

# 类器官

稳健培养脑、肠、肝和  
胰腺类器官的培养基



## 目录

- 4 [简介](#)
- 5 [肠类器官](#)
- 6 [IntestiCult™类器官生长培养基 \(小鼠\)](#)
- 7 [IntestiCult™类器官生长培养基 \(人\)](#)
- 8 [IntestiCult™ 类器官分化培养基 \(人\)](#)
- 12 [STEMdiff™肠类器官试剂盒](#)
- 14 [肝类器官](#)
- 14 [HepatiCult™类器官生长培养基 \(小鼠\)](#)
- 17 [胰腺类器官](#)
- 17 [PancreaCult™类器官生长培养基 \(小鼠\)](#)
- 21 [肾脏类器官](#)
- 21 [STEMdiff™肾脏类器官试剂盒](#)
- 23 [呼吸道类器官](#)
- 23 [PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒](#)
- 26 [脑类器官](#)
- 26 [STEMdiff™脑类器官试剂盒](#)
- 28 [产品信息和参考资料](#)

过去的十年里,类器官技术是干细胞研究中最重要进展之一。类器官为三维的细胞培养物,重现了所代表器官的一些关键细胞类型和结构特征。这些“迷你器官”提供了高度相关的组织建模,从而使科学家可在体外研究复杂的学术问题。自从肠类器官<sup>1</sup>和脑类器官<sup>2</sup>的文献发表以来,类器官技术应用于多种物种和组织,可从成体干细胞(ASCs)或多能干细胞(PSCs)衍生构建。

虽然每种细胞培养系统都不同,类器官通常具有多种器官特异性的细胞类型,可重现所代表器官的功能。在类器官培养中,干细胞(PSCs或ASCs)在模拟体内信号环境的信号因子环境下进行培养。干细胞在该环境下增殖并分化为代表器官的细胞类型。总体来说,类器官具有与体内环境类似的结构,如顶侧和底侧表面的极化现象(上皮类器官),细胞分层现象(脑类器官)或复杂区域的重建(如小鼠肠类器官的隐窝绒毛结构)。在上皮类器官中,培养物中具有活跃增殖的成体干细胞,可以通过传代对培养物进行长期维持培养和扩增。

类器官已快速且广泛的应用于多项应用中,包括基础研究、转化医学和工业用途。类器官技术的根本在于发育生物学,所以类器官对其所模拟的组织提供宝贵的发育信息,尤其是PSC衍生的类器官。由于类器官重现了体内的信号通路和细胞间的相互作用,是研究细胞生物学中的宝贵模型,包括研究组织再生机制、干细胞niche的维持培养以及细菌、病毒和其他组织来源细胞的相互作用。

类器官具有其特有的实验优势,它去除了动物模型可能引入的混淆变量,但与均一化的细胞培养物相比,则提供更高度的复杂性。通过结合高水平的生理相关性与体外操作的便宜性,在许多情况下,类器官具有辅助或替代体外使用原代细胞或永生细胞系和动物实验的潜力。另外,类器官在培养中具有高度基因稳定性,维持了来源组织的基因型与表型。因此,类器官可进行疾病建模,用于研究疾病机制和进展,以及预测患者对药物治疗的个体化反应。

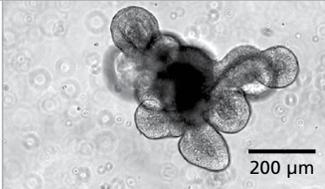
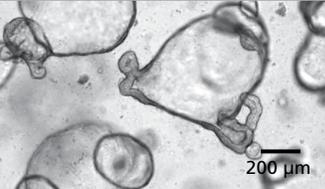
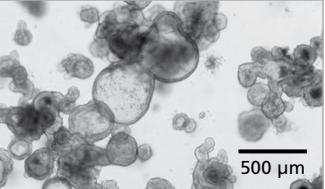
类器官方法的持续发展为干细胞研究带来了改革。在很多实验室,类器官已经用于互补现有的建模,用于开展曾经无法研究的方向。类器官培养技术的发展和标准化会使得类器官的可及性更广泛地实现。

肠类器官含关键性的肠细胞类型, 包括肠上皮细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞和肠干细胞, 再现了肠上皮的生理结构。位于肠类器官内的活跃分裂的干细胞群保证这些类器官的长期稳定扩增和传代。

IntestiCult™类器官生长培养基 (小鼠) 和IntestiCult™类器官生长培养基 (人) 分别支持小鼠ASC和人ASC衍生的肠类器官的构建和长期维持培养。STEMdiff™肠类器官试剂盒可用于从人多能干细胞

直接分化为肠类器官, 通过3个阶段的分化, 这些肠类器官可以在STEMdiff™肠类器官生长培养基中进行维持培养和成熟。使用这些培养基可方便、灵活的构建实验所需的肠类器官, 提高实验的稳定性, 降低实验动物的使用。

表1. 肠类器官培养系统的比较

肠类器官类型	小鼠 (源于ASC)	人 (源于ASC)	人 (源于PSC)
代表性图像			
类器官细胞构成	类器官同时包括活跃的肠干细胞群和一群终末分化的细胞, 重现了体内成熟的肠上皮系统。	经过1-3次传代的类器官主要包含处于肠祖/干样状态的细胞, 类器官可后续在适宜的培养基中分化为成熟的肠道细胞类型。	类器官同时包括活跃的肠干细胞群, 终末分化的肠道上皮细胞类型和相关的间充质细胞。类器官为胎儿表型。
起始样本	<ul style="list-style-type: none"> <li>小鼠小肠或结肠隐窝</li> <li>小鼠肠类器官 (产品号 #70931)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>人小肠或结肠隐窝</li> <li>已构的ASC来源的肠类器官</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>人诱导多能干细胞 (iPSC) 或胚胎干细胞 (ES)</li> <li>已构建的PSC来源的肠类器官</li> </ul>
类器官维持培养	类器官可以被长期传代或冷冻保存。	类器官可以被长期传代或冷冻保存。	类器官可以被长期传代或冷冻保存。
遗传学考量因素	<ul style="list-style-type: none"> <li>已制定的健康和疾病模型</li> <li>体内遗传操作的工具</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>具有供体特异的遗传学背景</li> <li>可体外进行基因编辑</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>具有供体特异的遗传学背景</li> <li>可体外进行基因编辑</li> </ul>
适宜使用的培养基	IntestiCult™类器官生长培养基 (小鼠) (产品号#06005)	IntestiCult™类器官生长培养基 (人) (产品号#06010) IntestiCult™类器官分化培养基 (产品号#100-0214); 用于对类器官进行3D、单层浸没/气液界面 (ALI) 分化。	STEMdiff™肠类器官试剂盒 (产品号#05140) STEMdiff™肠类器官生长培养基 (产品号#05145)

# IntestiCult™类器官生长培养基（小鼠）

## 用于小鼠肠类器官的构建和维持培养

IntestiCult™类器官生长培养基（小鼠）是首个完全的、且成分确定的，用于培养小鼠肠类器官的生长培养基。使用该培养基，研究人员可以在五到七天的时间内轻松培养出适用于实验的、可繁殖的类器官。IntestiCult™可实现对小鼠肠上皮类器官的有效建立、扩增和长期维持培养。

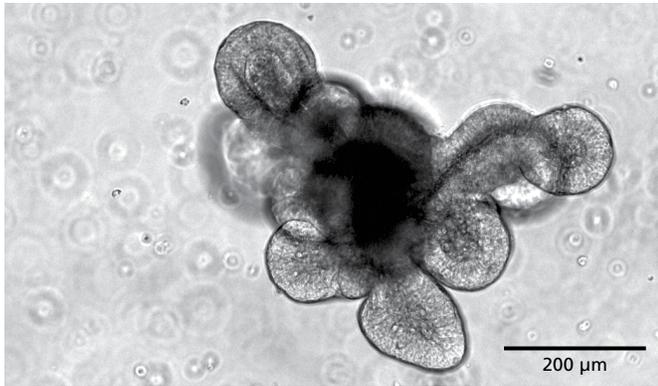


图1. 一个小鼠肠类器官的光学显微镜成像

在IntestiCult™类器官生长培养基（小鼠）培养的第0代小鼠肠类器官，在培养的第5天进行成像。

## IntestiCult™类器官生长培养基（小鼠）的优势

**生理相关性。** 生成的肠类器官可重现成体肠道上皮的特性和组织。

**高效。** 在不到一周的时间内从小鼠肠隐窝生成肠类器官。

**简单。** 规格简单、浅显易懂的优化步骤。

**无血清。** 优化后的配方提高了了实验的重现性。

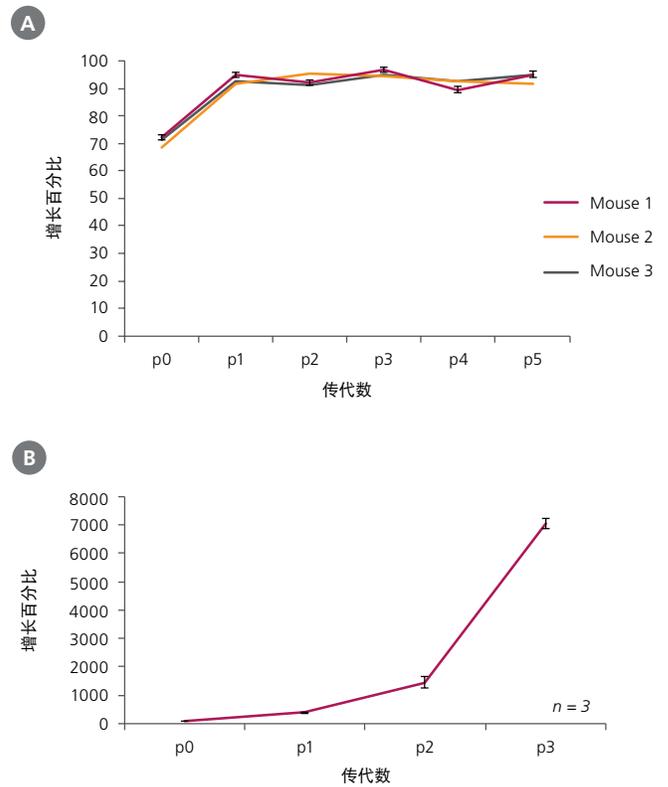


图2. IntestiCult™类器官生长培养基（小鼠）支持类器官的构建和有效扩增

(A) 已建立的类器官可通过传代（无限）进行有效扩增。(B) 从含有100个类器官的单孔开始，以1:4进行传代，则类器官计数可在每次传代实现平均4.2倍的增长。

# IntestiCult™类器官生长培养基（人）

## 用于人肠类器官的构建和维持培养

IntestiCult™类器官生长培养基（人）是一种完全的培养基，用于从原代的肠或结肠隐窝或之前冷冻的结肠类器官有效地建立肠类器官以及对其进行长期的维持培养。不到一周的时间，即可观察到类器官，每7到10天传代一次以进行维持培养和扩增。

### IntestiCult™类器官生长培养基（人）的优势

**高效。**不同的供体样本来源的类器官均可实现肠干细胞的高效扩增。

**生理相关性。**肠类器官可重现成体肠道上皮的特性和组织。

**完全。**双组分完全培养基，不需要添加其他细胞因子或者生长因子。

**稳定。**培养基经过严格的质量控制，保证实验批次及不同实验室间的稳定性。

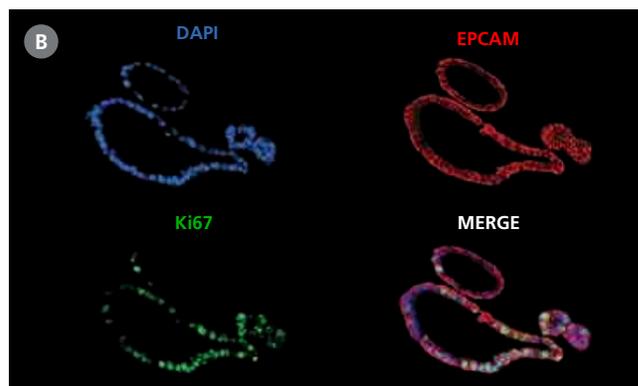


图3. 在IntestiCult™类器官生长培养基（人）中生成的人结肠类器官

(A) 在IntestiCult™类器官生长培养基（人）中培养的第0代人结肠类器官，在培养的第7天进行成像。(B) 荧光染色肠类器官结果显示成熟上皮细胞标志物（EPCAM，红色）以及增殖活跃的肠祖细胞（Ki67，绿色）。

