

Renal Cancer Organoid Complete Medium (肾癌类器官完全培养基)

货号: RCOM-100

产品介绍

肾癌类器官完全培养基是一款专用于人源肾癌类器官培养的商品化培养基，可有效扩增和维持患者来源肾癌类器官的体外生长与结构完整性。患者来源的肾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，在肾癌发病机制研究、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
Renal Cancer Organoid Complete Medium A	RCOM-100	100 mL	4°C, 6个月
Renal Cancer Organoid Complete Medium B (50×)		1 mL×2	-20°C, 1年
Renal 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
水凝胶胞外基质材料	SHR Biotechnology	HEM-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
类器官裂红液	SHR Biotechnology	OCM-50

肾癌类器官完全培养基的制备

在无菌条件下配制肾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Renal Cancer Organoid Complete Medium B (50×)和Renal Cancer Organoid Complete Medium C (250×)。

注意: 初次解冻后，建议将Renal Cancer Organoid Complete Medium B (50×)和Renal Cancer Organoid Complete Medium C (250×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

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

注意: 配制后的肾癌类器官完全培养基可在2-8 °C储存不超过1周，建议现配现用。Renal Cancer Organoid Complete A内含有细菌及真菌抗生素。

肾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. 将新收集的肾癌组织从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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心 3 min，弃上清。
9. 加入 1 mL 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 $^{\circ}\text{C}$ 下，300 g 离心 3 min。

注意：下面如使用类器官专用基质胶培养参考步骤 10-14，使用水凝胶胞外基质材料培养参考步骤 15-16。

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 ，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 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 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，加入已配制的肾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 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 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. 步骤 9 结束后，吸弃上清液，取少量悬液进行细胞计数，然后按 1×10^6 - 1×10^7 个细胞/mL 浓度加入预制好的水凝胶胞外基质材料 (HEM-10) 与类器官完全培养基混合物，接种至低吸附细胞皿，培养板或培养瓶中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

注意：24 孔板添加量建议为 750 μL ，自然沉淀基质厚度在 3-10 mm 间为最佳。

16. 每隔 2 天更换 1/3 类器官完全培养基，即吸弃 1/3 上清，加入等体积新鲜类器官完全培养基。

注意：此步骤仅需更换上清培养基，沉淀的基质材料不需要吸走。

17. 密切监测类器官的形成。理想情况下，肾癌类器官可以在初次接种后 5-8 天之间进行首次传代。原代培养的肾癌类器官培养过程如图 1A 所示。

肾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：

注意：如使用类器官专用基质胶培养参考步骤1-9，使用水凝胶胞外基质材料培养参考步骤10-12。

1. 吸弃原培养液，加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 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）洗涤沉淀一次，室温条件下 300 g 离心 3 min。
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。

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。

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 μL 左右。
7. 将接种完成后的培养板至于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25 min 左右成胶。
8. 待基质胶完全凝固后，加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的肾癌类器官完全培养基，24 孔板每孔 500 μL 。
9. 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养。每隔 2 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。
10. 对于在水凝胶胞外基质材料体系中生长密度过高（换液周期 < 2 天）的类器官进行传代。使用无菌宽口枪头轻柔混匀 1 个孔中的类器官培养液，均分至 2 孔。
11. 按照各规格培养板单孔接种量，补加预制好的水凝胶胞外基质材料（HEM-10）与类器官完全培养基混合物至所需体积，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。
12. 每隔 2 天更换 1/3 类器官完全培养基，即吸弃 1/3 上清，加入等体积新鲜类器官完全培养基。

注意：此步骤仅需更换上清培养基，沉淀的基质材料不需要吸走。

13. 密切监测类器官的生长。传代后的肾癌类器官培养过程如图 1B 所示。

肾癌类器官的冻存

当有较多数量的类器官平均直径长至 100-200 μm ，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：

注意：对于类器官专用基质胶培养体系，参考步骤 1-2，水凝胶胞外基质材料培养体系参考步骤 3。



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、水凝胶培养体系：收集水凝胶胞外基质材料培养类器官连同基质材料一起转移至1.5 mL EP管中。

4、在室温条件下300 *g*离心3 min，弃上清。

5、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。

6、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。

7、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

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



附录1 肾癌类器官培养过程例图

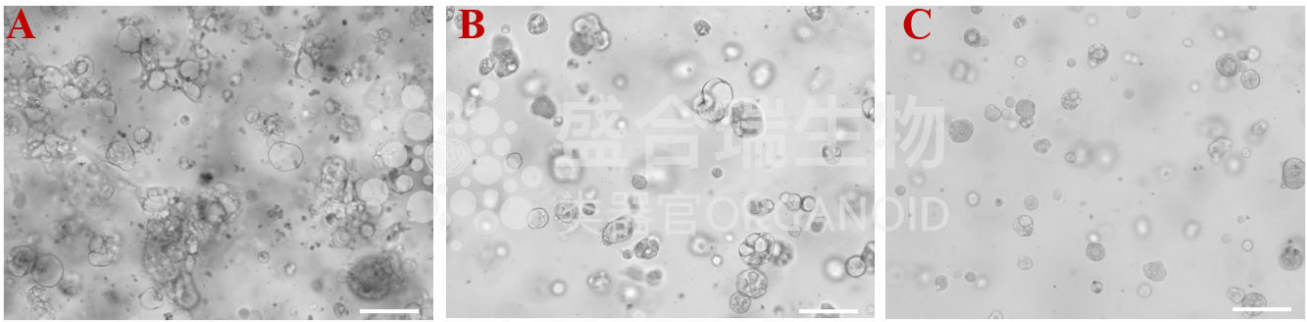


图1 肾癌类器官原代培养、传代和复苏后的生长状态例图

(A) 原代肾癌类器官的生长状态 (P0)。类器官呈泡状和实体混合结构，大小约100 μm 。(B) 第一代肾癌类器官的生长状态 (P1)，传代后的类器官仍为泡状和实体混合结构。(C) 复苏后的类器官表现出稳定的增长趋势。比例尺：200 μm 。

