

干细胞类器官形成能力检测

Organoid Formation Efficiency Assay of Stem Cells

郭旺昕^{1, #}, 田维新^{2, #}, 韩帅², 赵宏伟², 高栋^{1, 3, 4, *}

¹ 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海; ² 化学生物学技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海; ³ 中国科学院干细胞与再生研究所, 北京; ⁴ 中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: dong.gao@sibcb.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 郭旺昕, 田维新, 韩帅, 赵宏伟, 高栋. (2021). 干细胞类器官形成能力检测. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010867. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010867.

How to cite: Guo, W. X., Tian, W. X., Han, S., Zhao, H. W. and Gao, D. (2021). Organoid Formation Efficiency Assay of Stem Cells. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010867. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010867. (in Chinese)

摘要: 干细胞类器官形成能力的鉴定是干细胞研究领域经典的方法。随着类器官培养体系的日渐成熟, 基于基质胶的 3D 培养的干细胞类器官形成实验也逐渐地被广泛地应用于体外干细胞潜能的鉴定。而前列腺的类器官培养体系是由小肠类器官培养体系优化而来。本文将利用基质胶 3D 培养体系以前列腺干细胞为例, 分析前列腺干细胞体外类器官形成能力, 探究前列腺干细胞是否具有更高的类器官形成能力, 验证基于 3D 培养体系的类器官形成实验能够用于检测干细胞潜能。

关键词: 前列腺干细胞, 类器官培养, 基质胶

材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (Greiner Bio-One, catalog number: 188261)
2. Plates, 24 well (Greiner Bio-One, catalog number: 662 102)
3. Matrigel, growth factor reduced, Phenol Red-free (CORNING, catalog number: 356231)
4. Advanced DMEM/F12 (adDMEM/F12; Life Technologies, catalog number: 12634-034)
5. GlutaMAX, 100x (Life Technologies, catalog number: 35050-068)
6. Penicillin-streptomycin (Life Technologies, catalog number: 15140-122)

7. HEPES (Life Technologies, catalog number: 15630-056)
8. B27 supplement, 50x (Life Technologies, catalog number: 17504-044)
9. N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, catalog number: A9165)
10. A83-01 (Tocris Bioscience, catalog number: 2939)
11. Y-27632 dihydrochloride (Abmole Bioscience, catalog number: M1817)
12. Human epidermal growth factor (EGF) (PeproTech, catalog number: AF-100-15)
13. Recombinant human Noggin (PeproTech, catalog number: 120-10C)
14. recombinant R-spondin 1 protein (R&D Systems, catalog number: 4645-RS-025)
15. (DiHydro)testosterone (5α -Androstan- 17β -ol-3-one) (Sigma-Aldrich, catalog number: A8380)
16. DAPI (Invitrogen, catalog number: D21490, use concentration 1ng/ μ l)
17. EpCAM-PE-Cy7 (Biolegend, catalog number: 118216, dilution rate 1:500)
18. Tacstd2-APC (R&D system, catalog number: FAB1122F, dilution rate 1:20)
19. Collagenase/Hyaluronidase (STEMCELL, catalog number: 7912)
20. 小鼠前列腺消化液

成分	终浓度
Advanced DMEM/F12	——
Collagenase/Hyaluronidase	10x 稀释
Y-27632	10 μ M
HEPS	100x 稀释
GlutaMAX	100x 稀释
Penicillin-streptomycin	100x 稀释
Primocin	500x 稀释

21. 前列腺类器官培养基 (Gao *et al.*, 2014 and 2016; Drost *et al.*, 2016)

细胞因子	终浓度
Advanced DMEM/F12	——
B27	50x 稀释
N-acetylcysteine	1.25 mM
EGF	50 ng/ml
Noggin	10%

R-spondin 1	5%
A83-01	200 nM
DHT	1 nM
Y-27632	10 μ M
HEPS	100x 稀释
GlutaMAX	100x 稀释
Penicillin-streptomycin	100x 稀释
Primocin	500x 稀释