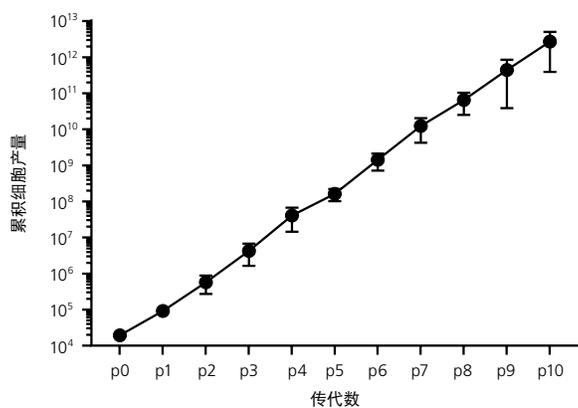


图4. 肠类器官可以通过传代实现长期维持培养

在IntestiCult™类器官生长培养基（人）在传代过程中保持稳健生长。平均传代比例为1:6。误差线代表标准误差。

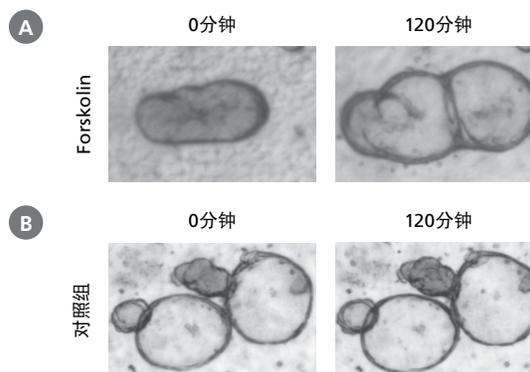


图5. Forskolin诱导的肠类器官膨胀实验

使用 (A) 5μM Forskolin 或 (B) DMSO 处理在 IntestiCult™ 类器官生长培养基（人）中培养的类器官。在 0 分钟和 120 分钟时测量类器官面积。与对照组类器官  $7.5 \pm 0.8\%$  增长相比，经 Forskolin 处理的类器官的大小增加了  $33.5 \pm 3.8\%$  ( $n=3$ )。图中所示为代表性图像。

# IntestiCult™类器官分化培养基（人）

## 用于肠类器官分化的完全培养基

IntestiCult™类器官分化培养基（人；ODM）是一种完全培养基，支持肠类器官在三维（3D）或二维（2D）浸没单层或气液界面（ALI）培养中的进一步分化。这些培养物可以从来自人肠道隐窝的肠类器官，或通过用IntestiCult™类器官生长培养基（人；OGM；产品号#06010）培养的一类器官。

### IntestiCult™类器官分化培养基的优势

**生理相关性。** 得到的肠类器官培养物具有分化和干细胞群的生理比例。

**灵活。** 允许通过转化为单层和ALI培养的肠类器官体系，方便作用于顶端表面

**重现性高。** 在不同的代数和重复中产生一致的结果。

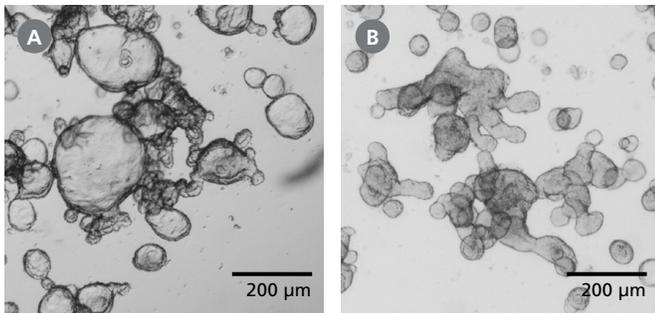


图6. 分化后的人肠类器官显示出芽状形态

(A) IntestiCult™ OGM中生长的类器官主要是囊泡状的。(B) 当切换到IntestiCult™ ODM时，类器官上皮增厚，并具有明显的出芽，表明更多的分化状态。类器官分别在扩增或分化的第5天进行成像。

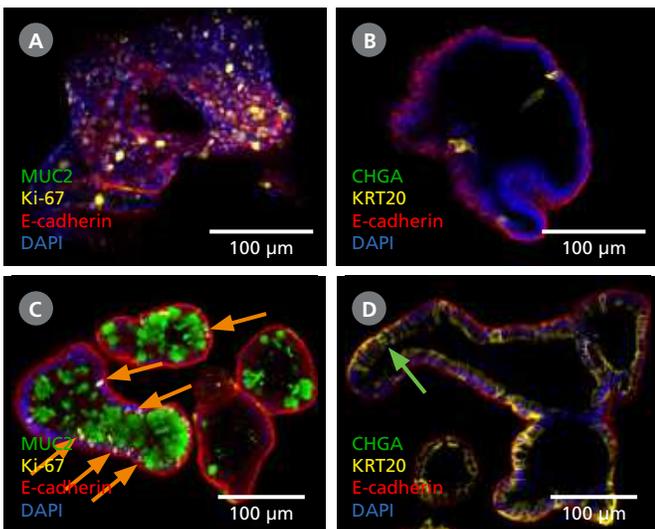
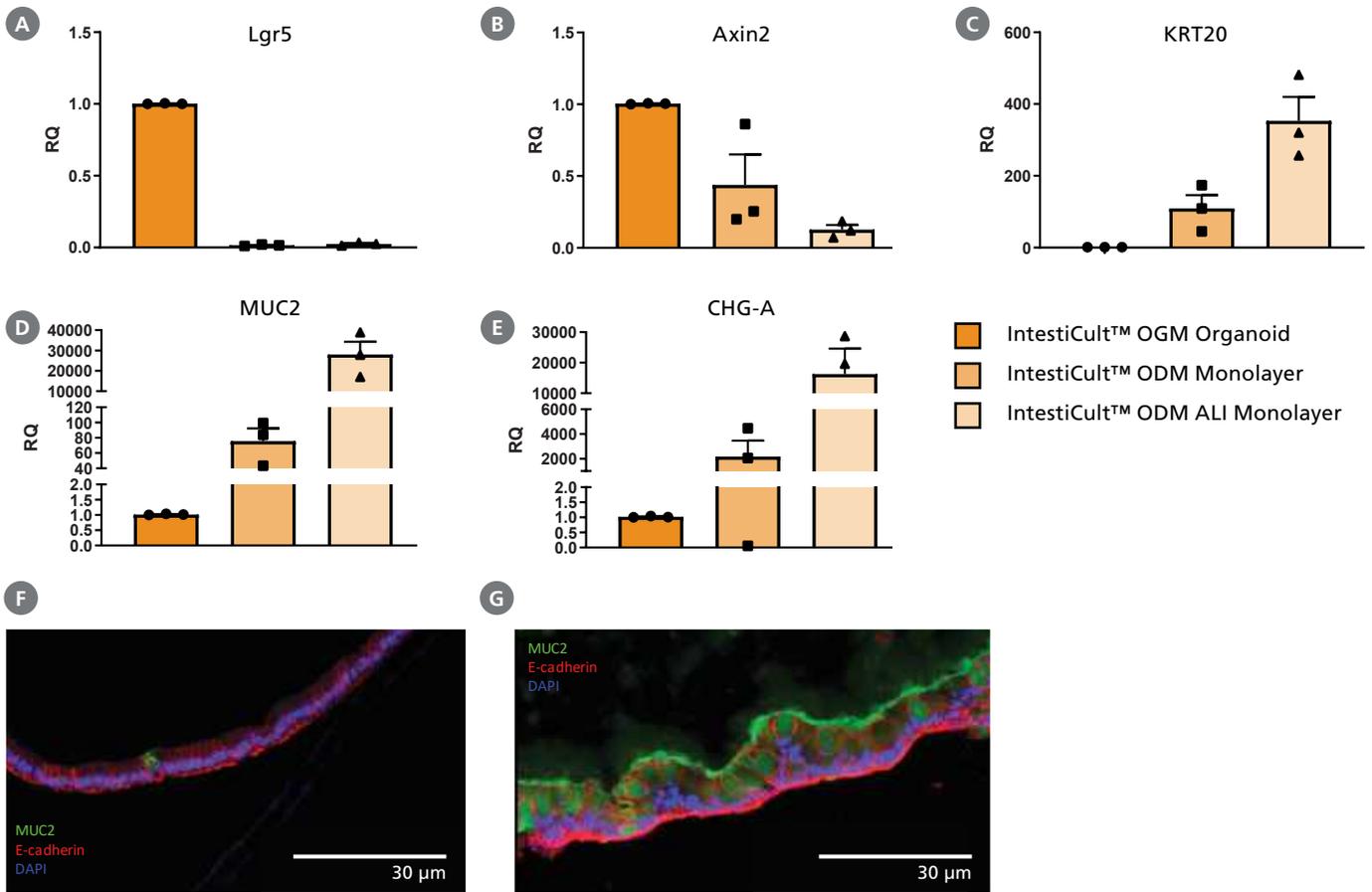


图7. 肠类器官在IntestiCult™ ODM中分化后含有较高比例的成熟细胞类型

(A, B) 在IntestiCult™ OGM中生长的类器官富含Ki-67+增殖细胞(A)，同时含有很少的分化细胞类型，如杯状细胞(MUC2, A)、肠上皮细胞(KRT20, B)和肠内分泌细胞(CHGA, B)。(C, D) 当切换到IntestiCult™ ODM时，类器官中含有少量Ki-67+增殖细胞(C, 箭头)，杯状细胞(MUC2, C)、肠上皮细胞(KRT20, D)和肠内分泌细胞(CHGA, D, 箭头所指处)的比例更高。



**图8. 使用IntestiCult™ ODM对气液界面(ALI)的肠上皮体系进行分化。**

(A - E) 将类器官来源的单层体系使用ALI的方式培养, 可以促进肠上皮培养物的进一步分化, 使用RT-qPCR检测基因表达水平。每个标记的相对定量 (RQ) 是相对于actB和TBP管家基因显示的, 并且相对于在IntestiCult OGM (人) 中生长的未分化的类器官进行了标准化。在浸没培养和ALI培养的单层体系中, 祖细胞标记物 (A) Lgr5和 (B) Axin2的表达量显著下降, 而肠上皮细胞 (KRT20, C), 杯状细胞 (MUC2, D) 和肠内分泌细胞 (CHGA, E) 显著上调。在ALI单层培养体系中, Axin2进一步减少, KRT20、MUC2和CHGA的表达增加。(F, G) 比较在IntestiCult™ ODM中生长的类器官单层的横截面, 作为 (F) 淹没或 (G) ALI的培养体系显示了肠上皮细胞的进一步分化与杯状细胞和细胞外粘液 (MUC2, 绿色) 的比例增加。

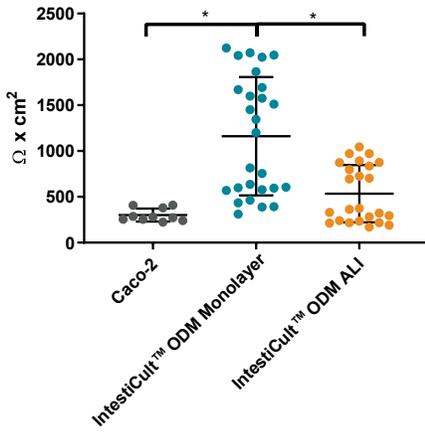


图9. 相比于Caco-2的细胞，分化的类器官来源的单层体系和ALI培养体系显示更高的生理性跨上皮电阻（TEER）

使用ALI方法培养的类器官来源的单层体系的紧密连接由于体系的进一步分化弱于浸没状态培养的单层，因此TEER值较低。\*  $p < 0.0001$

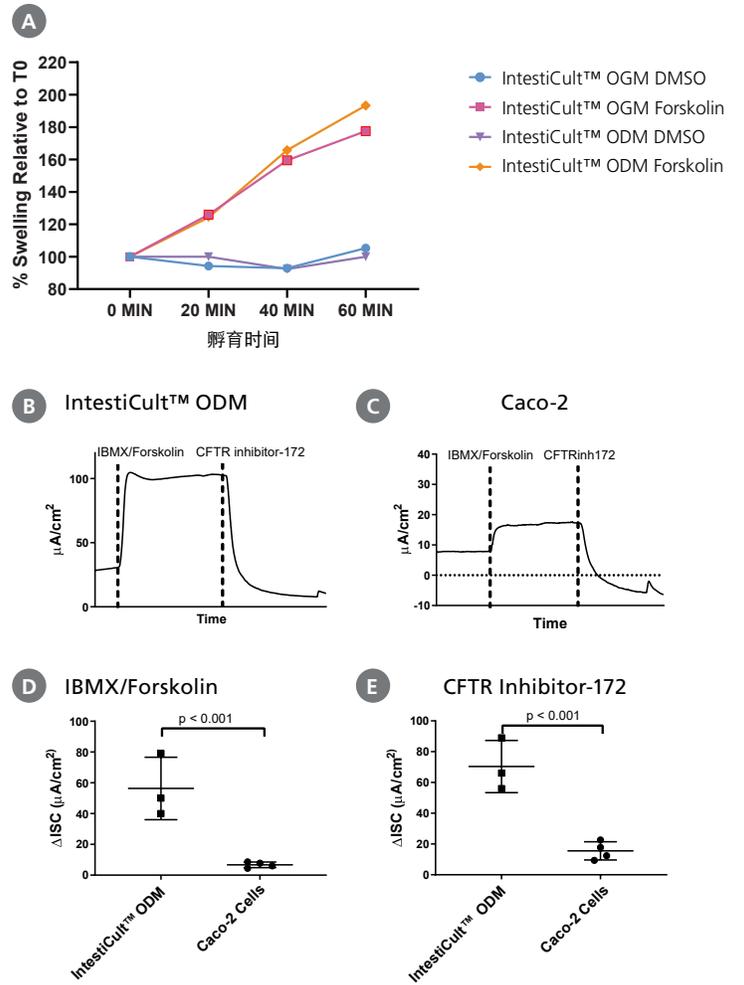


图10. 分化后的肠类器官为研究CFTR的体外反应提供了合适的模型

(A) 在IntestiCult™ ODM中进一步分化的类器官与在IntestiCult™ OGM中生长的类器官相比，用forskolin处理时显示出相当程度的膨大，这表明适合于forskolin诱导的膨大试验。(B - E) 使用Ussing室分析浸没培养的(B) 类器官来源的单层和(C) Caco-2培养物，类器官来源的单层体系对IBMX/Forskolin诱导的CFTR的激活和CFTR Inhibitor-172介导的抑制更加敏感。(D, E) 通过IBMX/ Forskolin和CFTR Inhibitor-172对CFTR调控的分析显示，与Caco-2培养物相比，类器官来源的单层中CFTR的(D) 激活和(E) 抑制显著增加 ( $P < 0.001$ )。

