



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109679893 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201910042354.5

(22)申请日 2019.01.17

(71)申请人 浙江工商大学

地址 310018 浙江省杭州市江干区下沙高
教园区学正街18号

(72)发明人 秦玉梅 韩剑众 王稣嫱

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限
公司 33246

代理人 黎双华

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及
表征方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法。该方法包括:(1)小鼠肠上皮的单层培养;(2)肠上皮单层培养物的表征。相比于现有技术,本发明以含有干细胞的小肠隐窝为基础,优化了肠上皮单层体外培养体系和培养基,并包含完整的培养和表征方法。

1. 一种基于小鼠干细胞的肠上皮单层培养方法,其特征在于包括以下几个步骤:

步骤一、使用冰上提前预冷无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液1:20稀释复合粘胶溶液,随后按照每孔150微升,加入48孔培养板1中,溶液要完全覆盖孔板底部,后放入37℃二氧化碳培养箱孵育2小时;

步骤二、将10周大的C57BL/6小鼠颈椎脱臼处死;解剖剪切开小鼠腹腔,将小肠从腹腔内拉出,取10-20厘米长度肠段,放入预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液中,眼科镊将小肠沿纵轴纵向剖开,用预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗去除肠道中的食糜;然后解剖镜下,用盖玻片沿小肠绒毛面轻轻刮除小肠绒毛,预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗肠段一次;用眼科剪将小肠沿纵轴剪成3-5毫米的小段,将肠段转移至含5毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液的离心管1中清洗;清洗完毕后,将离心管1置于冰上使小肠碎片自然沉降于离心管1底部,去除上清液;然后在离心管1中加入10毫升预冷的浓度为5mM, pH为8.0的乙二胺四乙酸溶液,横向埋于冰盒中用回旋式摇床低速振荡30分钟;消化结束后,将离心管1置于冰上自然沉降,去除上清液;向离心管1加入7毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗消化后肠组织片一次;随后去除上清液后,加入10毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液,轻柔振荡50次,脱出小肠碎片中的隐窝,随后将离心管1置于冰上自然沉降后,将离心管1上清液通过100微米孔径的细胞筛收集至50毫升离心管2中,重复上述步骤4-6次;将含有隐窝的离心管2以300g转速和4℃温度下离心5分钟;去除离心管2中的上清液,加入1毫升37℃预热培养基得隐窝悬液1,移液枪吸取10微升隐窝悬液1,滴于载玻片上,倒置显微镜下计数隐窝数量;使用培养基将隐窝浓度调整为4000-8000个/毫升,获得隐窝悬液2;将隐窝悬液2置于37℃水浴锅中孵育5min备用;

步骤三、将步骤二中得到的隐窝悬液2,按照250微升/孔的量接种到步骤1复合凝胶液包被过的48孔培养板1中;在接种前首先去除培养板中原有溶液;接种后将培养板放于37℃二氧化碳培养箱中;培养一天后更换新的培养基,去除无贴附的死细胞;而后每两天更换一次培养基,待细胞达到90%汇合后,用于其他分析实验。

2. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于该复合凝胶液提取自小鼠肉瘤,由粘连蛋白、胶原蛋白IV、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖、转化生长因子-β、表皮生长因子、类胰岛素生长因子、成纤维细胞生长因子和组织纤溶酶原激活剂组成。

3. 根据权利要求1所述的培养方法,其特征在于所述培养基由R-spondin条件培养基、Noggin条件培养基、DMEM/F12培养基、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽、青霉素、链霉素、表皮生长因子、神经元细胞培养补充剂N2和B27, Rho相关形成蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶卷曲螺旋抑制剂Y27632组成。

4. 一种基于小鼠干细胞的肠上皮单层培养五鉴定方法,其特征在于包括以下几个步骤:

