

团 体 标 准

T/××××—××××

人胃肿瘤类器官构建、质量控制与保藏 操作指南

Guidelines for the construction, quality control and preservation of human gastric
tumor organoids
(征求意见稿)

20×-××-××发布

20×-××-××实施

中国抗癌协会

发 布

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给中国抗癌协会，以便修订时参考。

本标准版权为中国抗癌协会所有。除了用于国家法律或事先得到中国抗癌协会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

地址：天津市华苑新技术产业园区兰苑路 5 号 A 座 10 楼

邮编：300384 电话：022-23359958

邮箱:bgs@caca.org.cn 网址：www.caca.org.cn

目 录

前 言	I
人胃肿瘤类器官构建、质量控制与保藏操作指南	1
1. 范围	1
2. 规范性引用文件	1
3. 术语和定义	1
4. 通则	3
5. 基本原则	3
6. 操作流程与方法	3
6.1 胃肿瘤原发灶及转移灶类器官的构建	3
6.2 操作注意事项	8
7. 类器官鉴定与质量控制	9
8. 数据管理	11
9. 废弃类器官处置	11
附 录 A	12
附 录 B	14
附 录 C	15
附 录 D	156
附 录 E	158
参 考 文 献	20

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专利的责任。

本标准由中国抗癌协会提出并归口。

本标准起草单位：中国医科大学附属第一医院、中山大学、华中科技大学同济医学院、南京大学医学院附属鼓楼医院、中国人民解放军第三军医大学、厦门大学

本标准主要起草人：王振宁、苗智峰、林水宾、王桂华、柏峰、林树海、张永有、孙景旭、鞠怀强、范新娟、王斌、钟继新、王敏、喻波、冯永东、罗学来、吴剑宏、庞敏娇、刘福团、胡福清、兰静芬、孙灵钰、程诚。

人胃肿瘤类器官构建、质量控制与保藏操作指南

1. 范围

本文件提供了胃肿瘤类器官构建、质量控制与保藏的基本原则、操作流程方法以及检测指标与检测方法的指导与建议。

本文件适用于胃肿瘤类器官的培养、传代、冻存、复苏、质量控制与保藏过程。

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/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求

GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求

GB/T 42060—2022 医学实验室样品采集、运送、接收和处理指南

WS 233—2017 病原微生物实验室生物安全通用准则

T/NAHIEM 6-2018 医学研究伦理委员会通用要求

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 胃肿瘤类器官 **gastric tumor organoid**

由病理诊断为胃肿瘤的患者自体肿瘤原发灶或转移灶样本中提取的肿瘤细胞，通过3D培养形成的，可以在体外扩增并重现原始肿瘤的病理形态和遗传特征的一类器官。

3.2 胃肿瘤类器官培养基 **culture medium for gastric tumor organoids**

可以实现体外模拟胃肿瘤细胞生长及扩增所需微环境，能诱导胃肿瘤细胞长期体外扩增培养，维持原始肿瘤细胞特性，实现体外胃肿瘤组织类器官的长期存活的培养介质。

3.3 3D培养基质 **culture matrix**

组成成分包括但不限于层粘连蛋白、IV型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白，添加物包括但不限于生长因子、小分子化合物和/或微量元素、激素。在室温条件下能够聚合形成具有生物学活性的三维基质，模拟体内细胞基底膜结构和功能，能够为胃肿瘤细胞的生长提供支架。

3.4 类器官传代 **organoid passage**

采用物理吹打联合化学酶消化的方法将培养至一定大小、状态良好的类器官解离为小细胞团或单细胞悬液，再重新接种于与原培养条件相同的培养体系内，继续进行类器

官培养。新一代类器官与原来的类器官具有相同的形态功能特征。

3.5 类器官冻存 organoid cryopreservation

需将类器官解离成小细胞团或单细胞悬液，加入冻存保护剂，程序降温后置于-196°C液氮中低温保存，使其暂时脱离生长状态而保留其细胞特性。冻存后的类器官在需要时能够通过复苏用于试验。

