



团 体 标 准

T/CSCB 0005—2022

人 肠 道 类 器 官

Human intestinal 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

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 伦理要求	3
6 技术要求	3
7 检测方法	4
附录 A (规范性) 细胞类型标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法	6
附录 B (规范性) 各类细胞组成比例检测 免疫荧光染色法	7
附录 C (规范性) 碱性磷酸酶检测 碱性磷酸酶显色法	8
附录 D (规范性) 黏蛋白检测 黏蛋白染色法	9
附录 E (规范性) 类器官存活率检测 钙黄绿素染色法	10
附录 F (规范性) 类器官 STR 鉴定	11
参考文献	13

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：清华大学、复旦大学附属肿瘤医院、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、广州华医再生科技有限公司、丹望医疗科技(上海)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：陈晔光、华国强、赵同标、马爱进、王亚龙、林汉卿、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。

人肠道类器官

1 范围

本文件规定了人肠道类器官的伦理要求、技术要求和检测方法。
本文件适用于人肠道上皮组织来源的类器官的体外制备和检测。

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

人肠道类器官 human intestinal organoid

由人体正常肠道干细胞体外培养的能够自我组建,长期生长更新,且具有多种成熟肠道上皮细胞类型的类器官。

3.3

传代 passage

体外培养的类器官经过物理、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。

3.4

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。

3.5

复苏 thawing

冻存的类器官重新获得生长活力的过程。

3.6

肠干细胞 intestinal stem cell

能分化形成所有类型的肠道上皮细胞的干细胞。

3.7

肠干细胞分化 intestinal stem cell differentiation

肠道干细胞在分裂过程中,其子细胞逐渐产出形态结构、基因表达、功能特征各不相同的包括吸收型肠上皮细胞、杯状细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞等细胞类群的过程。

3.8

短暂扩增性细胞 transit amplifying cell, TA cell

在肠道干细胞的周期性激活过程中,由干细胞初步扩增而来,具有高度增殖能力,并可以初步分化为祖源细胞以进一步分化为各类成熟肠道上皮细胞的肠道上皮细胞。

3.9

吸收型肠上皮细胞 enterocyte

主要负责肠腔内营养物质吸收的肠道上皮细胞。细胞呈高柱状,细胞核为椭圆形且位于细胞基底部,肠腔侧由密集而规则排列的微绒毛构成。

3.10

杯状细胞 goblet cell

周期性分泌黏液的肠道上皮细胞。其细胞胞体膨大,呈杯状,细胞顶端充满黏液颗粒,细胞核被挤于细胞底部。

3.11

潘氏细胞 Paneth cell

细胞顶部有粗大嗜酸性分泌颗粒的肠道上皮细胞。通常聚集在小肠隐窝底部与肠干细胞间隔排列,细胞呈锥形,细胞核圆形且位于基部。

3.12

肠内分泌细胞 enteroendocrine cell

受管腔食物刺激或酸碱度(pH)变化等影响而分泌肠道激素的肠道上皮细胞。细胞通常呈单个分散于其他上皮细胞之间,不规则圆锥形,细胞底部胞质中含有大量分泌颗粒。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct:循环数的荧光阈值(Cycle-threshold)

DAPI:4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenyl indole)

DMSO:二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide)

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)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

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 人肠道类器官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

在光学显微镜下应为囊球状或芽体状,中间为空腔,外侧为紧密接触的柱状上皮细胞。空腔及与外界交界处的边缘清晰,细胞透亮。

6.2 染色体核型

正常核型应为 46,XY 或 46,XX。

6.3 标志基因

应检测到肠干细胞中的标志基因 *LGR5*、杯状细胞中的标志基因 *MUC2*、吸收型肠上皮细胞中的标志基因 *ALPI*、肠内分泌细胞中的标志基因 *CHGA*、增殖细胞中的标志基因 *MKI67* 的表达。其中小肠来源的类器官还应检测到潘氏细胞标志基因 *LYZ* 的表达。

