**创芯类器官药敏方法及设备**

**一、药敏SOP**

1、类器官药敏检测板制备：类器官消化后进行细胞计数，根据计数结果取胶原P与细胞悬液按1:1的比例混匀铺至预冷的384孔板中，每孔10ul,作为含有类器官的样本孔。取胶原P与类器官培养基按1:1的比例混匀铺至同一384孔板中，作为不含类器官的空白组。接种完成后放置于培养箱凝固30min，取出加入类器官培养基后拍照记录，置于培养箱培养。

2、药物接触：待类器官在药敏检测板中培养72小时后，按照下表进行加药处理并拍照记录：

空白组 不含类器官的孔为空白孔，每个板设置6复孔，不添加药物，补充培养基；

阴性对照组 接种有类器官的孔，不添加药物接触，补充培养基；

药物测试组 接种有类器官的孔，添加药液。

3、药敏检测：

1）加药培养96h后，取出拍照并进行药敏检测。

2）机器质控：用ATP制作一条标准曲线，ATP最高浓度为1000nM，进行4倍梯度稀释，共6个浓度梯度，添加发光试剂，进行酶标仪检测，制作标准曲线，要求R2＞0.99；

3）样本检测、分析：在样本检测时同上操作，在培养板上制作一条标准曲线。往药敏检测板上加入发光试剂后，使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。检测完成后，导出数据做好相关标记发送分析。

**二、仪器**

|  |  |
| --- | --- |
| **仪器名称** | **参考品牌** |
| 生物安全柜 | BSC-II1500A2 |
| CO2培养箱 | C1-191C |
| 低速离心机 | Beckman Coulter |
| 医用双温冰箱 | ZLN-UT300 |
| 倒置显微镜 | OLYMPUS |
| 化学发光微孔读板机 | LUMIstar Omega |

**三、试剂**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称** | **参考品牌** |
| 凝胶消化液 | Accuroid |
| AccuMatrix | Accuroid |
| 专用癌种培养基 | Accuroid |
| Hank’s 平衡盐溶液 | 上海源培生物 |
| 发光增强液 | Accuroid |
| 发光试剂 | Accuroid |

**四、耗材**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗 材** | **耗 材** | **耗 材** |
| 15ml离心管 | 吸水纸 | 一次性手套 |
| 60mm培养皿 | 离心管制冷载体 | 一次性帽子 |
| 1ml枪头 | 加样槽制冷载体 | 一次性口罩 |
| 200ul枪头 | 冰盒 | 一次性鞋套 |
| 10ul加长枪头 | 75%医用酒精 |  |