仪器设备

1. 多色干细胞流式细胞分选仪 (BD FACS Aria III)
2. 细胞培养箱 (Thermo)
3. 离心机 (Eppendorf)
4. 移液枪 (Eppendorf)
5. 细胞成像多功能微孔板检测仪 (BioTek, Cytation 5)

实验步骤

1. 小鼠前列腺消化
 - 1) 将一只 10 周龄的 T2Y 公鼠放入二氧化碳箱体中, 对 T2Y 小鼠进行安乐死处理。
 - 2) 将前列腺从安乐死的小鼠体内取出, 并在体视显微镜下将前列腺组织解剖干净。
 - 3) 将一只小鼠的前列腺放入含有 0.75 ml 小鼠前列腺消化液的 1.5 ml 无菌离心管中, 用眼科剪刀将前列腺剪碎, 并放入 37 °C 培养箱消化 30 min。
 - 4) 消化后的前列腺组织悬液室温静置 2 min, 而后移除上清。
 - 5) 加入 1 ml DMEM 培养基重悬前列腺组织沉淀, 而后室温静置 2 min, 移除上清。
 - 6) 加入 1 ml 含有 10 μ M Y27632 的 TrypLE 中, 放入 37 °C 培养箱消化 10 min。
 - 7) 消化结束后, 用 1 ml 含有 10% FBS 的 DMEM 终止消化, 并用 45 μ m 的细胞滤网过滤细胞悬液, 将含有细胞悬液的离心管放入离心机 300 $\times$ g 离心 3 min, 移除上清。

2. 流式分选抗体染色

- 1) 加入 1 ml 预冷的流式分选缓冲液重悬细胞沉淀，而后放入室温离心机中 $300 \times g$ 离心 3 min，移除上清。
- 2) 用 300 μ l 预冷的流式分选缓冲液稀释所需染色的流式抗体 (DAPI、EpCAM-PE/Cy7、Tacstd2-APC)，并将配好的含有流式抗体的流式分选缓冲液加入细胞沉淀中，重悬细胞沉淀并吹打混匀。
- 3) 将含有吹打好的细胞悬液的离心管插到冰上，避光染色 15 min。
- 4) 染色结束后，向离心管中加入 1 ml 流式分选缓冲液，并将含有细胞悬液的离心管放入室温离心机 $300 \times g$ 离心 3 min，移除上清。
- 5) 用 500 μ l 预冷的流式分选缓冲液重悬细胞沉淀，并用 45 μ m 的细胞滤网将细胞悬液过滤到无菌的流式管中。用 Aria III 分选所需细胞。

3. 干细胞类器官形成能力检测

- 1) 将含有分选后的细胞悬液的 15 ml 离心管放入离心机中， $300 \times g$ 离心 5 min，随后吸取上清。
- 2) 用合适的体积前列腺类器官培养基重悬细胞沉淀，并调整细胞浓度为 2×10^4 个/ml 或者 4×10^4 个/ml，紧接着取 10 μ l 细胞悬液到一个新的 1.5 ml 无菌离心管中，加入等体积的台盼蓝染料混匀滴加到血球计数板上。在倒置显微镜下，统计活细胞率，活细胞率大于 90% 为宜。随后按照基质胶：前列腺类器官培养基 = 1:1 的比例轻轻吹打混匀，一般情况 50 μ l 基质胶和前列腺类器官混合液含有 500 或者 1000 个细胞，直接滴加到 24 孔悬浮细胞培养板中。
- 3) 将滴加好的培养板放入 37 °C 细胞培养箱内，培养半个小时。等待基质胶凝固后，加入 1 ml 前列腺类器官培养基，放入 37 °C 培养箱中。
- 4) 此后，每三天换一次细胞培养液。一周之后，拍照统计类器官形成效率以及类器官的大小。

注：1) 基质胶要提前两个小时从 -20 °C 冰箱取出放在冰上，等待基质胶的融化。2) 更换细胞培养液的时候，轻轻从孔壁吸取旧的培养基，再缓慢加入新鲜的培养基。

