

ICS XXXXX

CCS XX

团 体 标 准

T/TPPA XXX - XXXX

基于 3D 培养技术的小鼠肠道类器官 构建操作规程（征求意见稿）

Standard operating procedure for the construction of murine intestinal
organoids based on 3D culture technology

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

天津市医药行业协会 发布

目 次

前 言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 材料与设备	1
4.1 生物材料	1
4.2 主要试剂	2
4.3 主要设备与耗材	2
5 试验方法	2
5.1 小鼠小肠类器官的建立、传代培养与冻存	2
5.2 小鼠小肠类器官的鉴定	4
5.3 结果判定	4

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由天津市药品检验研究院提出。

本文件由天津市医药行业协会归口。

本文件起草单位：天津市药品检验研究院、天津天士力之骄药业有限公司、天津赛诺制药有限公司、天津生化制药有限公司。

本文件主要起草人：徐琳、王冲、仝彩铃、岳洪水、华晓东、贾文婷、曾凡伟、宋丽丽、徐军田、万梅绪、赵洁。

基于 3D 培养技术的小鼠肠道类器官构建操作规程

1 范围

本文件规定了以3D培养的一类器官进行小鼠肠道类器官构建的实验方法。

本文件适用于基于3D培养技术的小鼠肠道类器官构建的各类实验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 14925-2023 实验动物 环境及设施

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

GB/T 24001-2016 环境管理体系 要求及使用指南

GB/T 45001-2020 职业健康安全管理体系 要求及使用指南

3 术语和定义

下列属于和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoid

类器官指利用成体干细胞或多能干细胞三维（3D）培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物，从而在结构和功能上模拟真实组织器官。

3.2

小鼠肠道类器官 murine intestinal organoid

源自小鼠小肠或结肠隐窝基底柱状细胞（Lgr5⁺干细胞）或单个干细胞，在含有特定生长因子的培养基中，于细胞外基质内三维生长形成的，具有隐窝-绒毛样极性结构、包含多种肠上皮细胞类型的微器官。

4 材料与设备

4.1 生物材料

健康成年小鼠（如C57BL/6品系）的肠道组织，或已建立的小鼠肠道类器官冻存株。验动物应从取得实验动物生产许可证资质的单位购进。在实验期间应按国家对实验动物饲养条

件要求进行饲养。动物饲养符合GB 14925 和 GB/T 24001 的要求,动物实验符合 GB 19489 和 GB/T 45001 的要求。

4.2 主要试剂

细胞外基质、小鼠肠道类器官完全培养基(含Wnt3a、R-spondin 1、Noggin、EGF等必需生长因子)、Advanced DMEM/F12基础培养基、细胞消化液(如含dispase II或Accutase的溶液)、细胞活力检测试剂(如CellTiter-Glo® 3D 或 Calcein-AM/PI双染试剂盒)、受试物储备液及溶剂对照。

4.3 主要设备与耗材

超净工作台、37 °C, 5% CO₂细胞培养箱、预冷的离心管、吸头、24孔或96孔超低吸附培养板、倒置相差显微镜及具备图像分析功能的活细胞成像系统、化学发光检测仪或荧光酶标仪、2 °C-4 °C冰箱、-80 °C低温冰箱。

5 试验方法

5.1 小鼠小肠类器官的建立、传代培养与冻存

5.1.1 实验准备

实验前先将基质胶放置4 °C冰上解冻,同时取出培养基放置室温平衡。与细胞接触的离心管,试管或者塑料吸头需要用类器官培养防粘附润洗液润洗后使用。

5.1.2 取样

小鼠断颈处死后,在小鼠身体上喷75%酒精。在无菌条件下,取出近胃端3 cm-10 cm小肠组织,用镊子轻轻剥离肠道外部的肠系膜及脂肪后,放入4 °C预冷的含双抗的DPBS中。

5.1.3 清洗

使用手术剪将肠管剪开,肠腔面朝上,一只手使用手术镊夹住肠组织一端,另一只手使用手术刀片轻轻刮去肠腔表面肠绒毛,待肠绒毛被刮净后,将肠组织置于新的已装有DPBS的培养皿中清洗,重复清洗2次。将清洗后的小肠组织剪碎至5 mm长度,并再次转移至新的培养皿中,用DPBS清洗2次至清洗液澄清。

5.1.4 消化

将清洗好的肠段转移至50 ml离心管中,加入30 ml的DPBS,再加入300 μl 0.5M EDTA(EDTA终浓度为5 mM)。置4 °C摇床上,80 rpm,消化30分钟。消化结束后,待肠段沉降至离心管底部,吸弃上清,加入5 ml DPBS,使用宽口移液管吹打肠段,肉眼观察到大量的绒

毛脱落，取上清显微镜下观察，待上清出现完整隐窝即可终止消化；若无隐窝出现，继续添加EDTA至终浓度为5 mM，并适当延长消化时间。

5.1.5 清洗

消化完成后，加入4 °C预冷DPBS，轻柔摇匀，静置后弃上清，重复2次以去除消化酶及EDTA。

5.1.6 重悬与收集

加入30 ml预冷的含0.1%BSA的DPBS，涡旋10秒，取上清70 μm滤网过滤，收集穿过滤网的组织悬液。若需要大量培养可重复收集2次。300 g离心力4 °C离心3分钟。吸弃上清液并将沉淀重悬于含0.1%BSA的DPBS中，取悬液进行隐窝计数。根据培养需求取适量细胞沉淀加入基质胶 (>70%) 并在冰上混匀。

