



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110129256 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910484492.9

(22)申请日 2019.06.05

(71)申请人 中国科学院亚热带农业生态研究所

地址 410125 湖南省常德市芙蓉区马坡岭
远大二路644号

(72)发明人 吴信 殷跃帮 印遇龙

(74)专利代理机构 南昌汇智合诚知识产权代理
事务所(普通合伙) 36130

代理人 邓秋星

(51)Int.Cl.

C12N 5/073(2010.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法。包括分离胎盘干细胞,包裹在基质胶中,加入类器官生长因子,放入细胞培养箱中培养等步骤。本发明克服了细胞系模型和原代细胞模型单一细胞类型、永生化或癌化特征、原代细胞无法长期培养和传代的缺点,用本发明技术手段培养3D猪源胎盘类器官可永久传代、冻存,本发明首次提出的3D猪胎盘类器官将对基础研究和应用型研究具有重要的价值。

1. 一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法,其特征在于,其步骤如下:

(1) 分别配置两份3ml的等渗30%和等渗60%Percoll,并将二者按浓度由大到小逐层缓慢加入到15ml的无菌离心管内,同时取淋巴细胞分离液5ml加入到该15ml无菌离心管内;

(2) 将猪胎盘组织放在超净工作台上使用无菌抗生素生理盐水反复冲洗8~10次,然后使用眼科剪子剪下猪胎盘绒毛并剪碎成多段;

(3) 将剪碎后的绒毛浸泡在35~40℃的温箱中,温箱中包含有胰蛋白酶和DNA酶混合液,消化时间为30~40min;

(4) 向将消化后得到细胞悬液内添加含10%FBS的DMEM/F12培养液终止消化,吹打成细胞悬液;将细胞悬液通过100目铜网过滤后,转移到离心管中,1000~1500r/min,离心3~10min;

(5) 离心后弃上清,加DMEM/F12培养液重悬细胞,将细胞悬液分别缓慢加入Percoll分离液和淋巴细胞分离液上层,1500~2000r/min,离心25~35min;

(6) 吸取Percoll分离液两个浓度液面交界处的灰白色云雾状细胞层和淋巴细胞分离液与培养液之间的细胞层,用抗生素盐水和培养液洗涤两次,1000~1500rpm,离心5~10min;

(7) 向洗涤过后的细胞悬液内添加含20%FBS的DMEM/F12培养基重悬,调整细胞浓度至 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$,分别接种于涂有鼠尾胶原(5-10U/cm²)和未经胶原处理的6孔细胞培养板中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养2~3h。

2. 根据权利要求1所述的建立方法,其特征在于,步骤(2)中为猪胎盘样品。

3. 根据权利要求1所述的建立方法,其特征在于,步骤(3)中的混合液由含胰蛋白酶溶液水溶液和含DNA酶的水溶液按体积比例1:1组成,其中含胰蛋白酶溶液水溶液中胰蛋白酶的浓度为0.25%,含DNA酶的水溶液中DNA酶的含量为100U/ml。

4. 根据权利要求1所述的建立方法,其特征在于,步骤(1-7)中提供的3D猪胎盘类器官培养体系包括胎盘干细胞分离方案和培养基配方。

一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药和农业生物技术领域,尤其是涉及一种体外生物模型,具体是一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法。

背景技术

[0002] 胎盘包含不同功能的细胞,不同细胞协同互动,共同维持胎盘的功能。以往的研究中,对胎盘功能的研究多使用细胞系或者原代细胞,细胞系多为永生化或者癌细胞,因此,与体内正常细胞差别较大,无法真实地模拟体内胎盘的特征和功能。然而胎盘滋养层细胞系存在很多的弊端:例如单细胞类型、二维生长、易发生变异等。虽然原代胎盘细胞来源于体内胎盘组织,但是其单细胞类型特征、2D的培养模型和无法长期培养等缺点限制了其应用。

[0003] 由于分离胎盘组织较为困难,且涉及伦理问题。所以,对胎盘功能的研究仍局限于细胞层面。在最新研究中,研究人员利用来自胎盘组织的绒毛(一种微小的叶状结构),这些滋养层类器官能够长期存活,具有遗传稳定性并组织成绒毛状结构,分泌必需的蛋白质和激素,这些蛋白质和激素会影响母亲在怀孕期间的新陈代谢;进一步的分析表明,类器官与正常的早期妊娠胎盘非常相似。因此研究人员可以在体外妊娠试验中记录积极的反应(Turco MY, 等. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. Nature, 2018, 564, 263-267)。3D胎盘类器官源自于胎盘干细胞,包含细胞滋养层和合胞体滋养层功能区域,本发明可保证3D猪胎盘类器官无限传代,并保持特征(合胞体滋养层和细胞滋养层功能区域)不变,因此该模型具有巨大的基础研究和应用研究价值。