4. 图像采集

我们使用细胞成像多功能微孔板检测仪器 (BioTek 公司的 Cytation5) 及 GENE5 软件进行类器官的图像采集及定量分析的流程。Greiner 24 孔板的尺寸参数设置见图

1, “Imaging Parameters”中的“Bottom Elevation”对于成像比较重要, 可根据实际拍照的清晰层面来确定。

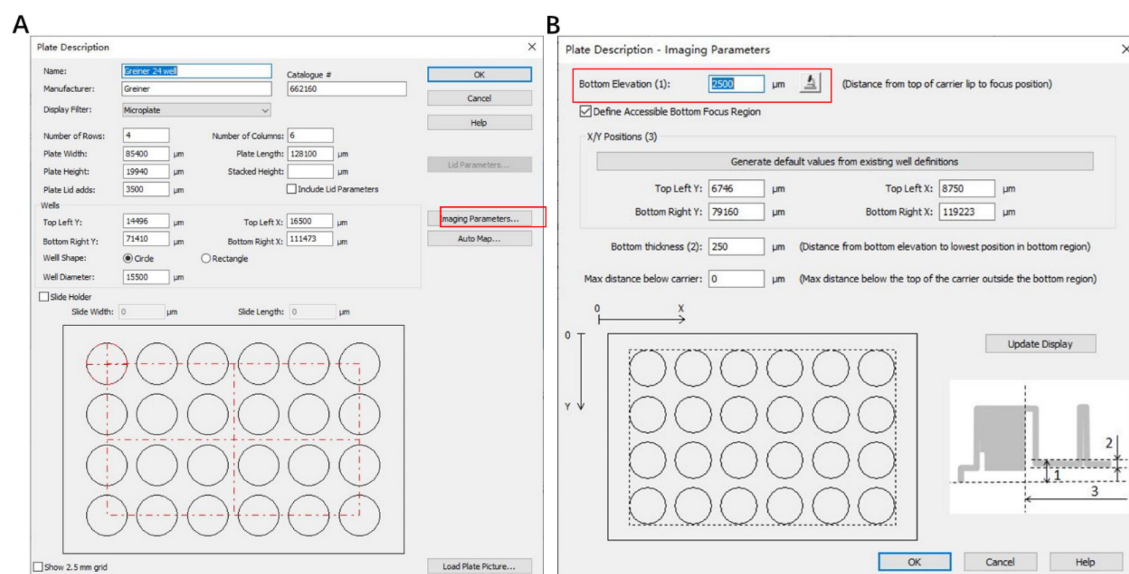


图 1. Greiner 24 孔板实验板参数设置

Cytation 5 多功能成像酶标仪图像收集方法: 1) 选择要拍摄的通道, 本案例中使用的是 Bright Field, 如果所用样品有荧光信号, 可同时添加荧光拍照通道 (例如 图 2A 中 RFP 通道)。2) 设好每个通道的曝光参数 (包括 Illumination, Integration Time 和 Gain 值)、聚焦方式 (Focus options)。此案例中我们使用固定层面聚焦的方式 (Fixed focal height)。3) 对于基质胶内样品的拍摄需要设置 Z stack。根据样品在基质胶中的实际分布情况, 我们发现有些器官的层面 (Z stack) 定位在 2300 μm 至 3320 μm 的区间内, 因此我们将 2300 μm 处定义为固定的聚焦层面 (图 2B), 由此层面向上共拍摄 4 层 (number of slices), 两层的间隔 (step size) 为 340 μm , 拍摄至 3320 μm 处结束 (图 2A)。4) 设置拍照的视野位置 (Montage)。本案例中我们收集了整个培养孔的图像 (图 2A)。5) 在 “Imaging Step” 界面右上角选择要拍摄的孔号。全部拍照参数设置完毕, 运行程序进行拍照。

