

Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium (人宫颈上皮类器官完全培养基)

货号: HCeCM-100

产品介绍

人宫颈上皮类器官完全培养基是一款用于培养人类宫颈上皮类器官的商品化培养基。宫颈上皮类器官作为一种理想的 3D 生理模型, 可用于研究和模拟宫颈生物学、宿主与病原体的相互作用及疾病进展等。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium A	HCeCM-100	100 mL	4°C, 6个月
Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Human Cervical epithelial 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
正常组织消化液	SHR Biotechnology	NTD-50
上皮类器官基础培养基	SHR Biotechnology	OBM-500
类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100



类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50

人宫颈上皮类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制人宫颈上皮类器官完全培养基。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 Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium B (50 \times) 和 Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium C (250 \times)。

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

2. 将 200 μ L Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium B (50 \times)，40 μ L Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium C (250 \times) 加至 9.76 mL Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 人宫颈上皮类器官完全培养基。

注意：配制后的人宫颈上皮类器官完全培养基可在 2-8 $^{\circ}$ C 储存不超过 1 周，建议现配现用。Human Cervical epithelial Organoid Complete A 内含有细菌及真菌抗生素。

人宫颈上皮类器官的原代培养

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. 将新鲜收集的宫颈组织从 4 $^{\circ}$ 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. 用上皮类器官基础培养基 (OBM-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。

注意：解离的样品必须足够小，可以通过 10 mL 移液管的尖端。

4. 加入 5 倍体积预热过的正常组织消化液 (NTD-50)，37 $^{\circ}$ C 消化 2-3 h。



注意：密切监测消化过程，定时通过剧烈摇晃或上下吸取混合物来混合试管中的内容物。为了防止过度消化，应在显微镜下观察是否出现上皮细胞簇。

5. 加入 10 mL (约 3~5 倍体积) 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 来终止消化，并轻轻地上下晃动离心管。
6. 使用 100 μm 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 类器官裂红液 (OCM-50) 重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 30 s-1 min，然后 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，加入适量的上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心 3 min，弃上清。
9. 吸弃上清液后，加入 1 mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，转移至 1.5 mL EP 管中，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 μL 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 μL 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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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，加入已配制的人宫颈上皮类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL 。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

14. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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，人宫颈上皮类器官可以在初次接种后 5-8 天之间进行首次传代。原代培养的人宫颈上皮类器官如图 1A 所示。

人宫颈上皮类器官的传代培养

当类器官直径长至 100-200 μm 左右时，即可进行传代培养，具体步骤如下：

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 上皮类器官基础培养基 (OBM-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，如果可以观察到小细胞团（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 上皮类器官基础培养基 (OBM-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) 重悬沉淀。

注意：如类器官生长状态较好，传代比例推荐为 1:3~1:5，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，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30 μ L 左右。

8. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 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 预热的人宫颈上皮类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

10. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养。传代后的人宫颈上皮类器官如图 1B 所示。

人宫颈上皮类器官的冻存

当类器官平均直径长至100-200 μ m，增殖活性较好且结构透亮，边界清晰时，即可进行冻存。具体步骤如下：

1. 吸弃原培养液，加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的上皮类器官基础培养基 (OBM-500)，用经过类器官润洗液 (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. 用经过类器官润洗液 (OMR-100) 润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。

3. **注意：**吹打力度需要控制，尽量保证类器官的完整性，以提高冻存后的复苏活性。

4. 在室温条件下 300 g 离心 3 min，弃上清。

5. 加入 1 mL 上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 洗涤沉淀一次，室温条件下 300 g 离心 3 min，弃上清。

6. 类器官沉淀中加入 1 mL 预冷的类器官冻存液 (OFM-50)，吹打混匀后立即移入冻存管中。

7. 程序降温及长期保存：

冻存方法 (1)：将冻存管放入梯度降温冻存盒然后保存至 -80 $^{\circ}$ C 过夜，第二天取出放入液氮罐。

冻存方法 (2)：4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 10 min，转移至 -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min，转移至 -80 $^{\circ}$ C 过夜，第二天取出放入液氮罐。

