

OrganoGel用于类器官3D体外培养

——操作手册

产品背景:

基底膜是动物体内上皮细胞基底面的一层基质膜。OrganoGel 是从小鼠肿瘤组织提取的基底膜成分，所形成的基质胶。该基质胶主要成分为 laminin, collagen IV, heparan sulfate proteoglycans (Kleinman et al. 1986)。同时，该基质胶也包含多种生长因子，例如表皮生长因子 EGF，血小板衍生生长因子 PDGF，神经生长因子 NGF，碱性成纤维细胞生长因子 FGF-2，乙型转化生长因子 TGF-beta 和胰岛素样生长因子 ILGF (Vukicevic et al. 1992)。

产品特性:

本品在 4° C 条件下为液态，但在加热到 37° C 时呈凝胶状态。基质胶凝固后，重新放回 4° C 过夜，基质胶可再次液化。

储存条件: 建议用户第一次融化后按照单次用量进行分装，保存-80° C 冰箱，有效期 2 年。

产品应用: 本品适用于类器官生长、分化、代谢和毒理学研究，体内和体外血管生成实验和免疫缺陷小鼠成瘤实验。

注意事项:

该基质胶在温度高于 10° C 时就会开始凝固成胶，所以尽量在冰上操作基质胶。类器官传代时，为了避免酶对类器官造成影响，可直接用 4° C 预冷的基础培养基对基质胶进行缓慢吹打，即可将类器官从基质胶中释放出来。

操作方法:

一、类器官培养（操作所需时间为 1 小时）

1. 将基质胶于 4° C 冰箱里的冰上过夜解冻。
2. 将 24 孔板放置于培养箱预热。
3. 用预冷的枪头将解冻的基质胶进行分装。
4. 准备病人或者动物组织（或者类器官）来源的，细胞总数为 1×10^5 的单细胞悬液。300g 离心 5min。
5. 取 50μL 的 OrganoGel 基质胶与离心所得的细胞进行混匀。
6. 取出预热的 24 孔板，立即将基质胶与细胞的混合物滴加在孔板里，立即将 24 孔板放入培养箱。
7. 约 10min 后，基质胶凝固后，向孔板里加入 500μL 类器官培养基，放于培养箱进行培养。

二、肿瘤类器官药敏实验（操作所需时间为 2 小时）

1. 将扩增好足够量的肿瘤类器官（实验组）以及正常类器官（对照组）用 4° C 预冷的基础培养基进行重悬，缓慢机械吹打，促进胶液化溶解，并保持类器官结构完整（可用于悬浮培养于有 5% 基质胶溶液的基质胶表面）（Guillen et al. 2022）。或者通过 TrypLE 酶消化获得单细胞悬液。
2. 离心收集类器官细胞，并进行细胞计数。
3. 加入 OrganoGel 基质胶原液，与细胞进行混匀。
4. 将细胞与胶的混合物，通过排枪加入 37° C 预热过的 96 孔板，或者 384 孔板，立即将孔板放入培养箱。
5. 大约 10min 后，OrganoGel 基质胶将凝固，加入相应体积的类器官培养液进行培养。
6. 类器官形成后（如果是机械吹打，类器官将在传代 24h 后就会形成；如果是酶消化，类器官会在 3-5 天后形成），每个孔分别加入含有 PI 染料以及不同种类、不同浓度的待筛选的抗肿瘤药物。
7. 用高内涵显微镜上进行活细胞成像，测定肿瘤类器官对各种药物的敏感性。

三、免疫缺陷小鼠成瘤实验（操作所需时间为 1 小时）

1. 搜集用于注射小鼠的细胞 1×10^5 个，以 1:1 的体积与 OrganoGel 基质胶混合，为方便注射，建议每次注射总体积不低于 100 μ L。
2. 用脱毛器对小鼠注射部位皮肤进行脱毛，然后用酒精棉球进行消毒。
3. 用不带针头的 1mL 注射器将细胞和胶的混合物吸入针头，再装上 16g 的针头（针头内直径为 1.194mm），将混合物注射到皮下，或者大腿肌肉（针对代谢特别旺盛的肿瘤细胞）。

