

肠癌类器官培养试剂盒

Intestine Carcinoma Organoid Kit

PRS-ICOK

中科普瑞昇
PRECEDO

一、产品说明

中科普瑞昇肠癌类器官培养试剂盒是一款用于人源肠癌类器官原代提取、体外形成和扩增的试剂盒，包含从肠癌组织处理，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
肠癌类器官培养基	PRS-ICM-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-III	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：

注意：以下操作均需无菌环境中进行。

(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冰箱取出肠癌类器官培养基（产品目录号：PRS-ICM-3D，合肥中科普瑞昇），使其平衡至室温。

(3)将15mL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。10091148，Gibco）的DMEM培养基，冰上预冷备用。

肿瘤组织样本的消化：

(1)在60mm培养皿中加入5mL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），将样本倒入其中，并切成3 - 4大块，用培养皿中液体反复吹洗样本后吸出上清液。

(2)将样本在75 %酒精中涮洗1-2 s后，转移至另一60mm培养皿中，在冰上用无菌手术刀片将样本切碎为糊状。

(3)加入7mL组织清洗液（产品目录号：PRS-TCR-1，合肥中科普瑞昇）于培养皿中，收集组织碎片至15mL离心管，1500rpm，室温离心5min，弃上清。（此步骤依据样本大小重复2-3次）。

(4)根据原肿瘤组织块大小加入适当体积（消化液体积需是原肿瘤组织体积的25-50倍）的本试剂盒内提供的组织消化酶III（产品目录号：PRS-TDE-III，合肥中科普瑞昇），并置于37℃恒温摇床中进行振荡消化，200-250 rpm，消化20-30 min（不同病人来源的肿瘤的样本，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一半时即可终止消化。

(5)将所得的细胞悬液用100 μm滤网过筛，用枪头研磨组织，使组织尽量通过筛网。1500rpm，室温离心5分钟，弃上清；

(6)若红细胞较多，添加3mL红细胞裂解液，冰上裂解5-10 min。1500rpm，离心5分钟，弃上清，用DMEM（含10% FBS）重悬细胞沉淀待用。

◎ 肠癌类器官的培养（以24孔板为例）

(1)将获取的肠癌原代细胞悬液进行细胞计数，根据计数结果选择所需要接种的孔数（通常保证每孔至少含有 2×10^5 个细胞）。

(2)1500rpm，离心5 min，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)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30 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30 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，孵育至少30min。

(5)待基质胶凝固后，沿24孔板内壁缓慢加入预先恢复至室温的肠癌类器官培养基（产品目录号：PRS-ICM-3D，合肥中科普瑞昇），置于5% CO₂、37℃培养箱中培养。

(6)镜下观察类器官形成情况，每2-3天更换一次培养基。

◎ 肠癌类器官的传代（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，准备好类器官回收试剂（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。1500rpm，室温离心5min，弃上清。

(4)加入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30min后，300g，4℃离心5min，弃上清；

(5)除胶完成后，1500rpm，4℃离心5min，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4mL DMEM（含10% FBS），300g，离心5min，吸弃上清，将细胞沉淀置于冰上。

(7)按照“肠癌类器官培养”步骤的3-6继续进行类器官的接种和培养。

◎ 肠癌类器官的冻存

(1)重复“肠癌类器官的传代”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，作好标记。

(4)将细胞冻存管放入梯度冻存盒中， -80°C 超低温冰箱中保存。注意： -80°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

