MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养试剂盒

MasterAim® Colorectal Cancer Organoids and Immune Cell Co-culture 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®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养试剂盒，支持肿瘤类器官与不同免疫细胞（未编辑过的免疫细胞，如TIL细胞，NK细胞，CIK细胞等，不适用于经过基因工程改造的如CAR-T细胞，CAR-M细胞等）进行共培养，用于评估细胞免疫疗法的抗肿瘤活性，助力细胞治疗药物开发。由于免疫治疗的阳性反应通常依赖于肿瘤细胞与肿瘤微环境内免疫调节的相互作用，临床上迫切需要个体化验证疗效的体外模型，但是鉴于肿瘤微环境的复杂性，免疫治疗药物体外实验一直无法与临床疗效相匹配。类器官与免疫细胞共培养技术则为这一需求提供了技术出口，为癌症研究提供一大助力。但免疫细胞与结直肠癌类器官培养条件存在一定差异，而MasterAim®类器官与免疫细胞共培养试剂盒经测试，可在实验窗口内维持两者的活性，提供更可靠的检测数据。

产品信息

MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养试剂盒包括：结直肠癌类器官与免疫细胞共培养基础培养基及结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物。除结直肠癌类器官与免疫细胞共培养完全培养基（结直肠癌类器官与免疫细胞共培养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®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养试剂盒	10-100-504	1 盒	-20°C，12个月
MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养培养基	100-505	47.5 mL	-20°C，12个月；4°C，3个月
MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物 1	100-506	2.5 mL	-20°C，12个月
MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物 2	100-507	600 µL	-20°C，6个月；-80°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®结直肠癌类器官完全培养基	10-100-018	100 mL	-20°C，12个月
DPBS平衡盐溶液（无钙镁，无酚红）	100-184	500 mL	AMB，24个月
MasterAim®抗粘附液	100-291	100 mL	4°C，12个月
TrypLE	/	/	/
活细胞染料	/	/	/
无血清培养基DMEM	/	/	/
人外周血淋巴细胞分选液	/	/	/

患者来源的结直肠癌类器官的构建

参考MasterAim®结直肠癌类器官完全培养基产品说明书。

MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养完全培养基制备

1. 试剂准备：提前一天将**MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养培养基（#100-505）、MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物 1（#100-506）及MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物 2（#100-507）**从-20℃取出，4℃放至融化。

2. 完全培养基制备：将MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物1全部转移至MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养基础培养基中，混合均匀，即为结直肠癌类器官与免疫细胞共培养混合培养基。使用时添加MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物2（现用现加），即为MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养完全培养基。添加比例为每10 mL MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养混合培养基加入120 µL的MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养添加物2。

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，推荐工作浓度为1%。

（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。

免疫细胞与肿瘤类器官的共培养

以下流程以96孔板培养体系为例，如需扩大培养体系，可对应调整所需细胞数量和培养体积；以下流程使用Incucyte的实时成像进行免疫细胞杀伤活力分析，具体流程可参考Incucyte操作说明，也可根据实验需求选择不同方法进行检测。

1. 结直肠癌类器官的前处理：提前一天将培养好的类器官用预冷的DPBS-PS吹散胶滴，尽量保证类器官完整性，离心后将类器官重悬于1 mL的**MasterAim®结直肠癌类器官完全培养基**中。

2. 重悬类器官：根据实验需求，一般将长势较好的24孔板中3-4个胶滴的结直肠癌类器官重悬于1 mL培养体系中，约800个类器官。

3. 共培养：对重悬类器官及免疫细胞进行染色和计数，加入免疫细胞进行共培养， 并观察、拍照记录：

3.1 类器官计数：提前一天将类器官用1 mL MasterAim®结直肠癌类器官完全培养基悬浮后，第二天取100 µL类器官悬浮液，向其中加入1 mL TrypLE消化成单细胞后计数，根据100 µL体系中类器官单细胞数量反推1 mL体系中类器官的数量。单孔96孔板需要的细胞数量为10^4个，24孔单孔需要的细胞数量为$2x10^5$个，根据不同实验组别计算出所需类器官总量。

注意：由于共培养时类器官需为完整状态，不能将类器官均消化成单细胞，故采用该方法进行计数。

3.2. 免疫细胞CIK的计数：根据实验需求，计算并收集所需CIK细胞数量。CIK与PDO的共培养effector：target为10:1，其余免疫细胞需要根据不同项目要求进行调整。

3.3. 结直肠癌类器官染色：将结直肠癌类器官重悬液转移至1.5 mL EP管中（每管约800 - 5000个类器官），300 g， 离心5 min，弃上清；使用1 mL 37 ℃预热的无血清培养基DMEM重悬类器官沉淀，加入红色活细胞荧光染料2 µL，在37 ℃细胞培养箱中避光孵育30 min，染色结束后，300 g， 离心5 min；使用1 mL DPBS-PS清洗类器官沉淀2 -3 次。使用MasterAim®结直肠癌类器官完全培养基重悬类器官沉淀于低吸附孔板中，于37 ℃细胞培养箱中放置4小时后，使用DPBS-PS清洗类器官沉淀2 - 3次后，300 g， 离心5 min，收集类器官沉淀。

3.4. 免疫细胞CIK染色：将免疫细胞悬液转移至1.5 mL EP管中（每管约5*10^5 - 1*10^6个免疫细胞），300 g， 离心5 min，弃上清；使用1 mL 37 ℃预热的无血清培养基DMEM重悬免疫细胞，加入绿色活细胞荧光染料1 μL，在37 ℃细胞培养箱中避光孵育15 min，染色结束后，300 g，离心5 min；使用1 mL DPBS-PS清洗细胞3 - 5次后，300 g， 离心5 min，收集细胞沉淀。

注意：步骤3.3及步骤3.4为荧光染色步骤，本实验方法使用红色活细胞荧光染料标记结直肠癌类器官，绿色活细胞荧光染料标记CIK细胞，实验室可根据需求选择染色方案及活细胞染料。染色步骤为可选步骤，可根据具体实验需求进行调整。

3.5 类器官和免疫细胞重悬：结直肠癌类器官及免疫细胞CIK标记完成后，按照实验组别加入适量的MasterAim®结直肠癌类器官与免疫细胞共培养完全培养基重悬类器官沉淀。在96孔板（低吸附板）中加入类器官悬液，静置30min以上，待类器官沉入底部后，沿液面交界处缓慢滴入已进行染色重悬的免疫细胞。建议每孔加入类器官重悬液100 μL，免疫细胞悬液10 μL，96孔板每孔的总的体系的不大于150 μL。

3.6 培养：将培养板的盖子盖上，在37℃和5% CO_2下培养。

3.7杀伤活力分析（可选）：根据实验需求，可选择不同时间点进行荧光拍照，该实验利用Incucyte S3进行实时成像，将96孔板放入incucyte进行拍照，模式选择standard，孔板选择96孔板，荧光通道选择明场、绿光，物镜选择4X，采集时间间隔设置为2h，共采集72h。

【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结直肠癌类器官与免疫细胞的共培养。

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，因此会存在共培养失败的情况。