

Colorectal Cancer Organoid Complete Medium (结直肠癌类器官完全培养基)

货号: CROM-P100

产品介绍:

结直肠癌类器官完全培养基是一款用于培养人类结直肠癌类器官的商品化培养基。患者来源的癌症类器官再现了原始肿瘤的基因组和病理特征，在医学研究和精准医学方面具有良好的应用前景。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Colorectal Cancer Organoid Complete Medium A	CROM-P100	100mL	4℃, 6个月
Colorectal Cancer Organoid Complete Medium B(50X)		1mL*2	-20℃, 1年
Colorectal Cancer Organoid Complete Medium C(250X)		0.4mL	-20℃, 1年
Colorectal Cancer Organoid Complete Medium D(100X)		1mL	-20℃, 1年

其他需准备的试剂信息

试剂名称	厂家	货号
类器官专用基质胶	SHRbio	OEM-10
样本保存液	SHRbio	SPS-100
肿瘤组织消化液	SHRbio	TTD-50
肿瘤类器官基础培养基	SHRbio	TBM-500
类器官传代消化液	SHRbio	OPD-100



类器官润洗液	SHRbio	OMR-100
红细胞裂解液	-	-

结直肠癌类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制结直肠癌类器官完全培养基。以下是准备 10mL 完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Colorectal Cancer Organoid Complete Medium B (50x), Colorectal Cancer Organoid Complete Medium C (250x) 和Colorectal Cancer Organoid Complete Medium D(100X)。

注意：解冻后，建议将Colorectal Cancer Organoid Complete Medium B (50x), Colorectal Cancer Organoid Complete Medium C (250x) 和Colorectal Cancer Organoid Complete Medium D(100X) 按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 200 μ L Colorectal Cancer Organoid Complete Medium B(50X), 40 μ L Colorectal Cancer Organoid Complete Medium C(250X), 100 μ L Colorectal Cancer Organoid Complete Medium D(100X)加至 9.66mL Colorectal Cancer Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10mL 结直肠癌类器官完全培养基。

注意：配制后的结直肠癌类器官完全培养基可在2-8 $^{\circ}$ C储存，建议在两周内使用。Colorectal Cancer Organoid Complete A内含有细菌及真菌抗生素。

结直肠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。在收集人体组织材料之前,必须获得所有受试者的知情同意。

1. 将新收集的结直肠癌组织从4 $^{\circ}$ C样本保存液 (SPS-100) 中取出，评估所获得的组织块是否由上皮细胞组成，是否含有脂肪或肌肉组织。如果含有脂肪或肌肉组织，需在解剖显微镜下使用手术剪刀或手术刀和钳子尽可能移除非上皮成分。如果没有脂肪或肌肉组织，立即继续下一步。
2. 用肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 冲洗组织，直到上清液澄清。
3. 使用外科剪刀或手术刀在细胞培养皿中将组织切成小块，放入 15 mL 离心管中。

注意：解离的样品必须足够小，可以通过 10 mL 移液管的尖端。

4. 加入10 mL预热过的肿瘤组织消化液 (TTD-50) , 37 $^{\circ}$ C消化20-30 min。

注意：密切监测消化过程，每 5-10min 通过剧烈摇晃或上下吸取混合物来混合试管中的内容物。为了防止过度消化，应在显微镜下观察是否出现上皮细胞簇。



5. 加入终浓度为 2% 的 FBS 来终止消化，并轻轻地上下晃动离心管。
6. 使用 100 μ m 滤网过滤，收集滤液。
7. 在 4 $^{\circ}$ C 下，250g 离心滤液 3 min，弃上清。如果细胞沉淀为红色，吸弃上清液后，加入 2mL 红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞 3min，然后在 4 $^{\circ}$ C 下 250g 离心 3min。
8. 吸弃上清液后，加入适量的肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬沉淀，在 4 $^{\circ}$ C 下，250g 离心 3 min，弃上清。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 吸弃上清液后，用适量的基质胶（OEM-10，>70% vol/vol）重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每 25 μ L 基质胶悬液含 20-100 个亚结构，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。
11. 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30 μ L 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。

12. 将铺好的培养板至于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15-25min 左右成胶。
13. 待基质胶完全凝固后，加入已配制的结直肠癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μ L。

注意：请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

14. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养。每隔 3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。
15. 密切监测类器官的形成。理想情况下，结直肠癌类器官可以在初次接种后 5-8 天之间进行首次传代。原代培养的结直肠癌类器官培养过程如图 1 所示。

