

适用项目：人类器官培养

一、产品简介

本产品专用于人视网膜母细胞瘤类器官的原始分离与稳定扩增培养。支持人视网膜母细胞瘤类器官的构建、传代扩增、冻存保存及复苏，能够稳定保留原始肿瘤组织的基因组与病理特征，适用于精准药物筛选及相关科学研究。

二、产品信息

产品名称	组分	货号	规格	储存条件
人视网膜母细胞瘤类器官完全培养基	人视网膜母细胞瘤类器官基础培养基 A	30-126	95 mL	4℃，9 个月
	人视网膜母细胞瘤类器官添加物 B（20×）		5 mL	-20℃，9 个月
	人视网膜母细胞瘤类器官添加物 C（1000×）		100 μL	-20℃，9 个月
	人视网膜母细胞瘤类器官基础培养基 A	30-226	475 mL	4℃，9 个月
	人视网膜母细胞瘤类器官添加物 B（20×）		25 mL	-20℃，9 个月
	人视网膜母细胞瘤类器官添加物 C（1000×）		500 μL	-20℃，9 个月

三、自备试剂、耗材和仪器

自备/选购配套试剂

组分	货号	规格	储存条件
减因子类器官基质胶（无酚红）	10-101	10 mL	-20℃，12 个月
类器官防黏附润洗液	20-103	100 mL	4℃，12 个月
	20-203	500 mL	
红细胞裂解液	20-102	100 mL	4℃，12 个月
	20-202	500 mL	
肿瘤组织消化液	20-108	100 mL	-20℃，9 个月
	20-208	500 mL	
Starter 增强剂（1000×）	20-116	0.1 mL	-20℃，12 个月
类器官传代消化液	20-105	100 mL	4℃，12 个月
	20-205	500 mL	
类器官回收液	20-106	100 mL	4℃，12 个月
	20-206	500 mL	
类器官冻存液	20-104	100 mL	-20℃，12 个月
组织清洗液	20-118	500 mL	4℃，12 个月
组织运输保存液	20-101	100 mL	4℃，12 个月
类器官清洗液	20-111	100 mL	4℃，12 个月
	20-211	500 mL	4℃，12 个月

自备耗材和仪器

- 生物安全柜、CO₂ 培养箱（37℃，5% CO₂）、离心机、水浴锅、倒置显微镜。
- 精密解剖剪、手术镊、60 mm 培养皿。
- 1.5 mL/15 mL/50 mL 离心管、10 mL 移液管、无菌低吸附移液枪头（P1000/P200）、100 μm 无菌细胞筛网。
- 24 孔或 48 孔组织培养板（TC-Treated）。



四、人视网膜母细胞瘤类器官完全培养基制备说明

- (1) 试剂解冻: 提前将人视网膜母细胞瘤类器官添加物 B 和添加物 C 置于冰上或 4°C 冰箱缓慢融化。使用前轻柔颠倒混匀 (切勿剧烈涡旋)。
- (2) 无菌混合: 在超净工作台中, 将培养基添加物 B 和培养基添加物 C 分别按照稀释倍数加入 A 瓶中, 充分混匀。此时, 您已得到人视网膜母细胞瘤类器官完全培养基。

***注意: 完全培养基中已含 1% Pen-Strep Solution, 无需另行添加。**

- (3) 提高类器官建成率: 在建系/传代/复苏首日可每 10 mL 配置好的完全培养基中加入 10 μ L 的 Starter 增强剂 (20-116)。类器官成熟稳定生长后无需添加。
- (4) 分装储存: 建议按日常用量分装 (如 10 mL/管), 置于 -20°C 保存。开封后 4°C 请于 2 周内用完, 避免反复冻融。

五、原代人视网膜母细胞瘤类器官构建

实验准备

- (1) 基质胶置于冰上或 4°C 提前解冻, 每个胶滴 30~50 μ L, 根据所需种板数量进行适当调整用量。
- (2) 提前将接种用的培养板置于 37°C 预热 30 min。

