技术公告

使用IntestiCult™类器官生长培养基（人）培养癌症组织来源的类器官

癌症是全球主要的死亡原因之一，而大肠癌是最常见的癌症类型之一。尽管肿瘤细胞系和动物模型已经揭示了许多有关肠道癌的信息，但从癌症样本来源的肠道类器官可以更真实地重现起源肿瘤的组织结构、细胞异质性和形态[1]。因此，癌症来源的类器官被证明可以可以用于研究癌症生物学的有用实验模型，包括疾病进展以及受影响的信号通路和肿瘤微环境[2]。癌症样本来源的类器官还可以实现更多的转化医学应用，例如激活和扩增肿瘤反应性T细胞群体，预测患者特定的治疗结果，并筛选潜在的治疗药物[3, 4]。

在本技术操作手册，我们描述了如何使用IntestiCult™类器官生长培养基（人）（IntestiCult™ OGMH；产品号 #06010）培养Wnt-independent（不依赖于Wnt）的癌症样本来源的肠类器官。查阅完整实验流程，请配合IntestiCult™产品说明书（PIS；文档号 #DX21423）一起使用，包括如何从人的活检样本中分离出结肠隐窝（colonic crypts），从分离的肠隐窝建立肠类器官的培养体系，以及如何通过传代对肠类器官的培养体系进行扩增和维持培养。

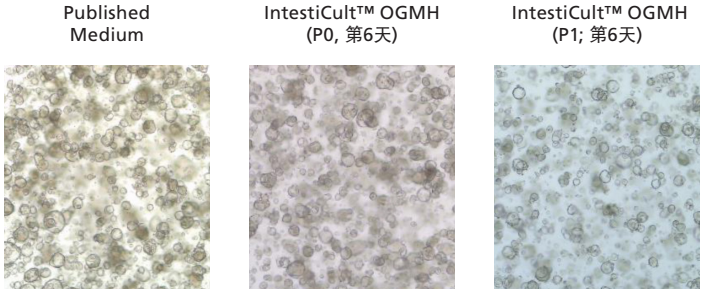


图1. 在IntestiCult™ OGMH中生长的癌症样本来源的类器官

使用发表文献中的培养基1建立源于结肠癌活检样本的类器官，后转换至IntestiCult™ OGMH（P0），详细描述参下。癌症样本来源的类器官在IntestiCult™ OGMH中表现出强劲的生长速率，且不受传代影响。实验数据来源于Hubrecht Organoid Technology，经许可后使用。

操作流程

下述操作流程与Hubrecht Organoid Technology合作开发，用于在IntestiCult™ OGMH培养Wnt-independent结肠癌样本来源的肠类器官。本操作流程不适用于没有携带Wnt信号通路活化突变的肿瘤。

A. 培养基制备

以下为制备100 mL IntestiCult™ OGMH用于培养Wnt-independent癌症样本来源的类器官（IntestiCult™ OGMH组分A + DMEM/F-12 with 15 mM HEPES；若仅购买IntestiCult™ OGMH组分A，请联系我们的客服部门）。如需配置其他体积，请进行相应调整。

1. 于室温（15 - 25℃）解冻IntestiCult™ OGMH组分A或过夜2 - 8℃解冻。混合均匀。立即使用或分装后于-20℃保存最多3个月。分装后的培养基重新解冻后，需马上使用。切忌反复冻融。
2. 混合50 mL IntestiCult™ OGMH组分A和50 mL DMEM/F-12 with 15 mM HEPES。混合均匀。如果不立即使用，可于2 - 8℃储存最多一周。
3. 使用前加入所需的抗生素（例如，50 µg/mL庆大霉素）。

B. 从肿瘤活检样本中分离组织

1. 冰上解冻100 µL Matrigel®。
   注意： *这足够4个培养domes（液滴）的用量。*
2. 将下列试剂置于冰上：D-PBS（不含Ca++和Mg++），DMEM + 1% BSA（配置方法查阅PIS[文档号 #DX21423]）
3. 将经组织培养处理的（tissue culture-treated）24孔板在37℃培养箱预热至少2小时。
4. 在15 mL离心管中，使用10 mL冰冷的PBS清洗组织样本。通过重力沉降组织（约5秒），吸除上清液。
5. 重复第4步，管中保留1 mL上清液。
6. 使用1 mL枪头将组织和剩余的上清液转移至一个1.5 mL EP管中。
7. 使用无菌剪刀，将组织切碎成约5mm的小块。使用1 mL枪头将组织小块转移至新的15 mL离心管中。用PBS清洗EP管，一并转移至离心管中。
8. 重力沉降组织小块（约5秒），吸除上清液。
9. 加入10 mL温和细胞解离试剂。在中速（约40 rpm）的水平摇床上以37℃孵育60分钟。
10. 以290 x g，离心5分钟。吸除上清液。
    注意： *接下来的所有步骤，枪头需使用DMEM + 1% BSA预先湿润，才可操作样本。这可避免隐窝黏附在枪头壁上造成样本流失。*

11. 加入1 mL冰冷的DMEM + 1% BSA。使用1 mL枪头剧烈上下吹打20次。
    注意: *避免枪头接触到管底。*
12. 使用一个1 mL的枪头，将管中的样品通过70 µm细胞筛网转移至一个新的15 mL离心管中。并使用1 mL DMEM + 1% BSA润洗细胞筛网。

C. 从分离的活检组织中进行类器官培养

有关如何将分离的组织接种成为类器官培养物的完整说明，请查阅PIS（文档号 #DX21423）的B部分，第2步。当使用从癌症组织来源的样本时，使用本操作步骤A部分中配置的培养基，而不是完全培养基IntestiCult™ OGMH。

