MasterAim®ALI-肺癌类器官培养试剂盒

MasterAim® ALI-Lung Cancer Organoid Kit

从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的整体解决方案

艾名医学 AIMINGMED
杭州艾名医学科技有限公司
官网：www.aimingmed.com
地址：浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园10幢南座1层
电话：0571 - 85352695
邮箱：info@aimingmed.com

产品介绍

MasterAim®ALI-肺癌类器官培养体系，支持气液交互法（Air–Liquid Interface, ALI）构建具有肿瘤微环境结构的肺癌类器官。该体系模拟了患者体内肿瘤免疫微环境，构建的肿瘤类器官含有天然同源、自体肿瘤反应性肿瘤浸润淋巴细胞，从而可保留肿瘤组织中固有的纤维基质和免疫组分、原始肿瘤T细胞受体谱等，为表征肿瘤免疫微环境、免疫检查点阻断、个体化治疗等研究提供理想体外模型。MasterAim®ALI-肺癌类器官培养基适用于肺癌患者来源类器官的构建、维持培养及传代扩增。本试剂盒包括从组织运输到类器官构建、扩增的全套试剂，优化了实验步骤，提高气液交互法模型构建类器官的效率。

产品信息

MasterAim®ALI-肺癌类器官培养试剂盒包括：ALI-肺癌类器官基础培养基及肺癌类器官添加物、ALI-包被液、组织重悬液、消化液Ⅰplus。除完全培养基（基础培养基&添加物）和基础培养基外，其他组分不单独售卖 。

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
MasterAim®ALI-肺癌类器官培养试剂盒*	10-100-363	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®ALI-肺癌类器官基础培养基	100-364	47.5mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物 1	100-365	2.5mL	-20°C，12个月
MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物 2	100-366	600µL	-20°C，3个月
MasterAim®ALI-包被液A	100-367	1.5mL	4°C，6个月
MasterAim®ALI-包被液B	100-368	500µL	4°C，12个月
MasterAim®ALI-包被液C	100-369	500µL	4°C，12个月
MasterAim®ALI-组织重悬液	100-370	1.5mL	4°C，6个月
MasterAim®消化液Ⅰplus	100-362	10 mL	4°C，12个月
MasterAim®组织运输保存液	100-049	20 mL	4°C，12个月；4°C，2周

需要使用但本试剂盒中不包含的试剂

产品名称	产品号	规格	储存温度&质保期
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
TrypLE	/	/	/
MasterAim®组织消化液Ⅰ	100-047		

MasterAim®组织消化液II	100-048		
MasterAim®抗粘附液	100-291		
红细胞裂解液	/	/	/

患者肺癌组织运输

将新鲜组织标本置于标本储存管中（注：组织块太大将影响组织运输保存液中营养物质的交换，影响标本活性，需将组织标本修剪至体积约为0.5 cm^3），加入足量**MasterAim®组织运输保存液（#100-049）**浸没组织，于2 - 8°C运输，于48小时内运输至实验室进行处理。

MasterAim®ALI-肺癌类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前将**MasterAim®ALI-肺癌类器官基础培养基（#100-364）**、**MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物 1（#100-365）**及**MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物 2（#100-366）**从-20℃取出，冰上放至融化。

2. 完全培养基配制：将MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物1 和MasterAim®ALI-肺癌类器官添加物2 全部转移至MasterAim®ALI-肺癌类器官基础培养基中，混合均匀，即为**MasterAim®ALI-肺癌类器官完全培养基**。

注：（1）类器官完全培养基中不含有抗生素成分，请根据实验需求自行添加。

（2）建议进行适当分装，-20℃储存，开封后，4℃保存使用，并于2周内用完，避免反复冻融。

3. 包被液制备：

体积估算：以24孔板为例，每孔需50 µL包被液，由于**MasterAim®ALI-包被液组分A（#100-367）**较为粘稠，可能会导致部分体积损失，建议配置体积上浮20%（该试剂盒已包含可能损失量）。

配置：将ALI-包被液A（#100-367）、ALI-包被液B（#100-368）、ALI-包被液C（#100-369）按照体积比8：1：1 混合，配置时可将ALI-包被液A和ALI-包被液B先混匀，再加入ALI-包被液C，避免气泡产生；现配现用，全程置于冰上，配置完成后冰上保存。

ALI-肺癌类器官的构建及培养

1. 包被Transwell：取出24孔板，向Transwell上室中每孔内加入50 µL包被液，轻轻晃动24孔板至包被液完全覆盖Transwell上室底部， 37℃ 30 min，待胶体凝固即可。

注：包被完的培养板放在37℃可保存1天。

2. 组织处理：

以下步骤所有接触细胞的试管及枪头均需使用MasterAim®抗粘附液（#100-291）进行润洗，以减少样本损失。

2.1 组织清洗：根据标本的大小，将标本放入15/50 mL离心管中，使用DPBS-PS进行清洗，每次使用5/15 mL，反复涮洗至清洗液澄清，约3 - 5次。

2.2 消化前样本准备：吸除大部分的DPBS-PS，将标本转移至EP管中，加入少量DPBS-PS或**MasterAim®组织消化液 I （#100-047）**（约200 µL），用剪刀将标本均匀剪切至0.5 - 1 mm^3的大小。

2.3 消化阶段 I：使用**MasterAim®抗粘附液（#100-291）**预先润洗的巴氏吸管将切碎的组织从EP管转移至15 mL的离心管中，加入4 mL

MasterAim®组织消化液Ⅰ（#100-047），37℃摇床消化，每隔15 min进行观察，当有细胞大量漏出，且组织块中大部分细胞已经被消化出来时，即可终止消化阶段Ⅰ。