注: 1) 成像前, 用 75% 酒精喷湿无尘擦拭纸, 擦拭细胞板底部的外表面。2) 如果各孔内样品位置都接近孔中央部位, 可以只对孔中央区域进行成像, 会节约拍照时间。

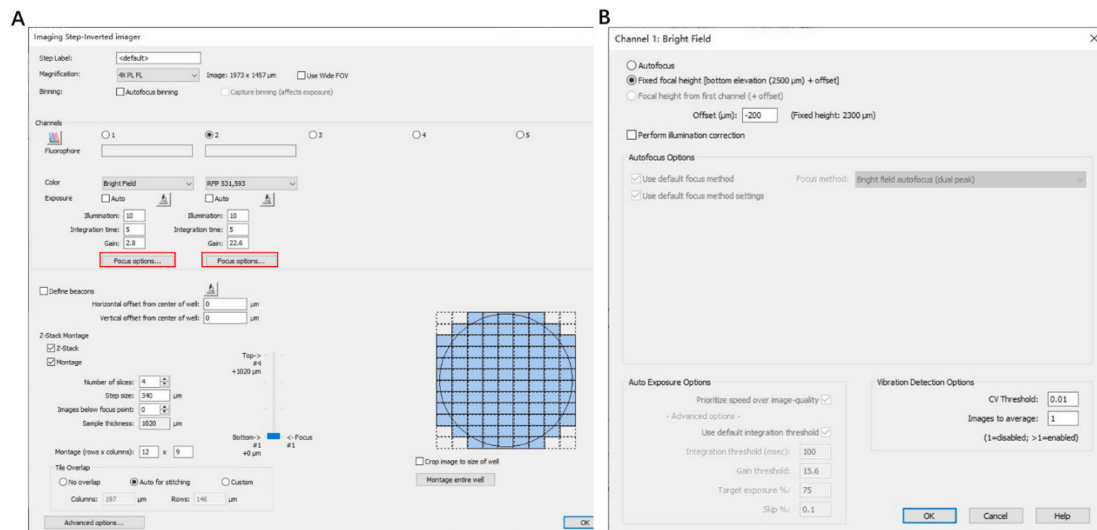


图 2. Cytation 5 成像参数设置

5. 图像分析

图像定量分析思路如下：我们首先对图像进行预处理，根据明场进行图像的拼接，将同一个孔中同一层面的所有视野拼接成一张图片，之后选择要进行投射的层面，将相应的拼接后的图像进行投射，叠加到一张图片上，最终每个孔得到一张包含整孔多个层面信息的图片。然后进行图像的分析，根据明场圈选出每一个孔的类器官位置，最终得到每个孔中的类器官数目及大小、面积等信息。

Cytation 5 图像预处理及分析方法设置

第一步：对图片进行“image stitching”，将一个孔中的所有视野进行拼接，得到整孔拼接图片（图 3A、图 3D）。

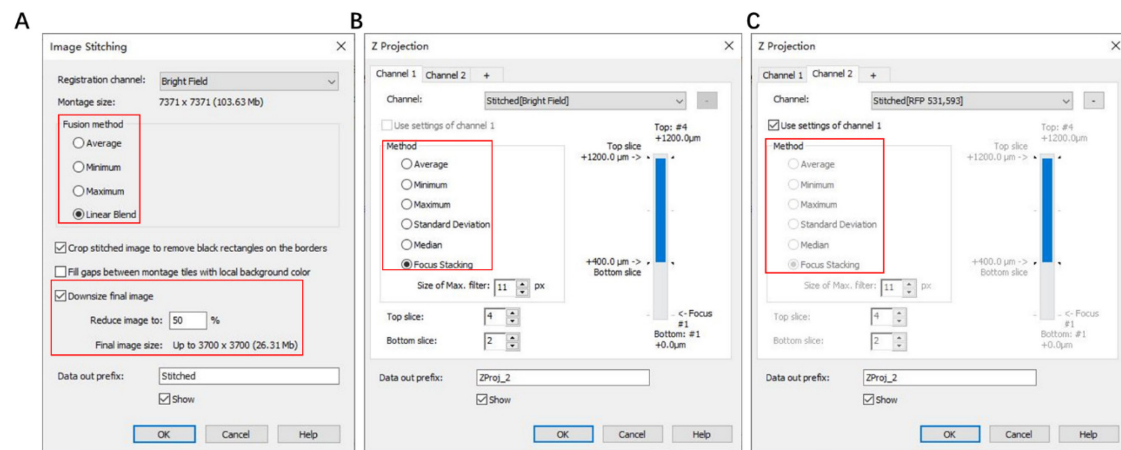
第二步：对“stitched image”进行投射“Z projection”，将一个孔中 stack 2 至 stack 4 三个层面的图像进行投射，得到包含三个层面图像信息的单张图片（图 3B-E）。

