

乳腺癌类器官培养试剂盒

Breast Cancer Organoid Kit

PRS-BCOK

中科普瑞昇
PRECEDO

一、产品说明

中科普瑞昇乳腺癌类器官试剂盒是一款用于人源乳腺癌类器官原代提取、体外形成和扩增的试剂盒，包含从乳腺癌组织处理，到类器官构建、扩增及冻存的全套试剂。

二、产品组成及保质期

收到产品后请于以下推荐温度储存：

产品名称	产品组成	规格	数量	储存温度及有效期
乳腺癌类器官培养基	PRS-BCM-3D	60mL	1	-20℃ 1年；2-8℃ 1个月
基质胶	PRS-LM	1.5mL	1	-20℃ 2年
组织清洗液	PRS-TCR-I	50mL	1	-20℃ 1年；2-8℃ 6个月
组织消化酶II	PRS-TDE-II	30mL	1	-20℃ 1年
类器官解离消化试剂	PRS-ODR	20mL	1	-20℃ 1年；2-8℃ 1个月
类器官冻存液	PRS-OCR	20mL	1	-20℃ 1年；2-8℃ 1个月

注：如果不立即使用，请将以上组分按需分装并储存在 -20 ° C 下。请不要反复冻融。

三、使用说明

实验前准备：

(1) 提前将24孔细胞培养板置于37 °C的培养箱中预热2h。

(2) 将15 mL无菌离心管、1.5 mL EP管、移液器、移液管、无菌枪头等表面消毒后放入超净工作台中紫外照射30 min。

(3) 提前30min从4 °C冰箱取出试剂盒内所含的乳腺癌类器官培养基（产品目录号：PRS-BCM-3D，合肥中科普瑞昇）平衡至室温。

(4) 提前从-20 °C冰箱取出试剂盒内基质胶（产品目录号：PRS-LM，合肥中科普瑞昇）冰上融化。

(5) 配置含10% FBS（产品目录号：10091148，Gibco）的DMEM备用。

(6) 配置含1% BSA（产品目录号：V900933，Sigma）的DMEM/F12冰上预冷备用。

肿瘤组织样本的消化：

(1) 在60mm培养皿中，用5-6 mL 试剂盒内所含的组织清洗液（产品目录号：PRS-TCR-1，合肥中科普瑞昇）冲洗组织样本，吸弃上清液。再加入10mL组织清洗液至培养皿中。

(2) 将培养皿至于冰上，利用手术剪或手术刀将乳腺肿瘤组织切割成体积约为1~3mm²的碎片。

(3)将切碎后的组织转移至15mL离心管中，并用2-3mL组织清洗液冲洗培养皿，将冲洗液收集至同一离心管中。300g，5min离心，吸弃上清。

(4)根据原组织块大小加入适当体积的（消化液体积需是原肿瘤组织体积的25-50倍）本试剂盒内提供的组织消化酶Ⅱ（产品目录号：PRS-TDE-Ⅱ，合肥中科普瑞昇），置于37℃恒温摇床中进行组织消化，摇床转速200-250 rpm，一般消化40-60min（不同病人来源的乳腺肿瘤的样本，因其肿瘤亚型及个体化差异，消化所需时间会有所不同）。

注意：在此操作过程中须仔细监测消化过程，因为过度消化会显著降低类器官的形成效率。当组织块出现絮状拉丝或组织块大小较原始体积减少三分之二时即可终止消化。

(5)在消化完成的组织悬液中加入5-6 mL DMEM（含10% FBS）以终止消化，300g，5min离心，弃上清。

未消化完全的剩余组织可再次加入组织消化酶Ⅱ进行消化，重复步骤（4-5）。所获得的消化悬液完成中止消化步骤后用100 μm细胞筛网过滤，300g，5min离心，弃上清。若进行了二次消化，则合并两次消化后过筛离心得到的细胞沉淀待用。