步骤一、将达到90%汇合度的培养板1去除培养基;向培养孔中加入200微升4%多聚甲醛得鉴定培养板孔1, 20-25℃条件下孵育15分钟;去除鉴定培养孔1中多聚甲醛溶液,后磷酸盐缓冲液清洗培养孔3次,加入200微升抗原封闭液得鉴定培养板2, 20-25℃条件下孵育30-45分钟;去除鉴定培养孔2中抗原封闭液,加入一抗稀释液,在温度4℃条件下过夜放置12小时,得鉴定培养孔3;

步骤二、将步骤二中得到的鉴定培养孔用磷酸盐缓冲溶液重复清洗3次,每次5分钟,得

鉴定培养孔4;在鉴定培养孔4中加入与步骤一中一抗相对应的二抗,温度20-25℃条件下孵育30分钟,得鉴定培养孔5;将鉴定培养孔5用磷酸盐缓冲溶液重复清洗4次,每次5分钟;随后,加入2-(4-脒基苯基)-6-吡啶脒二盐酸盐溶液,温度20-25℃条件下孵育5分钟;用超纯水以清洗1-2次,每次5分钟,得小肠鉴定培养孔6;最后用封片剂和48孔板相匹配的原型盖玻片对鉴定培养孔6进行封片,得到肠上皮单层培养物鉴定孔;

步骤三,采用激光共聚焦显微镜对步骤二中得到的鉴定孔进行观察,获取免疫荧光图像。

基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法。

背景技术

[0002] 肠道作为人体最大的营养物质识别和吸收器官,关于食物在肠道上皮层面的发生的识别、感受、转运及激素释放作用,对于代谢紊乱疾病如肥胖及糖尿病的预防与治疗具有重要指导作用。以往,用于上述功能研究的体外细胞模型,以由单一细胞组成的肿瘤细胞系组成,这些经过基因改造的肠道上皮细胞系虽然具有肠道吸收细胞或分泌细胞功能,但是单一的细胞组成只能用于相对简单功能的分析,无法再现真实肠道中细胞-细胞之间相互作用。幸运的是,进食年来肠道干细胞的发现及干细胞培养技术的进步,为新型体外肠道研究模型的建立提供了基础。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法。该方法区别于现有技术,以小鼠肠道干细胞为基础,通过优化培养板处理方法、肠道隐窝接种密度、培养基条件实现了长上皮的体外单层培养,并包含鉴定方法。。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 一种基于小鼠干细胞的肠上皮单层培养方法,包括以下几个步骤:

[0006] 步骤一、使用冰上提前预冷无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液1:20稀释复合粘胶溶液,随后按照每孔150微升,加入48孔培养板1中,溶液要完全覆盖孔板底部,后放入37℃二氧化碳培养箱孵育2小时;

[0007] 步骤二,将10周大的C57BL/6小鼠颈椎脱臼处死;解剖剪切开小鼠腹腔,将小肠从腹腔内拉出,取10-20厘米长度肠段,放入预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液中,眼科镊将小肠沿纵轴纵向剖开,用预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗去除肠道中的食糜;然后解剖镜下,用盖玻片沿小肠绒毛面轻轻刮除小肠绒毛,预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗肠段一次;用眼科剪将小肠沿纵轴剪成3-5毫米的小段,将肠段转移至含5毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液的离心管1中清洗;清洗完毕后,将离心管1置于冰上使小肠碎片自然沉降于离心管1底部,去除上清液;然后在离心管1中加入10毫升预冷的浓度为5mM, pH为8.0的乙二胺四乙酸溶液,横向埋于冰盒中用回旋式摇床低速振荡30分钟;消化结束后,将离心管1置于冰上自然沉降,去除上清液;向离心管1加入7毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗消化后肠组织片一次;随后去除上清液后,加入10毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液,轻柔振荡50次,脱出小肠碎片中的隐窝,随后将离心管1置于冰上自然沉降后,将离心管1上清液通过100微米孔径的细胞筛收集至50毫升离心管2中,重复上述步骤4-6次;后含有隐窝的离心管2以300g转速和4℃温度下离心5分钟;去除离心管2中的上清液,加入1毫升37℃预热培养基得隐窝悬液1,移液枪吸取10微升隐窝悬液1,滴于载玻片上,倒置显微镜下计数隐窝数量;使用培养基将隐窝浓度调整为4000-8000/毫升,获得隐窝

