胃癌类器官培养试剂盒

Cat NO:IMV-TK13

产品描述

胃癌类器官试剂盒是一款适用于原代人源胃癌类器官构建和稳定培养的试剂盒。该试剂盒可实现人源胃癌类器官的构建、扩增和冻存，并稳定保留原始肿瘤组织的基因组学与病理学特征，因此在医学研究中具有巨大的应用前景。

产品信息

表 1. 试剂盒组成信息

规格（1 kit）	产品名称	规格（5 kit）	储存
100mL	胃癌类器官完全培养基	500mL	-20℃，12 个月
20mL	肿瘤组织消化液	100mL	-20℃，3 个月
200mL	类器官专用基础培养基	500mL	2～8℃，18 个月
20mL	类器官冻存液	100mL	2～8℃，36 个月
20mL	类器官传代消化液	100 mL	2～8℃，18 个月
20mL	红细胞裂解液	100 mL	2～8℃，24 个月
20mL	类器官组织保存液	100 mL	-20℃，18 个月
20mL	类器官抗粘附液	100 mL	2～8℃，18 个月

表 1. 其他自备材料和试剂

产品货号	产品名称	品牌
IMV-A017	标准型基质胶	-
IMC-014-Y	iPS Y27632	-
	胎牛血清	-
-	70 μm 细胞滤网	-

胃癌类器官完全培养基使用说明

1. 收到胃癌类器官完全培养基后，将培养基置于四度冰箱进行解冻；

2. 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀，在无菌的生物安全柜或超净工作台中将培养基进行分装，推荐分装成 10 ml 规格；

3.将分装后的培养基储存于-20℃，使用时拿出分装后的培养基解冻后即可使用。

注意：

- **分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期一年，注意避免反复冻融；**
- **解冻后类器官完全培养基可在 4℃ 储存，建议在两周内使用；**
- **类器官培养基中内含有抗生素。**

肿瘤组织消化液使用说明

1. 收到肿瘤组织消化液后，置于四度冰箱进行解冻；

2. 将解冻后培养基上下颠倒充分混匀，在无菌的生物安全柜或超净工作台中将培养基进行分装，推荐分装成 10 ml 规格；

3.将分装后的培养基储存于-20℃，使用时拿出分装后的消化液解冻后即可使用。

注意：配制后的肿瘤组织消化液可在 2-8℃ 储存，建议 24 h 内使用，或-20℃ 储存 3 个月。

类器官专用基础培养基使用说明

1. 可用于类器官原代建立时组织的清洗和消化后组织的重悬（建议加入 1%双抗）；
2. 可用于类器官复苏时的清洗，以去除残余冻存液；
3. 用于类器官传代、冻存时类器官的清洗；
4. 可以自行添加生长因子等成分配置成类器官完全培养基。

注意：

- **类器官专用基础培养基可在 4℃冰箱中稳定保存，建议分装后使用；**
- **本产品不含任何抗生素，如果需要请额外添加。**

胃癌类器官的建立与传代培养

胃癌类器官的建立

注意：涉及人体生物样本的研究必须遵循所有相关的机构和政府法规。在收集人体生物样本之前，必须获得样本提供者的知情同意。

1．将收集到的胃癌肿瘤组织浸泡于装有 2-8℃类器官组织保存液的样本保存管中，样本转移运输过程中需全程保持 2-8℃，尽量缩短运输时间。

2．转移肿瘤组织至细胞培养皿中，使用无菌手术剪刀或手术刀和镊子尽可能多地去除脂肪、肌肉或坏死组织等。

3．用 2-8℃组织清洗液清洗组织 3 次，洗去组织表面残渣。

4．在细胞培养皿或 1.5 mL EP 管中，使用无菌手术剪刀或手术刀将组织切碎成 1mm^3 的小块。

5.转移组织碎片至 15 mL 离心管中，加入 10 mL 组织消化液，37℃恒温振荡消化 20-60 min，每 10 min 镜检观察，当出现大量细胞团块时，即可加入 5% FBS 终止消化。

6．使用 70 μm 细胞筛网过滤细胞悬液，收集过滤后的细胞悬液于 15 mL 离心管中。

7．300g，4℃，离心 5 min，弃上清。

8．若细胞沉淀存在较大量红细胞，加入 2 mL 红细胞裂解液重悬细胞，室温孵育 1-2 min，300g，4℃，离心 5 min，弃上清。若细胞沉淀无红细胞，可进入下一步。