3.6 类器官复苏 organoid thawing

将处于深低温冻存的类器官取出并恢复其继续生长状态的过程。

3.7 伦理审查委员会 ethics review committee

负责对科学研究中涉及的伦理道德进行评估和审查的专门组织。

3.8 知情同意 informed consent

有自主判断能力的供体或其法定监护人，在获得并充分了解样本和数据捐赠相关信息之后，供体所受到的风险最小，且没有受到任何利诱或恐吓等不当行为影响的前提下，自愿自主的捐赠个人生物样本及其关联数据，并与采集者/收集者共同签署的文件，包括但不限于合适条件下潜在研究应用、研究成果潜在的商业应用及其他问题所适用的内容。

注：知情同意书由采集者/收集者和被收集者共同签署，一式两份。正本由采集者/收集者保存，被收集者保存副本。伦理要求与隐私保护见 GB/T 38736-2020 第 3.7 条。

3.9 肿瘤细胞存活率 tumor cell vitality rate

能够增殖、保持代谢活性以及形成肿瘤类器官的细胞比例。

3.10 环境污染 environmental contamination

从环境或其他细胞中引入多余的化学或生物物质。

[来源：WS 233—2017]

3.11 无菌技术 aseptic technology

在实验室，用于防止细胞、试剂、物料、人员受到微生物感染的操作。

[来源：WS 233—2017]

3.12 肿瘤细胞纯度 tumor cell purity

具有相同生物学特性(如肿瘤细胞表面标志物、遗传多态性及生物学活性等)的胃肿瘤类器官中肿瘤细胞占全部细胞的百分比。

3.13 生长因子 growth factors

促进特定细胞类型或谱系增殖和/或分化的重组细胞因子。某些生长因子可用于体内（例如，造血祖细胞的动员）或离体（例如，细胞扩增、疫苗开发和过继性细胞疗法）

情况下。

4. 通则

4.1 胃肿瘤组织采集与处理应获得伦理委员会审批。

4.2 胃肿瘤组织采集前应签署知情同意书，应在充分告知和尊重提供者权利的前提下签署知情同意书。

4.3 胃肿瘤组织的处理宜采用可操作性强、成功率高、结果稳定的方法。

4.4 胃肿瘤组织采集与处理应由接受过专业培训的医护人员/工作人员进行。

5. 基本原则

5.1 签署知情同意

应在样本采集前获得类器官组织源供者的书面知情同意，明确供者和样本收集方双方的利益和责任，知情同意应符合 GB/T 38736—2020 中 5.3 的要求。

5.2 伦理要求

胃肿瘤类器官的构建和研究方案应由伦理审查委员会审查通过。

5.3 隐私保护

类器官组织源供者享有个人隐私权，其个人隐私信息的保密和保护应符合 GB/T 38736—2020 中 6 的要求。

6. 操作流程与方法

6.1 胃肿瘤原发灶及转移灶类器官的构建

6.1.1 胃肿瘤原发灶类器官的构建

6.1.1.1 胃肿瘤组织的获取和运送

手术获取胃肿瘤组织，体积至少 10mm×10mm×10mm。新鲜胃肿瘤组织应在离体 30min 内放进预冷的组织运输保存液，在 4℃恒温的低温条件下运送到实验室。对运输过程的记录应符合 GB/T 37864—2019 中 A.3、B.3 条，宜记录的内容包括但不限于运送方式、运送过程中的温度、接收时温度或温度范围、运送起止时间和日期。

6.1.1.2 胃肿瘤组织的处理

6.1.1.2.1 胃肿瘤组织的清洗

在超净台中将胃肿瘤组织取出，用预冷的含抗生素的 PBS 缓冲液振荡漂洗 3 次（超净台内手动摇晃 100mm² 培养皿 10s）。

6.1.1.2.2 胃肿瘤组织的分离和消化

用手术刀片及眼科剪将漂洗后的胃肿瘤组织机械解离成 0.3mm³ 大小的组织块，加

入 37℃预热的胃肿瘤组织消化液（应加入合适的胶原酶，推荐IV型胶原酶或者XI型胶原酶、透明质酸酶以及II型分散酶的混合液）。置于 37℃振荡水浴锅中消化 30-45min，加入等体积的终止液终止消化，利用移液枪吹打 100 次，冰上静置 10min。