悬液2;后将隐窝悬液2置于37℃水浴锅中孵育5min备用;

[0008] 步骤三、将步骤二中得到的隐窝悬液2,按照250微升/孔的量接种到步骤1复合凝胶液包被过的48孔培养板1中;在接种前首先去除培养板中原有溶液;接种后将培养板放于37℃二氧化碳培养箱中;培养一天后更换新的培养基,去除无贴附的死细胞;而后每两天更换一次培养基,待细胞达到90%汇合后,用于其他分析实验。

[0009] 进一步地,所述复合凝胶液提取自小鼠肉瘤,由粘连蛋白、胶原蛋白IV、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖、转化生长因子- β 、表皮生长因子、类胰岛素生长因子、成纤维细胞生长因子和组织纤溶酶原激活剂组成。

[0010] 所述培养基由R-spondin条件培养基、Noggin条件培养基、DMEM/F12培养基、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽、青霉素、链霉素、表皮生长因子、神经元细胞培养补充剂N2和B27,Rho相关形成蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶卷曲螺旋抑制剂Y27632组成。

[0011] 本发明还提供了基于小鼠干细胞的肠上皮单层培养五鉴定方法,,包括以下几个步骤:

[0012] 步骤一、将达到90%汇合度的培养板1去除培养基;向培养孔中加入200微升4%多聚甲醛得鉴定培养板孔1,20-25℃条件下孵育15分钟;去除鉴定培养孔1中多聚甲醛溶液,后磷酸盐缓冲液清洗培养孔3次,加入200微升抗原封闭液得鉴定培养板2,20-25℃条件下孵育30-45分钟;去除鉴定培养孔2中抗原封闭液,加入一抗稀释液,在温度4℃条件下过夜放置12小时,得鉴定培养孔3;

[0013] 步骤二、将步骤二中得到的鉴定培养孔用磷酸盐缓冲溶液重复清洗3次,每次5分钟,得鉴定培养孔4;在鉴定培养孔4中加入与步骤一中一抗相对应的二抗,温度20-25℃条件下孵育30分钟,得鉴定培养孔5;将鉴定培养孔5用磷酸盐缓冲溶液重复清洗4次,每次5分钟;随后,加入2-(4-脒基苯基)-6-吡啶脒二盐酸盐溶液,温度20-25℃条件下孵育5分钟;用超纯水以清洗1-2次,每次5分钟,得小肠鉴定培养孔6;最后用封片剂和48孔板相匹配的原型盖玻片对鉴定培养孔6进行封片,得到肠上皮单层培养物鉴定孔;

[0014] 步骤三、采用激光共聚焦显微镜对步骤二中得到的鉴定孔进行观察,获取免疫荧光图像。

[0015] 本发明具有以下优点及有益效果:

[0016] 相比于现有的技术方法,本发明提供的方法具有以下几个显著的优点和进步:

[0017] 1、本发明的技术方法,优化了培养板的处理方法,保证肠上皮体外单层培养顺利完成。

[0018] 2、本发明的技术方法,对小鼠肠上皮体外单层培养体系采用的培养体系、培养基和培养方法等培养关键性试剂及条件进行了突破性优化,进而保证实现肠上皮体外单层培养,保证培养具有快速及稳定特征。

[0019] 3、本发明的技术方法,优化了肠上皮体外单层培养的体外鉴定方法,能够明确肠上皮体外单层培养的可靠性。

附图说明

[0020] 图1是空肠上皮单层培养形成图。

[0021] 图2是空肠上皮单层培养鉴定图。

[0022] 其中,A是原代分离孔肠隐窝接种48孔培养板后1h代表性图像,B是空肠隐窝经过3天培养后形成单层培养代表性图像;