结直肠癌类器官的传代培养

1. 吸弃原培养液，加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的培养基，用经过润洗液（OMR-100）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吹打重悬类器官悬浮液，使得类器官与基质胶分离。
3. 在室温条件下 250g 离心 3min，弃上清，加入 0.2mL 类器官传代消化液（OPD-100）重悬底部类器官沉淀，用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于 37 $^{\circ}$ C 下孵育，直到类器官消化完成。也可以采用机械吹打方式进行类器官传代消化，即在加入 1mL 肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬底部类器官沉淀后，小心地将类器官悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏类器官。

注意：密切监测类器官消化情况，使用类器官传代消化液进行消化时需要将消化时间控制在最短时间内完成（不要超过 5min）。根据经验，如果可以观察到小块细胞（由 10-50 个细胞组成）的混合物，消化就完成了。

4. 加入 1mL 肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）洗涤沉淀一次，室温条件下 250g 离心 3min。
5. 吸弃上清液后，用适量的基质胶（OEM-10，>70% vol/vol）重悬组织沉淀。
6. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30 μ L 左右。
7. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 恒温培养箱中，孵育 15-25min 左右成胶。



- 待基质胶完全凝固后，加入 37℃预热的结直肠癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500μL。
- 将 24 孔板置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。传代后的结直肠癌类器官培养过程如图 2 所示。

注意事项

- 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅供科研使用，禁止用于人体。



附录1 结直肠癌类器官培养过程图

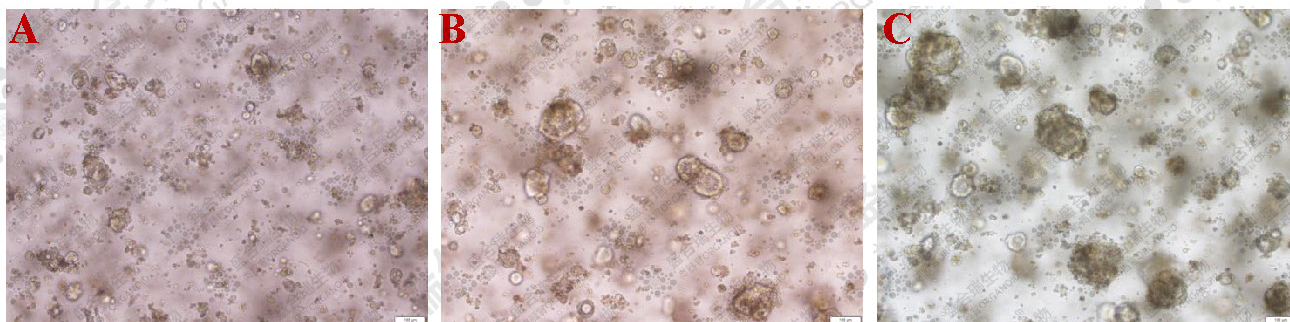


图1 结直肠癌类器官原代 (P0) 培养生长过程示例

(A) 在生长至第3天时，可观察到明显的3D细胞球；(B) 继续生长至第6天，类器官体积逐渐增大，呈空泡囊状结构；(C) 在生长至第9天时，直径可达到300 μm ，部分类器官呈致密结构，并可见褶皱。比例尺：100 μm 。

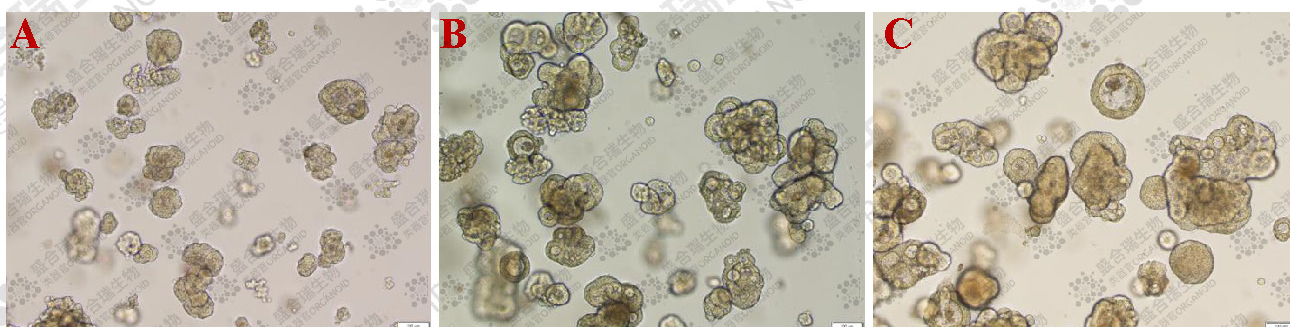


图2 结直肠癌类器官首次传代后 (P1) 生长过程示例

(A) 经消化传代后的结直肠癌类器官生长状态良好；(B) 生长至第3天时体积明显增加，且形态不规则；(C) 继续生长至第5天时，类器官直径可达300 μm 。比例尺：100 μm 。