四、血管生成实验（以永生化 HUVEC 细胞系为例，操作所需时间为 1 小时）

1. 将完全培养基换成饥饿细胞用培养基：加入含 0.2% FBS，2mM L-谷氨酰胺，1mM 丙酮酸钠，100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基培养 24 小时。
2. 将 OrganoGel 基质胶均匀铺满 96 孔板底。注意：枪头需提前预冷半小时。尽量在冰上操作，避免基质胶过早固化，避免气泡产生。
3. 将 96 孔板在细胞培养箱孵育 30min，固化基质胶。
4. 消化 HUVEC 细胞，并计数。
5. 将 200 μ L 的 HUVEC 细胞悬液（含 5×10^4 个细胞）加于含基质胶的 96 孔板中。将 96 孔板放于培养箱。
6. 血管样网络结构将于 3 至 12 小时时间形成。
7. 在血管网络形成最佳时间，小心去除培养基，并用加入含活细胞染料 1/1000 Calcein AM（绿色）的培养基进行染色，并用显微镜进行拍照记录。

五、神经轴突 3D 生长实验（以大鼠胚胎神经干细胞为例，操作所需时间为 2 小时）：

1. 取孕期 12-15 天的大鼠胚胎，用眼科剪和眼科镊分离出大脑皮层于 4° C 预冷的 DMEM 培养基中。
2. 用吸管轻缓吹打，然后用 70 μ m 滤网过来，获得单细胞悬液，并进行细胞计数。
3. 离心（300g，3min），弃上清。将细胞与 OrganoGel 基质胶进行混合，然后将基质胶混合物滴加在 24 孔板中，每孔 50 μ l。
4. 将 24 孔板放于培养箱，大约 10min 后，OrganoGel 基质胶将凝固。加入 1mL 神经元分化培养基：Neurobasal medium，2% B27，2mM L-glutamine，5%FBS，20ng/mL EGF 和 20ng/mLbFGF，100U/mL penicillin 和 100 μ g/mL streptomycin。第二天开始，就能观察到有明显的神经轴突生长。
5. 在第 7 天可观察到大量的神经突（Neurite）长出。

OrganoGel 实际应用案例：

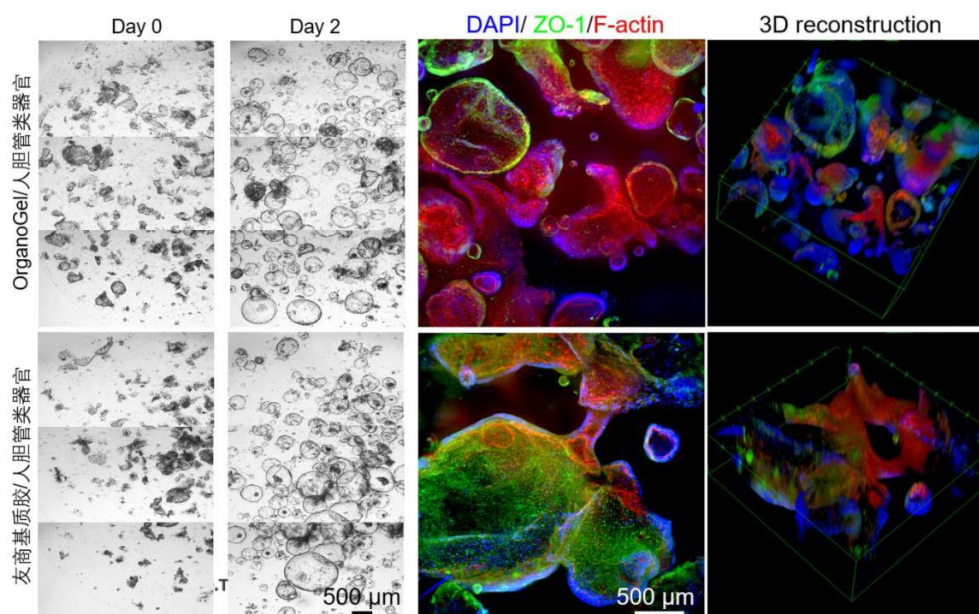


图 1.人胆管类器官在 A 公司的基质胶和 OrganoGel 基质胶中的生长情况。人胆管类器官由细胞核染料 DAPI（蓝色），紧密连接蛋白抗体 anti-ZO1 和细胞骨架蛋白 F-actin 的染料 Alexa Fluor 647 Phalloidin 染色成像。