6.1.1.2.3 细胞的过滤

通过 70 μm 的筛网去除胞外基质杂质后离心（4℃，300×g，5min）。

6.1.1.2.4 胃肿瘤原发灶类器官培养

弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。向人胃肿瘤原发灶的单细胞沉淀中加入适量培养基并轻轻重悬细胞，避免产生气泡，按照 50 μL/孔向 24 孔板中加入培养基-细胞混合物。37℃孵箱放置 10min。待培养基凝固后，补充培养基 500 μL/孔（提前 37℃预热）。每三天更换一次生长培养基，每代胃肿瘤类器官生长周期约为 7-14 天。

6.1.2 胃肿瘤实质转移灶类器官的构建

6.1.2.1 胃肿瘤实质转移灶组织的获取和运送

手术获取完整/部分胃肿瘤实质转移灶组织，体积至少 5mm×5mm×5mm。新鲜胃肿瘤实质转移灶组织应在离体 30min 内放进预冷的组织运输保存液，在 4℃恒温的低温条件下运送到实验室。对运输过程的记录应符合 GB/T 37864—2019 中 A.3、B.3 条，宜记录的内容包括但不限于运送方式、运送过程中的温度，接收时温度或温度范围、运送起止时间和日期。

6.1.2.2 胃肿瘤实质转移灶组织的处理

6.1.2.2.1 胃肿瘤实质转移灶组织的清洗

在超净台中将胃肿瘤实质转移灶组织取出，用预冷的含抗生素的 PBS 缓冲液振荡漂洗 3 次（超净台内手动摇晃 100mm² 培养皿 10s）。

6.1.2.2.2 胃肿瘤实质转移灶组织的分离和消化

用手术刀片及眼科剪去除非肿瘤组织后，将漂洗后的胃肿瘤实质转移灶机械解离成 0.3mm³ 大小的组织块，加入 37℃预热的胃肿瘤实质转移灶组织消化液（根据转移灶位置选择合适的消化酶，如卵巢实质转移灶推荐使用II型胶原酶和IV型胶原酶；肺实质转移灶推荐使用去氧核糖核酸酶、I型胶原酶以及II型分散酶；肝实质转移灶推荐使用IV型胶原酶、II型胶原酶以及II型分散酶），37℃水浴振荡消化 60-90min，加入等体积的终止液终止消化，利用移液枪吹打 100-150 次，冰上静置 10min。

6.1.2.2.3 细胞的过滤

通过 70 μm 的筛网去除胞外基质杂质后离心（4 $^{\circ}\text{C}$ ，300 $\times\text{g}$ ，5min）。

6.1.2.2.4 胃肿瘤实质转移灶类器官培养

弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。向人胃肿瘤实质转移灶的单细胞沉淀中加入适量培养基轻轻重悬细胞，避免产生气泡，按照 50 μL /孔向 24 孔板中加入培养基-细胞混合物。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱放置 10min。待培养基凝固后，补充培养基 500 μL /孔（提前 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热）。每三天更换一次生长培养基，每代胃肿瘤实质转移灶类器官生长周期约为 7-14 天。

6.1.3 胃肿瘤非实质转移灶类器官的构建

6.1.3.1 胃肿瘤非实质转移灶的获取和运送

手术前获取胃肿瘤非实质转移灶，抽取患者腹水至少 20mL。新鲜胃肿瘤腹水应在离体 30min 内放入无菌离心管，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的低温条件下运送到实验室。对运输过程的记录应符合 GB/T 37864—2019 中 A.3、B.3 条，宜记录的内容包括但不限于运送方式、运送过程中的温度、接收时温度或温度范围、运送起止时间和日期。

6.1.3.2 胃肿瘤非实质转移灶的处理

6.1.3.2.1 细胞的过滤

在超净台中取出患者腹水，利用 70 μm 筛网过滤去除腹水中可能含有的絮状物、胞外基质杂质，离心（4 $^{\circ}\text{C}$ ，200 $\times\text{g}$ ，5min）。收集腹水上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。

