Tumor organoid and T cell coculture Kit（肿瘤类器官与T细胞共培养试剂盒）

货号：TOCM-K100P

产品介绍:

肿瘤类器官与 T 细胞共培养试剂盒是一款专为肿瘤类器官免疫研究设计的培养试剂盒，支持患者来源的肿瘤类器官与自体 PBMC 的体外共培养，可高效诱导肿瘤反应性 T 细胞的生成，并实现肿瘤类器官与活化的自体 T 细胞的短期体外共培养。该试剂盒用于评估在药物测试体系下诱导的肿瘤反应性 T 细胞的浸润能力及其对自体肿瘤类器官的杀伤性能，适用于结直肠癌、胃癌、肺癌等多种类型的肿瘤类器官。

产品信息:

产品组成	货号	规格	储存条件及周期
Tumor reactive T cell expansion medium A	TOCM-K100P	50mL	4℃，6个月
Tumor reactive T cell expansion medium B(10X)		5mL	-20℃，1年
Tumor reactive T cell expansion medium C(250X)		0.2mL	-80℃，3个月
Tumor organoid and T cell coculture medium A		50mL	4℃，6个月
Tumor organoid and T cell coculture medium B(10X)		5mL	-20℃，1年
Tumor organoid and T cell coculture medium C(250X)		0.2mL	-20℃，3个月
Supplement D(500X)		0.1mL	-20℃，3个月
Supplement E(100X)		0.2mL	4℃，3个月

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

类器官传代消化液	SHRbio	OPD-100
肿瘤类器官基础培养基	SHRbio	TBM-500
肿瘤类器官完全培养基	SHRbio	咨询
PBS	-	-

肿瘤反应性 T 细胞扩增完全培养基、肿瘤类器官与 T 细胞共培养完全培养基的制备

在无菌条件下配制。以下是准备 10mL T 细胞维持培养基，肿瘤反应性 T 细胞扩增培养基，肿瘤类器官与 T 细胞共培养完全培养基的示例，如所需量不同，请进行相应用量调整。

1. 冰上解冻Tumor reactive T cell expansion medium B (10x)，Tumor reactive T cell expansion medium C (250x)，Tumor organoid and T cell coculture mediumB (10x)，以及Tumor organoid and T cell coculture medium C (250x)。

注意: 解冻后，建议将Tumor reactive T cell expansion medium B (10x)，Tumor reactive T cell expansion medium C (250x)，Tumor organoid and T cell coculture mediumB (10x)和Tumor organoid and T cell coculture medium C (250x)按需分装后保存取用，避免反复冻融。

2. 将 1mL Tumor reactive T cell expansion medium B (10x)加至 9mL Tumor reactive T cell expansion medium A 中，充分混合，配制成 10mL T 细胞维持培养基。
3. 将 1mL Tumor reactive T cell expansion medium B (10x)，40μL Tumor reactive T cell expansion medium C (250x)加至 8.96mL Tumor reactive T cell expansion medium A 中，充分混合，配制成 10mL 肿瘤反应性 T 细胞扩增培养基。
4. 将 1mL Tumor organoid and T cell coculture medium B (10x)，40μL Tumor organoid and T cell coculture medium C (250x)加至 8.96mL Tumor organoid and T cell coculture medium A 中，充分混合，配制成 10mL 肿瘤类器官与 T 细胞共培养完全培养基。

注意: 配制后的培养基可在2-8°C储存，建议在两周内使用。Tumor reactive T cell expansion medium A及Tumor organoid and T cell coculture medium A内含有细菌及真菌抗生素。

肿瘤反应性T细胞的扩增

注意: 使用肿瘤类器官和自体PBMC来刺激肿瘤反应性T细胞的扩增。涉及主要人体组织材料的研究必须遵循所有相关机构和政府法规。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、准备工作