# STEMdiff™肠类器官试剂盒

## 用于分化PSC衍生的人肠类器官的培养基试剂盒

STEMdiff™肠类器官试剂盒用于在30天内有效的从胚胎干细胞 (ESCs) 或诱导多能干细胞 (iPSCs) 构建小肠类器官。本试剂盒不含血清, 配方基于Spence等<sup>2</sup>发表的配方, 并对其进行了优化, 提高了类器官形成和扩增的效率和实验的重现性。STEMdiff™肠类器官生长培养基可用于对肠类器官进行长期的维持培养和传代。

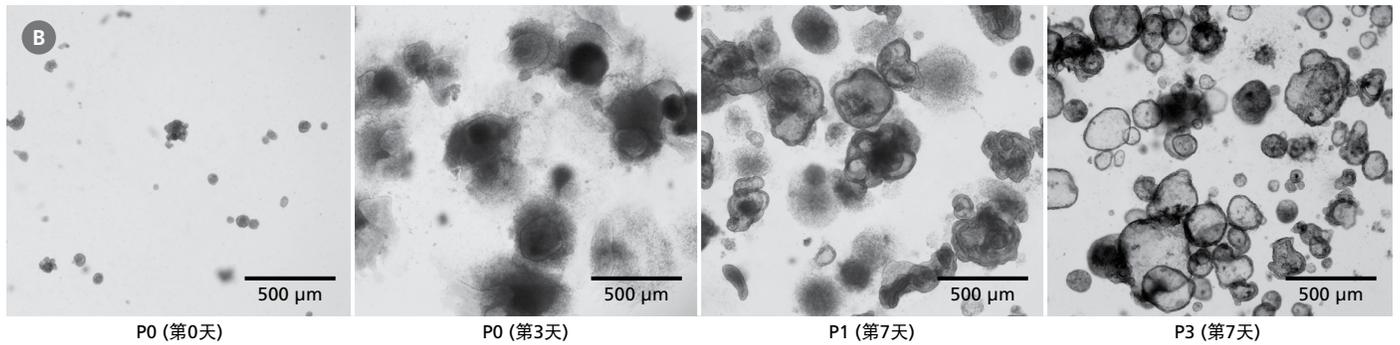
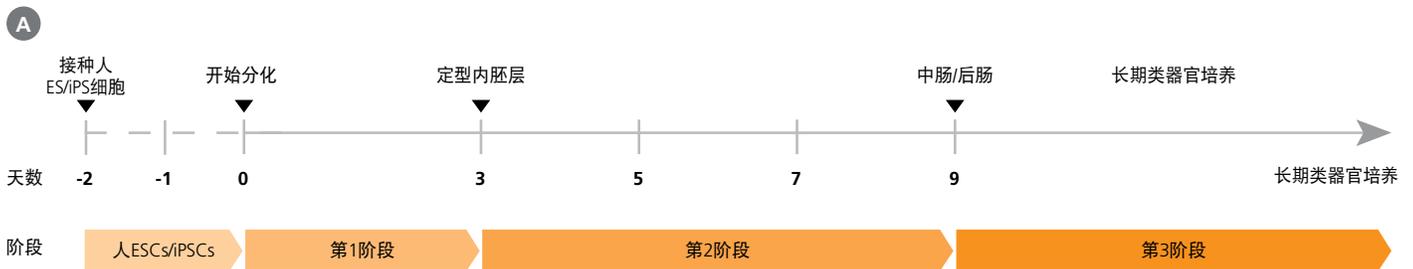
### STEMdiff™肠类器官试剂盒的优势

**生理相关性。**小肠类器官可模拟发育中的肠道上皮和相关的间充质系统。

**高效。**支持从人ESC和iPSC细胞系高效分化为肠类器官。

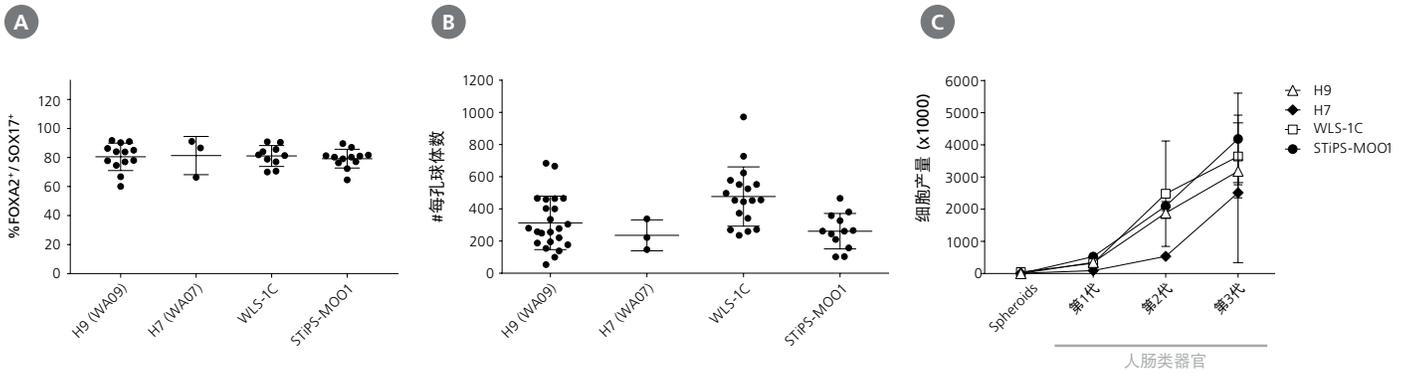
**方便。**肠类器官可以通过传代以维持长期培养或将其进行冷冻保存, 提高了实验的灵活性。

**无血清。**优化的配方提高了实验的一致性。



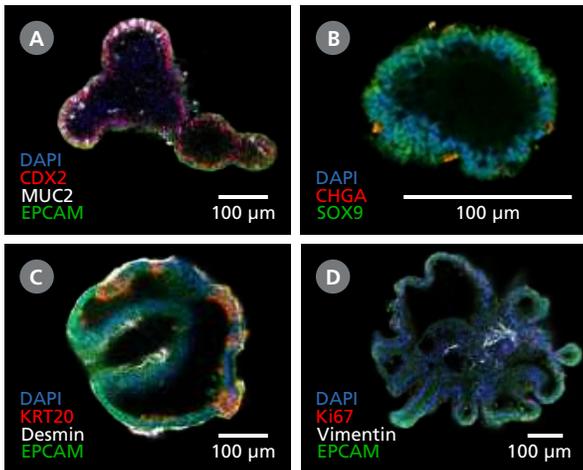
**图11.** STEMdiff™肠类器官试剂盒支持从hPSCs分化为人肠类器官

从hPSC分化为人肠类器官需要经过三个阶段。在培养的第3天, 培养物表现出典型的定型内胚层分化特性和开始进行中/后肠分化。在中/后肠分化期间 (第5-7天), 细胞形成中/后肠的球体, 从细胞单层释放至培养基中。将这些球体收集, 用胞外基质包裹, 并在STEMdiff™肠类器官生长培养基中进一步培养成熟为肠类器官。



**图12. STEMdiff™肠类器官试剂盒支持从多个ESC和iPSC细胞系有效构建和扩增肠类器官**

STEMdiff™肠类器官试剂盒支持从ESCs (H9, H7) 和iPSCs (WLS-1C, STIP5-MOO1) 高效构建和扩增肠类器官。(A) 从不同细胞系来源的类器官都显示有效地定向内胚层分化的表现, 包括在分化第3天时FOXA2和SOX17的共表达。(B) 源于ESC和iPSC的培养物都表现出中/后肠诱导的有效球体形成。图中所示为每孔得到的球体总数。(C) 从ESCs或PSCs来源的类器官都可以被长期传代扩增。图中所示为每代的细胞得率。类器官每7-10天传代, 传代比例在1: 2到1: 4。每个数据点都是3次生物重复实验的平均值。误差线代表平均值的标准差。



**图13. 使用STEMdiff™肠类器官生长培养基培养的肠类器官的特征**

使用免疫细胞化学染色对肠类器官进行染色和标志物的表达。(A、B) 肠类器官表达肠祖细胞的标志物CDX2和肠隐窝标志物SOX9。这些类器官由极化性的上皮组成, EPCAM位于类器官的外侧(基底外侧)表面(A), 且表达成熟细胞类型的典型标志物, 包括MUC2 (A: 杯状细胞) 和CHGA (B: 内分泌细胞)。(C、D) desmin (C) 和vimentin (D) 的阳性表达显示类器官中也包括有间充质细胞, 而KRT20 (C) 和Ki67 (D) 分别是已分化的肠道细胞和推定的肠干细胞的标志物。图片为对的整个免疫荧光染色的肠类器官(培养至P28第7天)的横截面。

肝类器官培养技术的发展为肝脏研究领域提供了体外维持肝细胞持续培养的便捷方法<sup>4, 5</sup>。肝祖细胞类器官的培养源于祖细胞的扩增, 祖细胞被认为位于肝管内。肝祖细胞形成的球状类器官, 主要由祖细胞构成, 转移至分化培养基后, 可进一步分化为肝细胞和胆管细胞<sup>6</sup>。

## HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）

### 构建和培养小鼠肝类器官的细胞培养基

HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）是一种无血清的培养基, 可以从小鼠肝脏组织快速生成肝祖细胞类器官。起始样本可来源于肝管、肝管小段、单个细胞或冷冻保存的类器官, 并在Corning® Matrigel®液滴 (domes) 中培养, 或在含有稀释的Matrigel®培养基中进行悬浮培养 (suspension)。

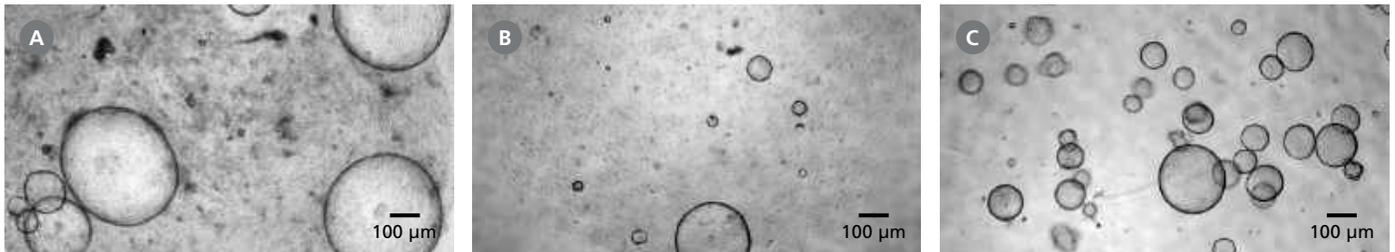
#### HepatiCult™的优势

**方便。**一周内即可在体外生成类器官。

**清晰的标准操作流程。**无需使用肝损伤小鼠模型, 无需手工挑选肝管或进行细胞分选。

**简单, 双组分。**不含血清, 培养基成分确定。

**灵活。**起始样本可来源于肝管小段或单个细胞, 培养方法可使用胞外基质凝固液滴 (matrix dome) 或悬浮培养。



**图14.** 小鼠肝祖细胞类器官可来源于各种起始样本

无论是从(A) 肝管小段(B) 单个细胞或(C) 冷冻保存的类器官, 都可在HepatiCult™类器官生长培养基(小鼠)中生成肝祖细胞类器官。所有的类器官在 Matrigel®dome 中生长, 并在原代培养的第7天或解冻后的第1代(冷冻保存的类器官)成像。