第三步：对得到的“z_proj_stitched image”进行分析，设置明场阈值及大小等参数圈选出类器官（图 4A-E）。设置需要定量输出的参数（图 4C）。

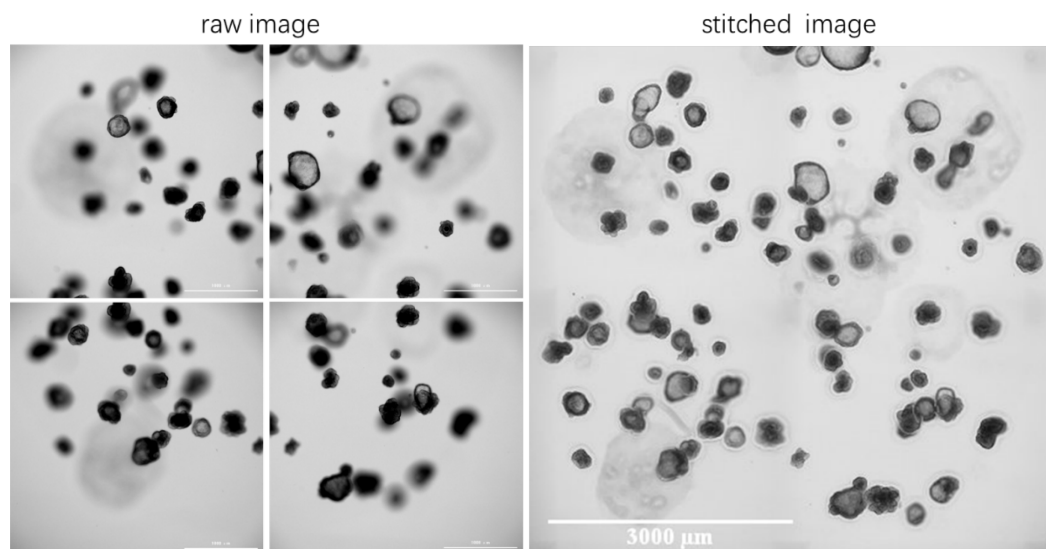
第四步：“subpopulation analysis”对第三步中圈选出的类器官进行再次筛选，排除不符合条件的群体。根据明场阈值（mean）、圆度（circularity）、面积（area）等条件复筛出符合条件的类器官亚群（图 4D、图 4E），选择需要输出的亚群参数，如个数、大小、面积，即可得到每个孔的类器官的大小、个数、面积结果。

注：1) 在培养过程中有少量细胞会贴在板子上以 2D 形式生长，stack 1 的层面将

2D 生长的细胞拍摄的比较清楚，如果参与投射会影响后续类器官的圈选，因此我们只选取第 2 至第 4 层面进行投射，并不会造成类器官数目出现漏数的情况。2) 图片拼接中，选择最合适的“Fusion method”以得到最佳的图片拼接效果，多层面投射同理选择最合适的拼接“Method”。图片拼接中因情况选择是否进行“Downsize stitched image”，若获得无损拼接，不要选择默认值。



