

BiozellenCM 肾癌类器官培养基 (BiozellenCM Renal Cancer Organoid Culture Medium)

Catalog No B-M-00007-100、B-M-00007-500

Specification 100ml、500ml

Storage 4°C , 12个月

一、产品介绍

BiozellenCM 肾癌类器官培养基模拟肿瘤细胞体内生长的微环境，培养出的类器官能够最大程度地保存肿瘤组织的病理学和基因组学特征。本产品是适用于多种亚型及分期的肾癌类器官培养、传代及复苏，有效提高实验效率和成功率。本产品为肾癌类器官培养的核心试剂，可以与类器官相关辅助试剂配套使用

二、产品信息

组成	货号	规格	储存温度&质保期
BiozellenCM 肾癌类器官基础培养基	B-M-00007	100 mL/500mL	4 °C , 12个月
BiozellenCM 肾癌类器官培养基添加剂 A (50×)	B-M-00007-A	2 mL/10mL	-20°C , 12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM 肾癌类器官培养基添加剂 B (50×)	B-M-00007-B	2 mL/10mL	-20°C , 12个月，避免反复冻融
BiozellenCM 肾癌类器官培养基 Primary enhancer (100×)	B-M-00007-PE	0.4 mL/2 mL	-20°C , 12个月，避免反复冻融

三、用前须知

- 首次使用时，请将解冻后的肾癌类器官培养基添加剂A、B按比例添加到肾癌类器官基础培养基中，配制肾癌类器官完全培养基（请在试剂瓶上标注配制时间），充分混匀后置于 2-8 °C 保存，建议 2-3 周内使用完毕。
- 建议：如短时间内不能用尽，可将配制的肾癌类器官完全培养基分装并贮存在-20°C冻存，保存期限不超过 12 个月。
- Primary Enhancer 只用于原代培养时现加使用，具体使用方法和体积请参照肾癌类器官构建操作步骤 1.12（说明 6）。
- 需要但不包含的其他配套使用试剂。

名称	货号	规格
组织保存液	B-R-00005-100	100 mL/瓶
肿瘤组织消化液	B-R-00001-50	50 mL/瓶
红细胞裂解液	B-R-00003-100	100 mL/瓶
抗粘附液	B-R-00007-100	100 mL/瓶
BiozellenGel 基质胶，低因子，无酚红	B-P-00007-10	10 mL/瓶
类器官传代消化液	B-R-00002-100	100 mL/瓶
类器官冻存液	B-R-00006-50	50 mL/瓶
DMEM/F12 (含10%血清)	-	-
无菌PBS (1×)	-	-
70µm滤网	-	-