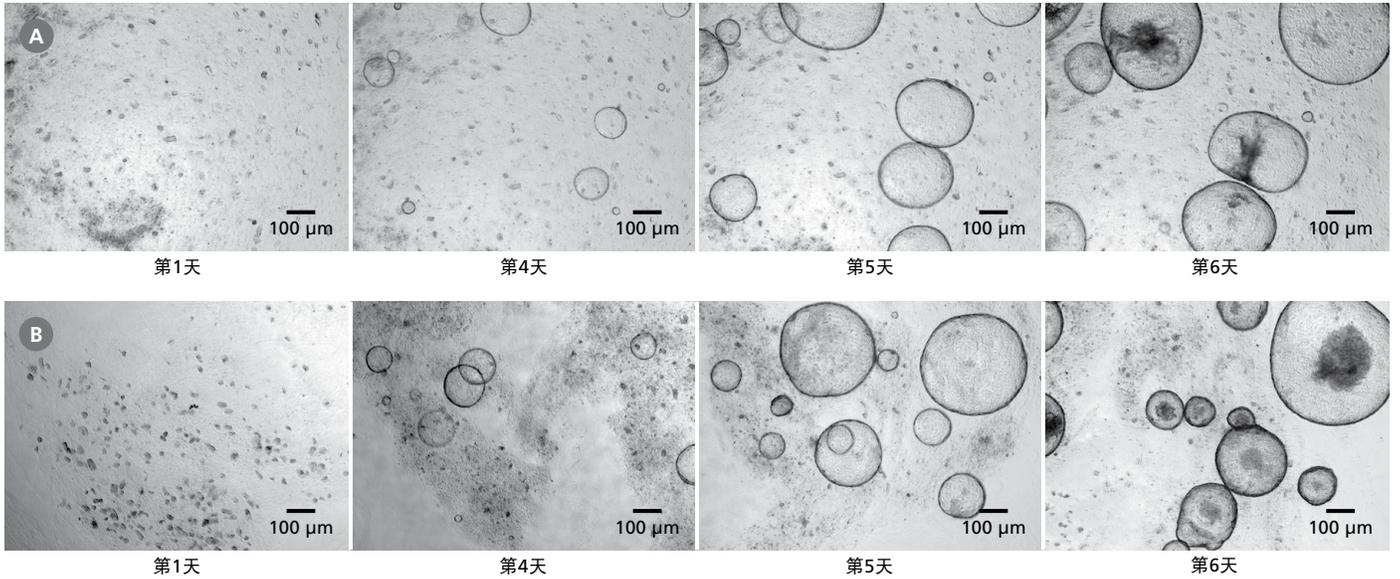


图15. 肝祖细胞类器官可使用Matrigel®dome或Matrigel®suspension的方法进行培养

从新鲜分离的小鼠肝脏组织来源，在HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）中培养的肝祖细胞类器官，可使用 (A) Matrigel® dome或 (B) Matrigel®suspension的方法。两种培养条件下生长的类器官可在4 - 7天内传代。

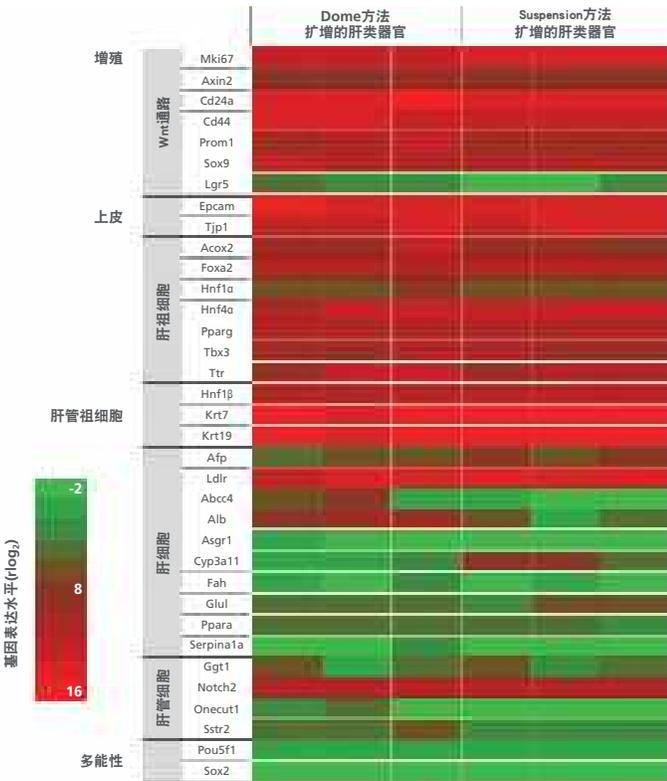


图16. 类器官基因表达水平分析

通过RNA-seq分析标志物得表达，在HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）中培养类器官，无论是使用Matrigel® dome或稀释的Matrigel® suspension的方法，都表达与肝脏干/祖细胞相关的标志物。类器官还表达出低水平的与成熟肝细胞相关的标志物，包括胆管细胞和肝细胞。纵列表代表第1 - 40代培养物的生物学重复结果。

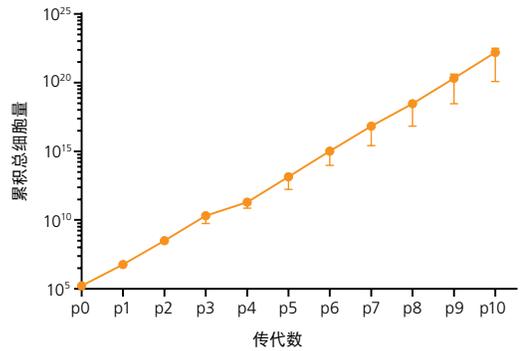
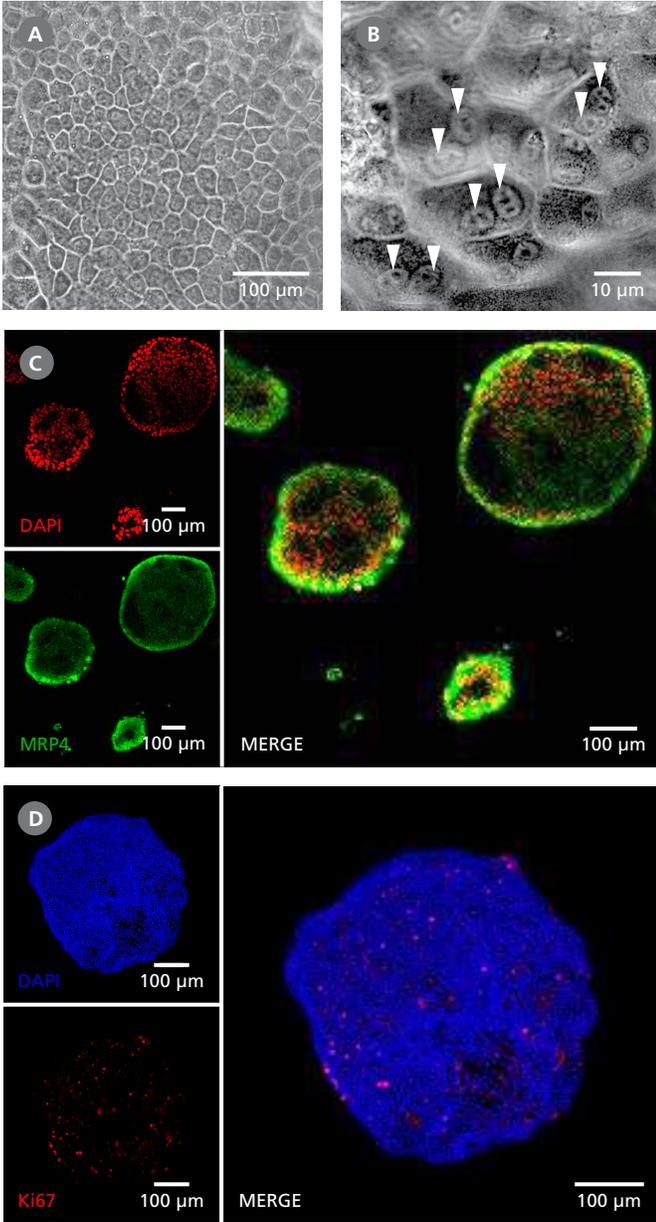


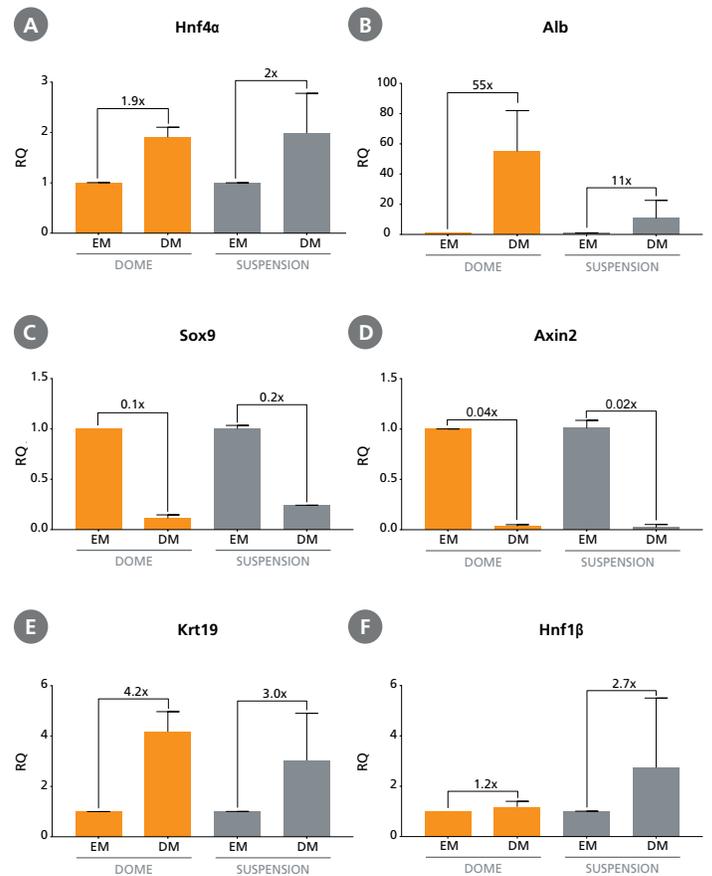
图17. 在HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）中类器官的扩增

使用HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）培养的类器官可以在多次传代后依旧显示高效生长。培养物在每次传代时的平均传代比例 (split ratio) 为1:25。



**图18.** 在HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）中生长的类器官显示出一些典型的成熟肝上皮特征

(A) 肝祖细胞类器官呈现肝上皮典型的多边形形态。(B) 肝祖细胞类器官显示出双核(箭头), 此为成熟肝细胞的共同特征。(C) 免疫细胞化学分析显示MRP4 (绿色) 的分布为沿着类器官外部; MRP4是一种膜结合、单向性外排转运蛋白。DAPI (红色) 的分布位于细胞核。这表示类器官的细胞出现极化, 因上皮基底外侧表面远离管腔的。(D) Ki67 (红色) 染色呈阳性结果, 显示肝类器官含有活跃增殖的祖细胞群。细胞核用DAPI (蓝色) 进行染色。



**图19.** 肝祖细胞器官的分化

生长在 HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）(EM) 中的肝祖细胞类器官可转换至分化培养基 (DM) 中分化成更类似于成熟细胞的类型。转换到分化的培养基后<sup>1,2</sup>, 肝类器官显示成熟肝脏标志物, 包括 (A) Hnf4a和 (B) Alb的上调, 而肝干/祖细胞标志物如 (C) Sox9和 (D) Axin2则下调。导管标志物如 (E) Krt19和 (F) Hnf1β亦上调。每个标志物的相对量化 (RQ) 标准为18S和TBP管家基因。参照标准为在 HepatiCult™类器官生长培养基（小鼠）中使用Matrigel® dome方法培养的肝祖细胞类器官。

胰腺类器官来源于从胰腺导管中分离出的胰腺干/祖细胞的扩增<sup>7</sup>。在添加有适当的生长因子和细胞外基质的培养环境中，胰腺祖细胞形成胰腺外分泌类器官。另外，从小鼠原代肿瘤和转移瘤中分离的组织可以构建出肿瘤源性的类器官，为胰腺癌和胰腺导管腺癌的研究提供模型。这些类器官保留了肿瘤的关键特征，包括基因表型和细胞表型，这为体外实验提供了一个方便的模型系统。

## PancreaCult™类器官生长培养基（小鼠）

### 构建和培养小鼠胰腺外分泌类器官的细胞培养基

PancreaCult™类器官生长培养基（小鼠）适用于来源于胰腺导管、导管小段、单个细胞或冻存的类器官的胰腺外分泌类器官的生长。胰腺类器官的维持可以通过长期传代或冷冻保存，为实验提供稳定的细胞来源。