[0023] C、D、E、F、G分别是肠道上皮细胞标志蛋白钙粘蛋白(E-cadherin)、肠道上皮增殖细胞标志蛋白(Ki67)、细胞紧密连接标志蛋白(ZO-1)、内分泌细胞标志蛋白嗜铬粒蛋白(Chromogranin A)和L型细胞标志蛋白胰高血糖素样肽(GLP-1)标记的肠道不同类型细胞在空肠单层培养中表达的免疫荧光代表性图像。

具体实施例

[0024] 本发明公开了一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述方法已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明。

[0025] 为更好地阐述本发明,下面通过实施例来说明。

[0026] 实施例1:

[0027] 步骤一、使用冰上提前预冷无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液1:20稀释复合粘胶溶液,随后按照每孔150微升,加入48孔培养板1中,溶液要完全覆盖孔板底部,后放入37℃二氧化碳培养箱孵育2小时;

[0028] 步骤二、将10周大的C57BL/6小鼠颈椎脱臼处死;解剖剪切开小鼠腹腔,将小肠从腹腔内拉出,取10-20厘米长度空肠,放入预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液中,眼科镊将空肠沿纵轴纵向剖开,用预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗去除肠道中的食糜;然后解剖镜下,用盖玻片沿空肠绒毛面轻轻刮除小肠绒毛,预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗肠段一次;用眼科剪将空肠沿纵轴剪成3-5毫米的小段,将肠段转移至含5毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液的离心管1中清洗;清洗完毕后,将离心管1置于冰上使空肠碎片自然沉降于离心管1底部,去除上清液;然后在离心管1中加入10毫升预冷的浓度为5mM, pH为8.0的乙二胺四乙酸溶液,横向埋于冰盒中用回旋式摇床低速振荡30分钟;消化结束后,将离心管1置于冰上自然沉降,去除上清液;向离心管1加入7毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液清洗消化后肠组织片一次;随后去除上清液后,加入10毫升预冷的无钙、镁离子磷酸盐缓冲溶液,轻柔振荡50次,脱出空肠碎片中的隐窝,随后将离心管1置于冰上自然沉降后,将离心管1上清液通过100微米孔径的细胞筛收集至50毫升离心管2中,重复上述步骤4-6次;后含有隐窝的离心管2以300g转速和4℃温度下离心5分钟;去除离心管2中的上清液,加入1毫升37℃预热培养基得隐窝悬液1,移液枪吸取10微升隐窝悬液1,滴于载玻片上,倒置显微镜下计数隐窝数量;使用培养基将隐窝浓度调整为4000-8000/毫升,获得隐窝悬液2;后将隐窝悬液2置于37℃水浴锅中孵育5min备用;

[0029] 步骤三、将步骤二中得到的隐窝悬液2,按照250微升/孔的量接种到步骤1复合凝胶液包被过的48孔培养板1中;在接种前首先去除培养板中原有溶液;接种后将培养板放于37℃二氧化碳培养箱中;培养一天后更换新的培养基,去除无贴附的死细胞;而后每两天更换一次培养基,待细胞达到90%汇合后,用于其他分析实验。如图1A所示,按照250微升/孔数量接种后,空肠隐窝基本可以70-90%覆盖培养板;培养3天后,如图1B所示,肠道隐窝形

成单层,而且具有多种不同形态及大小类型细胞,其中图中的含有多点状颗粒的细胞为典型肠上皮中潘氏细胞,充分说明以肠道干细胞为基础的培养可以形成与体内肠上皮相细胞组成单层结构。

[0030] 步骤四、将达到90%汇合度的培养板1去除培养基;向培养孔中加入200微升4%多聚甲醛得鉴定培养板孔1,20-25℃条件下孵育15分钟;去除鉴定培养孔1中多聚甲醛溶液,后磷酸盐缓冲液清洗培养孔3次,加入200微升抗原封闭液得鉴定培养板2,20-25℃条件下孵育30-45分钟;去除鉴定培养孔2中抗原封闭液,加入一抗稀释液,在温度4℃条件下过夜放置12小时,得鉴定培养孔3;