6.1.3.2.2 肿瘤细胞的提取和分离

弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。利用预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，按合适的比例（推荐比例为 1:3）加入红细胞裂解液，在冰上裂解 8-12min 后，离心（4 $^{\circ}\text{C}$ ，200 $\times\text{g}$ ，5min）。重复该步骤 2-3 次，至细胞沉淀中无肉眼可见的血红色。

6.1.3.2.3 肿瘤细胞活性及数量检测

采用吖啶橙（AO）/碘化丙啶（PI）荧光染色进行活细胞计数，将离心后的细胞沉淀用 PBS 缓冲液重悬，吹打混匀后吸取 10 μL 细胞悬液置于 0.5mL 的 EP（eppendorf）管中加入 10 μL 的 AO/PI 染液充分混匀，取 20 μL 细胞悬液加入细胞计数板，利用自动细胞分析仪检测细胞数量及活率。细胞总数达 1×10^6 个以上，细胞活率达 90%以上可用于

类器官培养。

6.1.3.2.4 胃肿瘤非实质转移灶类器官培养

将重悬后的肿瘤细胞悬液离心（4℃，200×g，5min）。弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。向人胃肿瘤腹水单细胞沉淀中加入适量 3D 培养基质轻轻重悬细胞，避免产生气泡，按照 50 μL/孔向 24 孔板中加入培养基质-细胞混合物。37℃孵箱放置 10min。待培养基质凝固后，补充培养基 500 μL/孔（提前 37℃预热）。每三天更换一次生长培养基，每代胃肿瘤实质转移灶类器官生长周期约为 7-14 天。

6.1.4 保留胃肿瘤微环境类器官的构建

6.1.4.1 胃肿瘤组织的获取和运送

手术获取完整/部分胃肿组织(原发灶或者实体转移灶),体积至少 5mm×5mm×5mm。新鲜胃肿瘤组织应在离体 30min 内放进预冷的组织运输保存液，在 4℃恒温的低温条件下运送到实验室。对运输过程的记录应符合 GB/T 37864—2019 中 A.3、B.3 条，宜记录的内容包括但不限于运送方式、运送过程中的温度，接收时温度或温度范围、运送起止时间和日期。

6.1.4.2 3D 支撑材料的准备

6.1.4.2.1 3D 胶原溶液的配制

利用无菌水配置含有氢氧化钠、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液及碳酸氢钠的无菌混合溶液 B、均匀混合 I 型胶原、Ham's F-12 基础培养基、混合液 B（推荐按 8: 1: 1 的比例）配置 3D 胶原溶液。操作过程应避免气泡产生，4℃保存。

6.1.4.2.2 内部类器官培养小室的制作

在 30 mm 插入式细胞培养皿中加入 1 mL 3D 胶原溶液，于 37℃ 下静置半小时，待其凝固。

6.1.4.3 胃肿瘤组织的处理

6.1.4.3.1 胃肿瘤组织的清洗

在超净台中将胃肿瘤组织取出，用预冷的含抗生素的 PBS 缓冲液振荡漂洗 3 次（超净台内手动摇晃 100mm² 培养皿 10s）。

6.1.4.3.2 胃肿瘤组织的分离

用手术刀片及眼科剪去除非肿瘤组织后，将漂洗后的胃肿瘤实质转移灶机械解离成 0.3 mm³ 大小的组织碎块，加入 1 mL 3D 培养基质轻轻混匀，避免产生气泡，向培养小室中加入培养基质-组织混合物。于 37℃ 孵箱中放置 30min。待培养基质凝固后，补充培养