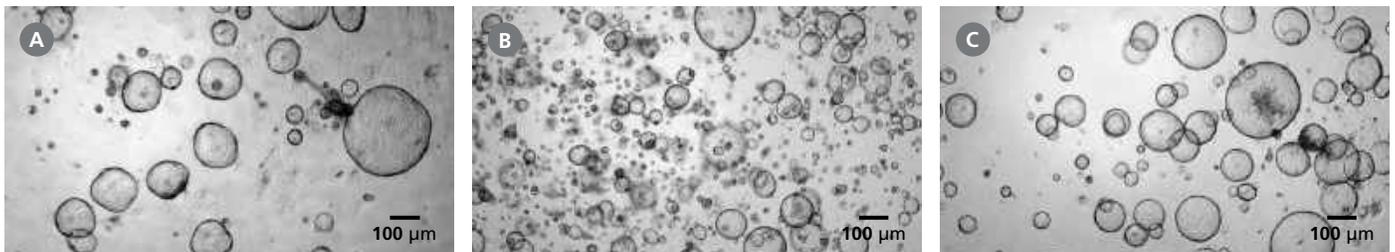
#### PancreaCult™的优势

**方便。**在体外一周内即可生成类器官。

**清晰的标准操作流程。**无需使用损伤模型，无需手工挑选胰管或进行细胞流式分选。

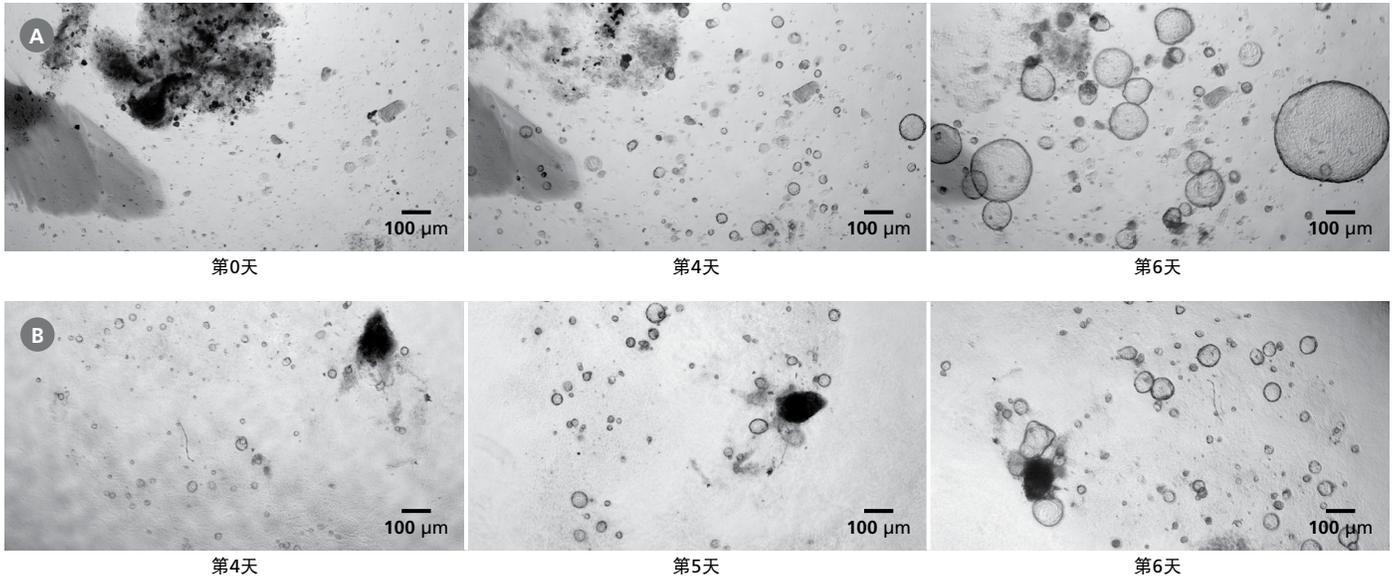
**简单，双组分。**不含血清，培养基成分确定。

**灵活。**起始样本可来源于胰管组织或单个细胞，培养方法可使用胞外基质凝固液滴（matrix dome）或悬浮培养（suspension）。



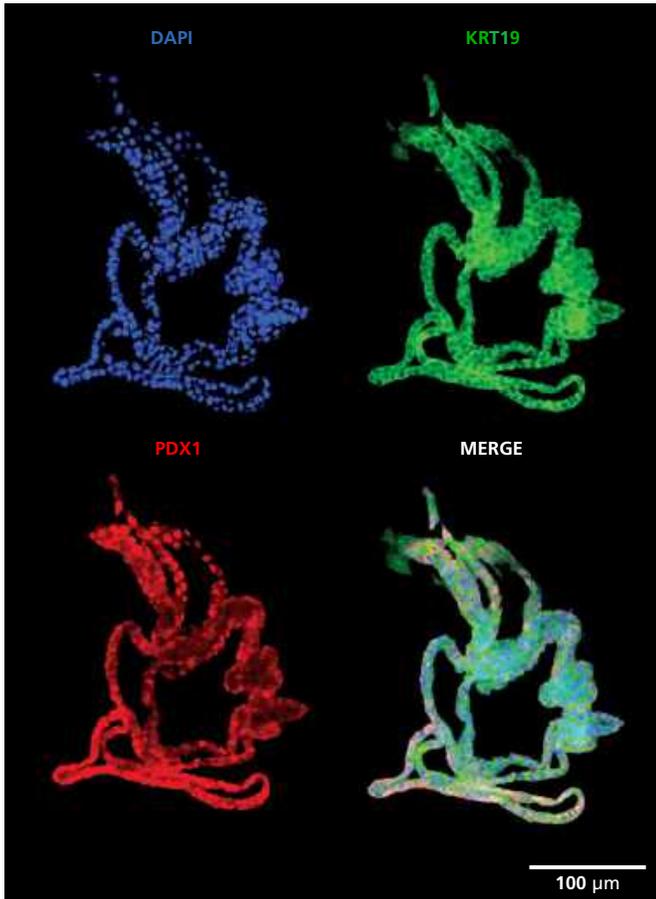
**图20.** 小鼠胰腺类器官可来源于各种起始样本

PancreaCult™类器官生长培养基（小鼠）可从 (A) 胰管、(B) 单个细胞和 (C) 冷冻保存的类器官中生成胰腺外分泌类器官。所有的类器官都在Matrigel® dome中生长。在原代培养的第4天或第5天（分别对胰管和单个细胞）或第一次解冻后的第3天（冷冻保存类器官）成像。



**图21. 胰腺类器官可在Matrigel®凝固液滴或稀释的Matrigel®培养基中生长**

从新鲜分离的小鼠胰管组织来源，在PancreaCult™类器官生长培养基（小鼠）中培养的胰腺类器官，可使用(A) Matrigel® dome或(B) Matrigel®suspension的方法。两种培养条件下生长的类器官可在3 - 6天内传代。



**图22. 胰腺外分泌类器官显示胰腺祖细胞和胰管细胞标志物**

胰腺外分泌类器官在PancreaCult™中生长，对细胞核 (DAPI, 蓝色)、胰管标志物 KRT19 (绿色) 和胰腺祖细胞标志物 PDX1 (红色) 进行染色。类器官在培养至第12代的第5天时进行成像。

注：上皮的折叠外观是冷冻切片的结果，并不代表增殖中类器官的形状。

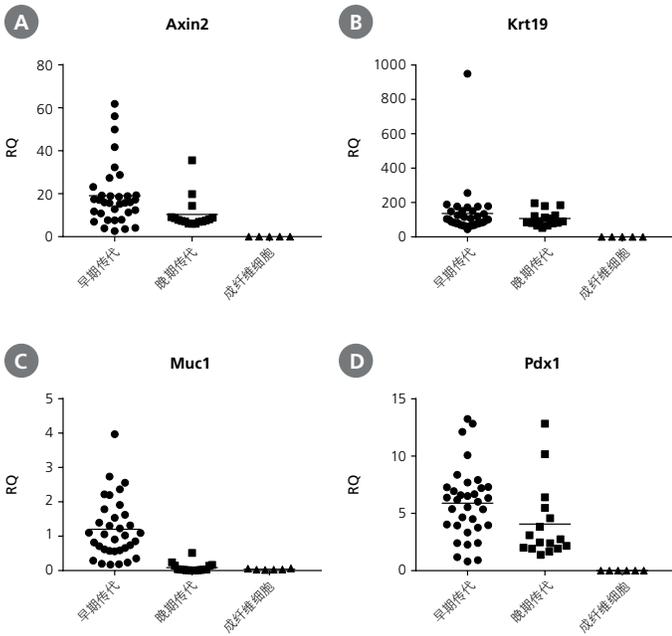


图23. 胰腺外分泌类器官在传代过程中保留胰腺标志物

胰腺类器官表达干细胞标志物和胰腺外分泌系统特有的标志物, 包括 (A) Axin2、(B) Krt19、(C) Muc1和 (D) Pdx1。每个标志物的表达水平使用18S和TBP管家基因进行相对定量, 并按 C57/B16 胰腺组织进行了标准化。标志物表达在早期传代 (1-5代) 和晚期传代 (6-10代) 期间进行测定。

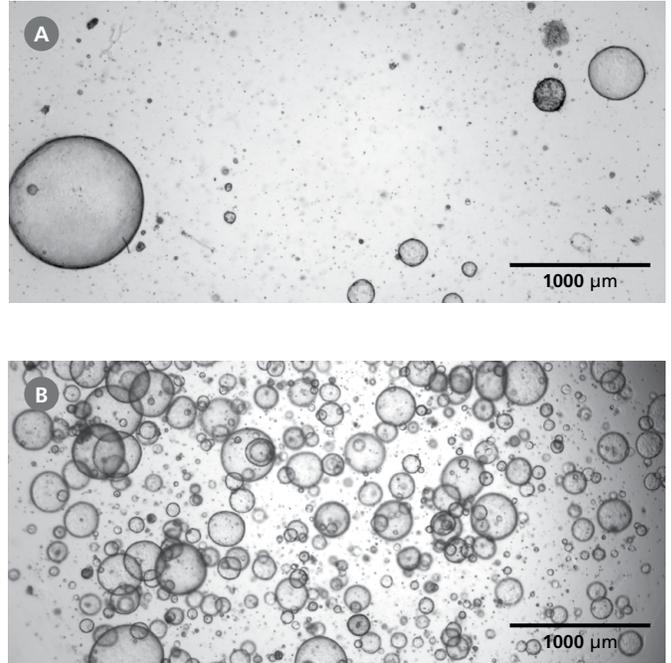


图25. 胰腺外分泌类器官提供胰腺癌造模

来源于胰腺癌组织的类器官可在PancreaCult™类器官生长培养基 (小鼠) 中进行培养。从KPC小鼠 ( $Kras^{+/LSL-G12D}; Trp53^{+/LSL-R172H}; Pdx1-Cre$ ) 分离胰管并将其在PancreaCult™类器官生长培养基 (小鼠) 中培养。生成的类器官在 (A) 原代培养的第4天和 (B) 第一次传代后的第三天进行成像。类器官于培养期间保留激活的KRAS基因表型。数据来源于David Tuveson博士, 经许可后使用。

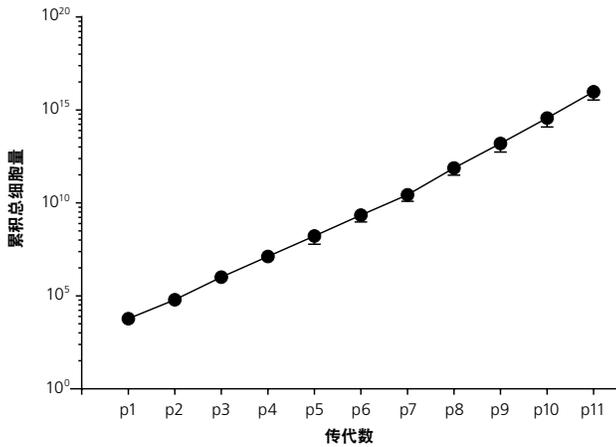


图24. 在PancreaCult™类器官生长培养基 (小鼠) 中类器官的扩增

使用PancreaCult™类器官生长培养基 (小鼠) 培养的类器官经多次传代依旧显示快速增长。培养物在每次传代时的平均传代比率 (split ratio) 为1:16。

# 肾脏类器官

肾脏在人体中起着重要的生理作用，因此，在药物筛选和开发过程中，肾毒性是一个关键的考虑因素。尽管如此，相关体外模型的可用性有限，为研究肾脏健康和功能带来了挑战。肾脏类器官正通过提供高效的体外培养系统，模仿肾脏和相关间质和内皮细胞的结构和细胞结构来解决这一挑战<sup>8</sup>。这些肾脏器官由卷曲的管状结构组成，具有典型的肾脏样分割，标记为肾小囊脏层细胞（足细胞，podocyte）（podocalyxin [PODXL]），近端（lotus tetragonolobus lectin [LTL]）和远端小管（E-cadherin [ECAD]）标记的表达。

## STEMdiff™肾脏类器官试剂 用于培养PSC来源的肾脏类器官的无血清培养基

STEMdiff™肾脏类器官试剂盒是一个完整的，不含血清的细胞培养基系统，支持高效和可重复的人多能干细胞来源的肾脏类器官的生成，整个过程只需要简单的两个阶段的分化。本试剂盒通过优化，采用严格质控后的组分，保证不同的多能干细胞系之间的实验重现性和效率。