1.1 肿瘤类器官预处理：取基质胶包裹的肿瘤类器官，加入含1X Supplement D的肿瘤类器官完全培养基刺激24-48h备用。

1.2 孔板预处理：将Supplement E溶解于PBS缓冲液配制成含1x浓度的包被工作液，在实施诱导前24h，将该工作液按照每孔200μL的量均匀加入96孔TC-U底板中进行包被处理。

1.3 与肿瘤类器官来源相同的PBMC准备

①对于液氮冻存的PBMC，在实施肿瘤反应性T细胞诱导前24h复苏，并使用T细胞维持培养基进行维持培养，并于诱导当天更换为肿瘤反应性T细胞扩增培养基；

②对于诱导当天分离提取的同一来源的新鲜PBMC细胞，直接将其重悬于肿瘤反应性T细胞扩增培养基。

2、肿瘤反应性T细胞诱导及扩增

2.1 肿瘤类器官解离为单细胞

将1.1步骤获取的肿瘤类器官使用类器官传代消化液（OPD-100）消化5分钟左右直至解离成单细胞，并重悬于肿瘤反应性T细胞扩增培养基，计数后备用。

2.2 共培养

按肿瘤类器官单细胞:PBMC=1:20（对应细胞数量为分别为5000、100000/孔）的比例接种到1.2 步骤预处理的96孔TC-U底板中，每孔补加入肿瘤反应性T细胞扩增培养基至200μL，在37℃、5% CO_2的培养箱中培养，培养过程中每隔2-3d进行补液或半量换液。

注意： 建议每次共培养至少使用1 x 10^6 PBMC。

2.3 重复刺激

每隔7天收集孔内悬浮细胞，转移至1.2步骤预处理的孔板中再次使用新鲜的肿瘤类器官单细胞（2.1步骤）实施共培养（2.2步骤）。

注意： 总刺激时长按照14d来算，鉴于肿瘤类器官的异质性，其特异性肿瘤反应性T细胞的扩增能力不一，一般可达3至20倍。研究者应根据淋巴细胞状态来调整实际培养时间，如果淋巴细胞状态不好，需及早处理。

肿瘤类器官与T细胞共培养

3、准备工作

3.1 肿瘤类器官预处理

在共培养24h前用包含1x Supplement D的肿瘤类器官完全培养基刺激基质胶包裹的肿瘤类器官以增强抗原提呈能力。

3.2 肿瘤反应性T细胞预处理

①对于在液氮中冻存的肿瘤反应性T细胞，建议于实施共培养前复苏，并使用T细胞维持培养基培养24h。

②针对新鲜制备的肿瘤反应性T细胞，可直接实施共培养。

3.3 共培养孔板预处理

在共培养前24h 用包含1x Supplement E的PBS缓冲液包被96孔未TC板。

4、肿瘤类器官与T细胞共培养

4.1 吸弃肿瘤类器官原培养液，加入1mL 4℃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，并将类器官和培养基的悬液转移至经过润洗液润洗的1.5mL EP管中。300g离心3min，弃上清。用肿瘤类器官与T细胞共培养完全培养基重悬类器官沉淀，每1mL培养基中含200-300个类器官。

4.2 将T细胞按照5x10^5个细胞/mL的浓度重悬于肿瘤类器官与T细胞共培养完全培养基。

4.3 将肿瘤类器官与T细胞按照不同的靶效比接种到1.3步骤预处理的96孔板中，使用肿瘤类器官与T细胞共培养完全培养基，在37℃、5% CO_2的培养箱中共培养2-3天。在该共培养体系中，可加入待测免疫治疗药物，以评估其对T细胞浸润能力以及肿瘤类器官杀伤效果的调控作用。

注意：

①为精准评估T细胞功能，建议在共培养前（4.3步骤）对肿瘤类器官或者T细胞进行荧光标记 (如CellTracker染料) 或凋亡指示剂（如caspase3/7活性染料），以实现动态过程监测。

②设置靶效比建议：如按照 1:5（肿瘤类器官:T细胞），即每孔接种含1×10^4个细胞的肿瘤类器官与5×10^4个T细胞。研究者可根据具体实验需求在一定范围内调整该比例。

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。