

Forskolin诱导培养于IntestiCult™中 人肠类器官膨胀的操作流程

囊性纤维化 (Cystic fibrosis, CF) 是囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 的基因突变所导致的遗传性疾病。氯离子通道广泛存在于包括肠道上皮等多种器官的上皮组织。CFTR的缺陷导致离子通道的转运功能受损，器官粘液分泌能力降低，引发呼吸困难，肺部感染，消化不良等多种临床症状。肠类器官的培养为体外研究CFTR蛋白功能提供了一种全新的技术手段。欲建立肠类器官培养，可以取结肠直肠样本，扩增并长期维持培养于体外培养环境中。这些类器官在体外培养下能够维持其亲本的基因型和表型，故而可以保留研究所需CFTR功能。

将肠类器官培养中加入forskolin会导致细胞cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 的水平急速上升，促进CFTR通道张开。当氯离子穿过通道进入内腔后，类器官将会由于水渗透量 (osmosis) 的增加而不断肿胀。通过这个原理，我们可以对CFTR的活性的进行试验。类器官肿胀与CFTR的活性有关，CFTR野生型的类器官在经过forskolin处理后体积将增大，而携带CFTR突变或使用CFTR抑制剂的类器官体积将不会变化。

下文介绍了使用Forskolin诱导源自健康人供体培养在IntestiCult™类器官生长培养基 (人) (产品号 #06010) 的结肠类器官的操作流程。需要了解完整的类器官培养教程，请同时参阅本流程以及相关的产品信息表 (文件号 #DX21423)

试验所需试剂

产品名	产品号 #
Forskolin	72112
CFTR _{INH} 172	例. Cayman 15545
GlyH-101	例. Cayman 15772
DMSO	-
Costar® 24 Well Flat-Bottom Plate, Tissue Culture-Treated	38017
Krebs-Ringer Solution, Bicarbonate-Buffered	例. Alfa Aesar J67591

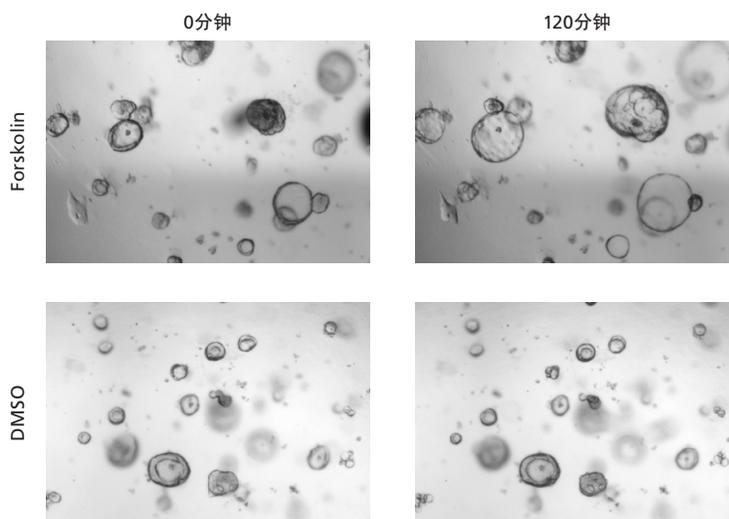


图1. 在IntestiCult™类器官生长培养基培养下，Forskolin诱导的肠类器官膨胀实验

使用10 μM的forskolin处理肠类器官12分钟，其内腔的面积增大。DMSO对照组面积无变化。

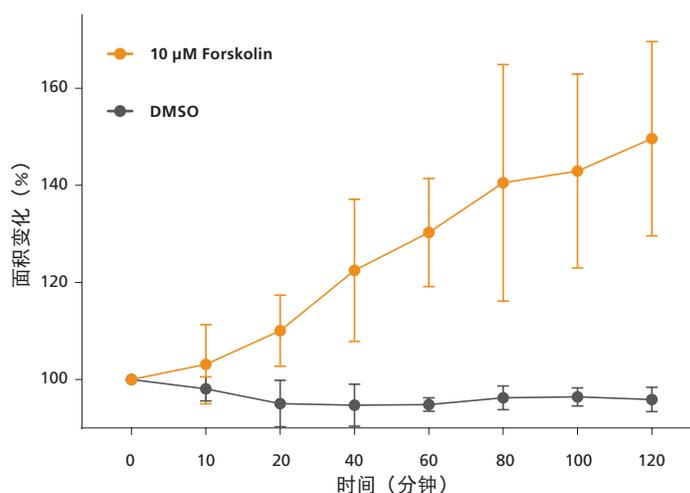


图2. Forskolin诱导的肠类器官膨胀百分比测量

类器官的膨胀程度采用明场显微镜检法 (brightfield microscopy) 测量。后续时间点面积变化的百分比系与初始时间 (T=0) 类器官平均面积的比值而得。在每个时间点，拍摄孔内所有类器官，计算三个复孔所有面积的平均值。数据代表了第3代正常供体类器官的实验结果。

Forskolin诱导的肠类器官膨胀

1. 根据产品信息表(文件号 #DX21423)介绍的方法,建立类器官培养。在进行forskolin诱导实验之前,先将类器官转移至IntestiCult™类器官生长培养基(人)(产品号 #06010)培养3-5天。
2. 吸出培养基,加入等体积Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (KRB),使KRB与Corning® Matrigel®的液滴在37°C充分融合30分钟。
注: Forskolin诱导的膨胀试验也可以在培养基中进行,不过在KRB中,其膨胀效果更明显。
3. 可选: 如果选择设置CFTR抑制剂对照组(例, CFTR_{INH}172或GlyH-101),请在孔中加入适量抑制剂,37°C孵育3小时。如果未设置抑制剂对照组,请直接进行步骤4。
4. 由于类器官可能在加入forskolin后马上膨胀,请拍摄加入forskolin前T=0的照片。
5. 吸出KRB,再加入新鲜的KRB。在其中添加阴性对照组试剂, forskolin (10 μM),以及CFTR抑制剂(可选)。
6. 每隔固定时间拍摄一次孔内类器官,直到forskolin实验组膨胀完全停止(通常80-120分钟)。
7. 使用ImageJ,分析计算各时间点类器官的平均面积,与T=0时作比较,类器官膨胀的百分比。

实验所需相关培养基

产品名	规格	产品号 #
IntestiCult™类器官生长培养基(人)	100 mL	06010
IntestiCult™类器官生长培养基(小鼠)	100 mL	06005

参考文献

1. Dekkers, JF et. al (2012). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. Nat. Med. 19(7): 939–47.
2. Boj, SF et. al (2017). Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: An in vitro assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. Journal of Visualized Experiments. 120(e55159).

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。CorningCostar, 以及Matrigel是Corning Incorporated的注册商标。其他商标也分属其相应的版权方。本产品是根据The Hubrecht Organoid Technology Foundation (“the 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出于商业目的在类器官内进行药物筛选或者其他商业目的的权利。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Organoid-Growth License,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。



微信ID: STEMCELLTech



STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话: 400 885 9050 E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM 网站: WWW.STEMCELL.COM

文档号 #27179CN 版本 1.0.0 2020年02月