注意：-80 $^{\circ}$ C 冻存建议不超过 3 个月，液氮冻存建议不超过 1 年。



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

Human cervical epithelial organoids were cultured with Human Cervical epithelial Organoid Complete Medium (HCeCM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



附录 人宫颈上皮类器官培养例图

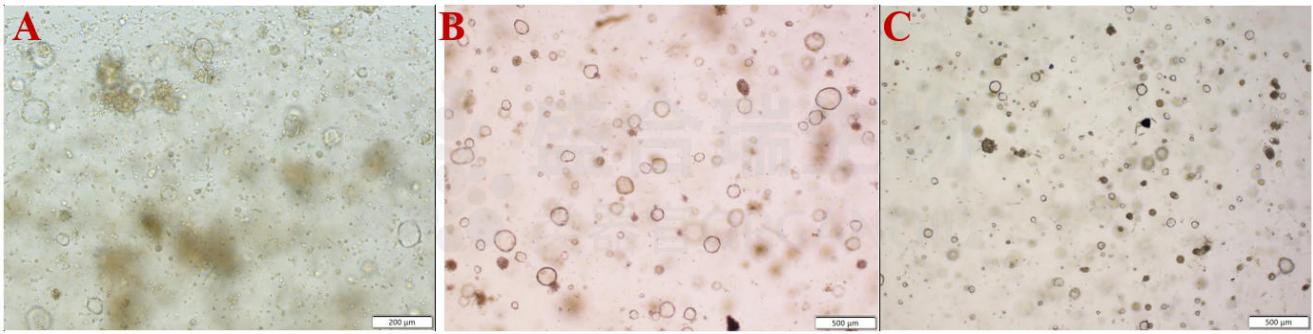


图1 人宫颈上皮类器官原代培养、传代和复苏后的生长状态例图

(A) 原代人宫颈上皮类器官的生长状态 (P0)。类器官以泡状结构为主。比例尺：200 μm 。(B) 第一代人宫颈上皮类器官的生长状态 (P1)，传代后的类器官为泡状或实体结构。比例尺：500 μm 。(C) 复苏后的类器官表现出稳定的增长趋势。比例尺：500 μm 。