6.4 细胞组成

人体小肠类器官中应含 *LGR5* 阳性的肠干细胞、*KI67* 阳性且 *LGR5* 阴性的短暂扩增性细胞、*ALPI* 阳性的吸收型肠上皮细胞、*MUC2* 阳性的杯状细胞、*LYZ* 阳性的潘氏细胞和 *CHGA* 阳性的肠内分泌细胞。且吸收型肠上皮细胞的数量占比应不低于 30%。

人体大肠类器官中应含 *LGR5* 阳性的肠干细胞、*KI67* 阳性且 *LGR5* 阴性的短暂扩增性细胞、*ALPI* 阳性的吸收型肠上皮细胞、*MUC2* 阳性的杯状细胞和 *CHGA* 阳性的肠内分泌细胞。且杯状细胞的数量占比应不低于 30%。

6.5 功能指标

人体小肠类器官中应检测到碱性磷酸酶及溶菌酶,人体大肠类器官中应检测到黏蛋白。

6.6 体外培养及生长

6.6.1 从供者来源的肠道上皮细胞组织在体外初次培养为类器官后,在保证整体细胞数量不减少的前提下,应能在体外传代至少 5 代。新传代的类器官与上一代类器官应具有相同的形态、细胞组成、细胞核型等特征。

6.6.2 当类器官传代后,应能进行体外重建成为新的类器官,且应能维持自我更新及肠干细胞分化的能力。

6.7 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。

6.8 微生物

真菌、细菌、支原体、HBV、HCV、HIV、外源病毒因子等应为阴性。

6.9 STR

体外培养类器官,进行 STR 检测及分型鉴定,应与供体 STR 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 染色体核型

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”检测。

7.3 标志基因

按照附录 A 的方法检测。

7.4 细胞组成

按照附录 B 的方法检测。

7.5 功能指标

溶菌酶检测按照附录 B 的方法检测,碱性磷酸酶检测按照附录 C 的方法检测,黏蛋白检测附录 D 的方法检测。

7.6 数量

体外三维培养类器官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。同时,对类器官的个数进行直接计数。

7.7 存活率

按照附录 E 的方法检测。

7.8 微生物

7.8.1 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。

7.8.2 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。

7.8.3 HIV

按照 WS 293 核酸法检测。

7.8.4 HBV

按照 WS 299 核酸法检测。

7.8.5 HCV

按照 WS 213 核酸法检测。

7.8.6 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。

7.9 STR

按照附录 F 的方法检测。

附录 A

(规范性)

细胞类型标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法

A.1 仪器和设备

A.1.1 聚合酶链式反应 PCR 仪。

A.1.2 实时荧光定量 PCR 仪。

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 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

A.2.2 商品化 RNA 提取试剂盒。

A.2.3 商品化 RNA 反转试剂盒。

A.2.4 商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒。

A.2.5 GAPDH 及目标基因 qPCR 引物。

A.3 检测步骤

A.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(A.2.1),吸去缓冲液。重复一次。

A.3.2 类器官 RNA 提取

按照商品化 RNA 提取试剂盒(A.2.2)进行类器官 RNA 提取,操作按照试剂盒说明书进行。

A.3.3 类器官 cDNA 制备

取 1 μg 类器官 RNA,利用聚合酶链式反应 PCR 仪(A.1.1),按照商品化 RNA 反转试剂盒(A.2.3)进行类器官 RNA 反转。操作按照试剂盒及仪器说明书进行。

A.3.4 基因表达情况确定

取 A.3.3 类器官 RNA 反转产物,利用实时荧光定量 PCR 仪(A.1.2),结合商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒(A.2.4)及相关引物(A.2.5),按照试剂盒说明书进行实时荧光定量检测。参照检测曲线确定 Ct 值,得到 GAPDH 的表达值 CtG 及目标基因表达值 CtM 。

A.3.5 目标基因表达情况分析

以 GAPDH 表达作为参照,得到目标基因的表达水平为: $X = CtM/CtG$ 。

A.4 计算与分析

按照 A.3.1~A.3.5 再重复 2 次。计算 3 次类器官目标基因的表达水平,记为类器官目标基因的平均表达水平。

A.5 精密度

在重复性条件下获得的 3 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)

