Tumor cell Spheroid Culture Medium（肿瘤细胞成球培养基）

货号：TCSM-100

产品介绍:

肿瘤细胞成球培养基是一款专用于体外培养肿瘤细胞球的商品化培养基，已添加关键生长因子与营养补充物，可在超低吸附悬浮或基质胶 3D 培养条件下高效富集肿瘤干细胞，支持多种肿瘤细胞系及原代肿瘤细胞成球、稳定传代。培养好的肿瘤细胞球可较好保留干细胞特性、细胞间相互作用及体内肿瘤生物学特征，适用于肿瘤干性、侵袭转移、药物敏感性筛选及免疫共培养等 3D 肿瘤模型研究。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Tumor cell Spheroid Culture Medium A	TCSM-100	100 mL	4℃，6个月
Tumor cell Spheroid Culture Medium B (50×)		1 mL*2	-20℃，1年
Tumor cell Spheroid Culture Medium C (100×)		1 mL	-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	SHR Biotechnology	OEM-10
类器官润洗液	SHR Biotechnology	OMR-100
胰酶	-	-
DPBS（不含钙镁离子）	-	-

肿瘤细胞成球培养基的制备

在无菌条件下配制肿瘤细胞成球培养基。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Tumor cell Spheroid Culture Medium B (50×)和Tumor cell Spheroid Culture Medium C (100×)。

注意: 解冻后，建议将Tumor cell Spheroid Culture Medium B (50×)和Tumor cell Spheroid Culture Medium C (100×)按需分装后保存取用，避免反复冻融。试剂Tumor cell Spheroid Culture Medium B (50×)和Tumor cell Spheroid Culture Medium C (100×)建议瞬时离心5秒钟（500-2000rpm)后，再开盖使用，以避免损失。

2. 将 200μL Tumor cell Spheroid Culture Medium B(50×)，100μL Tumor cell Spheroid Culture Medium C(100×)加至 9.7mL Tumor cell Spheroid Culture Medium A 中，充分混合，配制成 10mL 肿瘤细胞类器官完全培养基。

注意: 配制好的肿瘤细胞成球培养基可在2-8°C储存不超过1周，建议现配现用。Mouse Tumor cell-line Organoid Complete A内含有细菌及真菌抗生素。

肿瘤细胞球原代培养

1. 预先准备好培养在 TC 处理皿中增殖能力强，或者低代次的肿瘤细胞，待细胞汇合度达到 75-90%时，使用 0.25%胰酶消化细胞。

注意: 不同细胞的消化时间需要自行确定，可在镜下观察细胞收缩变圆，少量细胞脱离培养板表面即可终止消化。

2. 加入含 10%血清的培养基来终止消化，并轻柔吹打收集至离心管中，300g 离心 3min。
3. 吸弃上清液后，加入 DPBS 重悬，300g 离心 3min。
4. 吸弃上清液后，加入 1 mL 的肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬沉淀，使用细胞计数板对获得的肿瘤细胞悬液进行计数，计数完毕后，300g 离心 3 min。

注意: 肿瘤细胞成球培养可选超低吸附孔板悬浮培养（步骤5-6），或基质胶3D培养方案（步骤7-12）。

5. 吸弃上清液后，加入适量肿瘤细胞成球培养基重悬，以每孔5-10x10^5的密度接种于六孔低吸附培养板中，每孔加入2-3mL 肿瘤细胞成球培养基，至于37℃ CO_2恒温培养箱中培养。

注意: 此步骤六孔低吸附培养板可静置或置于摇床上培养，摇床转速可依照不同肿瘤细胞类型选择设置（0-100rpm）。

6. 密切监测细胞球的形成，每2天换一次液，换液时可将孔板倾斜45度，静置1-3min，吸弃上清培养基及未聚集成球的单细胞。一般3-5天可见明显的细胞球形成。

注意: 如果有细胞贴壁，将已形成的球体转移至新的孔板，来去除贴壁细胞。

7. 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3000-8000个细胞/10μL。重悬后置于冰上，脱离冰上重悬时间不超过 30s 以避免基质胶过早凝固。