D



E

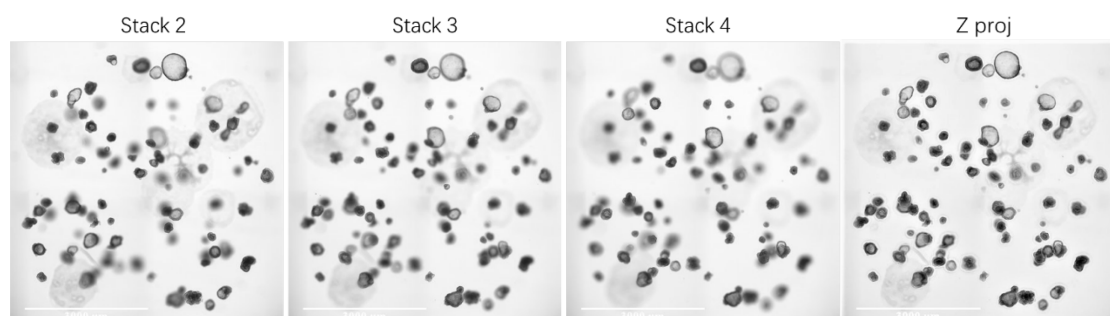
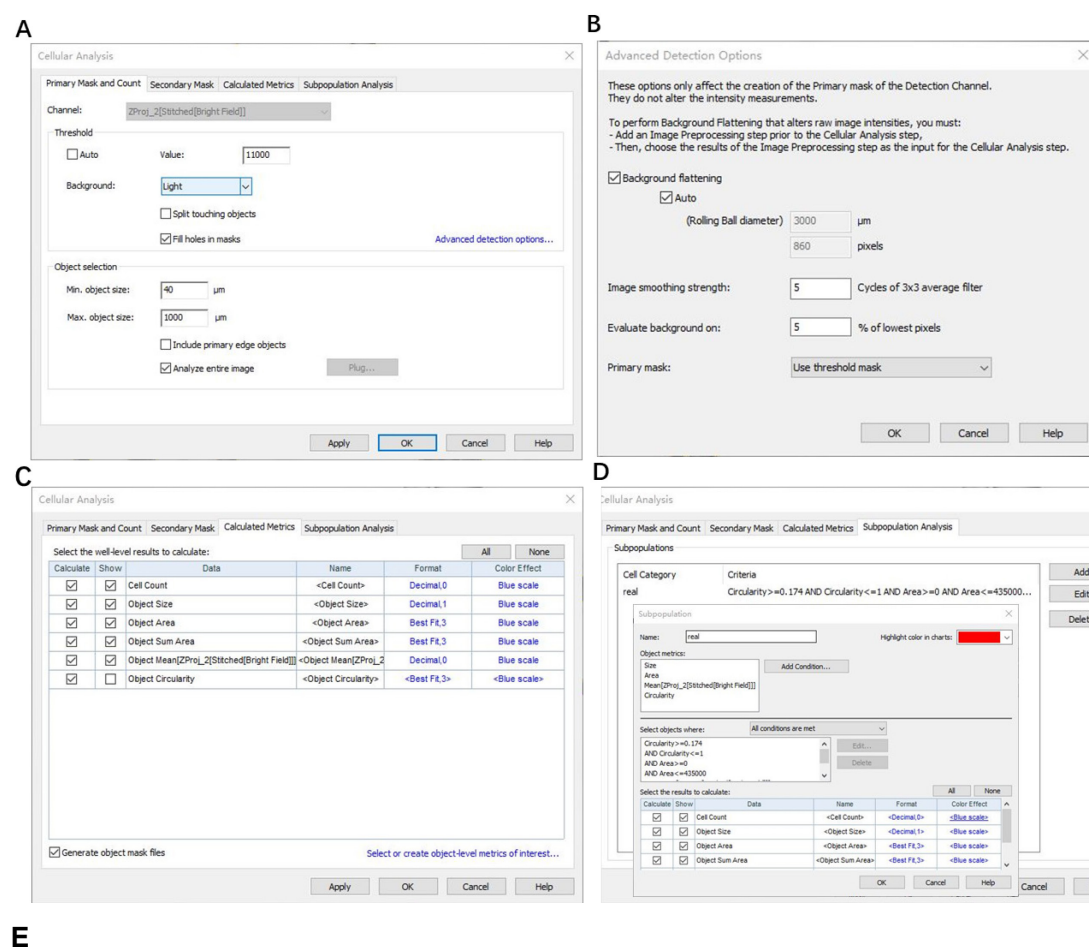


