

Human Kidney Cancer Organoid Medium Kit

人肾癌类器官培养基套装

Kit Art.No: MA-0807T016L / MA-0807T016S



- ◇ 分装后的类器官培养基需储存于-20℃，有效期1年，注意避免反复冻融；
- ◇ 配置后的人肾癌类器官完全培养基可在2~8℃存储，建议在两周内使用；
- ◇ 类器官培养基中内含有细菌及真菌抗生素。

1、产品描述

模基生物人肾癌类器官培养基套装（Human Kidney Cancer Organoid Medium Kit）是一种化学定义的细胞培养基，用于建立和维持人肾癌类器官。病人来源的肿瘤类器官概括了原始肿瘤的基因组和病理特征，因此在医学研究和精确医学中具有巨大的前景。

2、产品信息

产品名称	产品货号	试剂盒组分	规格	试剂盒组分货号	存储/运输	保质期
人肾癌类器官培养基套装	MA-0807T016L	人肾癌类器官基础培养基	500mL	MG2178-KC-A500	4℃	12 个月
		人肾癌类器官培养因子 B(50x)	10mL	MG2178-KC-B500	-20℃	
		人肾癌类器官培养因子 C(250x)	2mL	MG2178-KC-C500		
		人肾癌类器官培养因子 D(250x)	2mL	MG2178-KC-D500		
	MA-0807T016S	人肾癌类器官基础培养基	100mL	MG2178-KC-A100		
		人肾癌类器官培养因子 B(50x)	2mL	MG2178-KC-B100	-20℃	
		人肾癌类器官培养因子 C(250x)	0.4mL	MG2178-KC-C100		
		人肾癌类器官培养因子 D(250x)	0.4mL	MG2178-KC-D100		

3、其他自备材料和试剂

产品名称	产品货号
模基生物金牌基质胶	082701/082703/082755
上皮类器官基础培养基	MB-0818L07
类器官培养防粘附润洗液	MB-0818L03L / MB-0818L03S
肿瘤组织消化液	MB-0818L05L
模基生物基质胶分装预冷盒	AB-YL1005
红细胞裂解液	MB-0818L08L / MB-0818L08S
活组织细胞保存液	MB-0818L04L
类器官消化液	MB-0818L01L
Fetal Bovine Serum (FBS)	-
DPBS (1X), 液体, 不含钙和镁	-
细胞过滤器 100μm	-
细胞培养板 96/48/24/12/6 孔	-
离心管 1.5/5/15/50mL	-
细胞培养皿 6/10cm	-

4、人肾癌类器官完全培养基的制备

- 1、收到类器官培养基后，将培养基置于 4℃ 冰箱进行解冻；
- 2、待培养基完全解冻后上下颠倒充分混匀，在生物安全柜或洁净工作台中根据日常需求量进行分装，推荐分装成 10mL/管；
- 3、分装后的培养基请密封后储存于 -20℃，使用时取出分装的培养基放置室温平衡后即可使用。

5、患者来源的肾癌类器官的建立和传代培养

注意：涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关的机构和政府法规。在收集主要人体组织材料之前，必须获得所有受试者的知情同意。

a) 原代人肾癌类器官的建立

- 1、原代组织样本应在离体 5min 内放入装有预冷的活组织保存液（2~8℃）的样本管中，样本需要被活组织保存液完全覆盖（如果样品已经放在其他缓冲液或培养基中，请用预冷的活组织保存液替换整个溶液）。低温（2~8℃）运输转移至实验室。
- 2、实验前先将基质胶放置 4℃ 冰上解冻，同时取出培养基放置室温平衡。与细胞接触的离心管、试管或者塑料吸头需要用类器官培养防粘附润洗液润洗后使用。

3、在洁净工作台中，将样本转移至培养皿中，评估获得的组织是否完全由上皮组成。如果存在脂肪或肌肉组织，请在体式显微镜下使用手术剪刀或手术刀和镊子尽可能多地去除这些非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，请立即继续下一步。

4、用上皮类器官基础培养基或含双抗的 DPBS 冲洗组织两次。

5、使用镊子将组织转移至 1.5mL 离心管中，在冰上用无菌的组织剪将组织剪碎为 0.5~2mm²大小。

6、将剪碎的组织用 50 倍组织体积的肿瘤组织消化液重悬，并转移至 15mL 离心管内，吹打重悬组织块。于 37°C，100rpm 条件下的恒温摇床中，水平振荡消化 15~30 分钟，每隔 10 分钟观察组织消化情况，待组织块明显分散，悬液较浑浊时，取适量组织消化悬液镜检，待悬液中有较多肿瘤细胞团即可终止消化，若组织碎块较大或消化不完全可适当延长消化时间。消化期间可以使用不同规格（顺序从大到小如 10mL、5mL、1mL）的移液管吹打组织消化悬液，帮助充分消化。当大多数组织片段能够通过 1mL 移液器吸头时，消化过程即完成。

