



团 体 标 准

T/CSCB 0006—2022

人 肠 癌 类 器 官

Human intestinal cancer organoid

2022-08-30 发布

2022-10-31 实施

中国细胞生物学学会 发布
中国标准出版社 出版

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。

本文件由中国细胞生物学学会信号转导分会和干细胞生物学分会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：复旦大学附属肿瘤医院、清华大学、中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、北京工商大学、丹望医疗科技(上海)有限公司、广州华医再生科技有限公司、国家干细胞资源库、中国干细胞与再生医学协同创新平台、四川省人民医院、澳门大学、国家呼吸系统疾病临床医学研究中心(广州医科大学附属第一医院)、中国标准化研究院、深圳华大生命科学研究院、复旦大学附属中山医院、罗氏中国创新中心、礼来(中国)研发有限公司、北京科途医学科技有限公司、齐鲁制药有限公司。

本文件主要起草人：华国强、陈晔光、赵同标、马爱进、林汉卿、王亚龙、郝捷、章真、盛伟琪、宋林红、邓初夏、张勇、王长林、李启沅、李卡、陈文莉、于春萍、孙志坚、杨莹莹、梁灵敏、王柳、曹佳妮、王磊。

人 肠 癌 类 器 官

1 范围

本文件规定了人肠癌类器官的伦理要求、技术要求和检测方法。
本文件适用于患者来源人肠癌类器官的制备和检测。

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。

WS 213 丙型肝炎诊断
WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准
WS 299 乙型病毒性肝炎诊断标准
中华人民共和国药典(2020年版)
全国临床检验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoid

由干细胞或前体细胞体外培养形成,由组织器官特异性的多种细胞组成,具有特定器官关键结构和功能特性的三维(3D)细胞培养物。

3.2

肿瘤类器官 tumor organoid

由患者的肿瘤组织或其他含肿瘤细胞的样本中提取的肿瘤细胞经体外培养形成的,可以在体外扩增并重现原始肿瘤病理形态、遗传特征和治疗反应特征的一类器官。

3.3

人肠癌类器官 human intestinal cancer organoid

由病理诊断为肠癌患者的肠肿瘤细胞培养而成的具有肠癌特征的肿瘤类器官。

3.4

传代 passage

体外培养的一类器官经过物理、化学或生物处理方法,将原有类器官分成更小细胞簇甚至是单细胞,重新接种到与原培养条件相同的新培养体系中进行体外培养的过程。

3.5

冻存 cryopreservation

类器官暂时脱离生长状态并保持其细胞组成、基因表达特征及功能特性的低温冷冻过程。

3.6

复苏 thawing

冻存的类器官重新获得生长活力的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMSO:二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

HBV:乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus)

HCV:丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)

HIV:人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)

H&E:苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

5 伦理要求

5.1 应与类器官原组织供者签署书面的合法有效的知情同意通知书,包括但不限于:合适条件下潜在研究及治疗的应用、研究成果潜在的商业应用及其他问题所适用的内容。

5.2 人肠癌类器官的生产和研究方案应由伦理审查委员会审查通过。

5.3 应对类器官原组织供者个人信息进行隐私保护。

6 技术要求

6.1 形态

人肠癌类器官在光学显微镜下应边缘清晰、透亮,由细胞簇组合而成,呈现致密型、松散型、囊泡型或混合型等形态特征。

6.2 体外培养及生长

6.2.1 从肠癌患者来源的人肠癌组织或细胞,初次在体外培养成人肠癌类器官后,应能在体外维持培养2个月,且应能传代至少3代。

6.2.2 当类器官传代后,应能进行体外重建成为新的类器官,重建的类器官和传代前类器官的形态和特征应保持一致。

6.3 存活率

新复苏的类器官存活率应不低于50%。且存活的类器官在体外应可以进行传代培养。

6.4 微生物

真菌、细菌、支原体、HBV、HCV、HIV、外源病毒因子等应为阴性。

6.5 STR

体外培养的类器官,进行STR检测及分型鉴定,应与供体STR一致。

6.6 病理形态

6.6.1 类器官 H&E 染色后,由具备病理鉴定资质的专业人员进行判定,其组成细胞应具有肿瘤细胞的异型性特征如核深染、异常核分裂象、核质比失调等。

6.6.2 分化型肠腺癌类器官的免疫组化标志蛋白 CDX2、CK20 应呈阳性且表达分布无极性、排列紊乱。

6.7 遗传特征

应对类器官进行基因变异检测,检测的基因应包括但不局限于 *KRAS*、*NRAS*、*HRAS*、*BRAF* 及 *APC*、*TP53*、*SMAD4*,检测结果应与原肿瘤组织的基因变异结果一致。