[0004] 而长期以来,体外细胞系用于猪营养评价的模型。但是二维(2D)细胞系模型存在诸多固有缺点:呈单层生长,无法模拟体内三维立体结构;仅含有单一细胞类型,与体内组织和器官多细胞构成相差甚远;永生化或癌化细胞系易发生变异,与体内细胞生理差别较大;原代细胞无法在体外长期培养。因此,细胞系和原代细胞模型不是理想的体外模型。三维胎盘类器官为解决这一难题提供了可能。胎盘滋养层类器官来源于胎盘干细胞,呈三维立体生长;包含体内胎盘上皮几乎所有细胞类型;包含胎盘上皮绒毛和隐窝功能区;可长期培养而不发生基因变异,因此,是研究胎盘生长发育、生理和功能的理想模型,也为研究胎盘营养物质转运和代谢提供重要平台。

[0005] 我国是重要的养猪大国,猪肉产量及消费量均占世界水平的一半以上。母猪繁殖性能低下、仔猪死亡率较高,仍是困扰我国养猪业发展的主要障碍。胎盘功能是影响母猪繁殖性能和仔猪健康的关键。迄今没有猪胎盘类器官的研究与报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于,提供一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法,主要是3D猪胎盘滋养层类器官培养条件。

[0007] 本发明的技术方案是这样实现的：

[0008] 一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法，其特征在于，其步骤如下：

[0009] (1) 分别配置两份3ml的等渗30%和等渗60%Percoll，并将二者按浓度由大到小逐层缓慢加入到15ml的无菌离心管内，同时取淋巴细胞分离液5ml加入到该15ml无菌离心管内。

[0010] (2) 将猪胎盘放在超净工作台上使用无菌抗生素生理盐水反复冲洗8~10次，然后使用眼科剪子剪下猪胎盘绒毛并剪碎成多段。

[0011] (3) 将剪碎后的绒毛浸泡在35~40℃的温箱中，温箱中包含有胰蛋白酶和DNA酶混合液，消化时间为30~40min；

[0012] (4) 向将消化后得到细胞悬液内添加含10%FBS的DMEM/F12培养液终止消化，吹打成细胞悬液；将细胞悬液通过100目铜网过滤后，转移到离心管中，1000~1500r/min，离心3~10min；

[0013] (5) 离心后弃上清，加DMEM/F12培养液重悬细胞，将细胞悬液分别缓慢加入Percoll分离液和淋巴细胞分离液上层，继续离心，1500~2000r/min，离心25~35min；

[0014] (6) 吸取Percoll分离液两个浓度液面交界处的灰白色云雾状细胞层和淋巴细胞分离液与培养液之间的细胞层，用抗生素盐水和培养液洗涤两次，1000~1500rpm，离心5~10min；

[0015] (7) 向洗涤过后的细胞悬液内添加含20%FBS的DMEM/F12培养基重悬，调整细胞浓度至 1.0×10^6 /ml，分别接种于涂有鼠尾胶原(5-10U/cm²)和未经胶原处理的6孔细胞培养板中，在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养2~3h。

[0016] 在本发明的这种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法中，步骤(3)中的混合液由含胰蛋白酶溶液水溶液和含DNA酶的水溶液按体积比例1:1组成，其中含胰蛋白酶溶液水溶液中胰蛋白酶的浓度为0.25%，含DNA酶的水溶液中DNA酶的含量为100U/ml。

[0017] 实施本发明的这种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法，具有以下有益效果：

[0018] (1) 克服了细胞系模型和原代细胞模型单一细胞类型、永生化或癌化特征、原代细胞无法长期培养和传代的缺点，用本发明技术手段培养3D猪源胎盘类器官可永久传代、冻存，本发明首次提出的3D猪胎盘类器官将对基础研究和应用型研究具有重要的价值。

[0019] (2) 包含体内胎盘细胞几乎所有功能细胞(合胞体滋养层细胞和细胞滋养层细胞)，能够分泌胎盘特有的多肽和激素，明显优于现有的2D细胞系和原代细胞模型。且该3D类器官模型培养体系经过调试、优化，可保证胎盘类器官长期培养、稳定传代，并可作为研究猪胎盘功能的模型。

[0020] (3) 该3D猪胎盘类器官培养体系源自于胎盘干细胞，干细胞分化为不同的胎盘功能细胞包括合胞体滋养层和细胞滋养层，因此完全不同于2D细胞模型。

[0021] (4) 3D猪胎盘类器官生长在Matrigel中，维持3D结构，因此更加接近于体内的情况，3D猪胎盘类器官包含合胞体滋养层和细胞滋养层，非常接近体内胎盘结构。

[0022] (5) 本发明提供的3D猪胎盘类器官培养体系包括胎盘干细胞分离方案和培养基为全新方法和配方。

具体实施方式

[0023] 根据发明内容,成功培养出3D猪胎盘类器官,可见猪胎盘类器官具有明显的合胞体滋养层和细胞滋养层功能区。具体实施步骤为:(1)分离胎盘干细胞,包裹在基质胶中,加入类器官生长因子,放入细胞培养箱中培养;(2)在光学显微镜下定期拍照;(3)共聚焦进行免疫荧光观察胎盘类器官不同细胞类型。