9．重悬细胞沉淀于类器官基础培养基中，300g，4℃，离心 5 min，弃上清，清洗两次。

10．用胃癌类器官完全培养基和基质胶重悬细胞沉淀，混匀后分别取 30-50 μL 悬液接种于 24 孔板中，37℃、5% CO_2 培养箱中固胶 15-30 min。

注意：为防止基质胶凝固，全程在冰上操作，并尽快完成此过程。

基质胶浓度比例应>70%，过渡稀释不利于基质胶液滴的形成。

11．确认基质胶凝固后，沿孔壁小心加入 500 μL/孔胃癌类器官完全培养基。在原代培养前四天可额外在培养基中添加 Y27632（IMC-014-Y）提高类器官存活率，终浓度为 10 uM。

注意：不要直接将培养基滴加到基质胶液滴上，以免破坏基质胶液滴形状。

12．将培养板置于 37°C 和 5% CO_2 的恒温培养箱中，每隔 3-4 天更换一次培养基。

13．密切监测类器官的生长状态，理想情况下，患者来源的胃癌类器官应在 7-10 天左右即可进行首次传代。

类器官的传代培养

1. 去胶：用经过类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，多次吹打使得类器官与基质胶分离。

注意：移取类器官前枪头都应用类器官抗粘附液（IMV-A003）润洗，以减少类器官损失。后续不再特意注明。

2. 消化：300 g 离心 3 min，弃上清，加入 5～10 倍体积的类器官传代消化液（IMV-A001）并充分混匀，37℃条件下消化孵育 3～5 min 至类器官分散。消化结束后加入适量类器官专用基础培养基（IMV-A010）中止消化。300 g 离心 3 min。

4. 清洗： 弃上清，加入 1 mL 类器官专用基础培养基（IMV-A010）重悬。300 g 离心 3 min。

5. 铺胶： 用适量类器官专用基础培养基（IMV-A010）重悬细胞沉淀（推荐加入 10 倍沉淀体积），置于冰上预冷，加入适量基质胶（IMV-A017）混匀配置成 70%胶浓度的细胞-培养基-基质胶混合液，点入 24 孔板底部正中央，每孔 30-50 μL，避免悬液接触孔板侧壁。

注意：此步骤速度要尽可能快，避免基质胶温度升高而凝固；吹打时注意不要产生气泡。

6.凝胶：将接种完成后的培养板至于 37℃二氧化碳恒温培养箱中，孵育 15-30 min 左右待基质胶凝固。

7.加入培养基：待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入已配制好的胃癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL，避免破坏已凝固结构。

8. 将 24 孔板置于 37℃二氧化碳培养箱中培养，每 3~4 天更换培养基，直到类器官需要进一步的实验。

类器官的冻存

1. 将消化完成后的细胞悬液，200 g 离心 5 min，弃去上清。

2. 用类器官专用基础培养基（IMV-A010）清洗两次后，加入类器官冻存液（IMV-A002），轻轻吹打混匀后迅速转移至细胞冻存管中（冻存管内细胞悬液体积应大于 0.5 mL）。

注意： 每 1 mL 冻存液推荐冻存 1×10^6 个细胞或对应细胞量的类器官。

3. 将冻存管放入细胞冻存程序降温盒内（降温盒须提前平衡至室温），随后立即将降温盒放入-80℃超低温冰箱中；也可将冻存管进行人工梯度降温处理，如 4℃ 静置 10 min，-20℃保存 1 小时，-80℃保存过夜。

4. 次日或 12 小时后将冻存管于-80℃超低温冰箱转移至液氮中长期保存。

类器官的复苏

1. 提前在 37℃条件下预热类器官专用基础培养基（IMV-A010）。

2. 在 37℃的水浴中快速解冻细胞冻存管，当冻存管内冻存物仅剩些许冰渣残留时立即停止水浴并及时转移至洁净操作台。
3. 将细胞悬液转移至离心管中，缓缓加入 5-10 倍体积的类器官专用基础培养基，轻轻混匀。
4. 200 g，离心 3-5 min，弃上清，再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀。
5. 再次加入类器官专用基础培养基重悬细胞沉淀，重复步骤 4。
6. 弃上清后所获细胞沉淀可用于后续类器官培养。

注意事项

1. 本产品仅适用于科研用途，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本产品实验操作均为无菌操作，所有消耗品均应灭菌后一次性使用。
3. 使用完本产品后需密封避光保存，以避免试剂污染或失效。