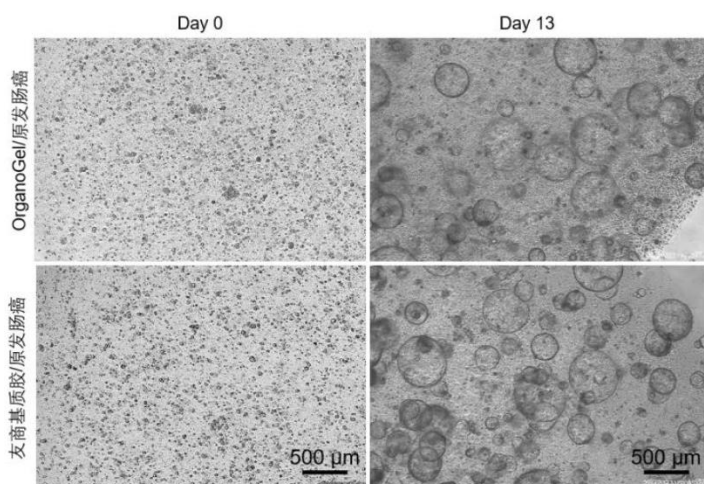


图2. 人原发性肠癌类器官在A公司的基质胶和OrganoGel基质胶中的生长情况。

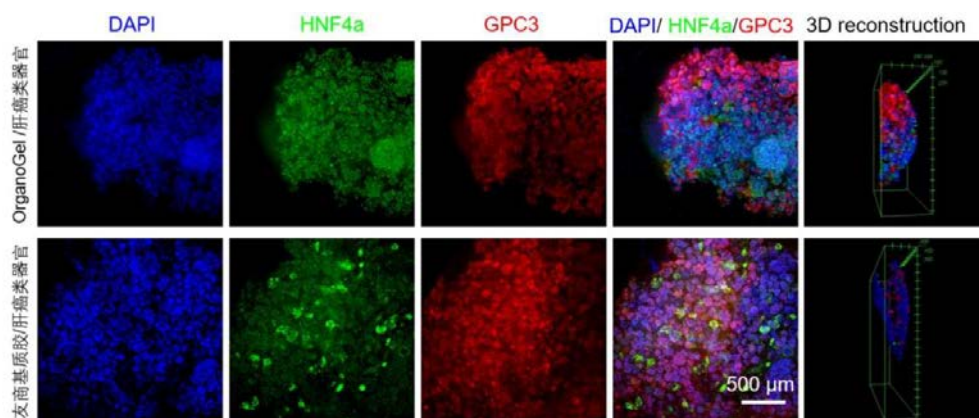


图3. 肝癌类器官在A公司的基质胶和OrganoGel基质胶中的生长情况。肝癌类器官由细胞核染料DAPI（蓝色），肝脏细胞生物标志物HNF4a和肝癌标志物GPC3的抗体染色成像。

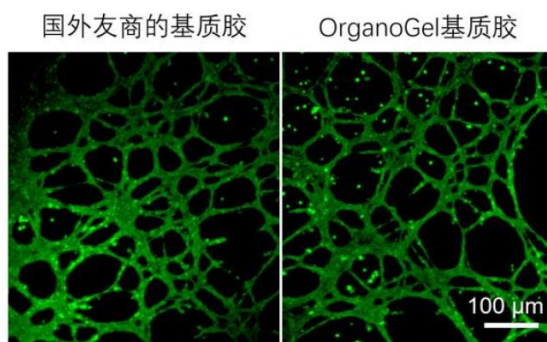


图4. 人脐静脉内皮细胞 HUVEC 在 A 公司的基质胶和 OrganoGel 基质胶上均可形成血管网络。HUVEC细胞由活细胞染料Calcein AM染色（绿色）成像。

参考文献:

1. Kleinman HK, et al, Basement membrane complexes with biological activity Biochemistry 25: 312 (1986).
2. Vukicevic , Slobodan, et al. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. Experimental cell research 202: 1 (1992) .
3. Guillen, K P, et al. A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology . Nature Cancer 3: 232 (2022).

本产品仅作科研实验使用，不支持临床等研究