[0024] 本发明所需的3D胎盘类器官培养基成分表

[0025]

培养基成分	储存浓度	工作浓度	体积 (ml)	来源
Wnt3a (条件培养基)	2	40%	16	L 细胞系分泌
以下可保存在 -20°C				
R-Spondin (条件培养基)	5	20%	8	L 细胞系分泌
Noggin (条件培养基)	10	20%	8	L 细胞系分泌
B27 supplement	50X	1X	0.8	Thermo Fisher: 17504-044
N2 supplement	100X	1X	0.4	Thermo Fisher: 17502-048
HEPES	100X	1X	0.065	Gibco: 15630080
青霉素-链霉素混合溶液	100X	1X	0.065	Thermo Fisher: 15070063
鼠源 IL-22	5 μ g/mL	5 ng/mL	0.004	GeneScript: Z02716-10
	mol/L	mol/L		
N-乙酰基-L-半胱氨酸	5.00E-01	1.00E-03	0.08	Sigma: A9165
尼克酰胺	1	1.00E-02	0.4	Sigma: N0636
SB202190 (p38 inhibitor)	3.00E-02	3.00E-06	0.004	R&D Systems Europe
EGF (g/L)	5.00E-02	5.00E-05	0.04	Sigma: SRP3196-500UG

[0026]

DMEM/F12	6.5	Thermo Fisher:10565-018
----------	-----	-------------------------

[0027] 实施例1

[0028] 一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法,其步骤如下:

[0029] (1)分别配置两份3ml的等渗30%和等渗60%Percoll,并将二者按浓度由大到小逐层缓慢加入到15ml的无菌离心管内,同时取淋巴细胞分离液5ml加入到该15ml无菌离心管内。

[0030] (2)将猪胎盘放在超净工作台上使用无菌抗生素生理盐水反复冲洗8次,然后使用眼科剪子剪下猪胎盘绒毛并剪碎成多段。

[0031] (3)将剪碎后的绒毛浸泡在35°C的温箱中,温箱中包含有胰蛋白酶和DNA酶混合液,消化时间为30min;

[0032] (4)向将消化后得到细胞悬液内添加含10%FBS的DMEM/F12培养液终止消化,吹打成细胞悬液,将细胞悬液通过100目铜网过滤后,转移到离心管中,1000r/min,离心5min。

[0033] (5)离心后弃上清,加DMEM/F12培养液重悬细胞,将细胞悬液分别缓慢加入Percoll分离液和淋巴细胞分离液上层,继续离心,1500r/min,离心25min。

[0034] (6)吸取Percoll分离液两个浓度液面交界处的灰白色云雾状细胞层和淋巴细胞分离液与培养液之间的细胞层,用抗生素盐水和培养液洗涤两次,1000rpm,离心5min。

[0035] (7)向洗涤过后的细胞悬液内添加含20%FBS的DMEM/F12培养基重悬,调整细胞浓度至 1.0×10^6 /ml,分别接种于涂有鼠尾胶原(5-10U/cm²)和未经胶原处理的6孔细胞培养板中,在37°C、5%CO₂细胞培养箱中培养2h。

[0036] 实施例2

[0037] 一种猪源3D胎盘类器官模型的建立方法,其步骤如下:

[0038] (1) 分别配置两份3ml的等渗30%和等渗60%Percoll,并将二者按浓度由大到小逐层缓慢加入到15ml的无菌离心管内,同时取淋巴细胞分离液5ml加入到该15ml无菌离心管内。

[0039] (2) 将猪胎盘放在超净工作台上使用无菌抗生素生理盐水反复冲洗10次,然后使用眼科剪子剪下猪胎盘绒毛并剪碎成多段。

[0040] (3) 将剪碎后的绒毛浸泡在40℃的温箱中,温箱中包含有胰蛋白酶和DNA酶混合液,消化时间为40min;

[0041] (4) 向将消化后得到细胞悬液内添加含10%FBS的DMEM/F12培养液终止消化,吹打成细胞悬液,将细胞悬液通过100目铜网过滤后,转移到离心管中,1500r/min,离心10min。

[0042] (5) 离心后弃上清,加DMEM/F12培养液重悬细胞,将细胞悬液分别缓慢加入Percoll分离液和淋巴细胞分离液上层,继续离心,2000r/min,离心35min。

[0043] (6) 吸取Percoll分离液两个浓度液面交界处的灰白色云雾状细胞层和淋巴细胞分离液与培养液之间的细胞层,用抗生素盐水和培养液洗涤两次,1000rpm,离心5min。

[0044] (7) 向洗涤过后的细胞悬液内添加含20%FBS的DMEM/F12培养基重悬,调整细胞浓度至 1.0×10^6 /ml,分别接种于涂有鼠尾胶原(5-10U/cm²)和未经胶原处理的6孔细胞培养板中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养3h。

[0045] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改,等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。