅供参考，可按实验需求调整）

备注5：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。

7. 基质胶固化：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37℃，5% CO₂培养箱内孵育10-15 min使基质胶凝固。

8. 培养：待基质胶凝固后，加入准备好的肝胆管类器官扩增培养基至浸没基质胶滴（需确认人肝胆管类器官扩增培养基中已加入添加剂 A 和 B）。

9. 换液：将已接种的孔板转移至 37℃，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。

七、友情提示

1. 本试剂仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂培养结果会受到标本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此可能会存在培养失败的情况。
3. 如遇到特殊样本或其他未涉及问题，请联系公司售后技术支持，我们将提供免费的技术咨询服务，再次感谢您的信任！

仅供研究使用