

## Bladder Cancer Organoid Complete Medium (膀胱癌类器官完全培养基)

货号: BLOM-100

### 产品介绍

膀胱癌类器官完全培养基是一款用于培养人类膀胱癌类器官的商品化培养基，可有效扩增并维持患者来源膀胱癌类器官的体外生长与结构完整性。患者来源的膀胱癌类器官能够高度还原原始肿瘤的基因组特征、病理表型及异质性，可精准模拟体内肿瘤微环境与生物学行为，在膀胱癌发病机制研究、个体化药物筛选、药效评估及精准医疗实践中具有重要应用价值与广阔前景。

### 产品信息

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Bladder Cancer Organoid Complete Medium A	BLOM-100	100 mL	4°C, 6个月
Bladder Cancer Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Bladder Cancer Organoid Complete Medium C (250×)		0.4 mL	-20°C, 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	SHR Biotechnology	OEM-10
样本保存液	SHR Biotechnology	SPS-100
肿瘤组织消化液	SHR Biotechnology	TTD-50
肿瘤类器官基础培养基	SHR Biotechnology	TBM-500



类器官传代消化液	SHR Biotechnology	OPD-100
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
类器官冻存液	SHR Biotechnology	OFM-50
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50

## 膀胱癌类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制膀胱癌类器官完全培养基。以下是准备 10 mL 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 Bladder Cancer Organoid Complete Medium B (50×) 和 Bladder Cancer Organoid Complete Medium C (250×)。

**注意：**解冻后，建议将 Bladder Cancer Organoid Complete Medium B (50×) 和 Bladder Cancer Organoid Complete Medium C (250×) 按需分装后保存取用，避免反复冻融。对于微量试剂组分 Bladder Cancer Organoid Complete Medium C (250×)，建议瞬时离心 5 秒钟 (500-2000 rpm) 后，再开盖分装使用，以避免损失。

2. 将 200 μL Bladder Cancer Organoid Complete Medium B (50×)，40 μL Bladder Cancer Organoid Complete Medium C (250×) 加至 9.76 mL Bladder Cancer Organoid Complete Medium A 中，充分混合，配制成 10 mL 膀胱癌类器官完全培养基。

**注意：**配制好的膀胱癌类器官完全培养基可在 2-8 °C 储存不超过 7 天，建议现配现用。Bladder Cancer Organoid Complete A 内含有细菌及真菌抗生素。

## 膀胱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. 将新收集的膀胱癌组织从 4 °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5倍体积预热过的肿瘤组织消化液 (TTD-50) ， 37 °C消化20-40 min。

**注意：**密切监测消化过程，可配合剧烈摇晃或使用减去尖端的 1 mL 枪头上下吸取混合物来加快消化进程。为了防止过度消化，每 5-10 min 应在显微镜下观察是否出现细胞团，并及时终止消化。

5. 加入 10 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 来终止消化，并轻轻地吹打或上下晃动离心管混匀。

6. 使用 100 μm 滤网过滤，收集滤液。

7. 在4 °C下，300 g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2 mL类器官裂红液 (OCM-50) 重悬沉淀，在室温下裂解红细胞1-2 min，然后在4 °C下300 g离心3 min。

**注意：**红细胞裂解的具体时间可以根据红色深浅进行判断，尽量去除红细胞。

8. 吸弃上清液后，加入10 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 重悬沉淀，在4 °C下，300 g离心3 min，弃上清。

9. 加入1mL 的肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 重悬沉淀，转移至1.5 mL EP管，在4°C下，300g离心3 min。

10. 吸弃上清液后，用适量的类器官专用基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀，推荐重悬密度为每μL基质胶悬液含8-20个细胞团 (约200-500个细胞)，重悬后置于冰上，重悬时间不超过30 s以避免基质胶过早凝固。