7 检测方法

7.1 形态

体外三维培养类器官,使用倒置相差显微镜观察。

7.2 数量

体外三维培养类器官可通过倒置相差显微镜进行拍照,显微镜附带比例尺进行类器官的直径测量并进行统计。类器官的个数可进行直接计数。

7.3 存活率

应对培养和传代的类器官进行存活率检测。存活率可按照附录 A 检测。

7.4 微生物

7.4.1 细菌及真菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中“1101 无菌检查法”检测。

7.4.2 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中“3301 支原体检查法”检测。

7.4.3 HIV

按照 WS 293 核酸法检测。

7.4.4 HBV

按照 WS 299 核酸法检测。

7.4.5 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

7.4.6 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中“3302 外源病毒因子检查法”检测。

7.5 STR

按照附录 B 检测。

7.6 病理形态

按照附录 C 检测。

7.7 遗传特征

按照附录 D 检测。

附 录 A

(规范性)

类器官存活率检测 钙黄绿素染色法

A.1 仪器和设备

A.1.1 倒置显微镜。

A.1.2 荧光显微镜。

A.2 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯,检测用水均为去离子水。

A.2.1 细胞级别 DMSO。

A.2.2 pH 7.4 的 PBS。

A.2.3 储存液的配制(钙黄绿素 AM 溶液):用细胞级别 DMSO 制备 2 mmol/L 的钙黄绿素溶液。

A.3 检测步骤

A.3.1 类器官总数量计数

将体外培养类器官置于光学显微镜下,观察其形态和状态,通过肉眼观察来确定类器官是否符合 6.1 类器官形态要求,对直径 $\geq 20 \mu\text{m}$ 的类器官计数。

A.3.2 活类器官数量计数

实验时,取出已经配置好的钙黄绿素 AM 储存液,加入钙绿黄素 AM 溶液到培养基中至终浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 。随后在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下孵育 60 min。到达时间后,用 PBS 缓慢清洗掉带有钙绿黄素的培养基,加入新鲜培养基。用 490 nm 激发波长,515 nm 发射波长的滤光片的荧光显微镜观察类器官并拍照。活类器官在荧光显微镜下显示为绿色且边缘清晰。对直径 $\geq 20 \mu\text{m}$ 的活类器官计数。

A.3.3 类器官计数

用显微镜和图像采集类软件对类器官进行断层扫描,层间高度设置在 $10 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ 范围内,将扫描后的图像叠加为一张平面图,然后对最终叠加平面图中的类器官进行计数。

A.4 类器官存活率计算

类器官存活率按照公式(A.1)进行计算:

$$X = (N_{\text{活}} / N_{\text{总}}) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

X ——类器官存活率;

$N_{\text{活}}$ ——活类器官数量;

$N_{\text{总}}$ ——总类器官数量。

A.5 计算与分析

按照 A.3 步骤再重复两次,计算三次活类器官比率结果的平均值,记为类器官平均存活率。

A.6 精密度

在重复性条件下获得的三次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

附 录 B
(规范性)
类器官 STR 鉴定

B.1 仪器和设备

- B.1.1 离心机。
- B.1.2 PCR 仪。
- B.1.3 电泳仪。

B.2 试剂

- B.2.1 细胞 DNA 抽提试剂盒。
- B.2.2 STR 细胞鉴定试剂盒。

B.3 样品保存

样品制备好后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品制备

将类器官在基质胶中培养至稳定生长状态,用移液器吹打基质胶,至基质胶破碎后,混合液收集于离心管中,离心收集类器官,弃上清。

B.4.2 DNA 提取

- a) 按细胞 DNA 抽提试剂盒说明书对类器官和原肿瘤组织基因组 DNA 进行提取;
- b) 紫外分光光度计检测提取后的 DNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8~2.0 之间;
- c) DNA 样本要求:DNA 体积 $\geq 20\text{ }\mu\text{L}$,浓度 $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

