

人肺癌类器官培养试剂盒

Human Lung Cancer Organoid Medium Kit

一、产品描述

逸芯生命科学人肺癌试剂盒包含人肺癌类器官培养完整流程的所需试剂，主要用于肺癌组织的类器官原代提取，类器官的体外形成扩增，以及类器官冻存复苏等。

二、试剂盒组分说明

产品名称	应用类别	货号	数量	规格
人肺癌类器官培养基	人肺癌	YX-H-10	1	100mL
活组织保存液	组织保存	YX-TP-01	1	100mL
组织清洗液	组织清洗	YX-W-01	1	250mL
组织消化液（通用型）	组织消化	YX-D-01	1	20mL
细胞解离液	类器官解离	YX-OD-01	1	100mL
细胞冻存液	类器官冻存	YX-CC-01	1	100mL

三、使用说明

（一）准备工作

（1）取出该培养基，在室温（15 - 25℃）或者 4℃过夜进行解冻，加入 200μL 的 Component C，轻轻摇晃使培养基混合均匀。

（2）将 15mL 无菌离心管、50mL 离心管、1.5mLEp 管、移液器、移液管、无菌枪头、医用手术剪刀等表面消毒后放入超净工作台中紫外照 30min 消毒。

（3）配制含 10% FBS 的 DMEM 备用

（二）新鲜人肺癌细胞分离、提取及培养

1. 取材

（1）新鲜组织取材。标本离体后，尽快取材放入适量低温**组织保存液（YX-TP-01）**；采用无菌器械，保证无菌环境，避开肿瘤中心坏死区域取肿瘤组织，大小约 5×5×5mm³ 左右；

（2）组织初步清洗。将取好的组织先放入冷的 PBS 或者生理盐水中进行漂洗 2-3 遍，再放入 4℃ **组织清洗液（YX-W-01）** 中；

（3）4℃环境下转运至细胞培养室，放入 4℃冰箱保存（**尽量在 6 小时以内进行后续组织清洗、消化和种板等步骤**）；

2. 组织清洗

(1) 组织初步清洗。在超净工作台或者生物安全柜中取出样品管，去除组织清洗液。将组织转移至加入 5mL 冷组织清洗液的 15mL 离心管中，涡旋振荡 15 秒，静置 1min，去除清洗液；

(2) 第二次清洗。加入 3mL 的冷组织清洗液，涡旋振荡 15 秒，静置 1min，去除清洗液；重复该步骤 3-4 次；

(3) 组织剪碎。将组织转移至 1.5mL 的 EP 管中，用无菌眼科剪将组织推至 EP 管底部，剪碎组织（大小约 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{mm}^3$ ）；

(4) 组织再次清洗。在超净工作台或者生物安全柜中将剪碎的组织移至新的已加入 3mL 左右冷组织清洗液的 15mL 离心管中，涡旋振荡 15 秒，静置 1min 后弃去上清。重复 4-5 次，减少污染概率。最后一次清洗用 800rpm 离心 3min，再弃去上清；

- 上述步骤应尽量在冰上进行。

3. 组织消化、活细胞获取及种板

(1) 组织消化。将清洗好的组织移至 1.5mL 的无菌 EP 管中，加入 1ml 组织消化液(YX-D-01)，放入 37°C 水浴锅中消化，每隔 10-15min，涡旋振荡 1 次，直至将组织块消化成絮状（一般需要 0.5-2h）。在消化期间，可用枪头吸取 10μL 消化液置于载玻片上，显微镜下进行观察，若能观察到大量圆而亮的单细胞或者细胞团，此时可终止消化。

(2) 稀释消化产物。将消化液移至 15mL 无菌离心管中，加入适量的 DMEM 培养基进行稀释，同时轻轻吹打数次；

(3) 过滤细胞。取 50mL 的离心管，拧开盖子，将 100μm 滤网放在离心管上。将稀释后的消化液过滤，将过滤后的液体移至 15mL 离心管，800rpm 离心 5min 后弃去上清。再加入 3mL 组织清洗液，800rpm 离心 5min。

(4) 类器官种板。离心完毕，弃去上清，保留沉淀。根据沉淀的细胞量，加入适当的无血清 DMEM 培养基，同时加入等体积的基质胶，充分混匀（避免吹打产生大量气泡）。将移液器量程调至 20-30ul，吸取混合后的基质胶，滴加于微孔板内，避免胶滴融合（原代培养建议采用 48 孔板）。种板完毕，将培养板倒置放于培养箱中 10min，胶稳定凝固后。取出培养板，加入人肺癌类器官培养基(YX-H-10) 300-400ul/孔。周边孔加入适量的无菌 PBS 或双蒸水，减少培养基蒸发。