### STEMdiff™肾脏类器官试剂盒的优势

**生理相关性。**能够生成肾脏类器官，模拟发育中的肾脏和相关的内皮细胞和间质。

**简单。**最大限度的简化实验步骤，整个过程仅需两个阶段。

**可靠。**严格的质控和优化的配方确保了最小的批次间差异性。

**高通量。**可在96孔或384孔板中重复性的生成类器官。

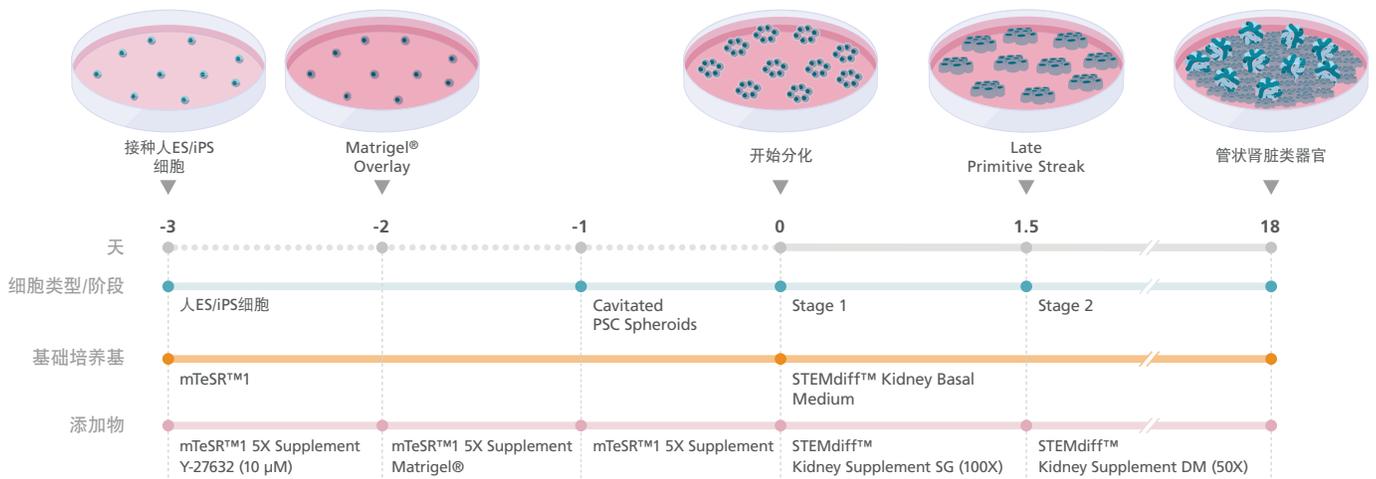


图26. 使用STEMdiff™肾脏类器官试剂盒从hPSC到人肾脏类器官的分化示意图

hPSC培养物通过简单的两个阶段的过程来生成肾脏类器官。首先将hPSC铺板，覆盖上Corning® Matrigel®，形成空腔球体。进而被诱导向late primitive streak、中间中胚层和后肾间质分化，在分化的第18天形成管状肾脏类器官。

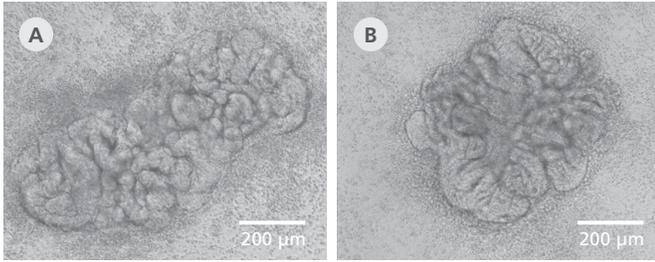


图27. 肾脏类器官的代表图像

STEMdiff™肾脏类器官试剂盒有利于定向分化的PSCs形成肾脏类器官，模拟发育中的肾脏。图为使用STEMdiff™肾脏类器官试剂盒培养的人肾脏类器官，从(A) iPS (WLS-1C) 或 (B) ES (H9) 细胞分化，在分化后第12天和第18天进行成像。

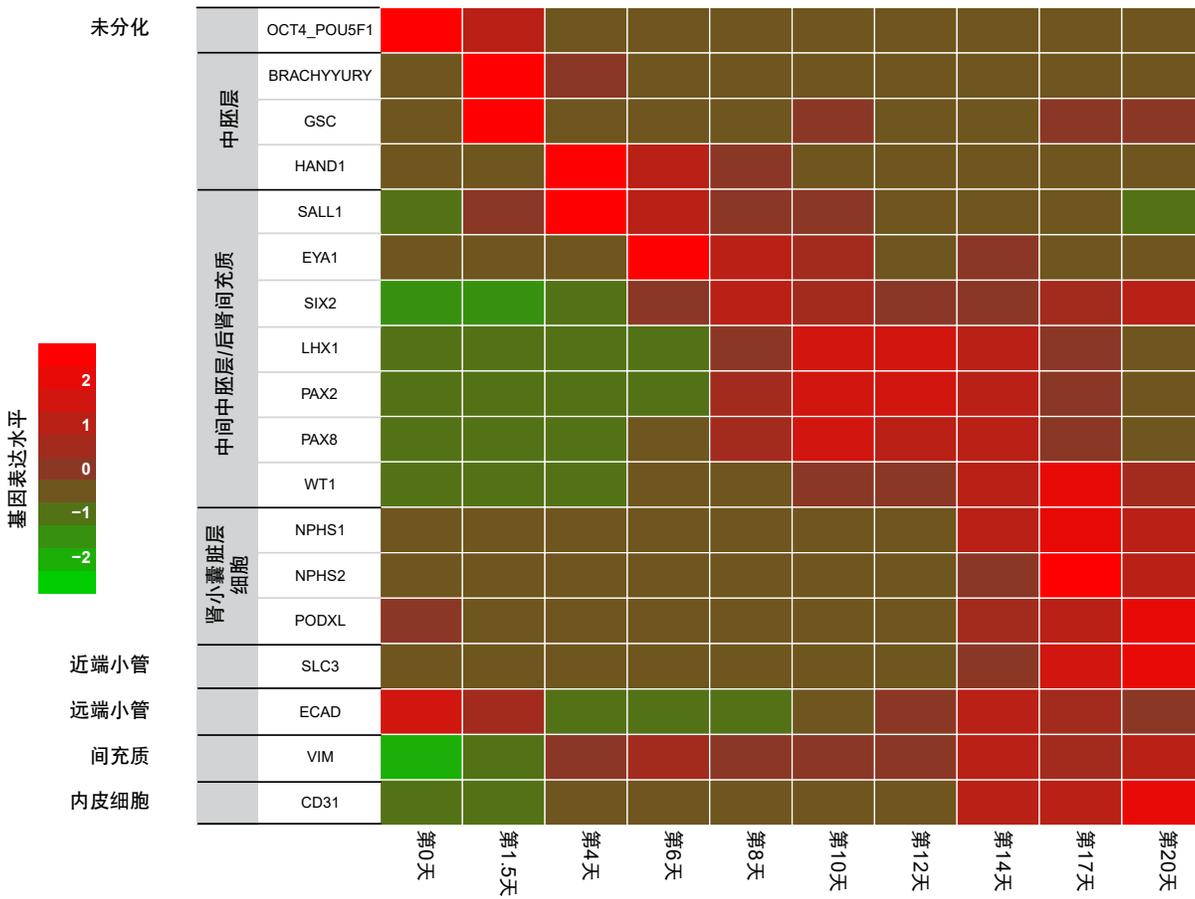


图28. 使用STEMdiff™肾脏类器官试剂盒培养的肾脏类器官在分化过程中显示出预期的基因表达变化

随着类器官通过分化阶段分化为更成熟的肾细胞类型，基因表达从多能性标志物(0天)转向中胚层(1.5天-4天)，并在第4天-12天转向中间中胚层/肾间质。从第14天开始可以观察到肾小囊脏层细胞、近端和远端小管、间质和内皮细胞的标志物。在四个独立的实验中，通过RT-qPCR评估标记物水平，并归一化为未分化细胞的表达水平。

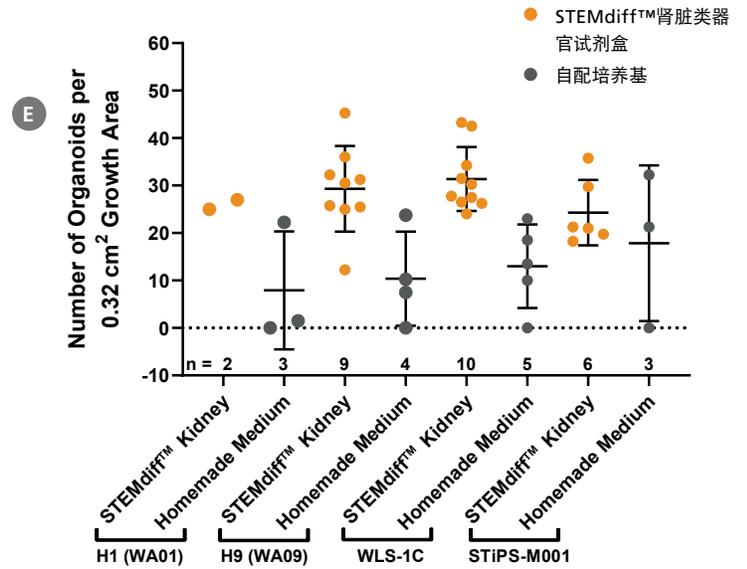
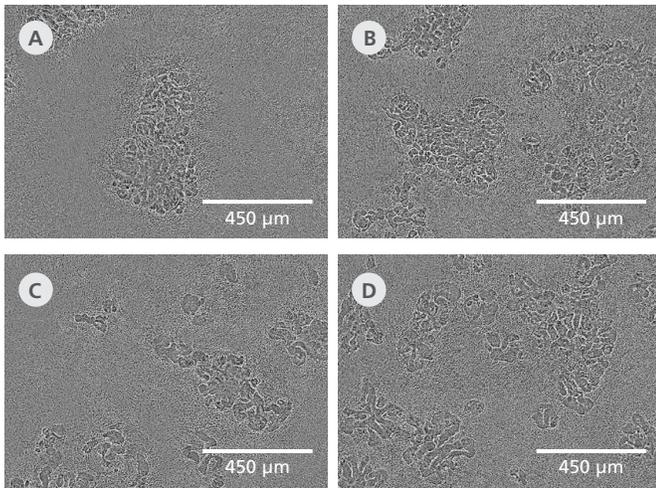


图29. 人多能干细胞高效分化为自我组织的肾脏类器官

STEMdiff™肾脏类器官试剂盒可以从ES (A, H1; B, H9) 和iPS (C, WLS-1C; D, STiPS-M001) 细胞系中高效生成肾脏类器官。(E) 使用STEMdiff™肾脏类器官试剂盒或使用自制培养基接种肾脏类器官, 并在第18天对96孔板每孔的类器官数量进行计数。所有四个测试细胞系都能够高效分化成自我组织的肾脏类器官, 形成卷曲的管状结构 (平均值±SD)。