**注意：**24孔板每孔推荐接种一个30 μL基质胶滴，可根据细胞计数结果确定需要接种的胶滴数量。混合过程中应尽量避免产生气泡，以免影响后续观察以及类器官生长。

11. 将悬液点入24孔板底部正中央，每孔30 μL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 °C CO<sub>2</sub>恒温培养箱中，孵育15-25 min左右成胶。

13. 待基质胶完全凝固后，加入已配制的膀胱癌类器官完全培养基，24孔板每孔500 μL。

**注意：**请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。如形成的基质胶穹顶结构较高，可加入600 μL保证浸没完全。

14. 将24孔板置于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养。隔天更换一次培养基，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，膀胱癌类器官可以在初次接种后5-8天之间进行首次传代。原代培养的膀胱癌类器官生长过程如图1所示。

## 膀胱癌类器官的传代培养

当大部分类器官直径长至100-200 μm左右时，即可进行传代培养，具体步骤如下：

1. 吸弃原培养液，加入4 °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1.5 mL 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液，使得类器官与基质胶分离。

3. 在室温条件下300 g离心3 min，弃上清，加入0.2 mL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 °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 1 mL 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 5 min）。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。建议优先采用机械吹打方式进行类器官传代消化，对于无法吹散的类器官进一步使用类器官传代消化液进行消化。

4. 加入 1 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 终止消化，室温条件下 300 *g* 离心 3 min。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 吸弃上清液后，用适量的基质胶 (OEM-10, >70% vol/vol) 重悬组织沉淀。

**注意：**传代比例建议为 1:3-1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

7. 将基质胶和类器官的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30  $\mu$ L，避免悬液接触孔板侧壁。
8. 将铺好的培养板至于 37 °C CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
9. 待基质胶完全凝固后，加入预热的膀胱癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500  $\mu$ L。

**注意：**请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。如基质胶穹顶结构较高，可加入 600  $\mu$ L 保证浸没完全。

10. 将 24 孔板置于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。传代后的膀胱癌类器官生长过程如图 2 所示。

## 膀胱癌类器官的冻存

当类器官平均直径长至 100-200  $\mu$ m，增殖活性较好且结构透亮，边界清晰时，即可进行冻存，具体步骤如下：

1. 吸弃原培养液，加入 4 °C 预冷的肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500)，用经过润洗液润洗的枪头吹打刮取类器官，并将类器官和培养液的悬液转移至经过润洗液润洗的 1.5 mL EP 管中。

2. 用经过润洗液 (OMR-100) 润洗的枪头反复吹打重悬类器官悬液，使得类器官与基质胶分离。

**注意：**吹打力度需要控制，尽量保证类器官的完整性，以提高冻存后的复苏活性。

3. 在室温条件下 300 *g* 离心 3 min，弃上清。
4. 加入 1 mL 肿瘤类器官基础培养基 (TBM-500) 洗涤沉淀一次，室温条件下 300 *g* 离心 3 min，弃上清。
5. 类器官沉淀中加入 1 mL 预冷的类器官冻存液 (OFM-50)，吹打混匀后立即移入冻存管中。
6. 程序降温及长期保存：

**冻存方法 (1)：**将冻存管放入梯度降温冻存盒然后保存至 -80 °C 过夜，第二天取出放入液氮罐。

**冻存方法 (2)：**4 °C 冰箱放置 10 min，转移至 -20 °C 放置 30 min，转移至 -80 °C 过夜，第二天取出放入液氮罐。

**注意：**-80 °C 冻存建议不超过 3 个月，液氮冻存建议不超过 1 年。



## 注意事项

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

## 论文发表规范引用参考

Bladder cancer organoids were cultured with Bladder Cancer Organoid Complete Medium (BLOM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.