图 3. Cytation 5 原始图片及分析前图像预处理 A. 图像拼接“image stitching”的参数设置。B. 明场“stitched image”进行投射的参数设置。C. RFP stitched image 投射 (选择和明场相同的投射参数设置)。D. 多个视野的原始图片拼接效果图, 左边“raw image”是指原始的四个视野的图片, “stitched image”即为按照 A 图方法拼接后的效果图。E. 多个层面图片投射效果图“stack 2”、“stack 3”、“stack 3”指拍摄的第二、三、四层的图像, “Z proj”是将二、三、四层的图像进行投射叠加后的图片。



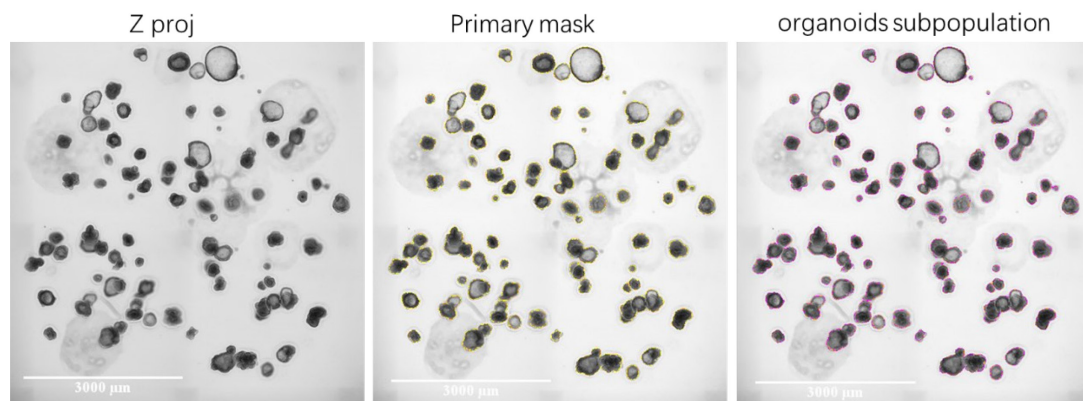


图 4. Cytation 5 成像分析方法及分析效果图 A-B. 设置明场阈值、面积、大小等参数对类器官进行圈选。C. 勾选需要定量的参数。D. 通过设置亚群分析“subpopulation analysis”的阈值，圈选出符合条件的类器官亚群 (organoids subpopulation)。E. 类器官初次分析圈选效果图及亚群分析圈选效果图 (黄色为初次分析圈选出的类器官，紫色为初次分析基础上二次圈选出的类器官)。

结果与分析

为了探究 *Tacstd2* 阳性 luminal-C 细胞是否具有干细胞的潜能，我们将 T2Y 成年小鼠前列腺组织消化成为单细胞，通过上皮细胞标记蛋白 *Epcam* 流式抗体，管腔细胞谱系追踪的标记蛋白 YFP，Luminal-C 细胞标记蛋白 *Tacstd2* 流式抗体以及去死细胞染料 DAPI 对小鼠前列腺细胞悬液进行染色，而后通过流式细胞分选仪将 *Tacstd2* 阳性 luminal-C 细胞和 *Tacstd2* 阴性管腔细胞分选出来，并分别进行类器官培养 (图 5A)。在培养 7 d 之后，对这三类管腔细胞亚群形成的类器官进行拍照，我们可以直观地看到 *Tacstd2* 阳性 luminal-C 细胞形成的类器官相较于 *Tacstd2* 阴性管腔细胞亚群所形成的数目更多、体积更大 (图 5B)。经过统计分析，我们发现 *Tacstd2* 阳性 luminal-C 细胞具有更高的类器官形成效率以及能够形成更大的类器官 (图 5C-D)。

