

Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free)

## 类器官冻存液

Kit Art.No: MB-0818L02L



◇ 分装后的类器官培养基需储存于 2-8 °C，有效期两年

### 1、产品描述

模基生物类器官冻存液【Organoid Cryopreservation Medium (Serum Free)】可应用于多种哺乳动物（如人、鼠、猪、蝙蝠、牛等）来源的类器官和细胞系的低温长期保存，该冻存液不含血清，不含任何动物来源成分，含有 10%DMSO。

### 2、产品信息

产品名称	产品货号	规格	存储/运输	保质期
类器官冻存液	MB-0818L02L	100 mL	2-8 °C	24 个月

### 3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L / MB-0818L03S
类器官消化液	MB-0818L01L
类器官回收液	MA-0837DS001
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
胰蛋白酶溶液	-
磷酸盐缓冲液	-
细胞冻存管	-
细胞培养皿 6/10cm	-

## 4、类器官或细胞的冻存和复苏

### a) 类器官的冻存

1、 实验准备：观察类器官状态，代次为 3~5 代最佳，避免选择已分化、代次过大进行冻存。若是状态较差，可更换完全培养基培养至类器官状态良好时冻存。准备好细胞冻存程序降温盒置于室温平衡温度。以下步骤与细胞接触的离心管、试管或者塑料吸头需要用类器官培养防粘附润洗液润洗后使用。

2、 冻存前处理：选择类器官生长状态良好的培养孔，在保留原培养液的情况下（或者吸去培养液加入等体积的基础培养基），用细胞刮刀或者移液器尖端轻轻刮下（或吹打）基质胶和类器官混合物，转移至 1.5ml 或 15ml 离心管中，吹打 5~10 次，使类器官和基质胶分离，100~300g 离心 3 分钟。若还有基质胶可用预冷基础培养基清洗几次，尽量去除基质胶，避免细胞无法与冻存保护液充分接触，或者按照说明书使用类器官回收液去除基质胶。

注：在冻存体积过大的或者是多层上皮的/鳞状细胞组成的类器官时，由于这类结构紧密，难以使用机械力分散，可使用类器官消化液适当消化 5~15 分钟再使用上皮类器官基础培养基清洗 2 次后进行冻存。

3、 添加冻存液：向准备冻存的类器官中加入 500~1000 $\mu$ L 预冷的冻存液（ $1 \times 10^5$ 个/mL），吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中。

4、 程序降温和长期保存：将低温冻存管放入细胞冻存程序降温盒内，随后迅速将细胞冻存程序降温盒放入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中，24 小时后将冻存管转移至液氮（-196 $^{\circ}$ C）中长期保存。也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4 $^{\circ}$ C 静置 10min，-20 $^{\circ}$ C 保存 1 小时，-80 $^{\circ}$ C 保存过夜，再转移至液氮中长期保存。

### b) 细胞的冻存

1、 实验前准备：选取处于对数生长期的细胞，在冻存前一天最好换一次培养液。

2、 细胞收集：

2.1、贴壁细胞：吸弃旧培养液，使用 PBS 润洗细胞后再加入适量胰蛋白酶溶液把单层生长的细胞消化下来，加入完全培养基终止消化，收集于离心管中离心，1000rpm，3min。

2.2 悬浮生长的细胞则直接收集于离心管中离心，1000rpm，3min。

3、 离心后去除上清液，加入适量预冷的冻存培养液，用吸管轻轻吹打使细胞均匀，计数，调节细胞浓度在  $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$ /mL 之间。

4、 添加冻存液：向准备冻存的细胞中加入 500~1000 $\mu$ L 预冷的冻存液（ $1 \times 10^6$ 个/mL），吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中。

5、 程序降温 and 长期保存：将低温冻存管放入细胞冻存程序降温盒内，随后迅速将细胞冻存程序降温盒放入 -80℃超低温冰箱中，24 小时后将冻存管转移至液氮（-196℃）中长期保存。也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4℃静置 10min，-20℃保存 1 小时，-80℃保存过夜，再转移至液氮中长期保存。

### c) 类器官或细胞的复苏

1、 提前在 37℃条件下预热类器官或细胞所需的的上皮类器官基础培养基。

2、 在 37℃的水浴中快速解冻细胞冻存管，当冻存管内冻存物仅剩些许冰渣残留时立即停止水浴并及时转移至洁净操作台。

3、 将冻存悬液转移至离心管中，缓缓加入 5-10 倍体积的预热的的基础培养基，轻轻混匀。

4、 将上步骤所获类器官或细胞悬液进行离心（水平离心转子，150-300g，3min），弃上清，再次加入基础培养基重悬类器官或细胞沉淀。

5、 将上步骤所获类器官或细胞悬液进行离心（水平离心转子，150-300g，3min），弃上清后所获类器官或细胞可用于后续类器官或细胞的培养。

V2.0 版

更新时间：2025/6/21