各类细胞组成比例检测 免疫荧光染色法

B.1 仪器和设备

激光共聚焦显微镜。

B.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。

B.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

B.2.2 商品化免疫荧光染色试剂盒。

B.2.3 目标蛋白质抗体。

B.3 检测步骤

B.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(B.2.1),吸去缓冲液。重复一次。

B.3.2 类器官免疫荧光染色

通过商品化免疫荧光染色试剂盒(B.2.2)及目标蛋白质抗体(B.2.3),进行类器官免疫荧光染色,操作按照试剂盒说明书进行。

B.3.3 免疫荧光染色阳性细胞观察

按照激光共聚焦显微镜进行观察及拍照。

B.3.4 目标基因表达情况分析

统计 DAPI 数量为类器官中细胞总数 M ,统计目标蛋白质阳性信号的细胞数量 N ,得到目标蛋白质阳性的细胞比例为 $X = N/M$ 。

B.4 计算与分析

统计至少 30 个类器官中目标蛋白质阳性的细胞比例,平均后记为类器官中目标细胞类型的比例。

附 录 C

(规范性)

碱性磷酸酶检测 碱性磷酸酶显色法

C.1 仪器和设备

显微镜。

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 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

C.2.2 4%多聚甲醛溶液。

C.2.3 商品化碱性磷酸酶显色试剂盒。

C.3 检测步骤

C.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(C.2.1),吸去缓冲液。重复一次。加入与培养基等体积的4%多聚甲醛溶液(C.2.2),室温静置 20 min。

C.3.2 类器官碱性磷酸酶染色

通过商品化碱性磷酸酶显色试剂盒(C.2.3),进行类器官碱性磷酸酶染色,操作按照试剂盒说明书进行。

C.3.3 显微镜观察

通过显微镜进行观察及拍照。

C.3.4 碱性磷酸酶检测分析

结合商品化碱性磷酸酶显色试剂盒(C.2.3)染色结果指征,判断类器官是否检测到碱性磷酸酶的表达。

附 录 D
(规范性)
黏蛋白检测 黏蛋白染色法

D.1 仪器和设备

显微镜。

D.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。

D.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

D.2.2 4%多聚甲醛溶液。

D.2.3 商品化黏蛋白染色法试剂盒。

D.3 检测步骤

D.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(D.2.1),吸去缓冲液。重复一次。加入与培养基等体积的4%多聚甲醛溶液(D.2.2),室温静置20 min。

D.3.2 类器官黏蛋白染色

通过商品化黏蛋白染色法试剂盒(D.2.3),进行类器官黏蛋白染色,操作按照试剂盒说明书进行。

D.3.3 显微镜观察

通过显微镜进行观察及拍照。

D.3.4 黏蛋白检测分析

结合商品化黏蛋白染色法试剂盒(D.2.3)染色结果指征,判断类器官是否检测到黏蛋白的表达。

附 录 E

(规范性)

类器官存活率检测 钙黄绿素染色法

E.1 仪器和设备

E.1.1 显微镜。

E.1.2 荧光显微镜。

E.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。

E.2.1 细胞级别 DMSO。

E.2.2 pH 7.4 的 PBS。

E.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。

E.3 检测步骤

E.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。

E.3.2 活类器官数量计数

试验时,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。

E.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。

E.4 类器官存活率计算

类器官存活率按照公式(E.1)进行计算:

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

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。

E.5 计算与分析

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

E.6 精密度

在重复性条件下获得的 3 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附 录 F
(规范性)
类器官 STR 鉴定

F.1 仪器和设备

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

F.2 试剂

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

F.3 样品保存

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

F.4 检测步骤**F.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。

F.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 $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

F.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。

F.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。类器官原肿瘤组织的扩增条带应该一致。

F.5 结果分析

- F.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。

F.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。

参 考 文 献

- [1] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
 - [2] 国际医学科学组织理事会,世界卫生组织.涉及人的生物医学研究的国际伦理准则,2002
 - [3] 国家卫生计生委.涉及人的生物医学研究理论审查办法,2016
 - [4] Sato, T., et al. (2009). "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." *Nature* 459(7244):262-265.
 - [5] Sato, T., et al. (2011). "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium." *Gastroenterology* 141(5):1762-1772.
-