

Human Liver Ductal Organoid Complete Medium (人肝类器官完全培养基)

货号: HLCM-100

产品介绍

人肝类器官完全培养基是一款用于扩增和分化源自人胆管祖细胞的肝类器官的商品化培养基, 包括人肝类器官接种培养基 (HLOSM)、人肝类器官扩增培养基 (HLOEM) 和人肝类器官分化培养基 (HLODM)。HLOSM 用于富集人胆管祖细胞, HLOEM 用于肝 (胆管) 类器官的传代和扩增, HLODM 则有助于将胆管类器官分化为成熟的肝类器官, 可用于肝脏生物学研究、传染病研究和药物筛选。

产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium A	HLCM-100	20 mL	4°C, 6个月
Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium B (50×)		0.4 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium C (100×)		0.2 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium D (250×)		0.08 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium A		50 mL	4°C, 6个月
Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium B (50×)		1 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium C (100×)		0.5 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium D (250×)		0.2 mL	-20°C, 1年



Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium A	30 mL	4°C, 6个月
Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium B (50×)	0.6 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium C (100×)	0.3 mL	-20°C, 1年
Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium D (250×)	0.12 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
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50
DPBS (不含钙镁离子)	-	-

人肝类器官完全培养基的制备

在无菌条件下制备人肝类器官完全培养基。以下是准备 10 mL 人肝类器官接种培养基 (HLOSM)、10 mL 人肝类器官扩增培养基 (HLOEM) 和 10 mL 人肝类器官分化培养基 (HLODM) 的示例, 如所需量不同, 请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻 Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium B (50×)、Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium C (100×)、Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium D (250×)、Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium B (50×)、Human Liver Ductal Organoid Expansion



Medium C (100×)、Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium D (250×)、Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium B (50×)、Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium C (100×)和Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium D (250×)。

注意:解冻后, 建议将所有组分均按需分装后保存取用, 避免反复冻融。对于所有微量试剂组分, 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 Liver Ductal Organoid Seeding Medium B (50×), 100 μ L Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium C (100×)和 40 μ L Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium D (250×)加至 9.66 mL Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium A 中, 充分混合, 配制成 10mL 人肝类器官接种培养基 (HLOSM) 。
3. 将 200 μ L Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium B (50×), 100 μ L Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium C (100×)和 40 μ L Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium D (250×)加至 9.66 mL Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 人肝类器官扩增培养基 (HLOEM) 。
4. 将 200 μ L Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium B (50×), 100 μ L Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium C (100×)和 40 μ L Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium D (250×)加至 9.66 mL Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium A 中, 充分混合, 配制成 10 mL 人肝类器官分化培养基 (HLODM) 。

注意: 配制后的培养基可在2-8 °C储存不超过7天, 建议现配现用。Human Liver Ductal Organoid Seeding Medium A、Human Liver Ductal Organoid Expansion Medium A、Human Liver Ductal Organoid Differentiation Medium A内含有细菌及真菌抗生素。

人肝 (胆管) 类器官原代培养

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脂肪或肌肉组织。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) 或 DPBS 冲洗肝组织, 直到上清液澄清。
3. 使用外科剪刀或手术刀将组织切成0.5-1 mm³的小碎块, 放入 5 mL离心管中。
4. 加入5倍体积预热过的正常组织消化液 (NTD-50) , 37 °C消化40-90 min。

注意: 密切监测消化过程, 每10分钟通过剧烈摇晃或上下吸取混合物来混合试管中的内容物。当悬浮液中还有80%以上单细胞时, 消化过程就可以完成。为了防止过度消化, 也可以在显微镜下观察消化情况。

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 70 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。
8. 吸弃上清液后，加入 10 mL 的上皮类器官基础培养基 (OBM-500) 重悬沉淀，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 15-30 min 左右成胶。
13. 配制人肝类器官接种培养基 (HLOSM)。
14. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的 HLOSM，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。

15. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养。每 2~3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。
16. 配制人肝类器官扩增培养基完全 (HLOEM)。
17. 培养 5-7 天后将 HLOSM 更换为 HLOEM。扩增培养好的人肝类器官生长状态如图 1A 所示。