5.1.7 培养

将基质胶和细胞的混合悬液点入培养孔板底部正中央，使用枪头稍微摊平悬液。将培养板放入37 °C和5% CO₂的培养箱中15-25分钟，让基质胶凝固。待基质胶完全凝固后，沿壁缓慢加入室温平衡的类器官完全培养基，避免破坏已凝固结构（推荐：96孔板加入100 μl /孔，48孔板加入250 μl /孔，24孔板加入500 μl /孔）。将培养板置于37°C和5% CO₂的恒温培养箱中。

5.1.8 观察

每隔2-3天更换一次培养基，小心地从孔中吸出培养基，并加入新鲜的室温平衡的类器官完全培养基。密切监测类器官生长状态。小鼠小肠类器官在5至7天内建成。

5.1.9 传代

待类器官培养到直径为600 μm大小时（或变黑不再增大时），即可进行类器官的传代（每代约5天）。以下操作与细胞接触的耗材均需用润洗液润洗后使用。吸弃旧培养基，加入等体积上皮类器官基础培养基，用细胞刮刀或者移液管吸头尖端轻轻刮下（或吹打）基质胶和类器官混合物，转移至1.5 ml离心管中（每管最多收集2-3孔类器官，避免体积过大消化效率低），吹打5-10次，使类器官和基质胶分离，300 g离心3分钟。弃去上清，加入1 ml基础培养基再次吹打类器官5-10次，取少量悬液镜检观察类器官状态：若类器官已分散成碎片则可选择机械吹打分散类器官后直接300 g离心3分钟，离心后上皮类器官基础培养基清洗2次；若类器官比较完整可300 g离心3分钟后，去除上清液加入5倍于基质胶和类器官混合物体积的类器官消化液，吹打混匀后置于37 °C培养箱中消化2分钟。消化完成后，加入5倍体积上皮类器官基础培养基轻柔吹打混匀以终止消化反应，然后300 g离心3分钟。

5.1.10 冻存

吸弃培养板中的旧培养基。加入预冷的PBS或Advanced DMEM/F12，轻柔吹打或使用枪头机械破碎基质胶，将类器官释放至溶液中。将含有类器官的悬浮液转移至15 mL离心管中，置于冰上。4 °C，300 g离心5分钟，小心弃去上清。配制冻存悬液根据冻存管数（建议每管冻存1-2个孔类器官的浓缩量），用预冷的冻存保护液重悬类器官沉淀。轻柔吹打形成均匀悬液，全程保持冰浴操作以减缓DMSO毒性。迅速将悬液分装至预标记的冻存管中（每管约0.5-1.0 mL），拧紧管盖。使用程序降温或者适宜降温方法将其放入-80 °C冰柜，长时间冻存需要转移至液氮中。

5.2 小鼠小肠类器官的鉴定

5.2.1 形态学鉴定

培养3至7天后，使用倒置显微镜或活细胞成像系统，对每个孔类器官的整体形态进行拍照记录。类器官应出现向外凸起的“芽”状结构，芽区为隐窝样区域，内含肠道干细胞和增殖细胞，中央腔体为绒毛样上皮区。光镜下可见单层柱状上皮围成囊状，细胞核位于基底侧，顶端朝向中央腔体，刷状缘可隐约辨识。评估指标包括：类器官存活率（结构完整、透亮的类器官比例）、平均直径/面积、隐窝样结构数量、以及出现结构塌陷、液化或坏死的程度。

5.2.2 细胞活力定量检测

方法1: 采用ATP检测法：直接向各孔中加入等体积试剂，振荡裂解后，测量化学发光信号。信号值与活细胞数成正比。

方法2: 采用荧光活死染色法：加入Calcein-AM（活细胞，绿色荧光）和碘化丙啶（死细胞，红色荧光）染色后，通过荧光显微镜或酶标仪进行定量分析。

细胞活力应大于98%。

5.2.3 细胞谱系标志物检测

用常用免疫荧光或免疫组化染色，实时定量PCR（RT-PCR）方法检测Lgr5基因表达，该基因表达应为阳性。

5.2.4 其他经过功能性鉴定

屏障功能评估（可选，需优化）：可在Transwell体系内培养类器官单层，通过测量跨上皮电阻（TEER）或荧光标记右旋糖酐（如FITC-Dextran）的渗透率来评估上皮屏障完整性。

5.2.5 数据处理与报告

如实记录以上鉴定结果并进行报告。

5.3 结果判定

结合形态学鉴定、细胞谱系标志物检测结果和功能性评价结果，综合评价小鼠小肠类器官的构建情况。

应报告：构建的小鼠小肠类器官的形态学鉴定结果、细胞谱系标志物鉴定结果和功能性评价结果。