注意： 24孔板每孔推荐接种一个30μL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细胞球生长。

8. 将悬液点入 24 孔板底部正中央，每孔 30μL 左右，避免悬液接触孔板侧壁。

注意： 点入前可再次混合细胞与基质胶，避免肿瘤细胞因重力沉底导致的接种细胞密度不均。为防止基质胶室温凝固，此步骤应尽快完成。

9. 将铺好的培养板至于 37℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25min 左右成胶。
10. 待基质胶完全凝固后，加入 37℃ 预热的肿瘤细胞成球培养基，24 孔板每孔 500μL。

注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

11. 将 24 孔板置于 37℃ CO_2 培养箱中培养。每 2-3 天更换一次培养基，更换培养基时应避免破坏基质胶。
12. 密切监测细胞球的形成。理想情况下，肿瘤细胞球可以在初次接种后7至10天之间进行首次传代。原代培养的肿瘤细胞球形成过程如图1所示。

肿瘤细胞球传代培养（基质胶体系）

当肿瘤细胞球直径长至100μm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℃预冷的培养基，用经过润洗液（OMR-100）润洗的枪头吹打刮取细胞球，并将细胞球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细胞球悬浮液，使得细胞球与基质胶分离。
3. 在室温条件下 300g 离心 3min，弃上清，采用机械吹打方式进行细胞球传代消化，即在加入 1mL 肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬底部细胞球沉淀后，小心地将细胞球悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏细胞球。

注意： 密切监测细胞球消化情况，如吹打无法消化，可加入0.2mL类器官传代消化液（OPD-100）/胰酶重悬底部细胞球沉淀，用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于37°C下孵育，直到细胞球消化完成。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，如果可以观察到小细胞团（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 300g 离心 3min。
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）重悬细胞球沉淀。

注意： 传代比例建议为1:2-1:5，根据消化获得的细胞团数量选择。

7. 将基质胶和细胞球的混合悬液点入 24 孔板底部正中央，避免悬液接触孔板侧壁，每孔 30μL 左右。
8. 将接种完成后的培养板至于 37℃ CO_2 恒温培养箱中，孵育 15-25min 左右成胶。

9. 待基质胶完全凝固后，加入 37℃预热的肿瘤细胞成球培养基，24 孔板每孔 500μL。

注意： 请沿壁缓慢加入，避免破坏已凝固结构。

10. 将 24 孔板置于 37℃ CO_2 培养箱中培养。传代后的肿瘤细胞球生长情况如图 2 所示。

肿瘤细胞球传代培养（悬浮体系）

当肿瘤细胞球直径长至100μm以上时，即可进行传代培养，具体步骤如下：

1. 将含有肿瘤细胞球的孔板倾斜 45 度静置 1-3min，使肿瘤细胞球自动沉降在孔板底部，用经过润洗液（OMR-100）润洗的枪头收集肿瘤细胞球转移至经过润洗液润洗的 1.5mL EP 管中。
2. 在室温条件下 300*g* 离心 3min，弃上清，采用机械吹打方式进行细胞球传代消化，即在加入 1mL 肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬底部细胞球沉淀后，小心地将细胞球悬浮液上下吹打 30 次，靠着管底部移液产生的压力来破坏细胞球。

注意： 密切监测细胞球消化情况，如吹打无法消化，可加入0.2mL类器官传代消化液（OPD-100）重悬底部细胞球沉淀，用经过润洗液润洗的枪头吹打后置于37°C下孵育，直到细胞球消化完成。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，如果可以观察到小细胞团（由10-50个细胞组成）的混合物，消化就完成了。

3. 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 300*g* 离心 3min。
4. 重复步骤 4 一次。
5. 吸弃上清液后，加入 10 mL 的肿瘤类器官基础培养基（TBM-500）重悬沉淀，使用细胞计数板对获得的肿瘤细胞悬液进行计数，计数完毕后在 4℃下，300*g* 离心 3 min，弃上清。

注意： 此步骤可加入台盼蓝染色，以确定获得的存活细胞数目。

6. 加入适量肿瘤细胞成球培养基进行重悬，随后以每孔 5~10x10^5 的密度接种于六孔低吸附培养板中。

注意： 步骤六孔低吸附培养板可选静置或置于摇床上培养，摇床转速可依照不同肿瘤细胞类型选择设置（0-100rpm）。

7. 密切监测细胞球的形成，每 2 天换一次液，换液时可将孔板倾斜 45 度，静置 1-3min，吸弃上清培养基及未聚集成球的单细胞。一般 3-5 天可见明显的细胞球形成。

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

Tumor cell spheroids were cultured with Tumor cell Spheroid Culture Medium (TCSM-100, SHR Biotechnology, Wuxi, China) according to manufacturer's instructions.

