

肝癌类器官培养试剂盒

Hepatocarcinoma Organoid Kit

PRS-HCOK

中科普瑞昇
PRECEDO

一、产品说明

中科普瑞昇肝癌类器官试剂盒是一款用于人源肝癌类器官原代提取、体外形成和扩增的试剂盒，包含从肝癌组织处理，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
肝癌类器官培养基	PRS-HCM-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1 - 2小时从-20 °C 冰箱取出所需体积的基质胶（产品目录号：PRS-LM，合肥中科普瑞昇），于冰上融化。

(2)提前30分钟从4 °C 冰箱取出肝癌类器官培养基（产品目录号：PRS-HCM-3D，合肥中科普瑞昇），使其平衡至室温。

(3)将15 mL 无菌离心管、无菌刀片、无菌枪头等表面消毒后放入超净工作台中紫外照射30分钟。

(4)配置含1 % BSA（产品目录号：V900933，Sigma）的DMEM/F12培养基、含10 %血清（产品目录号：10091148，Gibco）的DMEM培养基，冰上预冷备用。

肿瘤组织样本的消化：

(1)提前1 - 2小时从-20 °C 冰箱取出所需体积的基质胶（产品目录号：PRS-LM，合肥中科普瑞昇），于冰上融化。

(2)提前30分钟从4 °C 冰箱取出肝癌类器官培养基（产品目录号：PRS-HCM-3D，合肥中科普瑞昇），使其平衡至室温。

(3)将15 mL 无菌离心管、无菌刀片、无菌枪头等表面消毒后放入超净工作台中紫外照射30分钟。

(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）肿瘤组织消化酶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（不同病人来源的肝癌样本，因其肿瘤亚型及个体化差异，其消化所需时间可能会有所不同），200-220 rpm，一般消化20-60 min。

注意:在此操作过程中须仔细监测消化过程，因为过度消化可能会显著降低类器官形成效率。组织块出现絮状拉丝或组织块大小较原始体积减少一半时即可中止消化。

(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，300 g，5 min离心，弃上清。

(6)所获得消化悬液中止消化后用100 μm筛网过滤，未消化完全组织可加入肿瘤组织消化酶Ⅱ（产品目录号：PRS-TDE-Ⅱ；合肥中科普瑞昇）再次消化，即重复步骤4-5，将两次消化后得到的细胞沉淀合并。

(7)若沉淀红细胞较多，再添加5-10 mL红细胞裂解液，冰上放置5-10 min，300 g，离心5 min，弃上清。

◎ 肠癌类器官的培养（以24孔板为例）

(1)加入1 mL肝癌类器官培养基重悬细胞，对细胞悬液进行细胞计数。取10 μL细胞悬液与10 μL台盼蓝混匀，选取三个不同视野计数观察细胞活率和细胞密度；

(2)按 1×10^5 /孔细胞密度计算接种的多孔板孔数，300 g，5 min离心沉淀，弃上清（此步骤可重复一次，以确保培养基完全去除）；将细胞沉淀置于冰上。

(3)用冰的1% BSA（产品目录号：V900933；Sigma）吹打润洗枪头；按照每孔加基质胶20 μL比例，根据 1×10^5 /孔细胞密度用适量基质胶（冰上放置，防止凝固）重悬细胞，注意不能产生气泡；

(4)将基质胶与细胞的混悬液滴进24孔板中，再用枪头将液滴轻轻在孔的中央摊开，注意不要让胶滴边缘接触到孔壁。将细胞培养板倒置于培养箱中孵育30 min；

(5)待基质胶完全凝固后，沿24孔壁按1 mL/孔缓慢加入预先恢复至室温的肝癌类器官培养基（产品目录号：PRS-HCM-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；

(6)镜下观察类器官形成情况；粒径大于50 μm即认为类器官已经形成，每2-3天更换一次培养基。

◎ 肝癌类器官的传代（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，类器官细胞过多、生长超出胶体产生贴壁现象时需要传代。

(2)按照“实验前准备”部分准备好所需试剂及耗材，并准备类器官回收试剂（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15 mL离心管，每孔加入1 mL预冷的DMEM/F12培养基吹打底部胶体（轻柔，多次，把胶吹散），将吹散的胶体转入离心管。1500 rpm，室温离心5 min，弃上清。

(4)加入提前预冷的类器官回收试剂（产品目录号：354253，Corning）一般1孔类器官需加入500 μL，以此类推。轻轻重悬细胞沉淀，冰浴30 min后，300 g，4℃离心5 min，弃上清；

(5)除胶完成后，1500 rpm，4℃离心5 min，弃上清，加入4 mL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250 rpm，消化7-10 min。

(6)摇床振荡完毕后，加入4 mL DMEM（含10% FBS），300 g，离心5 min，吸弃上清，将细胞沉淀置于冰上。

(7)按照“肝癌类器官培养”步骤的3-6继续进行类器官的接种和培养。

◎ 肝癌类器官的冻存

(1)重复“肝癌类器官的传代”的步骤1 – 6;

(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，制成混合液。

(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1.5 mL，在冻存管上作好标记。

(4)将细胞冻存管放入梯度冻存盒中， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存。注意： $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、本品含抗生素，如无特殊需要，可直接使用，无需任何添加。
- 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、为达到预期效果，请于保质期内使用本产品。
- 5、建议使用肿瘤术中样本，目的肿瘤细胞比例越高（至少 $>50\%$ ），培养成功率越高。不推荐用于少量样本（如穿刺或者循环肿瘤细胞）的培养。
- 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