基 2mL/孔（提前 37°C 预热）。每 7 天更换一次生长培养基，每代保留肿瘤微环境的胃肿瘤类器官生长周期约为 14-30 天。

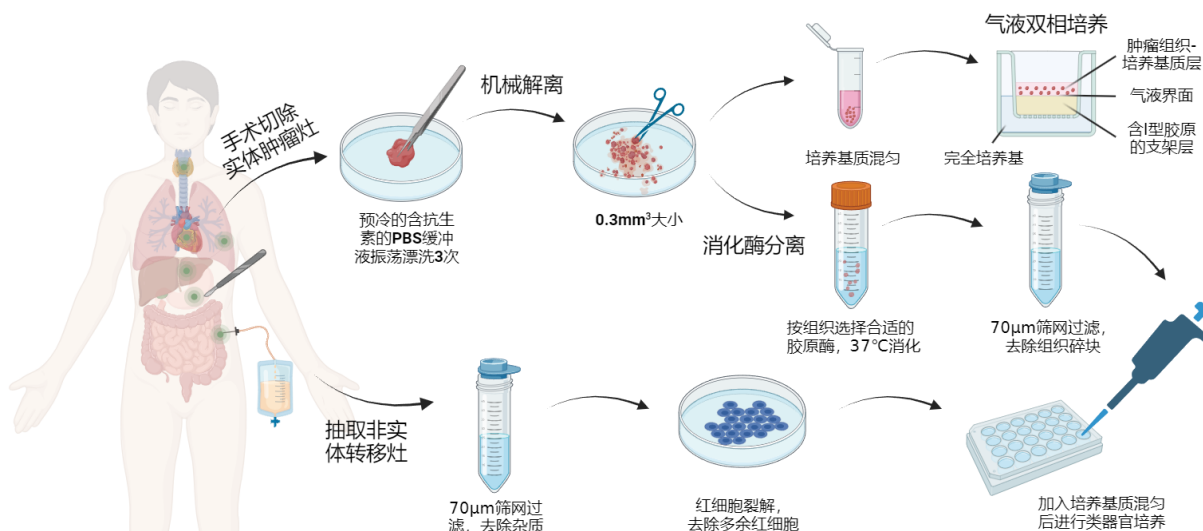


图 1 人胃肿瘤类器官构建流程图

6.1.5 肿瘤类器官的传代与保藏

6.1.5.1 类器官传代

应选择合适的类器官进行科学试验或传代，饱满度达到 80% 左右，显微镜 10× 下可看到超过 20 个类器官，或者大小 200-400µm 的类器官。胃肿瘤类器官构建过程中，培养传代一般以 1:3 的比例进行。吸去原培养基，每孔加入 500µL 的 DPBS，利用 1ml 的去尖枪头破坏培养基质，收集至 15mL 离心管后离心（4°C，150×g，5min），弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。加入适量 TrypLE 后，置于 37°C 水浴锅消化 5-8min 后加入等体积的终止液终止消化，利用移液管吹打 30-50 次后离心（4°C，300×g，5min）。弃掉上清，收集上清液至指定容器中，集中进行生物无害化处理。向细胞沉淀中加入适量 3D 培养基质轻轻重悬细胞，避免产生气泡，按照 50µL/孔向 24 孔板中加入培养基质-细胞混合物。37°C 孵箱放置 10min。待培养基质凝固后，补充培养基 500µL/孔（提前 37°C 预热）。每三天更换一次生长培养基。胃肿瘤类器官构建过程中，培养传代简化流程见图 2。