(5) 类器官培养。将培养皿放入 37°C CO₂ 培养箱培养。3-4 天更换培养基。加入培养基时，吸头朝向侧壁，避免破坏基质胶。

(6) 类器官观察。每天观察类器官并拍照，了解初始细胞数量、细胞增殖速度、类器官形态、微生物污染情况等。

- 为了获得更多的原代细胞，对于经验丰富的操作者，步骤 2) 和 3) 可省略。在步骤 1) 后，将消化液移至 15mL 离心管，再加入 5mL 左右的组织清洗液，用滴管吹打数次。然后将 15mL 离心管放在手中倾斜 45° 静置 15-30s，让大块组织残渣自然沉降。避开大块的组织残渣，用滴管尽可能多的吸取上清液，转移至另一个新的 15mL 离心管。为了获取尽可能多的原代细胞，该步骤可再重复一次。800rpm 离心 5min，弃去上清。再加入 3mL 组织清洗液，800rpm 离心 5min，弃去上清，留沉淀用于种板。该步骤将明显提高原代细胞的获取量，推荐使用。

4. 类器官传代

- (1) 去除培养基，加入 1mL 的 PBS，清洗 1 遍，注意不要破坏基质胶。
- (2) 加入适量的**细胞解离液 (YX-OD-01)** (96 孔板为 100μL; 48 孔板为 300-400μL; 24 孔板为 800-1000μL)，用移液器打散基质胶。
- (3) 将培养皿放入 37°C 培养箱中消化 10-15min，用移液枪吹打几次，在倒置显微镜下观察，直至大部分类器官被消化成只有单个细胞或者 2-4 个的细胞团。
- (4) 加入 1mL 的无血清 DMEM 培养基，把细胞转移至 15ml 离心管，800rpm 离心 5min，弃去上清。加入 1mL 的 PBS，轻轻吹散细胞沉淀，静置 1min，800rpm 离心 5min，弃去上清。
- (5) 根据沉淀的细胞量，加入适当的无血清 DMEM 培养基，同时加入等体积的基质胶，充分混匀（避免吹打产生大量气泡），取 60μL 种植于 24 孔板中（传代培养建议采用 24 孔板）。种板完毕，将培养板倒置放于培养箱中 10min，胶可凝固。取出培养板，加入**人肺癌类器官培养基 (YX-H-10)** 800-1000ul/孔。周边孔加入适量的无菌 PBS 或双蒸水，减少培养基蒸发。

(6) 类器官培养。将培养皿放入 37°C 的 CO₂ 培养箱培养，视情况更换培养基（加入培养基时，吸头朝向侧壁，避免破坏基质胶）。

(7) 类器官观察。每天观察类器官并拍照，了解初始细胞数量、细胞增殖速度、类器官形态、微生物污染情况等。

5. 肺癌类器官冻存

- (1) 当类器官能够稳定传代 4 代后，可进行类器官的冻存（以 24 孔板培养为例）。

(2) 在类器官传代稳定后，吸净细胞培养孔中的培养基，向每孔加入 600 μ L **细胞冻存液 (YX-CC-01)** 重悬，使用移液枪将细胞轻柔吹散混匀。

(3) 用移液枪将细胞悬液转移至冻存管中，将冻存管置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱至少 24 h，随后视储存需要转移至液氮中长期保存。

6. 肺癌类器官复苏

(1) 冻存的类器官从液氮或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出后，立刻于 37 $^{\circ}$ C 水浴下进行化冻。

(2) 将解冻完成的类器官悬液加入到适量体积的 PBS 缓冲液中，400 g，离心 3 min，弃去上清液。

(3) 进行“肺癌类器官传代”操作，将冻存管细胞悬液接种至细胞孔板中。

注意事项

1. 使用本产品时需要注意无菌操作，防止污染。
2. 该产品储存在 4 $^{\circ}$ C，有效期为半年；储存在 -20 $^{\circ}$ C 有效期为 1 年。使用该产品处理样本以及细胞前需恢复至室温。为了保持产品活性，请勿将产品置于室温或较高温度放置过夜。
3. 本产品适用于肿瘤术后样本，且样本所含肿瘤细胞越多则类器官成功率越高，不推荐用于病灶血样本（循环肿瘤细胞）。
4. 为了提高类器官培养的成功率，请尽量避免样本在体外放置时间过长，超过 48h 会严重影响样本活性并降低类器官培养成功率。
5. 本产品仅用于科研用途。