

# オルガノイドの取り扱い

**<通常の細胞とは全く異なる方法で培養します。使用前に、この注意書きを必ずお読みください>**

## 【融解及び培養方法】

培養を開始前に、当室ホームページの「細胞詳細情報」及び細胞発送時に同梱の「データシート」に記載の培養方法をご確認ください。

## 融解上の注意点（重要）

- ・融解時に、過度なピペッティングによる崩しは、オルガノイドの増殖性を著しく低下させます。
- ・提供するオルガノイド懸濁液は、オルガノイドとゲルが混ざった状態です。ゲルを完全に除く必要はなく、また細胞を単細胞化する必要はありません。
- ・融解直後は、あまり崩さず、大きなサイズのまま培養を開始してください。

## < 融解 >

### 用意するもの

- ・オルガノイドの凍結チューブ
- ・オルガノイドの培養培地（各細胞株に応じた指定の培地）
  - ・ A0 培地
  - ・ 10%FBS 含有 DMEM/F12 培地（融解時の懸濁用、TrypLE Express 不活化用）
- ・ゲル（Cultrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, Type 2）
- ・凍結チューブ立て
- ・ 1.5mL マイクロチューブ
- ・ 15mL 遠心チューブ
- ・ P-20 および P-100、P-200、P-1000 マイクロピペット及びチップ
- ・ 24-well culture plate
- ・ その他、培養操作に必要な器具

### 操作手順

- (1) 5mL の 10%FBS 含有 DMEM/F12 培地培地を分注した 15mL 遠心チューブを用意します。
- (2) オルガノイドの凍結チューブを 37°C の温浴層に 2-3 分浸し、チューブ半分が解けたら温浴層からチューブを引きあげます。
- (3) 培地の入った 15mL 遠心チューブへ、凍結チューブから回収した凍結保存懸濁液を移し、懸濁します。
  - ※ ここでオルガノイドを崩しすぎないようにかなりゆっくり 取り出してください。
  - ※ 通常の細胞株と同様、ダメージを与えないように、チップの先は凍結チューブの底に当てないように注意してください。
  - ※ 懸濁液の回収は一度に行わず、少量ずつ回収してください。
- (4) 400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心し、凍結時のゲルとオルガノイドのペレットを回収します。

- (5) 遠心後、15mL 遠心チューブの上清を少し残して (0.5-1mL 残し) 除去します。
- (6) 残りの上清ごとゲルとオルガノイドのペレットを 1.5mL マイクロチューブに移し、**400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心**します。
- (7) **ゲルを吸わないように注意**し、P-100 や P-200、P-1000 のマイクロピペットで可能な限り除去します。  
**※ 上清が残ると、ゲルが固まりにくくなります。**
- (8) P-100、または P-200 マイクロピペットを使い、**氷中で冷やしていたゲル** 60 $\mu$ L (1:3、20 $\mu$ L/well) で懸濁します。  
**※ 優しく、偏りなくほぐす感じで、緩やかに数回懸濁する。**
- (9) P-20 のマイクロピペットを使用して、**泡立ないように** 20 $\mu$ L/well のオルガノイド懸濁ゲルを 24-well culture plate へ塗布します。  
**※外側から円を描くように塗布すると、平らで均一なゲルになります。**
- (10) 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5-10 分ほど加温してゲルを固めます。
- (11) 500 $\mu$ L/well の **A0 培地**を添加し、インキュベーターで培養を開始します。

## < 継代 >

### 用意するもの

- ・オルガノイド培養中の 24-well culture plate
- ・オルガノイドの培養培地 (各細胞株に応じた指定の培地)
  - ・ A0 培地
  - ・ 10%FBS 含有 DMEM/F12 (融解時の懸濁用、TrypLE Express 不活化用)
- ・ゲル (Cultrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, Type 2)
- ・PBS (-)
- ・TrypLE Express (x1)
- ・凍結チューブ立て
- ・1.5mL マイクロチューブ
- ・15mL 遠心チューブ
- ・P-20 および P-100、P-200、P-1000 マイクロピペット及びチップ
- ・24-well culture plate
- ・その他、培養操作に必要な器具

### 操作手順

- (1) オルガノイド培養中の 24-well culture plate から上清を除去し、P-1000 マイクロピペットを使用して **0.5~1mL/well の PBS (-) で緩やかに懸濁しながら、チップの先でゲルを引っかけて崩します。**
  - ※ ピペッティングしすぎて、細かくゲルを崩すと、チップや well にそれらが付着し回収が難しくなります。
  - ※ 一度に回収すると P-1000 マイクロピペットのチップの中に付着してしまい、回収率が低下してしまうため、**少量ずつに分けて回収**してください。
  - ※ 多くても 3 well ごとに回収するようにしてください。
- (2) 15mL 遠心管に PBS (-) で懸濁したゲル中のオルガノイドを回収します。