样本处理

***若新鲜样本无法立即处理或需要转运, 请将组织样本浸没于组织样本保存液 (20-101) 中保持 2~8°C, 48 h 内处理。**

- (1) 样本获取: 优先选取肿瘤活性区域 (避免取中心坏死区、溃烂区)。
- (2) 组织清洗: 将人视网膜母细胞瘤组织块放入组织清洗液 (20-118) 中, 反复漂洗 3~5 次, 以去除黏液及血块残留, 直至清洗液澄清。

组织消化与收集

***后续步骤均需要使用类器官防黏附润洗液 (20-103) 润洗枪头、移液管和离心管。**

- (1) 清洗: 用手术剪将人视网膜母细胞瘤组织剪切小块, 组织清洗液 (20-118) 冲洗人视网膜母细胞瘤组织 3~5 次, 至清洗液澄清, 弃去清洗液。
- (2) 消化前准备: 将组织转移至 60 mm 培养皿中, 加入 50 μ L 的肿瘤组织消化液 (20-108) 冰上用无菌的组织剪将组织剪碎至 0.5~1 mm³ 左右大小碎块, 将切碎的組織转移至防黏附润洗液 (20-103) 润洗过的 15 mL 离心管。
- (3) 组织消化: 剪碎后的组织中加入 5 mL 的肿瘤组织消化液 (20-108), 37°C 消化 30~60 min。每隔 10 min 上下摇晃离心管。镜下观察, 直至大部分细胞呈团块状 (勿消化成单细胞状态), 即可终止消化。
- (4) 终止消化: 加入 5~10 mL 类器官清洗液 (20-111), 终止消化。300 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清。
- (5) 细胞筛过滤: 加入 10 mL 类器官清洗液 (20-111), 将细胞悬液通过预先润洗的 100 μ m 无菌细胞筛网过滤, 于 50 mL 离心管收集滤液。300 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清。
- (6) 红细胞裂解 (可选): 观察沉淀, 若沉淀较红则需进行红细胞裂解。加入 2 mL 红细胞裂解液 (20-102) 重悬细胞, 室温静置 3 min。加入 5 mL 类器官清洗液 (20-211) 重悬细胞, 终止裂解。300 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 收集沉淀。

种板培养

- (1) 计数: 取 1 mL 类器官清洗液 (20-111) 重悬细胞团, 利用细胞计数仪或手动计数板进行计数。取 10 μ L 悬液与等体积台盼蓝混匀并加入计数板, 置于显微镜或细胞计数仪观测和分析活细胞比例。300 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 收集组织细胞沉淀。
- (2) 重悬: 用预冷的移液器枪头, 加入适量基质胶重悬沉淀。基质胶的用量为每个胶滴 30~40 μ L。重悬过程应迅速 (不超过 30 s)、轻柔避免产生气泡。推荐重悬密度为每个胶滴含有 1000~1500 个细胞团。基质胶体积比应不低于 70% 以保证培养过程中基质胶的结构稳定。

***此步骤应迅速完成。**

- (3) 点胶: 用预冷的 P200 移液器, 吸取 30~40 μ L 基质胶-人视网膜母细胞瘤细胞团混合物, 垂直、快速地接种在预热的培养板孔中央。确保枪头尖端不接触孔底。重复此操作, 为每个孔点胶。
- (4) 固化: 将培养板小心转移至培养箱中, 正置孵育 3 min, 随后倒置孵育 20~30 min, 使基质胶聚合成固体圆顶, 以防组织团沉降接触孔底。
- (5) 补液: 基质胶固化后, 从培养箱中取出培养板。沿着 24 孔板孔壁一侧, 缓慢地向每个孔中加入 500 μ L 已配制好的完全培养基 (完全浸没胶滴)。

***切勿将培养基直接吹打在基质胶穹顶上, 以免使其破裂。**



类器官培养与维护

- (1) 培养: 将培养板放入 37°C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。
- (2) 观察: 每天在显微镜下观察类器官的生长情况并拍照记录, 一般在接种 3~4 天后, 可观测到类器官形成。
- (3) 换液: 每 2~3 天更换一次培养基。用移液器小心吸弃旧培养基 (同样沿孔壁操作)。加入 500 μL 新鲜的完全培养基。

