MasterAim®食管癌类器官培养试剂盒

MasterAim® Esophageal 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®食管癌类器官培养试剂盒适用于患者来源食管癌类器官的构建、维持培养及传代扩增，可支持多种亚型及多种分期的食管癌类器官。本试剂盒包括从组织运输到类器官构建、扩增及冻存的全套试剂，优化了实验步骤，提高类器官构建效率。

产品信息

MasterAim®食管癌类器官培养试剂盒包括：食管癌类器官基础培养基及添加物、组织运输保存液、类器官冻存液、组织消化液和Primary Enhancer。除食管癌类器官完全培养基（食管癌类器官基础培养基和添加物）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®食管癌类器官培养试剂盒	10-100-069	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®食管癌类器官基础培养基	100-070	47.5 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®食管癌类器官培养基添加物	100-071	2.5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®组织运输保存液	100-049	20 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®类器官冻存液	100-006	10 mL	4°C，12个月
MasterAim®组织消化液 I	100-050	20 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim®组织消化液II Plus	100-484	10 mL	-20°C，12个月；4°C，2周
MasterAim® Primary Enhancer	100-008	0.5 mL	-20°C，12个月

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
MasterAim®抗粘附液	100-291	100 mL	4°C，12个月
Pen-Strep Amphotericin Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
Pen-Strep Solution	/	参考供应商说明书	参考供应商说明书
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
0.25%胰酶	/	/	/
红细胞裂解液	100-547	100 mL	4°C，24个月
Martrigel，GFR	Corning,356231	10 mL	-20°C，24个月

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，48小时内运输至实验室进行处理。

MasterAim®食管癌类器官完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将 **MasterAim®食管癌类器官基础培养基（#100-070）**和 **MasterAim®食管癌类器官培养基添加物（#100-071）**从-20°C取出，4°C放至融化。

2. 完全培养基配制：将食管癌类器官培养基添加物全部转移到基础培养基中，混合均匀，即为食管癌类器官完全培养基。

3. 原代标本培养：取10 mL配置好的完全培养基，加入100 µL **MasterAim®Primary Enhancer（#100-008）**，即可使用。

4. 维持培养：对于非原代标本的培养，使用MasterAim®食管癌类器官完全培养基即可。

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，推荐使用Pen-Strep Amphotericin Solution，工作浓度为1%。

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

（3）所有移液管、枪头等类器官培养耗材均需进行润洗，以免在传代过程中出现样本的流失，推荐使用**MasterAim®抗粘附液（#100-291）**效果更佳。

患者来源的食管癌类器官构建

1. 样本处理：将组织标本转移到10 cm培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入10 mL **DPBS-PS**，清除多余组织，仅保留病灶。

注：DPBS-PS为添加1% Pen-Strep Solution的**DPBS(#100-184)**。

2. 样本清洗：将标本使用DPBS-PS进行清洗，反复涮洗10次以上，涮洗至清洗液澄清，去除清洗液。

3. 消化前样本准备：清洗完成后加入**MasterAim®组织消化液Ⅰ（#100-050）**约200 µL。将标本剪切至0.5 - 1 mm^3的大小，将切碎的组织转移至15 mL的离心管（用抗粘附液预先润洗）中。

4. 消化阶段Ⅰ：加入4 mL MasterAim®组织消化液Ⅰ，37°C水浴锅震荡消化60 - 80 min，每隔15 min观察是否有大量的细胞漏出，该步骤的消化时间可能会根据标本的情况进行调整。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。

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

6. 消化阶段Ⅱ：加入2 mL **MasterAim®组织消化液Ⅱ Plus（#100-484）**，37°C水浴锅震荡消化10 - 20 min。镜下观察到大部分细胞呈单细胞既可终止消化阶段Ⅱ。

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

8. 收集细胞：加入10 mL DPBS-PS对细胞进行重悬，使用2 mL **MasterAim®抗粘附液（#100-291）**预先润洗一个100 µm的细胞筛网，将细胞悬液使用该细胞筛网过滤，将滤液进行离心，300g，5 min，弃上清。