- (3) **400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心**します。
- (4) 遠心後、15mL 遠心管の上清を**少し残して (0.5-1mL 残し) 除去**します。
- (5) 残りの上清ごとゲルとオルガノイドのペレットを 1.5mL マイクロチューブに移し、**400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心**します。
- (6) 200~300 $\mu$ L の TrypLE Express を添加し、チューブのまま 37 $^{\circ}$ C の温浴層で反応させます。
- (7) **1-2 分後に優しくタッピングして、ゲルと TrypLE Express が良く混ざるように**します。  
※ 管壁に付着しても後々の遠心で回収できるので、そのまま反応させます。
- (8) **5-10 分後、1mL の 10%FBS 含有 DMEM/F12 を添加し、TrypLE Express の反応を止めます。**  
※ ゆっくりピペティングしてオルガノイドの塊を細かくする。単細胞化する必要はありません。
- (9) **400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心**し、オルガノイドのペレットを回収します。  
※ **ゲルは TrypLE Express で分解されてほとんど残らず、オルガノイドだけになります。**
- (10) 1.5mL マイクロチューブの上清を除去します。氷上で冷やしながら最終的に P-200 や P-1000 のマイクロピペットで可能な限り除去します。  
※ **上清が残ると、ゲルが固まりにくくなります。**
- (11) P-100、または P-200 マイクロピペットを使い、**氷中で冷やしていた必要な well 分のゲル (20 $\mu$ L/well) で懸濁**します。  
※ **優しく、偏りなくほぐす感じで、緩やかに数回懸濁する。**
- (12) P-20 のマイクロピペットを使用して、**泡立てないように 20 $\mu$ L/well のオルガノイド懸濁ゲル**を well へ塗布します。  
※ **外側から円を描くように塗布すると、平らで均一なゲルになります。**
- (13) 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5-10 分ほど加温してゲルを固めます。
- (14) 500 $\mu$ L/well の **AO 培地**を添加し、インキュベーターで培養を開始します。

※ 手順 (5) ~ (8) について、well の数が多くなりましたら、それに伴い回収する遠心チューブのサイズや添加する TrypLE Express、10%FBS 含有 DMEM/F12 の量を調整してください。

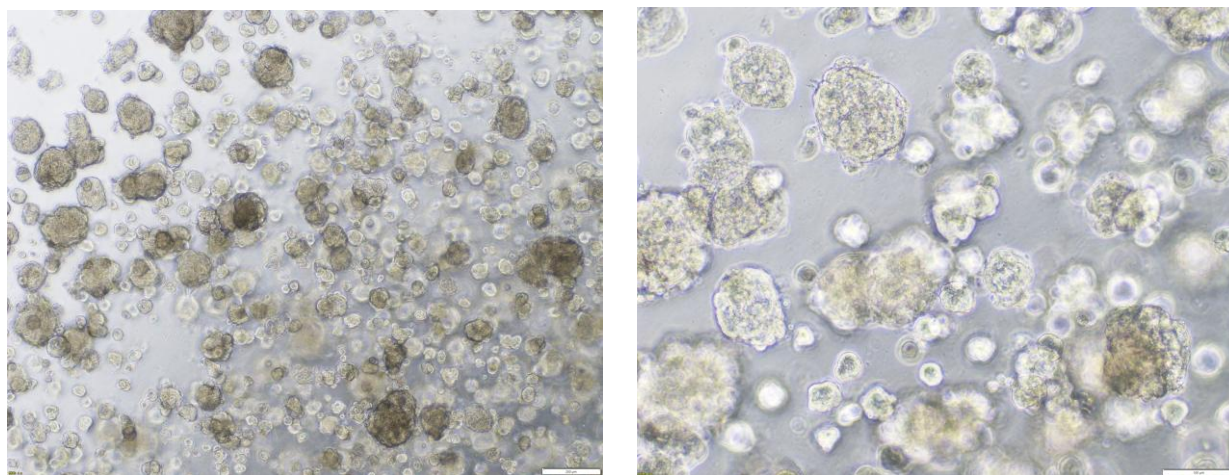


図 1. 継代前のオルガノイド

融解後、および継代後 7-10 日ほどで、サイズの大きなオルガノイドが形成される。オルガノイドの内部が黒く変色したものが出始める前後が継代のタイミング。(左: x4 倍、Scale bar=200 $\mu$ m; 右: x10 倍、Scale bar=100 $\mu$ m)

## < 凍結保存 >

### 用意するもの

- ・オルガノイド培養中の 24-well culture plate
- ・CELL BANKER-I
- ・凍結チューブ立て
- ・クライオチューブ
- ・15mL 遠心チューブ
- ・P-100 および P-200、P-1000 マイクロピペット及びチップ
- ・その他、培養操作に必要な器具

### 操作手順

**※ 継代培養するタイミングまで待たず、少し早い段階でストックを作製することをお奨めします。**

(1) P-1000 マイクロピペットを使用し、培養中のオルガノイドを培地上清で緩やかに懸濁しながら、チップの先でゲルを引っかけて崩します。

※ 細かくゲルを崩すと、チップや well にそれらが付着し回収が難しくなります。

※ 一度に回収すると P-1000 マイクロピペットのチップの中に付着してしまい、回収率が低下してしまうため、少量ずつに分けて回収してください。

※ 多くても 6-12well ごとに回収するようにしてください。

(2) 15mL 遠心チューブに培地上清で懸濁したゲル中のオルガノイドを回収します。

(3) 400 x g の条件で 3 分間、室温で 1 回遠心します。

(4) 遠心後、15mL 遠心管の上清を少し残して (0.5-1mL 残し) 除去します。

(5) 残りの上清は、ゲルを吸わないように注意し、P-100 や P-200、P-1000 のマイクロピペットで可能な限り除去します。

(6) 1mL/well の CELL BANKER-I を添加し、緩やかに懸濁します。

※ 小さく緩やかにピペッティングしてゲル崩してください。オルガノイドには影響はありません。また、気泡が入らないように注意してください。

(7) 1mL/tube のオルガノイド懸濁液を凍結チューブに分注し、凍結保存してください。

以上の操作で培養できない等のご相談がございましたら当室にお知らせください。



**RIKEN BRC**

【問い合わせ】 [cellqa.brc@riken.jp](mailto:cellqa.brc@riken.jp)

尚、再送の対象と連絡の期限につきましては、当室ホームページにてご確認ください。

<https://cell.brc.riken.jp/ja/distribution/flow/terms>

理化学研究所 BRC 細胞材料開発室