六、人视网膜母细胞瘤类器官传代培养

*传代节点: 当类器官生长旺盛 (直径 > 100 μm)、密度过高 (通常培养 5-10 天后) 或培养基明显变黄时, 需要进行传代。传代比例 1:2~1:3。

- (1) 破胶: 加入 1 mL 预冷的类器官清洗液 (20-111), 用润洗过的枪头轻轻吹打, 将基质胶穹顶吹散、溶解。将悬液收集至离心管, 300 × g 离心 5 min, 弃上清, 注意不要吸到底部沉淀。
- (2) 消化: 加入 3 mL 类器官消化液 (若类器官数量较多, 可适当增加类器官消化液用量), 用润洗过的枪头轻轻吹打底部沉淀。将离心管置于 37°C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中消化, 每隔 5 min 显微镜下观察类器官消化情况, 待大部分类器官消化至 10-50 个细胞团 (避免消化过度, 影响类器官生长) 时, 加入 2 倍消化液体积 类器官清洗液 (20-111), 终止消化。
- (3) 收集与种板: 离心管 300 × g 离心 3 min, 弃上清, 收集组织细胞沉淀。剩余步骤同“种板培养” (2) - (5)。

七、类器官冻存

观察类器官生长情况, 确保类器官活性良好, 多数类器官直径 > 100 μm。使用 1 mL 类器官冻存液 (20-104) 重悬类器官沉淀, 重悬动作需轻柔。将混悬液转入冻存管, 立即放入程序降温盒。将降温盒置于 -80°C 冰箱过夜。长期储存: 24 小时后, 迅速将冻存管转移至液氮中长期保存。切勿在 -80°C 长期存放, 否则会导致活性显著下降和复苏失败。

八、类器官复苏

- (1) 快速融化: 从液氮罐中取出冻存管, 迅速投入 37°C 水浴锅中。轻微摇动冻存管, 使其在 1-2 min 内迅速融化, 待管内尚存一小块冰晶时即可取出。
- (2) 清洗与稀释: 在超净工作台中, 用润洗过的枪头将冻存管内的类器官悬液转移至防黏附润洗液 (20-103) 润洗过的含有 5~10 mL 预冷类器官清洗液 (20-111) 的 15 mL 离心管中。轻轻吹打混匀, 使冻存液得到充分稀释。
- (3) 离心收集: 4°C, 300 × g 离心 3 min。小心吸弃上清液, 重复清洗并离心 1 次。
- (4) 重悬与接种: 参照“种板培养”步骤。
- (5) 启动培养: 沿孔壁缓慢加入 500 μL 已配制的人视网膜母细胞瘤类器官完全培养基。建议在复苏后的首个 48 h 每 1 mL 配置好的完全培养基中加入 1 μL Starter 增强剂 (20-116), 降低复苏初期的细胞应激, 提高类器官的生长速度。

九、注意事项

- (1) 安全提示: 本产品仅供科学研究使用, 不可用于临床诊断或治疗。使用前请仔细阅读本说明书。
- (2) 正确储存: 请严格按照推荐的温度储存培养基, 不宜长时间置于室温。建议将培养基进行小规格分装, 使用时解冻, 以保障活性与效果。
- (3) 无菌操作: 本产品仅供类器官体外培养, 实验室需具备培养条件, 并且实验过程涉及的所有试剂和耗材必须保持无菌以防止污染。
- (4) 操作环境: 组织样本在采集过程中应遵循全程冰上操作; 运输应使用组织运输保存液 (20-101) 并始终保持 4°C 运输环境。样本处理时应使用预冷的处理试剂以维持细胞活性。
- (5) 个人防护: 操作时需做好个人防护, 身着合适的实验服并佩戴一次性口罩和手套。使用过程中产生的废弃物应按照医疗垃圾处理标准妥善处理。
- (6) 本产品培养结果会受到组织采集过程、组织样本质量等因素影响; 同时也受到技术人员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术发展局限性等限制, 因此可能会存在培养失败的情况。

版本号: V2.6

发布日期: 2026 年 3 月 6 日

免责声明: 本产品仅用于科学研究用途。用户需自行承担使用产品的全部风险。生产商不对因使用本产品引起的任何间接或附带损害承担责任。建议使用者根据自身实验体系进行条件优化。

