

BiozellenCM 结直肠癌类器官培养基 (BiozellenCM Colorectal Cancer Organoid Culture Medium)

Catalog No B-M-00002-100、B-M-00002-500

Specification 100ml、500ml

Storage 2-8℃，12个月

一、产品介绍

BiozellenCM 结直肠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结直肠癌类器官培养、传代及复苏，有效提高实验效率和成功率。本产品为结直肠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 结直肠癌类器官基础培养基	B-M-00002	100 ml/500ml	2-8 ℃，12个月
BiozellenCM 结直肠癌类器官培养基添加剂 A (50×)	B-M-00002-A	2 ml/10ml	-20℃，12 个月，避免反复冻融
BiozellenCM 结直肠癌类器官培养基添加剂 B (50×)	B-M-00002-B	2 ml/10ml	-20℃，12个月，避免反复冻融

三、用前须知

- 首次使用时**，请将解冻后的结直肠癌类器官培养基添加剂A、B按比例添加到结直肠癌类器官基础培养基中，配制结直肠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 ℃保存，建议 2-3 周内使用完毕。
- 建议**：如短时间内不能用尽，可将配制的结直肠癌类器官完全培养基分装并贮存在-20℃冻存，保存期限不超过12 个月。
- 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、结直肠癌类器官构建操作步骤

- 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 50mL 离心管中，加入 漂洗液 PBS（含 1% 双抗和两性霉素 B，也可添加终浓度为 50 μ g/mL 的庆大霉素）剧烈漂洗 3-5 次。将漂洗后组织转移至 10 cm 无菌培养皿中，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 $^{\circ}$ C 恒温消化 30-60min。每间隔 5-10min 上下颠倒混匀。

备注 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 μ m 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。

备注 2：活细胞总数（个）= 测读值（个/ml） $\times$ 5 ml $\times$ 活细胞比率 %

9. 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。

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 μ L/滴接种至预热细胞孔板中。

备注 3：接种密度推荐 1-5 $\times$ 10⁴ 活细胞/ μ L（仅供参考，可按实验需求进行调整）

备注 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 $^{\circ}$ 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（需确认结直肠癌类器官培养基中已加入添加剂 A 和 B）。

备注 5：6 孔板建议加入 2.5ml，12 孔板建议加入 1.2 ml，24 孔板建议加入 600 μ L。

备注 6：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 $^{\circ}$ 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）。

备注 7：一般在接种后一周内即可观测到类器官形成。

五、结直肠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。

备注 1：建议待大部分类器官的大小大于 100 μ m 传代（传代标准仅供参考，可按实验需求调整）。

备注 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 $^{\circ}$ C 消化 5-10 min，期间颠倒混匀若干次。

备注 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 μ m 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-00007-10，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。

备注 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）

备注 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℃，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（需确认结直肠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℃，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结直肠癌类器官培养。
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