附录2 结直肠癌类器官组织染色鉴定图

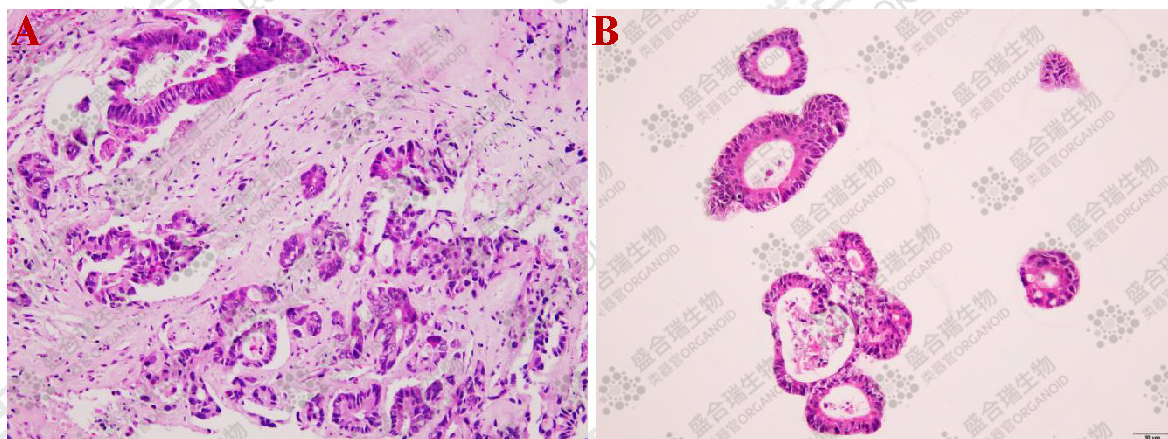


图3 结直肠癌组织和类器官HE染色

由图可见结直肠癌组织 (A) 和结直肠癌类器官 (B) 内细胞内核质比近似, 且类器官中有中空的内腔, 表现出一致的特异性聚集形态, 说明类器官和来源组织在组织形态上相似。放大倍数: 200 $\times$, 比例尺: 50 μm 。

注: HE染色后细胞核呈现蓝紫色, 细胞质和细胞外基质呈现红色。

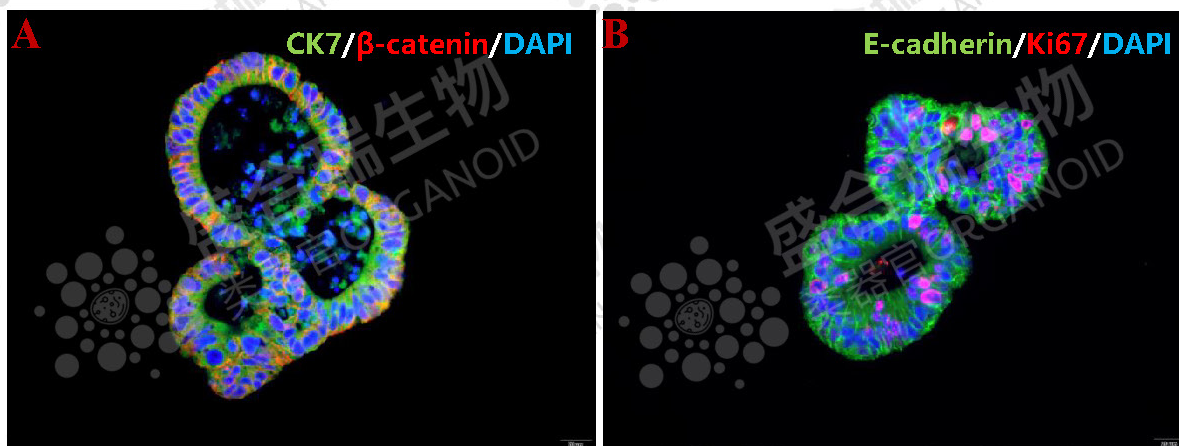


图4 结直肠癌类器官免疫荧光染色

(A) CK7 (腺癌标志物) 和 β -catenin (Wnt通路活化标志物) 的免疫荧光染色。(B) E-cadherin (肠上皮细胞标志物) 和Ki67 (细胞增殖标志物) 的免疫荧光染色。DAPI (蓝色) 标记细胞核。放大倍数: 400 $\times$, 比例尺: 20 μm 。