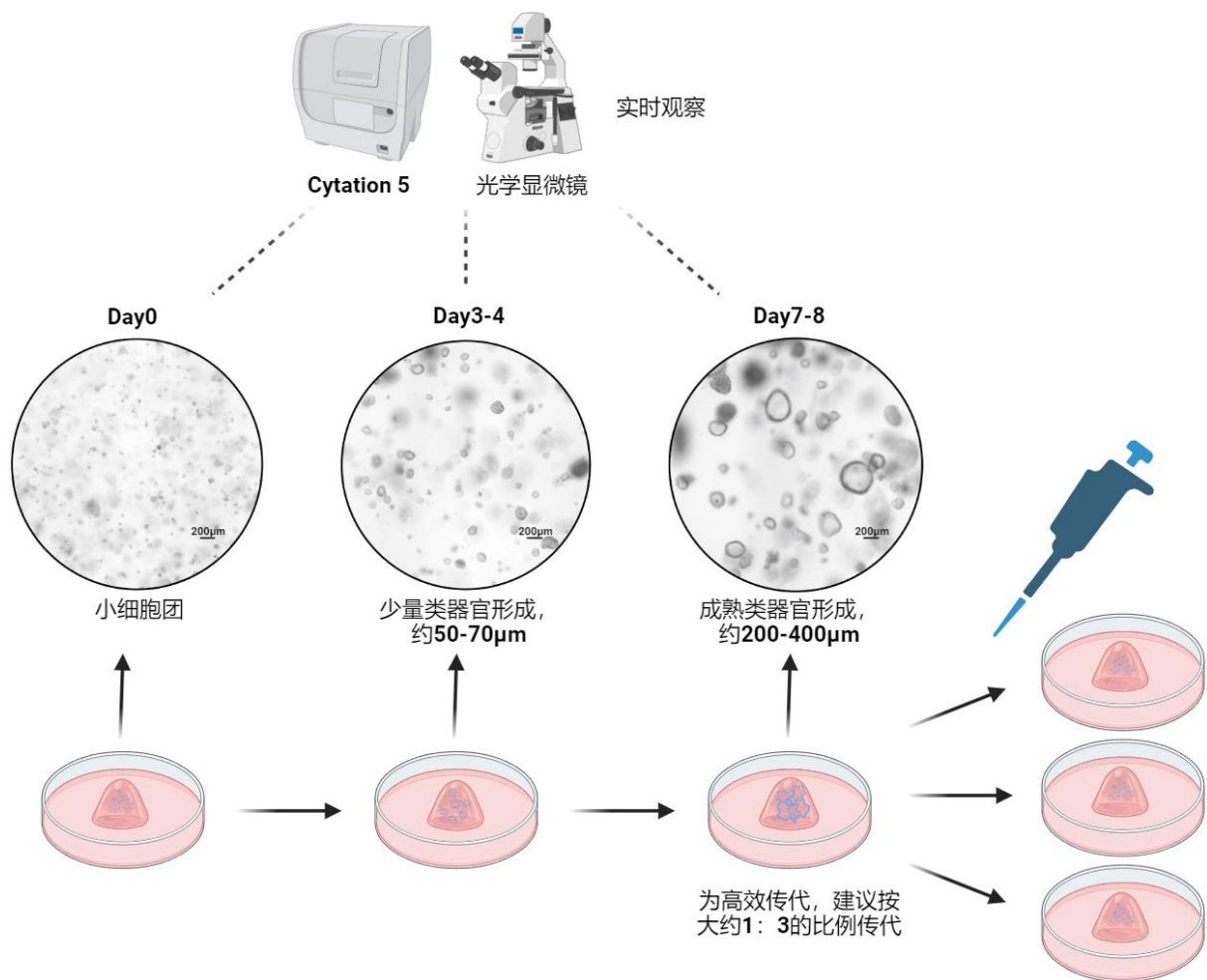


图 2 胃肿瘤类器官传代简化流程

6.1.5.2 类器官冻存

暂不使用的类器官应按附录 A 处理，加入细胞冻存液后移入低温环境冻存。

6.1.5.3 类器官的复苏

类器官复苏遵循速融原则。使用 37°C 水浴令其尽快融化，加入提前预热的复苏培养基（推荐使用含 10%FBS、抗生素、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液、谷氨酰胺、Y27632、NAC 的 DMEM/F12 基础培养基），1ml 的去尖枪头轻轻吹打混匀，离心（4°C，120×g，5min）后加入适量培养基重悬，避免产生气泡，24 孔板按照 45 µL/孔。37°C 孵箱放置 10min。待培养基凝固后，补充培养基 500uL/孔（提前 37°C 预热）。每三天更换一次生长培养基。

6.2 操作注意事项

样本采集、运送、处理以及类器官的构建、传代、冻存、复苏等过程均应无菌操作，以免污染。宜符合 GB/T 42060—2022 中附录 A 要求，注意保持手部卫生的时间点包括但不限于接触患者前/后、无菌操作前、体液暴露后、接触试验环境后、试验结束后。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/946140022120010210>