9.（可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色），加入红细胞裂解液进行裂红（具体方法参考产品说明书）后，300g，离心5 min，弃上清。

10. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）重悬，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后300g，离心5 min，去上清，收集组织沉淀。

11. 接种：按照4000 - 6000 cells/µL的密度接种（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。首先根据计数结果，使用完全培养基将获取

的细胞沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶，充分混合，将重悬后的细胞悬液接种至37℃预热的细胞培养板中。注意枪尖不要接种至培养板的底部，胶滴应接种于培养孔的中心位置，若是24孔板，则每孔可接种50 µL。将接种好的培养板放置在37℃培养箱中静置5 min后，倒置培养板静置25 min。

12. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入600 µL于37℃预热的MasterAim® 肿瘤类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

13. 培养：盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（一般建议每3 - 4天进行全换液或半换液）。一般在接种3 - 4天后，可观测到类器官形成。

患者来源的食管癌类器官传代

1. 传代标准：在传代前，确保大部分类器官的直径大于100 µm。传代窗口期一般为7 - 10天，传代比例一般为1:2或1:3。

2. 消化：将培养类器官的24孔板取出，用移液器去除培养基，每孔加入0.5 mL **0.25%胰酶**，使用1 mL枪头将胶滴吹散（可根据类器官量适量增加**0.25%胰酶**的体积）。37℃培养箱消化5 - 10 min（避免消化过度，影响类器官生长），显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化成单细胞时，即可加入2倍体积含有1% FBS的DPBS-PS终止消化。

3. 收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润洗离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）重悬，通过自动细胞计数板或手动计数板计出细胞个数。计数后，300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 接种：以24孔板为例，参考接种密度400 cells/µL（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。首先根据计数结果，使用完全培养基将获取的类器官沉淀重悬，再加入细胞悬液2倍体积的基质胶，充分混合。吸取50 µL细胞悬液，并加入到37℃预热的24孔板（提前预热半小时）的中心部位（不要将类器官接种到最外侧的孔中）。将接种好的培养板放置在37℃培养箱中静置5 min后，倒置培养板静置25 min，以待基质胶倒置凝固。

6. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入600 µL于37℃预热的MasterAim® 肿瘤类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。未接种液滴的培养孔均加入1 mL的DPBS。

7. 培养：盖上培养板板盖，并在37℃和5%CO_2下进行培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（一般建议每3 - 4天进行全换液或半换液）。一般在接种3 - 4天后，可观测到类器官形成。

患者来源的食管癌类器官冻存

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分类器官的直径大于100 µm，数量不低于300个时，即可进行冻存。

2. 消化：小心吸走培养孔中的培养基，每孔加入0.5 mL **0.25%胰酶**，吹散胶滴，37℃培养箱消化5 - 10 min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化成单细胞时，即可加入2倍消化液体积的DPBS-PS终止消化。

3. 收集类器官：将消化后的类器官悬液转入离心管中（可用抗粘附液预先润洗离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心5 min，弃上清。

4. 计数：使用1 mL DPBS-PS（额外添加1%FBS）重悬，通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞个数。计数后，300g，离心5 min，去上清，收集类器官。

5. 冻存：根据类器官计数结果，加入适量**MasterAim®类器官冻存液（#100-006）**重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，推荐每管冻存300个类器官（细胞量约为$3*10^5$个），冻存数量过少可能会影响类器官的复苏，每管1 mL，若细胞量较多时应注意分管冻存；将冻存管置于程序降温盒中，-80℃过夜保存（或进行梯度降温，4℃放置20 min，-20℃放置2 h，-80℃放置过夜），最后转移至液氮罐。

【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实体瘤组织标本或胸腹水的食管癌类器官培养。

3. 本试剂盒培养结果会受到标本质量、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，因此可能会存在培养失败的情况。