

## 人肺鳞癌类器官完全培养基产品说明书

### 【产品名称】

序号	名称	货号	规格	保存条件
1	肺鳞癌类器官基础培养基	3D303-100	95ml	-20°C, 12 个月; 4°C, 3 个月
2	肺鳞癌类器官培养基添加物		5ml	-20°C, 12 个月

### 【产品介绍】

肿瘤内异质性(同一肿瘤内癌细胞的基因型和功能多样性)是癌症医学的关键挑战之一。由于癌细胞的异质性是治疗耐药发展的重要参数, 准确评估肿瘤内异质性对于预测耐药和开发有效治疗至关重要。BDBIO 人肺鳞癌类器官培养体系模拟了肿瘤细胞体内生长的微环境, 极大程度维持了来源于体内肿瘤组织的特征, 保留了个体之间的肿瘤异质性。

### 【产品用途】

BDBIO 人肺鳞癌类器官完全培养基适用于患者来源肺鳞癌类器官的构建、维持培养及传代扩增, 可支持多种亚型及多种分期的肺鳞癌类器官。

### 【使用方法】

#### 肺鳞癌类器官完全培养基制备

1. 试剂准备: 提前将肺鳞癌类器官基础培养基和肺鳞癌类器官添加物从-20°C取出, 冰上放至融化。
2. 完全培养基配制: 将肺鳞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。
3. 原代标本培养: 取 10 mL 配置好的完全培养基, 加入 100  $\mu$ L Primary Enhancer, 即可使用。
4. 维持培养: 对于非原代标本的培养, 使用肺鳞癌类器官完全培养基即可。

#### 患者来源的肺鳞癌类器官构建:

1. 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  $0.5\text{ cm}^3$ ），加入足量组织运输保存液浸没组织，于  $2-8^{\circ}\text{C}$  运输，尽快运输至实验室进行处理。
2. 样本处理：将组织标本转移到 10cm 培养皿中，培养皿置于冰盒上，加入 10mL DPBS-PS 清除脂肪组织和正常组织，仅保留病灶。
3. 样本清洗：将标本用 DPBS-PS 进行清洗，反复涮洗至清洗液澄清，约 5-10 次，去除清洗液。
4. 消化前样本准备：清洗完成后加入组织消化液 I 约 200 $\mu\text{L}$ 。将标本剪切至  $0.5-1\text{ mm}^3$  的大小，将切碎的组织转移至 15mL 的离心管中。
5. 消化阶段 I：加入 4mL 组织消化液 I， $37^{\circ}\text{C}$  摇床消化 30-40 min，每隔 15min 进行观察是否有大片的细胞漏出，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。
6. 终止消化阶段 I：加入 8mL DPBS-PS 终止消化，300 g，离心 5 min，弃上清。
7. 消化阶段 II：加入 2 mL 组织消化液 II， $37^{\circ}\text{C}$ ，摇床消化 10-15 min。镜下观察到大部分细胞呈细胞团块（ $<200\mu\text{m}$ ）既可终止消化阶段 II（注：不要消化到单细胞状态）。
8. 终止消化阶段 II：加入 8mL DPBS-PS 终止消化，300 g 离心 5 min，弃上清。
9. 收集细胞：加入 10mL DPBS-PS 对细胞进行重悬，使用 2mL 抗粘附液预先湿润一个  $100\mu\text{m}$  的细胞筛网，将细胞悬液使用该细胞筛网过滤，将滤出的滤液进行离心，300g，5 min，弃上清。
- 10.10.（可选步骤）如含较多红细胞（细胞沉淀呈现红色），加入红细胞裂解液进行裂红（具体实验方法参考产品说明书）后，300g，5min，弃上清，使用 1mL DPBS-PS 重悬。
11. 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。
12. 接种：将获取的细胞沉淀，按照  $2-4 \times 10^3$  细胞/ $\mu\text{L}$  的密度重悬于基质胶（BME 或 Matrigel）中（接种密度仅供参考，可按照实验需求进行调整）。将基质胶重悬后的细胞接种至  $37^{\circ}\text{C}$  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 $\mu\text{L}$ 。将接种好的培养板放置在  $37^{\circ}\text{C}$  下静置 5min 后，倒置培养板静置 25min。
13. 补液：使用移液枪沿着孔侧壁向每个孔中轻轻地加入 600 $\mu\text{L}$  于  $37^{\circ}\text{C}$  预热的肿瘤类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将 1mL DPBS-PS 均匀加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。

14.培养：将培养板的盖子盖上，并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。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 2-3 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。

#### 患者来源的肺鳞癌类器官传代：

1. 传代标准：在传代前，确保大部分类器官的大小大于 100μm。
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 TrypLE，使用 1mL 枪头将胶滴吹散（可根据类器官量适量增加 TrypLE 的体积）。室温消化 5-8 min，或 37°C 培养箱消化 5min（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，待大部分类器官消化至 40-60μm 大小时，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湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心 5min，去上清，收集类器官，使用 1mL DPBS-PS 重悬。
4. 计数：通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞的个数。计数后，300g，离心 5 min，去上清，收集类器官。
5. 接种：将获取的类器官沉淀，根据计数结果重悬于基质胶（Matrigel）中，一个胶滴大约需要 200-500 个细胞团（约 2-5 万个细胞）。吸取 50μL 细胞悬液，并加入到提前预热的 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°C 下静置 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 600μL 于 37°C 预热的肿瘤类器官完全培养基，请勿将培养基直接加到胶滴上。将 1mL DPBS-PS 均匀加至其它未接种液滴的孔中，以保持培养时的湿度。
7. 培养：盖上培养板板盖，并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养。每 2-4 天进行一次全换液，观察生长情况，并进行拍照记录，直至下次传代。

注：所有接触类器官的移液管、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，使用抗粘附液效果更佳。

#### 患者来源的肺鳞癌类器官冻存：

1. 冻存标准：观察类器官生长情况，当类器官活性良好，大部分类器官的大小大于 100μm 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 0.5mL TrypLE，吹散胶滴，37°C培养箱，孵育 3min，显微镜下观察类器官消化情况，待类器官消化至 40-60 $\mu$ m 大小时，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湿离心管），保证培养孔中的类器官都被收集起来。300g，离心 5min，弃上清；加入 3mL DPBS-PS 重悬细胞，300 g，离心 5 min，弃上清，使用 1mL DPBS-PS 重悬。
4. 计数：通过自动细胞计数板或者手动计数板计出细胞的个数。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，加入适量类器官冻存液重悬沉淀，混合均匀后分装至标记好的冻存管中，类器官每管冻存细胞量约为  $5 \times 10^5$  个，每管 1mL，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°C过夜保存（或进行梯度降温，4°C放置 20min，-20°C放置 2h，-80°C放置过夜），最后转移至液氮罐。

#### 【注意事项】

1. 本产品使用过程中应注意无菌操作，避免污染。
2. 本产品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人肺鳞癌类器官培养。
3. 本产品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。
4. 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%。
5. 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。

#### 【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。