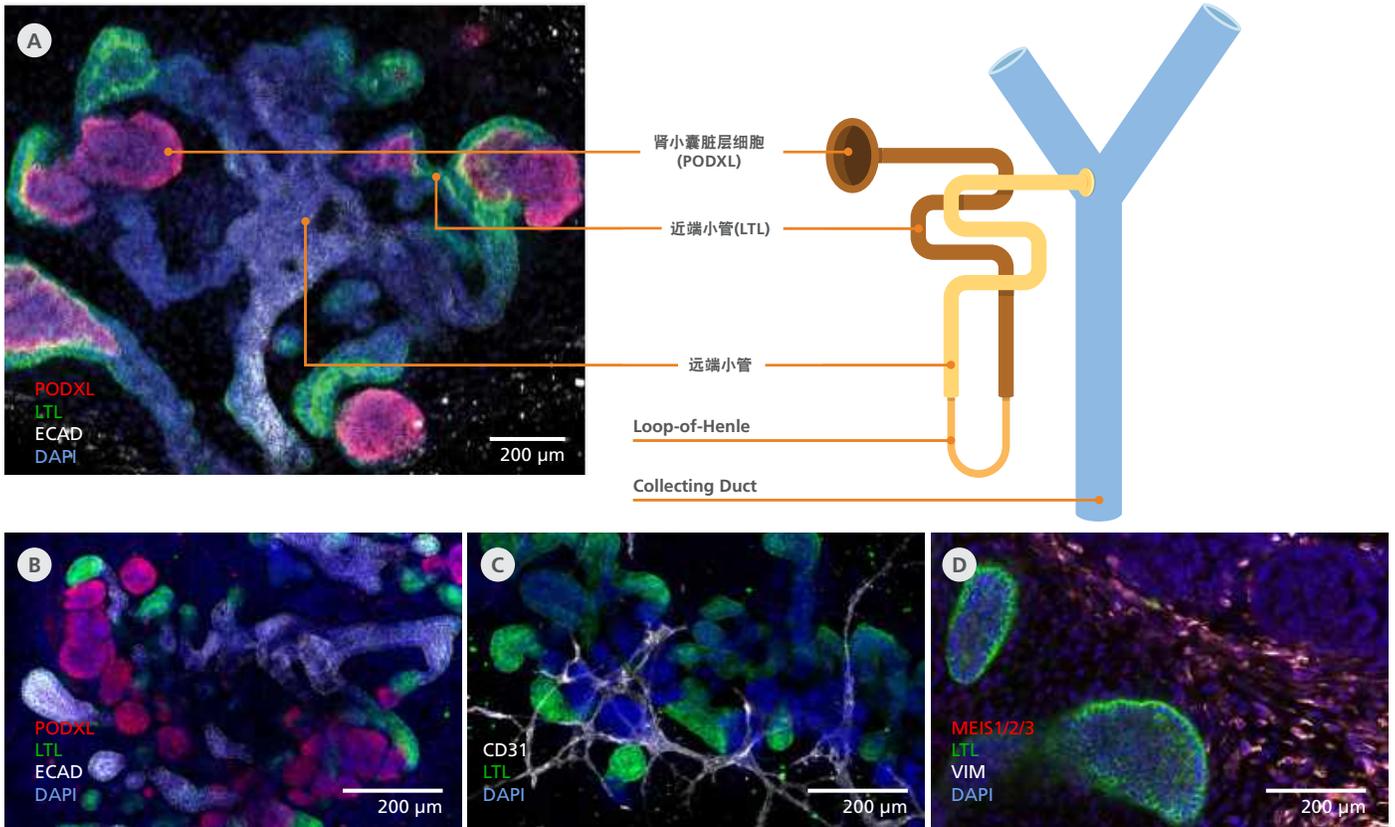


图30. 肾脏类器官形成卷曲的管状结构, 具有典型的肾脏类似于肾脏的分化

(A) 在从hPSCs分化过程中, 肾脏类器官组织形成卷曲的管状结构, 类似于发育中的人类肾脏的结构和分化。这些类器官表达了(B) 肾上皮的标记物, 包括 podocalyxin (PODXL, 红色)、lotus tetragonolobus (LTL, 绿色) 和E-cadherin (ECAD, 白色); 以及(C) 内皮的标记物(血小板内皮细胞粘附分子, CD31, 白色); 和(D) 间质(vimentin, VIM, 白色; Meis homeobox家族, MEIS1/2/3, 红色)。

## 呼吸道类器官

人气道上皮细胞的分化可以生成三维人呼吸道类器官。完全分化的人呼吸道类器官代表了一个多功能和生理相关的模型系统，用于研究气道上皮，由基底细胞、纤毛细胞、分泌细胞 (club cells) 和杯状细胞组成。呼吸道类器官培养物可用于呼吸道上皮细胞生物学的体外研究，了解慢性呼吸系统疾病如囊性纤维化(CF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、特发性肺纤维化(IPF)、肺癌和感染性疾病的基本机制。此外，呼吸道类器官也可用于药效学评价和毒理学的高通量筛选。

## PneumaCult™ 呼吸道类器官试剂盒 用于生成人呼吸道类器官的细胞培养基

PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒是一种新型的、不含血清的培养基，支持从健康和疾病样本中高效生成完全分化的功能性呼吸道类器官。呼吸道类器官培养物提供了一种替代方法，以气液界面 (ALI) 为基础的进行体外人气道建模。由于该培养体系不需要使用细胞培养插件，因此适合高通量药物筛选，可用于大规模筛选CF跨膜传导调节剂 (CFTR) 调节剂。

PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒包括PneumaCult™ Airway Organoid Seeding Medium (PneumaCult™呼吸道类器官接种培养基)，适用于3D类器官的构建及培养；PneumaCult™ Airway Organoid Differentiation Medium (PneumaCult™呼吸道类器官分化培养基)，以进一步获得形态上具有代表性和完全分化的人呼吸道类器官。

### PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒的优势

**生理相关。** 三维体外系统再现了体内人呼吸道。

**优化。** 人气道上皮细胞扩增和分化的完整系统，与PneumaCult™-Ex Plus兼容。

**可靠。** 严格的原材料筛选和广泛的质控测试确保了高度的重复性和最小的批次间差异性。

**方便使用。** 试剂盒成分简单，操作方便。

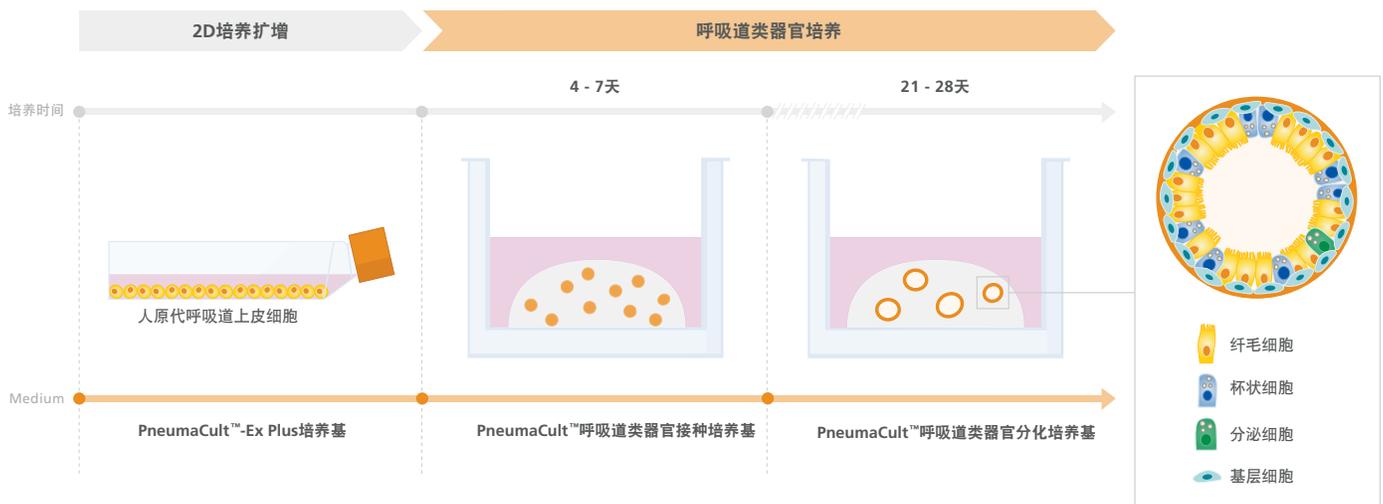


图31. 人呼吸道类器官培养工作流程示意图

在人呼吸道类器官培养程序的早期二维扩增阶段，人气道上皮细胞 (HAECs) 使用PneumaCult™-Ex Plus培养基进行扩增。然后将HAECs嵌入Matrigel®球体中，并使用PneumaCult™呼吸道类器官接种培养基扩增4-7天。扩增后，使用PneumaCult™呼吸道类器官分化培养基对HAECs进行21天以上的分化。

使用PneumaCult™呼吸道接种培养基进行扩增

使用PneumaCult™呼吸道类器官分化培养基进行分化

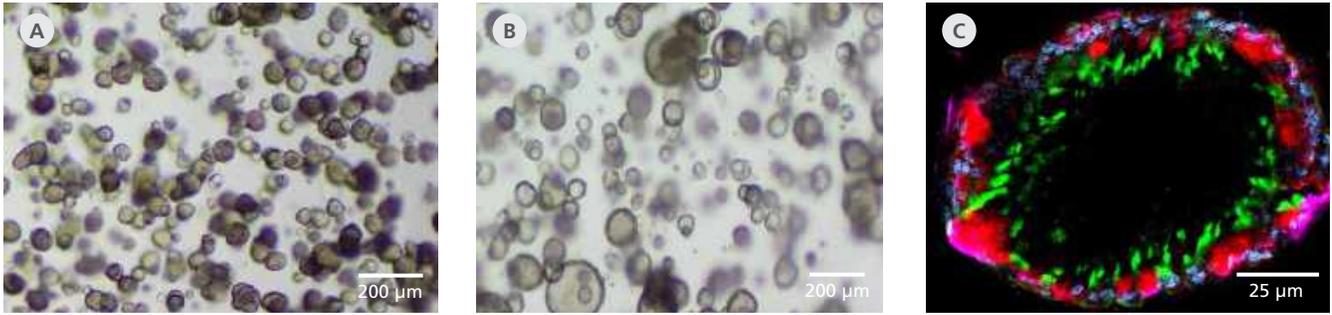


图32. 使用PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒生成完全分化的人呼吸道类器官

(A) 在PneumaCult™呼吸道类器官接种培养基中生长的呼吸道类器官的明场图像, 在第7天表现出基底细胞球状形态。(B) 在PneumaCult™呼吸道类器官分化培养基中分化的呼吸道类器官的明场图像在第21天表现出中空的腔体。(C) 对呼吸道类器官进行染色, ZO-1 (junction protein marker, 红色), MUC5AC (杯状细胞标记, 紫色), AC-管蛋白 (纤毛细胞标记, 绿色), 和DAPI (核, 蓝色)。

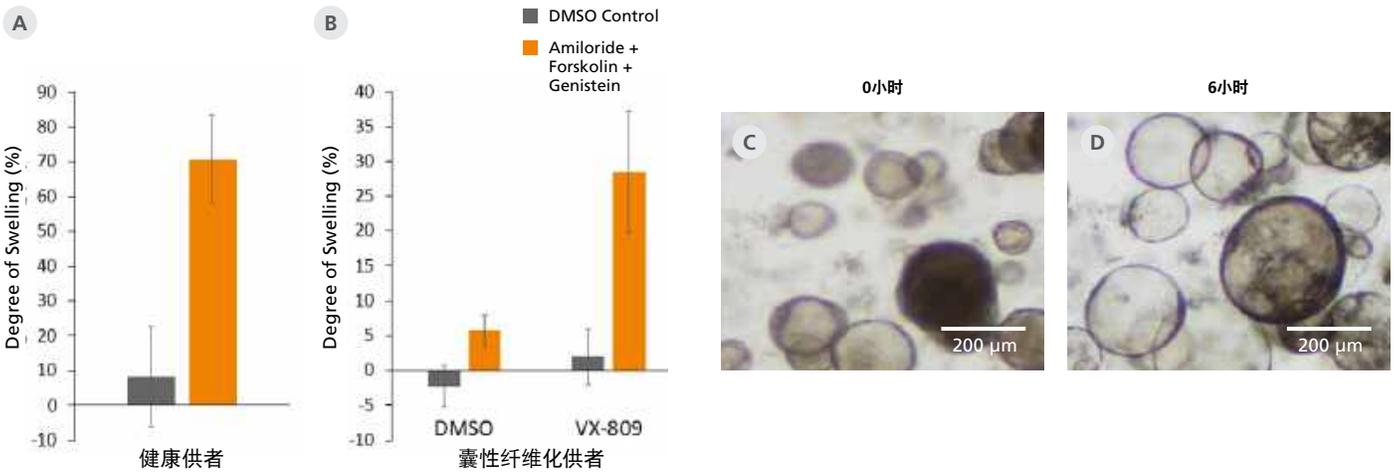


图33. Forskolin诱导的肠类器官膨大

(A) 与DMSO对照组相比, 来自健康供体的Forskolin处理过的类器官膨大, 表明CFTR蛋白的功能性表达。(B) 来自CF供体的类器官不具有Forskolin诱导的膨大现象, 但在VX-809处理的呼吸道类器官中重新建立。误差条代表平均值的±95%置信区间 (n=3)。在 (C) 0小时和 (D) 6小时的Forskolin膨大实验期间拍摄的呼吸道类器官的明场图像显示, 药物治疗后, 类器官重新具有了膨大应答。

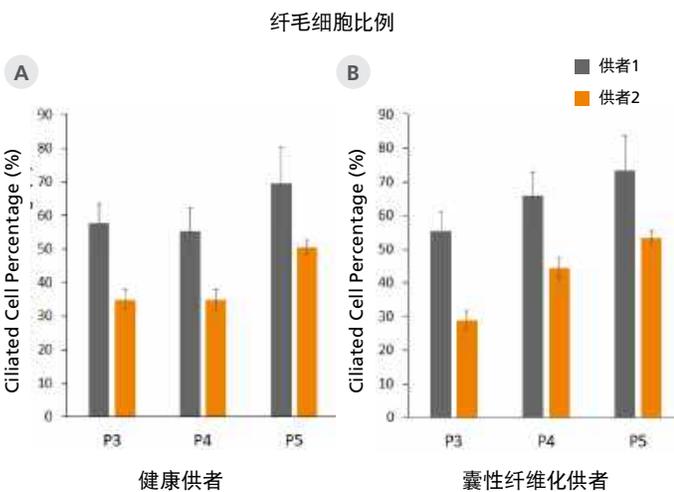


图34. 完全分化的呼吸道器官在传代后依旧保持形态特征

使用PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒培养从(A)健康和(B)CF供者来源的类器官, 纤毛细胞百分比从P3增加到P5。用细胞计数器对总细胞和纤毛细胞进行计数。误差条代表平均值的±95%置信区间 (n=3)。