B.4.3 PCR 扩增

- a) 按照标准 PCR 扩增方法对 STR 位点进行扩增,也可以按照经过质检合格的商业化试剂盒说明书进行。
- b) 设置阴性对照组、样本检测组和阳性对照组。阴性对照组采用无菌水为模板进行 PCR 扩增,样本检测组以类器官和原肿瘤组织样本提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,阳性对照组采用 DNA 模板进行扩增。
- c) 采用琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 扩增产物、阴性对照组和阳性对照组。阴性对照组无目的条带,阳性对照组有清晰的目的条带。

B.4.4 STR 基因分型检测

使用毛细管电泳基因分析仪对 PCR 扩增产物进行检测,并得到 STR 遗传图谱数据。阳性对照组有清晰的目的条带。类器官与原肿瘤组织的扩增条带应该一致。

B.5 结果分析

- B.5.1 当 STR 位点的等位基因含有相同重复次数时,图谱仅出现 1 个等位基因峰;当含有不同重复次

数时,图谱会出现 2 个等位基因峰。且当阴性对照组无等位基因峰出现,阳性对照组检测结果与其标准基因分型数据一致时视为有效检测。

B.5.2 在检测有效的前提下,若受检样本 STR 位点出现 2 个以上的等位基因峰,经过重复实验排除引物结合区突变等干扰因素后,判定受检样本存在交叉污染。

附 录 C

(规范性)

类器官组织病理检测 石蜡包埋法

C.1 仪器和设备

C.1.1 石蜡包埋仪。

C.1.2 石蜡切片机。

C.2 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯,检测用水均为去离子水。

C.2.1 石蜡切片制备试剂:按照相应要求配制石蜡包埋需要试剂,包括固定液、脱水液、石蜡、脱蜡液、复水液、乙醇、二甲苯、中性树脂。

C.2.2 H&E 染色试剂:苏木精、伊红。

C.2.3 免疫组化染色试剂:按照相应要求配制抗原修复液、一抗、二抗、封闭液、PBS、DBA。

C.3 检测步骤

C.3.1 样品准备和固定

取体外培养的一类器官,用移液器吸出类器官和基质胶混合物,转移至 15 mL 离心管内,离心弃上清,用 4%多聚甲醛固定类器官 15 min~30 min。

C.3.2 类器官石蜡切片制作

按照石蜡切片制作方法对类器官样品进行固定,脱水,透明后浸入石蜡中,用石蜡包埋仪器进行包埋。用石蜡切片机切成标准厚度,制成石蜡切片。

C.3.3 H&E 染色

将类器官石蜡切片进行脱蜡,复水,用苏木精染色,分化后冲水。接着用伊红染色,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

C.3.4 免疫组化染色

将类器官石蜡切片进行脱蜡,复水,抗原修复,加封闭液进行封闭。加一抗孵育,PBS 清洗。加对应二抗,PBS 清洗。用 DAB 进行显色,加水终止显色反应。苏木精衬染,盐酸透明后冲水。乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

C.4 结果分析

得到的检测结果由具有病理诊断资质的人员分析和判定,并与原肿瘤组织病理检测结果具有一致性。

附 录 D
(规范性)
类器官基因突变检测

D.1 仪器和设备

离心机。

D.2 试剂

按相应要求准备的细胞 DNA 抽提试剂盒。

D.3 样品保存

样品制备好后,于-80℃以下保存。

D.4 检测步骤

D.4.1 样品制备

将类器官在基质胶中培养至稳定生长状态,用移液器吹打基质胶,至基质胶破碎后,混合液收集于离心管中,离心收集类器官,弃上清。

D.4.2 DNA 提取

按细胞 DNA 抽提试剂盒说明书对类器官基因组 DNA 进行提取。

D.4.3 测序

将类器官 DNA 样本和原肿瘤组织送至具有临床基因检测资质的机构进行一代测序或二代测序检测,或采用 ARMS 法、ddPCR 法等对基因位点进行检测。

D.5 结果分析

分析基因突变位点,比较类器官测序和原肿瘤组织测序结果的一致性。

参 考 文 献

- [1] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
 - [2] 国家卫生计生委.涉及人的生物医学研究理论审查办法,2016
 - [3] 国家卫生健康委.中国结直肠癌诊疗规范(2020年版)中国实用外科杂志,2020,40(6):600-630.
 - [4] Driehuis, E., et al. (2020). “Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications.” *Nature Protocols* 15(10):3380-3409.
 - [5] Van de Wetering, M., et al. (2015). “Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients.” *Cell* 161(4):933-945.
 - [6] Yao, Y., et al. (2020). “Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer.” *Cell Stem Cell* 26(1):17-26.
-