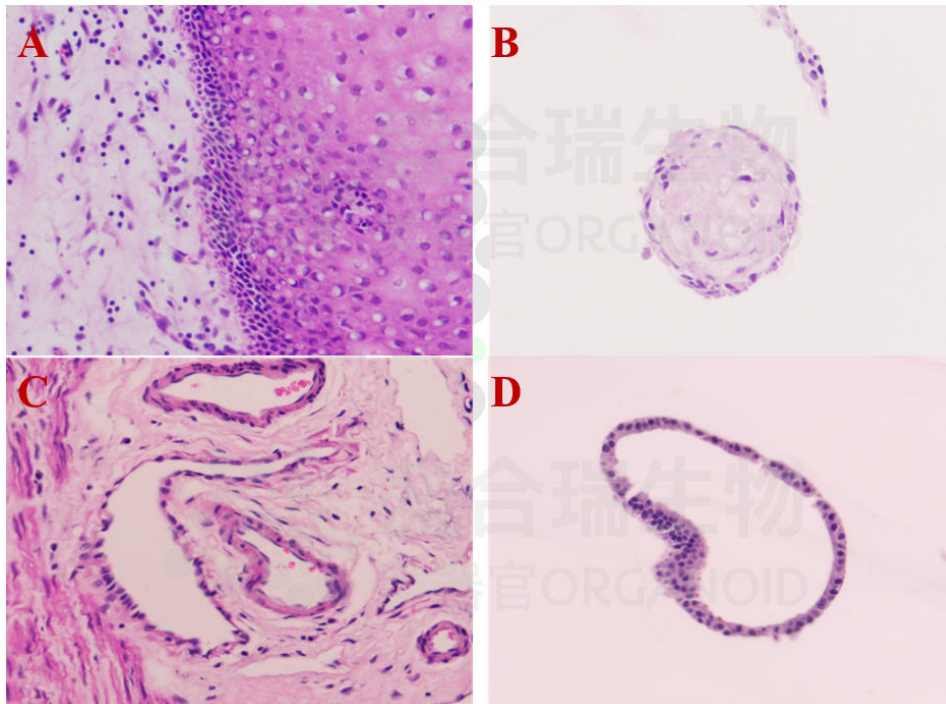


图2 人宫颈上皮类器官HE染色

由图可见人外宫颈上皮组织 (A) 和对应类器官 (B)，以及内宫颈上皮组织 (C) 和对应类器官 (D) 内细胞的排布，细胞核、细胞质颜色以及核质比均近似，且结构相近，提示类器官和来源组织在组织形态上相似。



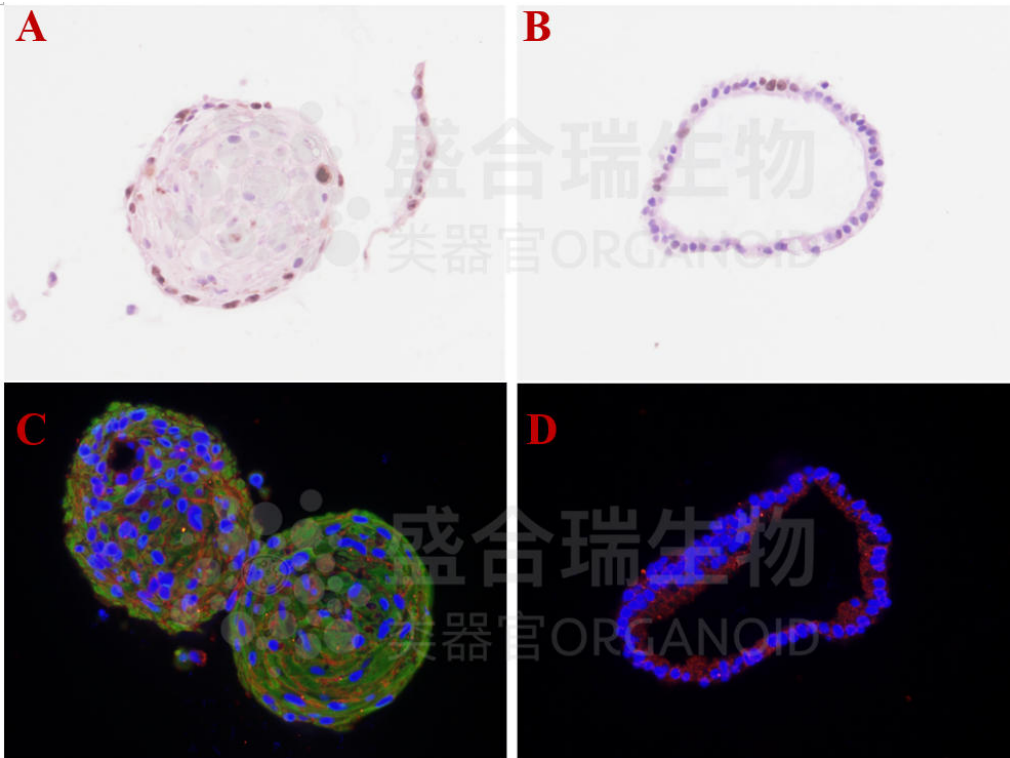


图3 人宫颈上皮类器官免疫组织化学与免疫荧光染色

(A-B) Ki67免疫组化结果显示：宫颈外上皮类器官（A）与宫颈内上皮类器官（B）的部分细胞呈现为Ki67阳性，表明其具有增殖能力。

(C-D) 免疫荧光染色结果显示：宫颈外上皮类器官（C）与宫颈内上皮类器官（D）来自于不同类型的上皮细胞谱系，宫颈外上皮类器官KRT5（绿色，鳞状上皮细胞标记物）染色阳性，表明其主要由鳞状上皮细胞构成，与体内组织情况一致。E-cadherin（红色）标记上皮细胞，DAPI（蓝色）标记细胞核。

