

## 人宫颈癌类器官试剂盒产品说明书

### 【产品名称】

| 序号 | 名称                   | 货号           | 规格    | 保存温度  | 保质期   |
|----|----------------------|--------------|-------|-------|-------|
| 1  | 人宫颈癌类器官基础培养基         | 3D005-500kit | 500ml | 2-8°C | 12 个月 |
|    | 人宫颈癌类器官培养因子 B (50X)  |              | 10ml  | -20°C |       |
|    | 人宫颈癌类器官培养因子 C (250X) |              | 2ml   | -20°C |       |
| 2  | 人宫颈癌类器官基础培养基         | 3D005-100kit | 100ml | 2-8°C | 12 个月 |
|    | 人宫颈癌类器官培养因子 B (50X)  |              | 2ml   | -20°C |       |
|    | 人宫颈癌类器官培养因子 C (250X) |              | 0.4ml | -20°C |       |

### 【产品介绍】

人宫颈癌类器官培养试剂盒是一种化学定义的细胞培养基，用于建立和维持人宫颈癌类器官。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。

### 【使用方法】

#### 宫颈癌类器官完全培养基的制备

使用无菌操作技术配制宫颈癌类器官完全培养基。以下是配制 10ml 完全培养基的示例，如所需量不同，可相应调整用量。

1. 冰上解冻宫颈癌类器官培养因子 B、C。

注意：解冻后，建议将人宫颈癌类器官因子 B、C 分别分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 200 $\mu$ l 培养因子 B、40 $\mu$ l 培养因子 C 加到 9.76ml 人宫颈癌类器官基础培养基中，充分混合，配制成 10ml 人宫颈癌类器官完全培养基。

注意：配制后的人宫颈癌类器官完全培养基在 2-8℃ 储存，建议两周内使用。宫颈癌类器官培养因子 B 内含有细菌及真菌抗生素（50X）。

### 病人来源的宫颈癌类器官的原代培养

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。

### 原代人宫颈癌类器官的建立

1. 用离心管将原发性宫颈癌类组织碎片收集在冰冷的原发组织储存溶液中。将组织样品保持在 4℃，直到分离开始。
2. 评估获得的组织碎片是否完全由上皮组成。如果存在脂肪或肌肉组织，请在解剖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。
3. 用宫颈癌类器官基础培养基或 DPBS 冲洗组织两次。
4. 在细胞培养皿中使用外科剪刀或手术刀将组织切成 1-3mm<sup>3</sup> 的小碎片。
5. 用 10ml 肿瘤组织消化液在 15ml 离心管中 37℃ 消化组织碎片，孵育时间从 30min-1h 不等。仔细监测消化过程，可适当吹打取上清观察消化程度。当大多数组织碎片能够通过 1ml 移液管尖端时，消化过程完成。
6. 将 FBS 加入组织消化液中，最终浓度为 2%，用 100μm 细胞过滤筛过滤。
7. 收集过滤后的细胞，在 4℃ 下 250g 离心 3min。在可见的红色沉淀的情况下，抽吸上清，用 2ml 红细胞裂解液重悬红细胞在室温下静置 1min，然后在 4℃ 下 250g 离心 3min。
8. 弃去上清液，将沉淀重悬于基础培养基中，在 4℃ 下 250g 离心 3min，再次重复此步骤。
9. 弃去上清液，将细胞悬液重悬于基质胶中。基质胶应该保存在冰上以防止凝固，基质胶用量取决于基质的大小，推荐重悬密度为每 25μl 基质胶悬液包含大约 10000 个细胞。  
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机构稳定型。
10. 将基质胶和组织细胞的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30μl 左右，避免悬液接触孔板侧壁。  
注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

11. 将接种完成后的培养板放于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中，孵育 15-25min 待基质胶凝固。
12. 配制人宫颈癌类器官完全培养基，待基质胶完全凝固后，加入已经配制好的人宫颈癌类器官完全培养基，每孔 500μl。
13. 将孔板放于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，每隔 3-4 天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并用新鲜的预热的类器官完全培养基代替它。密切监测类器官生长状态，理想情况下，宫颈癌类器官应在 7-10 天内建成。

### 人宫颈癌类器官的传代培养

1. 用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5ml EP 管中。
2. 用经过润洗液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 用 250g 离心力室温离心 3min。
4. 弃上清，使用类器官消化液或用机械破坏。对于使用类器官消化液的细胞解离，在类器官消化液中重悬类器官悬浮液，移液器反复上下吹打并置于 37°C 孵育，直至类器官解离。使用带滤芯移液头每 2min 反复上下吹吸 8 次，以帮助破坏类器官。密切监视消化过程使在类器官解离液中的孵育时间最短。如发生机械故障，在 1.5 ml 类器官培养基中重悬类器官悬液。小心地用移液管吸取类器官悬浮液，反复上下 30 次，这将有助于消化。  
注意：不要在类器官解离液中解离超过 7min，因为这可能会导致较差的类器官的生长甚至破坏。根据经验，如果是小块细胞的混合物，可以观察到由 10-50 个细胞组成的细胞团，消化就完成了。
5. 消化完成后，用 1ml 类器官培养基进行一次冲洗，然后室温下 250g 离心 3min。
6. 弃上清，用适量的基质胶重悬类器官沉淀，重悬后置于冰上，重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。  
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. 将基质胶和类器官的混合悬液加入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30ul 左右。  
注意：为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。
8. 将接种完成后的培养板至于 37°C 和 CO<sub>2</sub> 培养箱中，孵育 15min 左右待基质胶凝固。



9. 配制人宫颈癌类器官完全培养基。待基质胶完全凝固后，加入已配制好的人宫颈癌类器官完全培养基，24孔板每孔500ul。
10. 将24孔板置于37°C和CO<sub>2</sub>培养箱中，直到类器官需要进一步的实验。

### 【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。
3. 注意：涉及原代人体组织材料的研究必须遵守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。

### 【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。