## 脑类器官

hPSC衍生的脑类器官则是一种三维(3D)体外培养系统,能够重现人脑发育过程和发育中的人脑结构。这些“迷你脑”提供了一种模拟人体生理环境的体外模型,专用于研究人神经系统特有的神经发育和疾病过程。脑类器官在人脑发育和神经系统疾病(诸如自闭症、精神分裂症、或因寨卡病毒感染导致的脑缺陷)的研究中具有重要应用。

## STEMdiff™脑类器官试剂盒

### 构建和成熟人脑类器官的细胞培养试剂盒

STEMdiff™脑类器官试剂盒为无血清培养系统,设计用于从人胚胎干细胞(ES)和诱导多能干细胞(iPS)生成脑类器官,基于MA Lancaster和JA Knoblich<sup>8</sup>发表的配方研发。培养40天后,这些脑类器官具有层次分明的祖细胞群,并产生成熟神经元,与在早期发育中人脑皮质的观察结果相符。

### STEMdiff™脑类器官试剂盒的优势

**生理相关。**三维体外系统可重现脑发育过程和发育中的脑结构。

**创新。**基于无血清人多能干细胞的模型可实现对脑发育和疾病过程的研究。

**优化。**为了提升类器官的形成效率,对配方进行了优化。

**可靠。**严格的原材料筛选和广泛的质控测试确保了高度的重复性和最小的批次间差异性。

**简单。**试剂盒成分简单,操作方便。

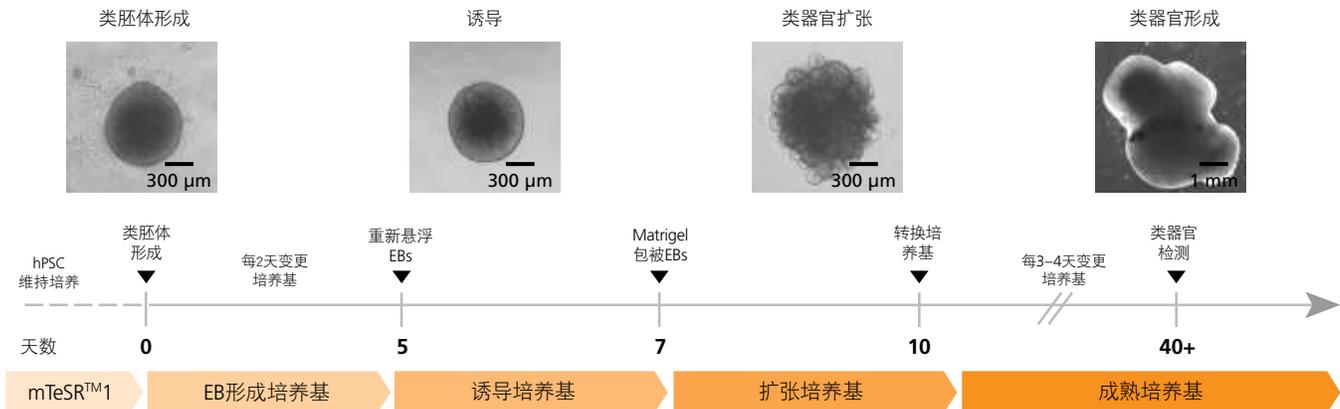


图35. STEMdiff™脑类器官试剂盒的示意图

将在mTeSR1™中维持培养的人多能干细胞(胚胎干细胞或诱导多能干细胞)使用温和细胞解离试剂(GCDR)解离为单细胞悬液,以密度为9000细胞/孔接种至U-Bottom 96孔超低粘附培养板(Corning®)中,接种培养基为EB形成培养基+10 μM Rho-kinase抑制剂(ROCKi)。每隔2天更换为不含ROCKi的EB形成培养基。5天之后,将EBs转移到含有诱导培养基的24孔超低粘附培养板(Corning®)中。对EB培养2天后,使用液体Matrigel®(减少生长因子,Corning®)包被EBs。接下来将它们转移到经过无组织培养处理的6孔板(12-16类器官/孔)中。嵌入的类器官在扩张培养基中维持培养3天。在第10天时,将类器官转换到成熟培养基中,然后放置在RPM为57-95的定轨摇床(Infors HT)上对其进行培养。在成熟培养基中,每3-4天进行换液。在第40天时,类器官进行RT-qPCR分析或冰冻切片后进行免疫染色。EBs形成、诱导和类器官扩张的比例尺=300 μm。类器官成熟的比例尺=1 mm。

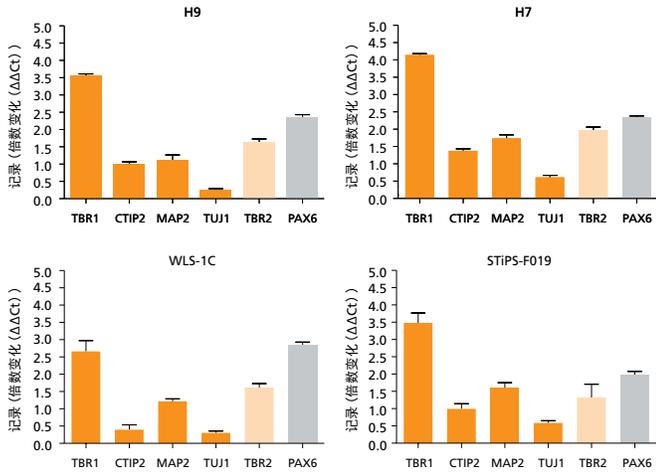


图36. 第40天的脑类器官含有祖细胞和组织成层次分明的神经元群

RT-qPCR分析显示出神经祖细胞和成熟神经元转录物的上调, Log (倍数变化 $\Delta\Delta Ct$ ) (平均数 $\pm$  SEM 每个细胞系的 $n = 2$ ; 每个分析  $\geq 3$ 个类器官)。数据以18S/TBP为标准, 并与未分化的hPSC对照组相比较。

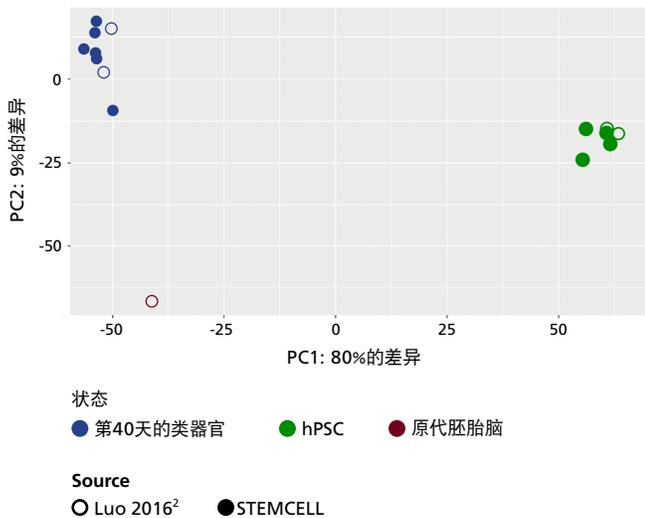


图37. 使用STEMdiff™脑类器官试剂盒生成的类器官与文献描述的类器官相似

对hPSC和脑类器官进行转录组学分析。使用STEMdiff™脑类器官试剂盒生成的脑类器官(蓝色实心圆)彼此聚集在一起, 同时也与先前公布的脑类器官(蓝色空心圆)相互聚集。第一主成分造成绝大多数差异(PC1; 80%)的原因, 并且用来区分脑类器官样本与hPSC(绿色圆)。第二主成分造成细微差异(9%)的原因, 并且突出了已培养的类器官与原代胚胎脑样本(胎龄为19周; 棕色圆)之间在基因表达上仅有细微差异。

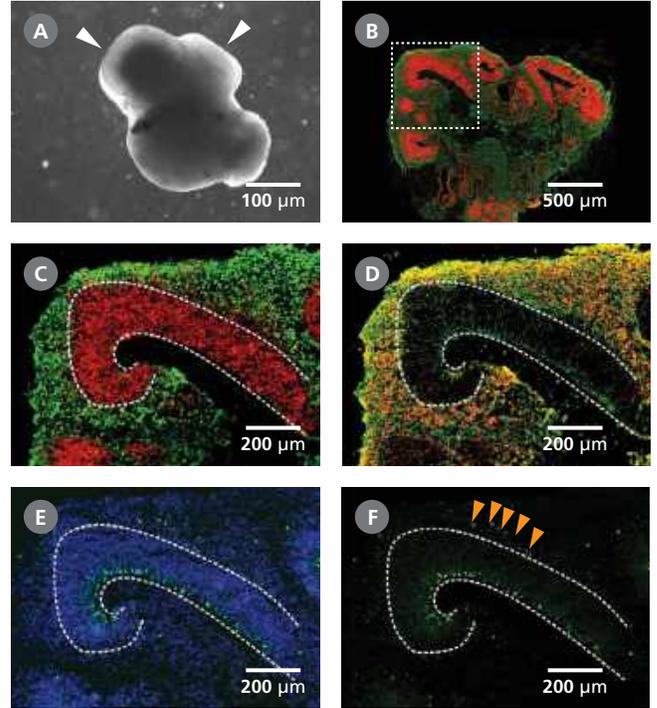


图38. 对使用STEMdiff™脑类器官试剂盒生成的脑类器官进行鉴定

(A) 使用STEMdiff™脑类器官试剂盒生成的整个脑类器官(第40天)于相差显微镜下的代表性图像。这一时期的脑类器官具有暗相衬结构, 且该结构周围可能是更薄更透明的、显示分层的区域(箭头所示)。(B) 在对脑类器官冰冻切片进行免疫组化分析时, 通过顶端祖细胞标志物PAX6(红色)和神经元标志物III类 $\beta$ -微管蛋白(TUJ-1)(绿色), 显示出类器官内部的皮质区域。(C-F) 对(B)划线区域的放大图像。(C) PAX6+顶端祖细胞(红色, 虚线之内)位于脑室带样区域。III类 $\beta$ -微管蛋白+神经元(绿色)位于该脑室带附近。(D) CTIP2(即发育中皮质板的标志物)与III类 $\beta$ -微管蛋白+神经元共同位于皮质板样区域。各层结构重现了在人脑发育中观察到的早期脑皮质发育。(E) 被Ki-67(绿色)标记的增殖祖细胞沿脑室带分布, 细胞核被DAPI复染(蓝色)。(F) 在外脑室下区状区域中发现了额外的Ki-67+细胞群(箭头所示)。比例尺: (A) 1 mm、(B) 500  $\mu$ m、(C-F) 200  $\mu$ m。

## 产品信息

产品	规格	产品号 #
IntestiCult™类器官生长培养基 (小鼠)	100 mL	06005
小鼠肠类器官	200个类器官	70931
IntestiCult™类器官生长培养基 (人)	100 mL	06010
IntestiCult™类器官分化培养基	100 mL	100-0214
STEMdiff™肠类器官试剂盒	1盒	05140
STEMdiff™肠类器官生长培养基	1盒	05145
HepatiCult™类器官生长培养基 (小鼠)	100 mL	06030
PancreaCult™类器官生长培养基 (小鼠)	100 mL	06040
STEMdiff™肾脏类器官试剂盒	1盒	05160
PneumaCult™呼吸道类器官试剂盒	1盒	05060
STEMdiff™脑类器官试剂盒	1盒	08570
STEMdiff™脑类器官成熟试剂盒	1盒	08571
mTeSR™1	500 mL	85850
mTeSR™ Plus	1盒	05825



### 网络研讨会

从干细胞到类器官: 胃肠道建模

[www.stemcell.com/huch\\_webinar](http://www.stemcell.com/huch_webinar)



### 免费挂图

构建3D人脑类器官

[www.stemcell.com/BrainOrganoidPoster](http://www.stemcell.com/BrainOrganoidPoster)



### 技术资源中心

了解更多关于类器官的知识和应用

[www.stemcell.com/discover\\_organoids](http://www.stemcell.com/discover_organoids)

## 参考文献

1. Sato T et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244): 262–5.
2. Lancaster MA et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501(7467): 373–9.
3. Spence JR et al. (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470(7332): 105–9.
4. Huch M et al. (2013) In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494(7436): 247–50.
5. Huch M et al. (2015). Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell* 160(1-2): 299–312.
6. Broutier L et al. (2016) Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc* 11(9): 1724–43.
7. Huch M et al. (2013) Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J* 32(20): 2708–21
8. Lancaster MA & Knoblich JA. (2014) Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9(10): 2329–40.
9. Freedman B, et al. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*. 6(8715): 1–13.

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, Hepaticult, Pancreacult, PneumaCult, 和STEMdiff均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。mTeSR是WARF的商标。Corning和Matrigel是Corning Incorporated的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。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。

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。若想了解更多关于产品质量和合规的信息, 请访问[WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE](http://WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE)。

# 类器官

稳健培养脑、肠、肝和  
胰腺类器官的培养基



STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话: 400 885 9050

E-MAIL: [INFO.CN@STEMCELL.COM](mailto:INFO.CN@STEMCELL.COM)

网站: [WWW.STEMCELL.COM](http://WWW.STEMCELL.COM)

微信: STEMCELLTech