生长培养基需每两天更换一次，培养体系每隔6 - 12天传代一次。有关传代流程的完整说明，请参阅PIS（文档号 #DX21423）。当使用从癌症组织来源的样本时，使用本操作步骤A部分中配置的培养基，而不是完全培养基IntestiCult™ OGMH。

产品信息

产品	产品号 #
IntestiCult™类器官生长培养基（人）	06010
DMEM/F-12 with 15 mM HEPES	36254
Corning® Matrigel® Matrix, Growth Factor Reduced (GFR), Phenol Red-Free	Corning® 356231
温和细胞解离试剂，GCDR	07174
D-PBS（不含Ca++和Mg++）	37350
CryoStor® CS10	07930
70 µm Reversible Strainer, Small	27216
Costar® 24-Well Flat-Bottom Plate, Tissue Culture-Treated	38017

参考文献

1. Sato T et al. (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology. 141(5): 1762–72.
2. Fujii M et al. (2016) A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. Cell Stem Cell. 18(6): 827–38.
3. Dijkstra K et al. (2018) Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. Cell. 174(6): 1586–98.
4. Vlachogiannis G et al. (2018) Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. Science. 359(6378): 920–26.

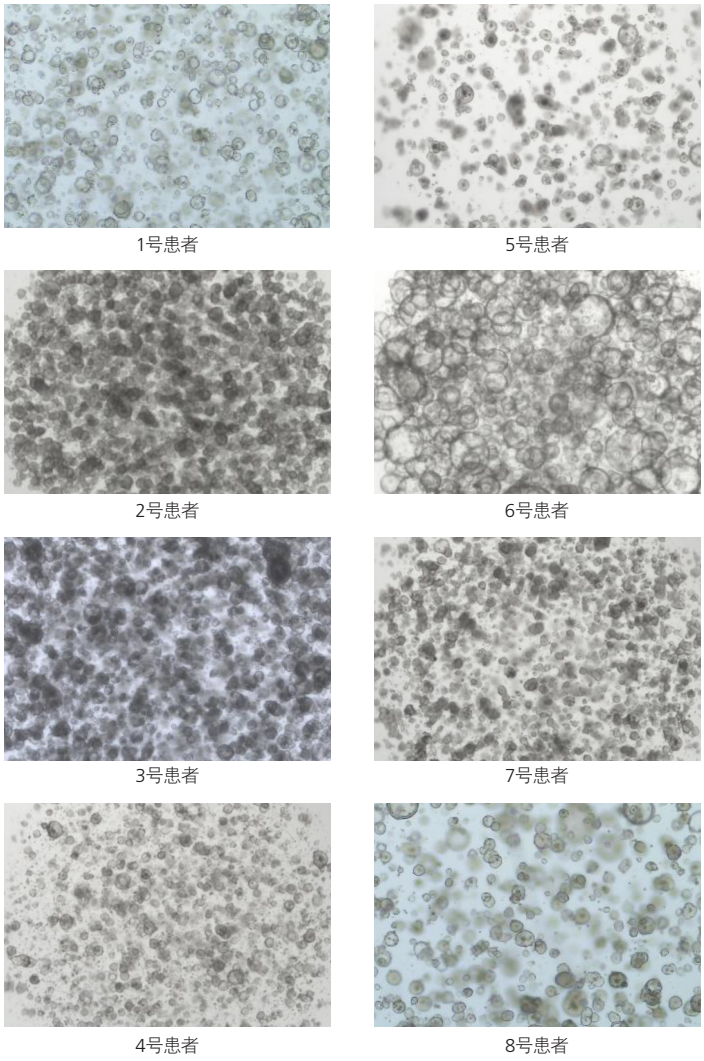


图2. IntestiCult™类器官生长培养基（人）支持从多个患者样本来源的类器官的生长

使用发表文献中的培养基[1]建立源于结肠癌活检样本的类器官，经上述方法传代后转换至IntestiCult™ OGMH。类器官在IntestiCult™传代2次后，在第2代结束时进行成像（第6-12天）。实验数据来源于Hubrecht Organoid Technology，经许可后使用。

补充操作流程

访问以下网址查看关于人肠类器官培养的更多流程。
www.stemcell.com/intesticult-supplementary-protocols

科学资源

了解更多关于类器官及其应用
www.stemcell.com/organoids

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2020。保留一切权利，包括图形和图像。STEMCELL Technologies和其设计及徽标，以及Scientists Helping Scientists，IntestiCult均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。Corning和Matrigel是Corning Inc的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。本产品是根据The Hubrecht Organoid Technology Foundation（" HUB"）拥有的知识产权许可开发的。本产品仅用于研究目的。购买此产品不包括将本产品用于为商业目的或其他商业目的使用类器官进行药物筛选的权利。希望将产品用于科研用途以外的购买者，应联系HUB以获得进一步的许可证（"Organoid-Growth License"）。购买者可以向HUB申请许可证，并且HUB不会无故扣留该许可证。尽管STEMCELL尽一切努力保证STEMCELL及其供应商提供的信息正确，我们免除此类信息准确性或完整性的声明及保证。

STEMCELL Technologies Inc.的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用。除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

STEMCELL™ TECHNOLOGIES

STEMCELL Technologies China Co. Ltd.
电话：400 885 9050　E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM　网站：WWW.STEMCELL.COM
微信ID: STEMCELLTech

文档号 #27161CN　版本 1.0.0　2020年03月