附录1 肿瘤细胞球培养过程例图

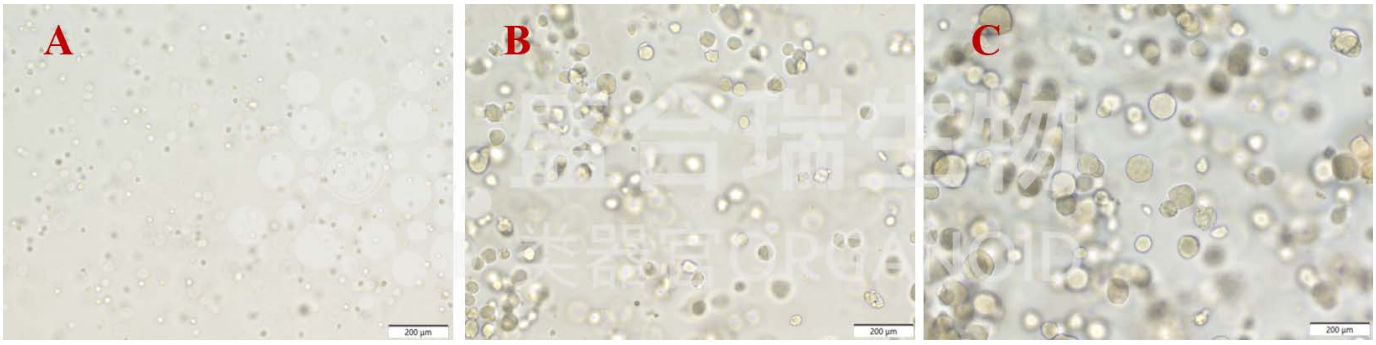


图1 肿瘤细胞球形成过程图

（A） 肿瘤细胞球原代培养D0天，可见单细胞为主；

（B） 肿瘤细胞球原代培养至第3天时，开始出现边界清晰的球体结构；

（C） 肿瘤细胞球原代培养至第8天时，类器官呈明显生长趋势。比例尺：200μm。

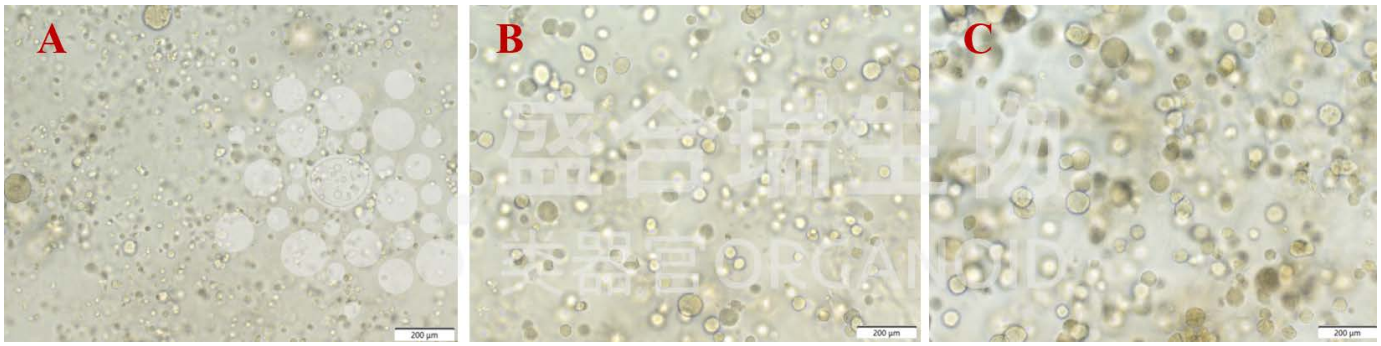


图2 肿瘤细胞球传代培养过程图

（A） 经机械吹打消化后的肿瘤细胞球在传代培养至第0天时，可见单细胞和较小细胞团为主；

（B） 继续培养至第3天，细胞球出现明显生长趋势，体积增大；

（C） 当生长至第8天，细胞球继续快速生长，直径可达150-200μm。比例尺：200μm。