

# Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium (肝内胆管癌类器官完全培养基)

货号: CHOM-100

## 产品介绍

肝内胆管癌类器官完全培养基是一款用于培养人类肝内胆管癌类器官的商品化培养基，可有效扩增与维持患者来源肝内胆管癌类器官的体外生长。患者来源的肝内胆管癌类器官能够高度还原原始肿瘤的基因组特征、病理表型及异质性，可精准模拟体内肿瘤微环境与生物学行为，在肝癌发病机制研究、个体化药物筛选、药效评估及精准医疗实践中具有重要应用价值与广阔前景。

## 产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium A	CHOM-100	100 mL	4°C, 6个月
Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium C (250×)		0.4 mL	-20°C, 1年

## 其他需准备的试剂信息

试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHR Biotechnology	OEM-10
样本保存液	SHR Biotechnology	SPS-100
肿瘤组织消化液	SHR Biotechnology	TTD-50
肿瘤类器官基础培养基	SHR Biotechnology	TBM-500



类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50

## 肝内胆管癌类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制肝内胆管癌类器官完全培养基。以下是准备 10 mL 完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻 Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium B (50×) 和 Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium C (250×)。

**注意：**解冻后，建议将 Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium B (50×) 和 Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium C (250×) 按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于微量试剂组分 Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium C (250×)，建议瞬时离心 5 秒钟 (500-2000 rpm) 后，再开盖使用，以避免损失。

2. 将 200 μL Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium B (50×)，40 μL Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium C (250×) 加至 9.76 mL Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 肝内胆管癌类器官完全培养基。

**注意：**配制后的肝内胆管癌类器官完全培养基可在 2-8 °C 储存不超过 1 周，建议现配现用。Cholangiocarcinoma Organoid Complete A 内含有细菌及真菌抗生素。

## 肝内胆管癌类器官的原代培养

**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。在收集人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

1. 将新收集的肝内胆管癌组织从 4 °C 样本保存液 (SPS-100) 中取出，评估所获得的组织块是否由上皮细胞组成，是否含有脂肪或肌肉组织。如果含有脂肪或肌肉组织，需在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和钳子尽可能移除非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，立即继续下一步。
2. 用肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 冲洗组织，直到上清液澄清。
3. 使用外科剪刀或手术刀在细胞培养皿中将组织切成小块，放入 15 mL 离心管中。
4. 加入 5 倍体积预热过的肿瘤组织消化液 (TTD-50)，37 °C 消化 20 min 左右。

**注意：**密切监测消化过程，可配合剧烈摇晃或使用减去尖端的 1 mL 枪头上下吸取混合物来加快消化进程。为



为了防止过度消化，每 5-10 min 应在显微镜下观察是否出现细胞团，并及时终止消化。

5. 加入 10 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 来终止消化，并轻轻地吹打或上下晃动离心管混匀。
6. 使用 100  $\mu\text{m}$  滤网过滤，收集滤液。
7. 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下，300  $g$  离心滤液 3 min，弃上清。如果细胞沉淀为红色，吸弃上清液后，加入 2 mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 1-2 min，然后在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 300  $g$  离心 3 min。

**注意：**红细胞裂解的具体时间可以根据红色深浅进行判断，尽量去除红细胞。

8. 吸弃上清液后，加入 10 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 重悬沉淀，在 4  $^{\circ}\text{C}$  下，300  $g$  离心 3 min，弃上清。
9. 加入 1 mL 的肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 重悬沉淀，转移至 1.5 mL EP 管，在 4  $^{\circ}\text{C}$  下，300  $g$  离心 3 min。
10. 吸弃上清液后，用适量的类器官专用基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每  $\mu\text{L}$  基质胶悬液含 8-20 个细胞团 (约 200-500 个细胞)，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30 s 以避免基质胶过早凝固。

**注意：**24 孔板每孔推荐接种一个 30  $\mu\text{L}$  基质胶滴，可根据细胞计数结果确定需要接种的胶滴数量。混合过程中应尽量避免产生气泡，以免影响后续观察以及类器官生长。

11. 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30  $\mu\text{L}$  左右，避免悬液接触孔板侧壁。

**注意：**为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

12. 将铺好的培养板至于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
13. 待基质胶完全凝固后，加入已配制的肝内胆管癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu\text{L}$ 。

**注意：**请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。如形成的基质胶穹顶结构较高，可加入 600  $\mu\text{L}$  保证浸没完全。

14. 将 24 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养。每隔 2 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。
15. 密切监测类器官的形成。理想情况下，肝内胆管癌类器官可以在初次接种后 5-8 天之间进行首次传代。

## 肝内胆管癌类器官的传代培养

1. 吸弃原培养液，加入 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的培养基，用经过润洗液 (OMR-100) 润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力吹打重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 在室温条件下 300  $g$  离心 3 min，弃上清，加入 0.2 mL 类器官传代消化液 (OPD-100) 重悬底部类器官沉淀，用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育，直到类器官消化完成。也可以采用机械吹打方式进行类器官传代消化，即在加入 1 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 重悬底部类器官沉淀后，小心地将类器官悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏类器官。

**注意：**密切监测类器官消化情况，使用类器官传代消化液进行消化时需要将消化时间控制在最短时间内完成 (不要超过 5 min)。根据经验，如果可以观察到小块细胞 (由 10-50 个细胞组成) 的混合物，



消化就完成了。建议优先采用机械吹打方式进行类器官传代消化，对于无法吹散的类器官进一步使用类器官传代消化液进行消化。

4. 加入 1 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 洗涤沉淀一次，室温条件下 300 *g* 离心 3 min。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 吸弃上清液后，用适量的基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀。

**注意：**传代比例建议为 1:2-1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

7. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30  $\mu$ L 左右。
8. 将接种完成后的培养板至于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
9. 待基质胶完全凝固后，加入 37  $^{\circ}$ C 预热的肝内胆管癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L。

**注意：**请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。如基质胶穹顶结构较高，可加入 600  $\mu$ L 保证浸没完全。

10. 将 24 孔板置于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

## 注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。

## 论文发表规范引用参考

Cholangiocarcinoma organoids were cultured with Cholangiocarcinoma Organoid Complete Medium (CHOM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.

