

人结直肠癌类器官培养试剂盒

Human Colorectal Cancer Organoid Culture Medium Kit

一、产品描述

逸芯生命科学人结直肠癌试剂盒包含人结直肠癌类器官培养完整流程的所需试剂，主要用于结直肠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
人结直肠癌类器官培养基	人结直肠癌	YX-H-03	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

1. 准备工作

- （1）提前 30min 将 24 孔细胞培养板放置于 37℃细胞培养箱中预热。
- （2）提前将取出在 4℃冰箱中保存的人结直肠癌类器官培养基并平衡至室温。
- （3）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射 30min 消毒。
- （4）配制含 10% FBS 的 DMEM 备用。

2. 肿瘤组织样本的原代提取

- （1）将肿瘤组织样本放置于预冷的 4℃组织保存液中直至开始处理。根据肿瘤组织样本的状态可在 4℃**组织保存液**（YX-TP-01）中保存，最长保存时长约为 48 h。
- （2）将肿瘤组织样本放置于 100 mm 培养皿中，加入 3mL 试剂盒中的**组织清洗液**（YX-W-01）冲洗组织样本，吸弃上清液，重复该步骤 2-3 次。最后根据肿瘤组织样本尺寸，用适量组织清洗液浸润该组织。
- （3）将培养皿放置于冰上，用手术剪刀耐心将组织样本切成 1~3 mm³ 大小的组织碎片。
- （4）将剪碎的组织转移至 15mL 离心管中，用 5-10mL **组织清洗液**冲洗培养皿，将冲洗液一起收集在离心管中。1500 rpm，常温离心 3 min，弃上清。
- （5）根据组织样本体积，加入 1-3mL 本试剂盒中的**组织消化液**（YX-D-01）完全浸没组织

样本，置于 37 °C 恒温振荡培养箱中消化，摇床转速为 200~300 rpm，消化 30min~1h（根据样本的具体情况可调整消化时间）。

（6）加入 3 倍组织体积的 **10% FBS DMEM** 终止消化。用 100μm 滤网进行细胞过滤，1500rpm，离心 3min 后收集细胞。

- 如果过筛后的细胞沉淀呈红色，加入 3-5 倍体积的红细胞裂解液处理 2-3min。完成裂解后加入 10mL **PBS** 重悬，1500rpm，离心 3min。

（7）用 **10% FBS DMEM** 重悬细胞沉淀，对细胞悬液进行细胞计数。以 24 细胞孔板为例，按每孔 $1\sim 2\times 10^5$ 个细胞密度计算需接种的孔数。1500rpm，离心 3min 得到细胞沉淀，将细胞沉淀置于冰上。

（8）将**基质胶**与**人结直肠癌类器官培养基**（YX-H-03）以 1: 1 的比例混合，重悬细胞（24 细胞孔板中每孔接种的总体积为 60μL，每孔含基质胶 30μL，该步骤需要全程在冰上操作）。

（9）将细胞沉淀与基质胶的混合悬液轻轻滴在已提前预热好的 24 孔板中央，使之形成圆顶状胶滴（每滴 20μL，每孔 3 滴，每孔接种总体积为 60μL）。缓慢将细胞培养板移至培养箱中 37°C 孵育 30min，让基质胶凝固。

（10）基质胶完全凝固后，每孔缓慢加入 500μL **人结直肠癌类器官培养基**，置于 37 °C，5% CO₂ 条件下静置培养。

3. 结直肠癌类器官传代

（1）在显微镜下观察肿瘤类器官，待细胞聚集成类器官结构后观察 2~3 天，当类器官尺寸超过 100μm 或培养基变黄时进行传代。

（2）将含有类器官的 24 孔板转移到洁净工作台，吸净细胞培养孔中的培养基，每孔加入 500μL **细胞解离液**（YX-OD-01），并使用移液枪将载有细胞的基质胶胶滴吹散。

（3）将培养板置于 37°C 恒温培养摇床中，转速为 200~300 rpm，消化 30min。

（4）消化结束后将消化液收集到离心管中，加入 2 倍体积的 **PBS** 稀释终止消化。

（5）400 g 离心 3 min，弃上清。

（6）加入少量的人**结直肠癌类器官培养基**重悬细胞，进行细胞计数。一般以 1: 2 的比例进行传代，或计数根据每孔细胞接种数量进行传代。按照“肿瘤组织样本的原代提取”的步骤（8）~（10）进行接种。

（7）每隔 2~3 d 观察类器官状态并更换培养基。

4. 结直肠癌类器官冻存

- (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。

5. 结直肠癌类器官复苏

- (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“结直肠癌类器官传代”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 3 个月；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。