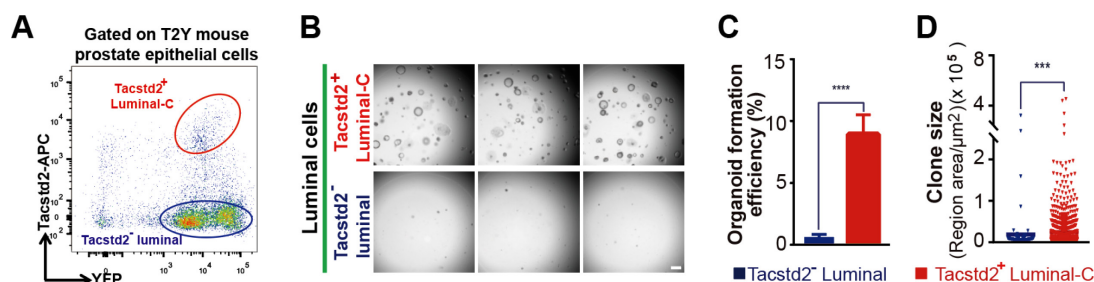


图 5. 管腔细胞亚群的类器官形成效率 A. 流式细胞分选散点图显示从 T2Y 小鼠前列腺分选 Tacstd2 阴性的管腔细胞、Tacstd2 阳性 Luminal-C 细胞。B. 由 Tacstd2 阴性的管腔细胞、Tacstd2 阳性 Luminal-C 细胞所形成的类器官（标尺为 500 μm ）。C-D. Tacstd2 阴性的管腔细胞、Tacstd2 阳性 Luminal-C 细胞的类器官形成效率 (C) 和类器官大小统计 (D)（Guo *et al.*, 2020）。

致谢

由衷地感谢高栋老师给予的大力支持和真知灼见的指导。感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台全体成员给予的积极建议和热情的帮助。

参考文献

1. Gao, D., Vela, I., Sboner, A., Iaquinta, P. J., Karthaus, W. R., Gopalan, A., Dowling, C., Wajala, J. N., Undvall, E. A., Arora, V. K., Wongvipat, J., Kossai, M., Ramazanoglu, S., Barboza, L. P., Di, W., Cao, Z., Zhang, Q. F., Sirota, I., Ran, L., MacDonald, T. Y., Beltran, H., Mosquera, J., Touijie, K. A., Scardino, P. T., Laudone, V. P., Curtis, K. R., Rathkopf, D. E., Morris, M. J., Danila, D. C., Slovin, S. F., Solomon, S. B., Eastham, J. A., Chi, P., Carver, B., Rubin, M. A., Scher, H. I., Clevers, H., Sawyers, C. L. and Chen, Y. (2014). [Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer](#). *Cell* 159: 176-187.
2. Gao, D., Zhan, Y., Di, W., Moore, A. R., Sher, J. J., Guan, Y., Wang, S., Zhang, Z., Murphy, D. A., Sawyers, C. L., Chi, P. and Chen, Y. (2016). [A tmprss2-creERT2 knock-in mouse model for cancer genetic studies on prostate and colon](#). *PLoS One* 11: e0161084.
3. Drost, J., Karthaus, W. R., Gao, D., Driehuis, E., Sawyers, C. L., Chen, Y. and Clevers, H. (2016). [Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue](#). *Nat Protoc* 11: 347-358.
4. Guo, W., Li, L., He, J., Liu, Z., Han, M., Li, F., Xia, X., Zhang, X., Zhu, Y., Wei, Y., Li, Y., Aji, R., Dai, H., Wei, H., Li, C., Chen, Y., Chen, L. and Ga, D. (2020). [Single-cell transcriptomics identifies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips](#). *Nat Genet* 52: 908-918.