人肝（胆管）类器官的传代培养

选取生长状态较好的肝类器官进行传代培养，具体步骤如下：

1. 在避免破坏基质胶的情况下，小心从待传代孔中吸出所有培养基，然后加入 500 μL 预冷的 DPBS。
2. 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。
3. 用经过润洗液润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬浮液 20~30 次，使得类器官与基质胶分离。
4. 4 $^{\circ}\text{C}$ 300 g 离心 5 min，弃上清，加入 500 μL 新的预冷 DPBS，用经过润洗液润洗的枪头反复吹打重悬 20~30 次。
5. 4 $^{\circ}\text{C}$ 300 g 离心 5 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，如果可以观察到大部分小细胞团（由 10-50 个细胞组成）出现，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。

6. 4 °C 300 g 离心 5 min，吸弃上清液后，加入适量预冷的基础培养基轻轻重悬沉淀，并进行类器官计数，调整至每 25 μL 300 个类器官的浓度。

注意：如果需要，离心浓缩类器官沉淀后再以每 25 μL 300 个类器官的密度进行重悬。

7. 重复步骤 6 一次。

8. 用适量的基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬沉淀，基质胶的浓度需在 70% 以上。

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。

9. 轻轻混匀后，小心吸取悬液点入 24 孔板底部正中央，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。

10. 将铺好的培养板至于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15-30 min 左右成胶。

11. 待基质胶完全凝固后，加入已配制好的 HLOEM，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。

12. 将 24 孔板置于 37 °C CO₂ 培养箱中培养。每 2~3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。传代培养的人肝类器官生长状态如图 1B 所示。

人肝类器官的成熟分化

在传代后扩增培养的第 5 天（或直到第 14 天），扩增期类器官可以在终点测定中进行成熟分化，步骤如下：

1. 配制人肝类器官分化培养基 (HLODM)。
2. 在避免破坏基质胶的情况下，小心从待分化孔中吸出所有培养基，然后加入 500 μL 已配制好的 HLODM 培养基。
3. 每 2~3 天更换一次培养基，在分化培养基中持续培养至第 10 天即可完全分化为成熟肝类器官，并可用于标准测定或收获用于免疫染色或功能分析等。分化后的人肝类器官生长状态如图 1C 所示。

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 liver ductal organoids were cultured with Human Liver Ductal Organoid Complete Medium (HLCM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



附录1 人肝类器官培养过程图

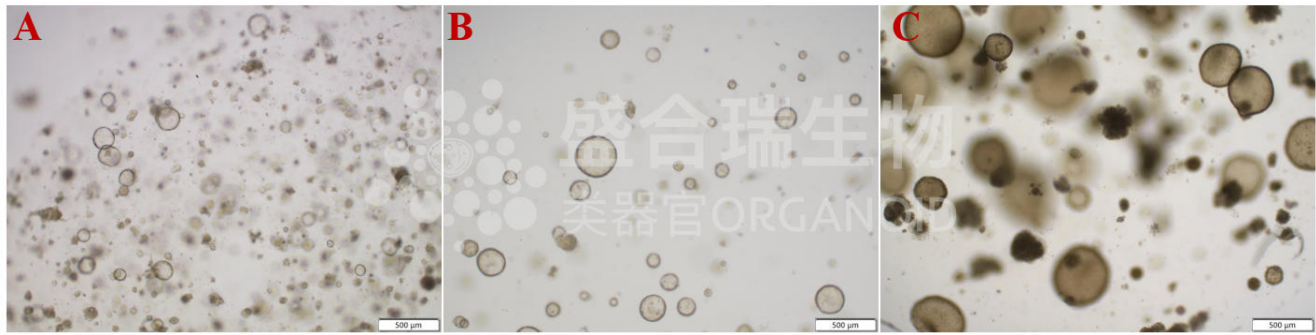


图1 人肝类器官扩增、传代与分化状态示例

(A) 在扩增培养至7天左右时，可观察到形成的囊泡状结构。(B) 传代培养过程中，可观察到相似的囊泡状结构。(C) 在分化培养至第15天左右，可观察到成熟的肝类器官结构。比例尺：500 µm。