注：2.2步骤组织剪切完后，可在镜下观察是否有细胞团漏出，如有大片的细胞漏出，则说明该标本比较容易消化，可能需要缩短消化时间；如果标本的纤维化程度高，该标本的收获率可能会较低，可适当延长消化时间。肺癌的样本消化时长不超过1 h。

2.4 终止消化阶段Ⅰ：消化液l消化结束后，加入8 mL DPBS-PS 终止消化，300 g，离心5 min，弃上清。

2.5 消化阶段Ⅱ：加入2 mL MasterAim®组织消化液Ⅱ（#100-048），37℃，摇床消化10 - 15 min。镜下观察细胞团是否被消化成小的细胞团，一般当在视野中出现的细胞团多数为5 - 20个细胞的细胞团时，既可终止消化阶段Ⅱ。

2.6 终止消化阶段Ⅱ：加入8 mL DPBS-PS终止消化，300 g，离心5 min，弃上清。

2.7 收集细胞：加入2 mL DPBS-PS对细胞进行重悬，使用2 mL 抗粘附液预先润洗一个100 μm的细胞筛网，将细胞悬液使用该筛网过滤，将滤出的滤液收集到一个新的50 mL离心管中（预先使用抗粘附液湿润）进行离心，300 g，5 min，弃上清。

注：穿刺样本此步骤可选择不过滤。

2.8 红细胞裂解：（可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈现红色），加入1 - 2 mL红细胞裂解液进行裂红（红细胞裂解液量可根据沉淀体积进行调整），使用1 mL的枪头上下吹打几次，室温孵育6 min，加入6 mL DPBS-PS重悬细胞，离心，300 g，5 min，弃上清，使用1 mL DPBS-PS重悬。

注：裂红时间不宜超过8 min，如红细胞数量较多，建议提高红细胞裂解液使用体积。

2.9 细胞计数：通过自动细胞计数仪或者手动计数板计出细胞的个数。计数后，300 g， 离心5 min，弃上清，收集细胞沉淀。

3. ALI-肺癌类器官的构建：

3.1 重悬细胞沉淀：将上一阶段获取的细胞沉淀根据计数结果重悬于MasterAim®ALI-组织重悬液（#100-370）中，为保证类器官的生长，每50 μL大约需要400-1000个细胞团（约10 - 20 W细胞），接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整。

3.2 接种：取出包被好的培养板，向每个Transwell上室中加入50 μL组织悬液，轻轻晃动24孔板至组织悬液完全覆盖Transwell上室底部， 37℃ 30 min ； 待组织悬液凝固后将Transwell小室取出，向Transwell下室中加入400 μL 37℃ **MasterAim®ALI-肺癌类器官完全培养基。**将Transwell小室稍倾斜，一侧先接触液面，再轻轻将小室放入孔中，使完全培养基淹没Transwell上室下层无细胞凝胶层（请勿淹没Transwell上室组织悬液层）。

4. 培养：在37℃和5% CO_2下培养，观察培养基颜色，颜色发黄时可进行换液，一般建议每3天可进行半换液、每7天进行全换液。

ALI-肺癌类器官的传代

1. 计数：根据类器官密度进行传代，一般建议接种比例为1：2/1：3，即1个孔中的细胞传至2-3孔中，计算出需要接种孔数(也可消化完计数，建议2 -3 W 细胞接种一孔)。

2. 包被Transwell：取出24孔板，每孔内加入50 μL包被液，轻轻晃动24孔板至包被液完全覆盖Transwell上室底部，置入Transwell上室中，37℃ 30 min，待胶体凝固即可。

3. 消化：将细胞培养板从培养箱中取出，提前润湿枪头，向培养类器官的每孔内加入1 mL TrypLE，将transwell取出，剥离或切割聚酯膜。将含有类器官的凝胶从transwell小室的膜上撕下分离后，转移至提前加入消化液的孔板中，吹打数次后，置于37℃ 5 min。取出后，300 g，5 min离心后，弃上清，若在沉淀中明显看见胶，建议先用预冷的6 mL的DPBS清洗一次，离心后，若仍见较明显胶体存在，可加入6 mL的

MasterAim®消化液Ⅰplus（#100-362），置于37℃ 5min后， 300 g，离心5min，弃上清。

4. 类器官收集：每孔加入1 mL MasterAim®ALI-肺癌类器官完全培养基重悬类器官，300 g，离心5 min，4℃，弃上清。根据传代比例使用对应体积的MasterAim®ALI-组织重悬液重悬类器官沉淀。

5. 接种：取出包被好的培养板，向每个Transwell上室中加入50 μL的类器官悬液，轻轻晃动24孔板至重悬液完全覆盖Transwell上室底部，37℃ 30 min，待类器官悬液凝固后将Transwell小室取出，向Transwell下室中加入400 μL 37℃ MasterAim®ALI-肺癌类器官完全培养基，将Transwell小室稍稍倾斜，一侧先接触液面,再轻轻将小室放入孔中，使完全培养基淹没Transwell上室下层无细胞凝胶层（请勿淹没Transwell上室上层细胞悬液层）。

6. 培养：在37℃和5% CO_2下培养，观察培养基颜色，颜色发黄时可进行换液，一般建议每3天可进行半换液、每7天进行全换液。

注意：ALI-肺癌类器官不建议进行冻存，冻存后会损失大部分的免疫细胞。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

2. 本试剂盒仅适用于经细胞学或组织病理学确认的肺癌类器官培养。

3. 本试剂盒培养结果会受到样本质量、培养条件等因素影响，同时也受到技术员操作习惯、操作环境以及当前细胞生物学技术局限性等限制，因此会存在培养失败的情况。