◎ 乳腺癌类器官的培养（以24孔板为例）

(1)用DMEM（含10% FBS）重悬细胞沉淀，对细胞悬液进行细胞计数。按每孔 $2\sim 5 \times 10^5$ 个细胞密度计算需接种的孔数。

(2)细胞沉淀300g，5min离心，弃上清（此步骤可重复一次，以确保培养基完全去除），小心吸弃上清，将细胞沉淀置于冰上。

(3)从37℃培养箱中取出24孔板。用DMEM/F12（含1% BSA）预冷200 μL枪头。按照40 μL/孔基质胶的体积，将适量体积基质胶加入细胞沉淀，并在冰上小心吹打混匀（注意：为了避免气泡产生，在加入基质胶的时候可按照损耗量多加入一些）。

(4)按照40 μL/孔基质胶的体积，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。缓慢将细胞培养板移至培养箱，孵育30min。

(5)待基质胶完全凝固后，按1mL/孔沿24孔板内壁缓慢加入预先恢复至室温的乳腺癌类器官培养基（产品目录号：PRS-BCM-3D，合肥中科普瑞昇），并将培养板置于37℃，5% CO₂条件下静置培养。

镜下观察类器官形成情况，每2-3天更换一次培养基。

◎ 乳腺癌类器官的传代（以24孔板为例，一般1:2传代）

(1)当培养板中类器官平均直径大于100 μm，类器官生长超出胶体产生贴壁现象或培养基变黄时需要进行传代或冻存；

(2)按照“实验前准备”部分准备好所需试剂及耗材，准备好细胞消化酶（产品目录号：12605028，Gibco）、类器官回收试剂（产品目录号：354253，Corning）和类器官解离试剂（产品目录号：PRS-ODR，合肥中科普瑞昇）；

(3)将培养板中培养基吸入15mL离心管，加入1mL预冷的DMEM/F12培养基吹打底部胶体（轻柔，多次地将胶体吹散），将吹散的胶体转入离心管，然后每孔加入500 μL细胞消化酶（产品目录号：12605028，Gibco），放入培养箱中消化15min，一般不超过15min；

(4)消化完成后取出培养板，将消化后的细胞悬液轻轻吹离培养板，转移至15mL离心管，加入5 mL DMEM（含10% FBS）终止消化，300g，离心5min；

(5)小心吸弃上清，注意不要将管底部半透明的胶体吸出；

(6)加入适量体积类器官回收试剂（产品目录号：354253，Corning），一般1孔类器官需加入500 μ L类器官回收试剂，以此类推。轻轻重悬细胞沉淀，冰浴30min后，300g，4 $^{\circ}$ C离心5min，弃上清；

(7)加入4mL类器官解离试剂（产品目录号：PRS-ODR，合肥中科普瑞昇），摇床转速180-220rpm，消化8-10min。

(8)摇床振荡完毕后，加入4mL DMEM（含10% FBS），300g，离心5min，吸弃上清，将细胞沉淀置于冰上。按照“乳腺癌类器官培养”步骤的2-5继续进行类器官的接种和培养。

◎ 肝癌类器官的冻存

(1)重复“乳腺癌类器官传代”的步骤1-8；

(2)加入适量的类器官冻存液（产品目录号：PRS-OCR，合肥中科普瑞昇）于离心管中，轻柔混匀，制成细胞混悬液。

(3)将离心管中的混合液按照至少 1×10^6 /管细胞数转入冻存管，建议每管体积1.5mL，在冻存管上作好标记。

(4)将细胞冻存管放入梯度冻存盒中，-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中保存。注意：-80 $^{\circ}$ C不可保存超过1周，若需长期保存，需移至液氮罐中。

注意事项

- 1、本产品在使用前需平衡至室温。
- 2、使用产品时应注意无菌操作，避免污染。
- 3、为保持本产品的最佳使用效果，不宜将其过夜放置于室温或较高的温度环境中。
- 4、请于保质期内使用本产品，超出保质期，需停止使用。
- 5、样本需为肿瘤术中样本，且肿瘤细胞比例越高(至少>50%)，培养成功率越高。不推荐用于少量样本（如循环肿瘤细胞）进行培养。
- 6、本产品仅用于科研用途，不能用于体外诊断。

合肥中科普瑞昇生物医药科技有限公司

地址：合肥高新区孔雀台路国家健康大数据产业园A6栋

电话：0551-67129201 网址：www.precedo.cn

E-mail：KY-services@precedo.cn

