

人视网膜母细胞瘤类器官完全培养基

说明书

货号	ZQ-ORG006
组成	基础培养基 A: 添加物 B
规格	100mL (95+5) / 500mL (475+25)
保存	基础跟添加物-20℃保存 12 个月
用途	仅供科研使用

【产品描述】

人视网膜母细胞瘤类器官培养基是一款专为高效构建和长期维持人源视网膜母细胞瘤 (RB) 类器官而设计的标准化培养系统。本产品基于高度优化的化学成分确定型 (Chemically Defined) 配方, 能够模拟视网膜微环境, 诱导 RB 原代细胞或细胞系快速自组装形成具有典型病理特征的三维 (3D) 结构。该系统极大地保留了母体肿瘤的遗传特性、细胞异质性及空间结构, 是基础癌症研究、抗肿瘤药物高通量筛选及个体化精准医疗的理想模型。

【操作说明】

一、培养基准备

(1) 试剂解冻: 提前将人视网膜母细胞瘤类器官基础培养基 A 和培养基添加物 B 置于冰上或 4℃ 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, 将培养基添加物 B 直接加入 A 瓶中, 充分混匀。此时, 您已得到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 Supplement (1000 \times)。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℃保存。开封后 4℃ 请于 2 周内用完, 避免反复冻融。

二、原代人视网膜母细胞瘤类器官构建

1、实验准备

- (1) 基质胶置于冰上或 4℃提前解冻，每个胶滴 30~40 μL，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及视网膜母细胞瘤类器官完全培养基置于 37℃预热 30 min。
- (3) 配制含 2% Pen-Strep 的 DPBS (1×)平衡盐溶液（无钙镁，无酚红），即 DPBS-PS。

2、样本处理

注意：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中保持 2~8℃，48 h 内处理。

- (1) 样本获取：手术切除样本：优先选取肿瘤活性区域（避免取中心坏死区、溃烂区或电刀严重烧灼炭化的边缘区域）。穿刺活检样本：建议采集 2-3 条完整的穿刺条组织。

- (2) 组织清洗：将手术切除或活检获得的视网膜母细胞瘤组织块放入含 2% Pen-Strep 的冰冷 DPBS 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。

3、组织消化与收集

注意：后续步骤均需要使用类器官防粘连润洗液润洗枪头、移液管和离心管。

- (1) 清洗：用手术剪将视网膜母细胞瘤手术样本剪切小块，DPBS-PS 冲洗视网膜母细胞瘤手术样本 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 μL 的肿瘤组织消化液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粘连润洗液润洗过的 15 mL 离心管。

- (3) 组织消化：剪碎后的组织中加入 2 mL 的肿瘤组织消化液，37℃消化 20~40 min。每隔 10 min 上下摇晃离心管。镜下观察，应能看到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 DPBS-PS，终止消化。移液器吹打 20 次，300×g 离心 3 min，弃上清。

- (5) 细胞筛过滤：加入 10 mL DPBS-PS 重悬细胞，将细胞悬液通过预先润洗的 70 μm 无菌细胞筛网过滤，于 50 mL 离心管收集滤液。300×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

胞裂解液重悬细胞，室温静置 3 min。加入 5 mL DPBS-PS 重悬细胞，终止裂解。300×g 离心 3 min，弃上清，收集沉淀。

4、种板培养

(1) 计数：取 1 mL DPBS-PS 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×g 离心 3 min，弃上清，收集组织细胞沉淀。

(1) 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。**注意：此步骤应迅速完成。**

(2) 点胶：用预冷的 P200 移液器，吸取 30~40 μ L 基质胶-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。

(3) 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。

(4) 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）。**注意：切勿将培养基直接吹打在基质胶穹顶上，以免使其破裂。**

5、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 μ L 新鲜的完全培养基。

6、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 μ m）、密度过高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：沿侧壁吸弃培养基，加入 1 mL 预冷的类器官传代消化液，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。

(2) 消化：将离心管置于 37°C 静置消化 5-10 min (避免消化过度，影响类器官生长)。显微镜下观察类器官消化情况，待大部分类器官消化至 30~40 μm 大小时，加入 2 倍消化液体积 DPBS-PS，终止消化。

(3) 收集与重种：后续步骤与“种板培养”相同，用新的基质胶重悬并点板，使用新鲜的完全培养基进行培养。

7、类器官冻存

观察类器官生长情况，确保类器官活性良好，数量不低于 500 个，多数类器官直径 >100 μm 。使用 1 mL 类器官冻存液重悬类器官沉淀，重悬动作需轻柔，保持类器官的 3D 团块结构。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。

8、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粘连润洗液润洗过的含有 5~10 mL 预冷 DPBS-PS 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 Supplement (1000×)，降低复苏初期的细胞应激，提高类器官的生长速度。

【注意事项】

- 1、注意无菌操作，避免污染；
- 2、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、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并始终保持4℃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；
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 5、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；
- 6、仅供科研使用。