[0031] 步骤五、将步骤二中得到的鉴定培养孔用磷酸盐缓冲溶液重复清洗3次,每次5分钟,得鉴定培养孔4;在鉴定培养孔4中加入与步骤一中一抗相对应的二抗,温度20-25℃条件下孵育30分钟,得鉴定培养孔5;将鉴定培养孔5用磷酸盐缓冲溶液重复清洗4次,每次5分钟;随后,加入2-(4-脒基苯基)-6-吲哚脒二盐酸盐溶液,温度20-25℃条件下孵育5分钟;用超纯水以清洗1-2次,每次5分钟,得小肠鉴定培养孔6;最后用封片剂和48孔板相匹配的原型盖玻片对鉴定培养孔6进行封片,得到肠上皮单层培养物鉴定孔;

[0032] 步骤六、采用激光共聚焦显微镜对步骤二中得到的鉴定孔进行观察,获取免疫荧光图像。

[0033] 图2是空肠上皮单层培养鉴定图,从图2中可以看到,与小鼠体内由单层细胞组成的空肠上皮一致,体外也可以实行肠上皮的单层培养;而且与体内细胞组成结构相同,不仅具有增殖能力的肠道干细胞,而且分化出功能成熟的肠分泌功能细胞,同时细胞与细胞之间形成紧密连接。

[0034] 因此,从上述步骤和结果可以看出,一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法是稳定,可靠,有效的。

[0035] 以上所述仅是本发明的特定实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

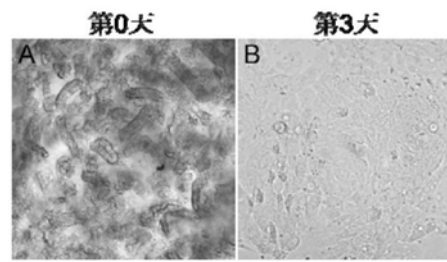


图1

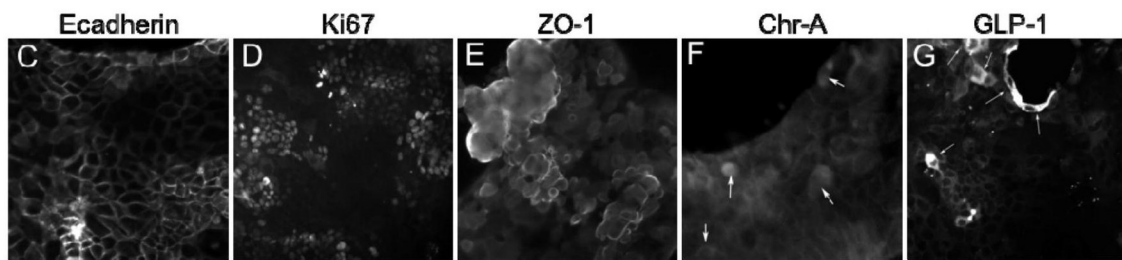


图2

专利名称(译)	基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法		
公开(公告)号	CN109679893A	公开(公告)日	2019-04-26
申请号	CN201910042354.5	申请日	2019-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
[标]发明人	秦玉梅 韩剑众 王稣婧		
发明人	秦玉梅 韩剑众 王稣婧		
IPC分类号	C12N5/071 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/64		
CPC分类号	C12N5/0679 G01N21/6458 G01N33/531 G01N33/54306		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于小鼠肠道干细胞的肠上皮单层培养及表征方法。该方法包括：(1)小鼠肠上皮的单层培养；(2)肠上皮单层培养物的表征。相比于现有技术，本发明以含有干细胞的小肠隐窝为基础，优化了肠上皮单层体外培养体系和培养基，并包含完整的培养和表征方法。