## 附录 1 膀胱癌类器官培养过程图

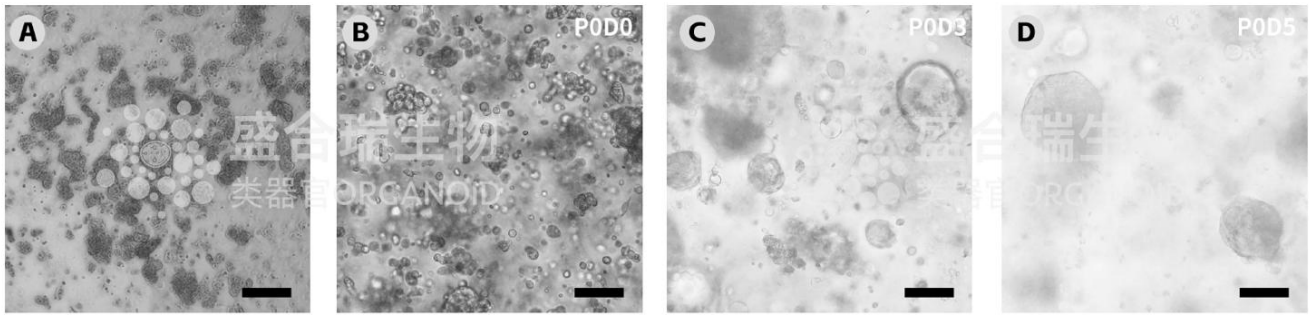


图 1 膀胱癌组织消化及类器官原代 (P0) 培养过程示例

(A) 膀胱癌组织消化后明场图, 可见大量的细胞团; (B) 膀胱癌类器官原代培养第 0 天(D0)的生长状态, 以单细胞和较小的细胞团为主; (C) 在生长至第 3 天(D3)时可观察到明显的 3D 细胞球; (D) 在生长至第 5 天(D5)时, 细胞球明显增大且出现混合囊泡结构。比例尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

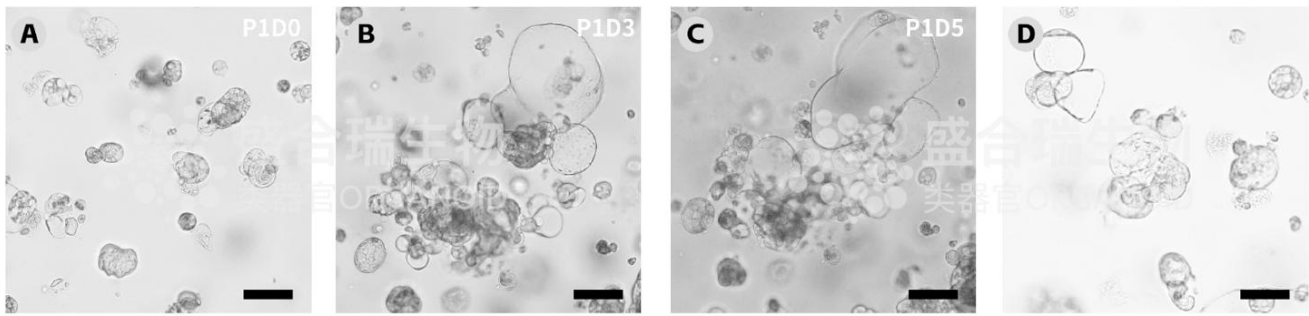


图 2 膀胱癌类器官传代 (P1) 与复苏培养过程示例

(A) 膀胱癌类器官原代培养第 0 天(D0)的生长状态, 可见混合囊泡结构; (B) 在生长至第 3 天(D3)时, 类器官直径明显增大; (C) 在生长至第 5 天(D5)时, 类器官直径持续增大, 可再次传代; (D) 复苏后的膀胱癌类器官表现出稳定的增长趋势。比例尺: 100  $\mu\text{m}$ 。