7、将 FBS 加入组织消化混合物中，最终浓度为 2%，并使用 100 μ m 细胞过滤器过滤。

8、收集滤液并在 4°C 下以 250g 离心 3 分钟。在可见的红色沉淀的情况下，吸弃上清液，加入 2mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 1 分钟，并在 4°C 下以 250g 离心 3 分钟。

9、吸弃上清液并将沉淀重悬于上皮类器官基础培养基中，在 4°C 下以 250g 离心 3 分钟，再次重复此步骤以完全去除消化液和 FBS，在离心前可取适量的悬液进行细胞活性检测。

10、吸弃上清液，根据培养需求取适量细胞沉淀加入基质胶 (>70%) 并在冰上混匀（注意：混匀吹打的动作要轻柔，切忌产生大量气泡，常温混匀则需要控制在 15 秒内），混匀后置于冰上。注：基质胶应保存在冰上以防止其凝固。尽快进行该过程。大约 10,000 个细胞应接种在 25 μ L 基质胶中。不要过度稀释基质胶（基质胶比例应 >70%（基质胶体积/总体积）），因为这可能会抑制固体液滴的正确形成。

11、将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，使用枪头稍微摊平悬液，注意避免悬液接触孔板侧壁。（推荐：96 孔板接种 3~10 μ L/孔，48 孔板接种 10~20 μ L/孔，24 孔板接种 20~30 μ L/孔）。

12、注意：一旦类器官重悬于基质胶中，尽快进行种板，因为基质胶可能会在试管或移液器吸头中凝固。

13、将培养板放入 37°C 和 5%CO₂ 的培养箱中 15~25 分钟，让基质胶凝固。

14、待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构。（推荐：96 孔板加入 100 μ L/孔，48 孔板加入 250 μ L/孔，24 孔板加入 500 μ L/孔）。

注：不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部，因为这可能会破坏已凝固结构。

15、将培养板置于 37°C 和 5%CO₂ 的恒温培养箱中。

16、每隔 2~3 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。

17、密切监测类器官生长状态，理想情况下，肾癌类器官应在 7~14 天内建成。

b) 人肾癌类器官的传代培养

1、待类器官培养到直径为 100~500 μ m 大小时 (或变黑不再增大时), 即可进行类器官的传代 (每代约 1~2 周)。以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用。

2、吸弃旧培养基, 加入等体积上皮类器官基础培养基, 用细胞刮刀或者移液管吸头尖端轻轻刮下 (或吹打) 基质胶和类器官混合物, 转移至 1.5mL 离心管中 (每管最多收集 2~3 孔类器官, 避免体积过大消化效率低), 吹打 5~10 次, 使类器官和基质胶分离, 300g 离心 3 分钟。

3、去除上清液加入 5 倍于基质胶和类器官混合物体积的类器官消化液, 吹打混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 5~10 分钟。取出吹打混匀, 取 10 μ L 混合液镜检是否消化成小的细胞团块, 消化不充分可适当延长消化时间。若要求细胞计数则需消化成单个细胞, 可延长消化时间至 10~20 分钟后终止消化后台盼蓝染色进行细胞计数。密切监视消化过程使在类器官解离液中的孵育时间最短。

4、消化完成后, 加入 5 倍体积上皮类器官基础培养基吹打混匀以终止消化反应, 然后 250g 离心 3 分钟。

5、吸弃上清液, 用上皮类器官基础培养基清洗 2 次以去除残留的消化液。最后一次清洗可将类器官合并收集在同一个离心管中。

6、清洗完成后将离心沉淀中的细胞进行传代培养, 在细胞沉淀中加入基质胶 (>70%) 并在冰上混匀 (注意, 混匀吹打的动作要轻柔, 切忌产生大量气泡, 常温混匀则需要控制在 15 秒内), 混匀后置于冰上。

注意: 基质胶稀释比例应在 70% 以上以保证培养过程中基质胶的结构稳定性。

7、将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央, 使用枪头稍微摊平悬液, 注意避免悬液接触孔板侧壁。(推荐: 96 孔板接种 3~10 μ L/孔, 48 孔板接种 10~20 μ L/孔, 24 孔板接种 20~30 μ L/孔)。注意: 为防止基质胶室温凝固, 此步骤应尽快完成。

8、将培养板放入 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的培养箱中 15~25 分钟, 让基质胶凝固。

9、待基质胶完全凝固后, 沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基, 避免破坏已凝固结构。(推荐: 96 孔板加入 100 μ L/孔, 48 孔板加入 250 μ L/孔, 24 孔板加入 500 μ L/孔)。注: 不要将培养基直接添加到基质胶液滴的顶部, 因为这可能会破坏已凝固结构。

10、将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的恒温培养箱中。

11、每隔 2~3 天更换一次培养基, 小心地从孔中吸出培养基, 并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。

12、密切监测类器官生长状态, 直到类器官需要进行下一步实验。