四、肾癌类器官构建操作步骤

- 1. 组织运输：**将采集的组织放入装有组织保存液（B-R-00005-100）的采集管中，充分浸没并于低温（建议冰上）迅速运至实验室。
- 2. 组织前处理：**将组织至于6孔板中，加入PBS（含1%双抗和两性霉素B）漂洗两次。如样本足量可进行如下留样操作：
 - a) 选做：**取部分组织进行速冻操作，留作基因组或转录组测序备用；
 - b) 选做：**取部分组织用固定液进行固定，留作病理组织学鉴定备用；
- 3. 组织剪碎：**将剩余组织转移至10cm的无菌培养皿中，剪碎至肉糜状（1-3 mm³）后移入15 mL离心管中。
- 4. 组织消化：**加入5 mL 肿瘤组织消化液（B-R-00001-50），37°C 恒温消化30-60min。每间隔5-10min上下颠倒混匀。
说明1：当大部分组织碎片能通过1 mL移液枪头或镜下观察到大部分细胞呈细胞团块时，即可终止消化。
- 5. 终止消化：**加入5 mL DMEM/F12（含10% FBS）混匀后，300 g 离心4 min，小心吸弃上清。
- 6. 细胞过滤：**加入5 mL PBS 重悬细胞，使用100 μm 细胞滤网过滤，再吸取5 mL PBS冲洗滤网，将滤出液于300 g 离心4 min，吸弃上清。
- 7. (选做)**如含较多红细胞（细胞沉淀呈红色）加入1 mL 红细胞裂解液（B-R-00003-100），轻轻涡旋或颠倒混匀，室温静置5 min。300 g 离心4 min，小心吸弃上清。
- 8. 细胞计数：**使用5 mL PBS 重悬细胞，吸取少量悬液通过自动细胞计数仪或手动计数板计算细胞总数和活细胞比率。计数后，300 g 离心4 min，小心吸弃上清。
说明2：活细胞总数（个）= 测读值（个/mL）× 5 mL × 活细胞比率 %
- 9. 细胞预冷：**取少量类器官完全培养基（30-50 μL）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。
- 10. 细胞接种：**（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的BiozellenGel(B-P-00007-10，或Matrigel)小心混匀上述预冷的细胞悬液，以30 μL/滴接种至预热细胞孔板中。
说明3：接种密度推荐1-5 × 10⁴活细胞/uL（仅供参考，可按实验需求进行调整）
说明4：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。
- 11. 基质胶固化：**接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37°C，5% CO₂ 培养箱内孵育10-15 min 使基质胶凝固。
- 12. 培养：**待基质胶凝固后，加入准备好的类器官完全培养基至浸没基质胶滴（需确认肾癌类器官培养基中已加入添加剂A和B）。
说明5：6孔板建议加入2.5 mL，12孔板建议加入1.2 mL，24孔板建议加入600 μL 完全培养基。
说明6：原代培养时，在上述已加液培养孔中以1:100 比例吸取相应体积的Primary Enhancer，一周后更换成完全培养基。
说明7：加液时建议沿侧壁缓慢加入，请勿将培养基直接加到胶滴上
- 13. 换液：**将已接种的孔板转移至37°C，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。
说明8：一般在接种后一周内即可观测到类器官形成。

五、肾癌类器官传代操作步骤

- 1. 收集：**用1 mL 移液枪头捣碎并刮取基质胶团，并将胶滴与培养基一起转入15 mL离心管中（如孔内有细胞存留，可另吸取PBS 涮洗孔板并转入离心管中）。300 g 离心4 min，小心吸弃上清。
说明1：建议待大部分类器官的大小大于100 μm 传代（传代标准仅供参考，可按实验需求调整）。
说明2：为避免枪头粘附性损耗，可用抗粘附液（B-R-00007-100）润洗移液枪头。
- 2. 消化：**加入5 mL 类器官传代消化液（B-R-00002-100）于37°C 消化5-10 min，期间颠倒混匀若干次。
说明3：在消化过程中，可使用移液器吹打混匀帮助消化。也可实时取少量消化悬液于显微镜下观察消化情况，当观察到较多的单细胞或直径在50 μm 以下的细胞簇后，即可认为消化完成。

- 3. 终止消化**：加入 5-10 mL DMEM/F12 (10 % FBS)，于 300 *g* 离心 4 min，小心吸弃上清。
- 4. 细胞漂洗**：取 5-10 mL PBS 重悬细胞，300 *g* 离心 4 min，小心吸弃上清
- 5. 细胞预冷**：取少量类器官完全培养基（30-50 μ L）重悬底部细胞，并放置于冰上预冷。
- 6. 细胞接种**：（整个过程在冰上进行）预冷枪头并吸取适量的 BiozellenGel(B-P-00007-100，或Matrigel) 小心混匀上述预冷的细胞悬液，以 30 μ L/滴接种至预热细胞孔板中。

说明 4：传代比例一般1:2 或 1:3（传代比例仅供参考，可按实验需求调整）

说明 5：为保证基质胶固化成胶，建议基质胶体积比例不低于70%。

- 7. 基质胶固化**：接种完成后迅速将接种后的细胞孔板翻转，置于37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱内孵育 10-15 min 使基质胶凝固。
- 8. 培养**：待基质胶凝固后，加入准备好的类器官完全培养基至浸没基质胶滴（需确认肾癌类器官培养基中已加入添加剂 A 和 B）。
- 9. 换液**：将已接种的孔板转移至 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱内培养。镜下观察类器官的培养情况，适时进行换液或传代（建议每2-3天全换或半换液）。

六、友情提示

1. 本试剂仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂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肾癌类器官培养。
3. 本试剂培养结果会收到标本质量、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. 如遇到特殊样本或其他未涉及问题，请联系公司售后技术支持，我们将提供免费的技术咨询服务，再次感谢您的信任!

仅供研究使用