## 附录 2 膀胱癌类器官染色鉴定图

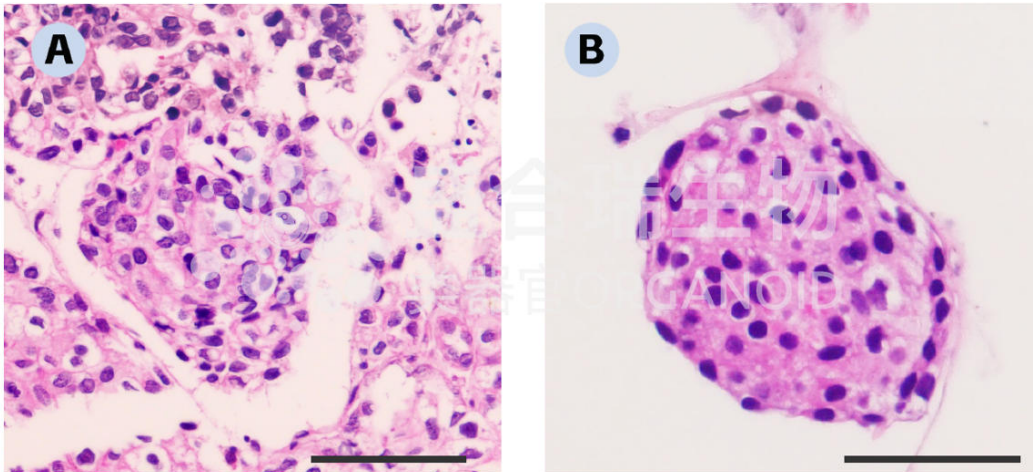


图3 膀胱癌组织和类器官HE染色

由图可见膀胱癌组织 (A) 和类器官 (B) 内细胞的排布, 细胞核、细胞质颜色以及核质比均近似, 提示类器官和来源组织在组织形态上相似。比例尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

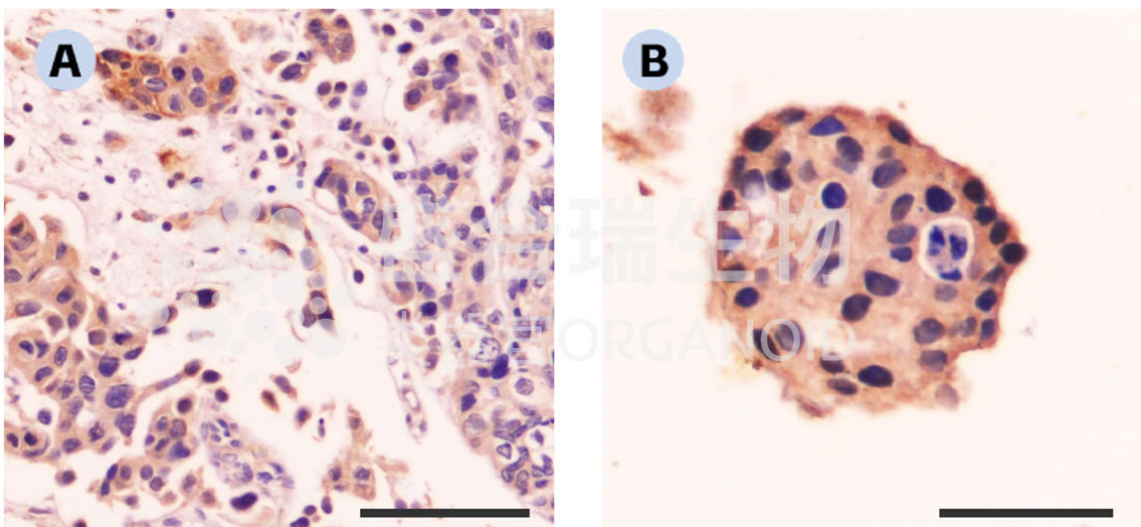


图4 膀胱癌组织和类器官IHC染色

CK5 (基底细胞标志物) 的免疫组织化学染色。结果显示CK5在膀胱癌组织 (A) 和类器官 (B) 中细胞的细胞质中均有表达, 说明膀胱癌组织和对应类器官在特异性标志物表达上的一致性。比例尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

