

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。

内部讨论资料，严禁非授权使用

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。

内部讨论资料，严禁非授权使用

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℃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 $10\text{mm}\times 10\text{mm}\times 10\text{mm}$ 。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°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。

6.1.1.2 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 100mm^2 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 0.3mm^3 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，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。

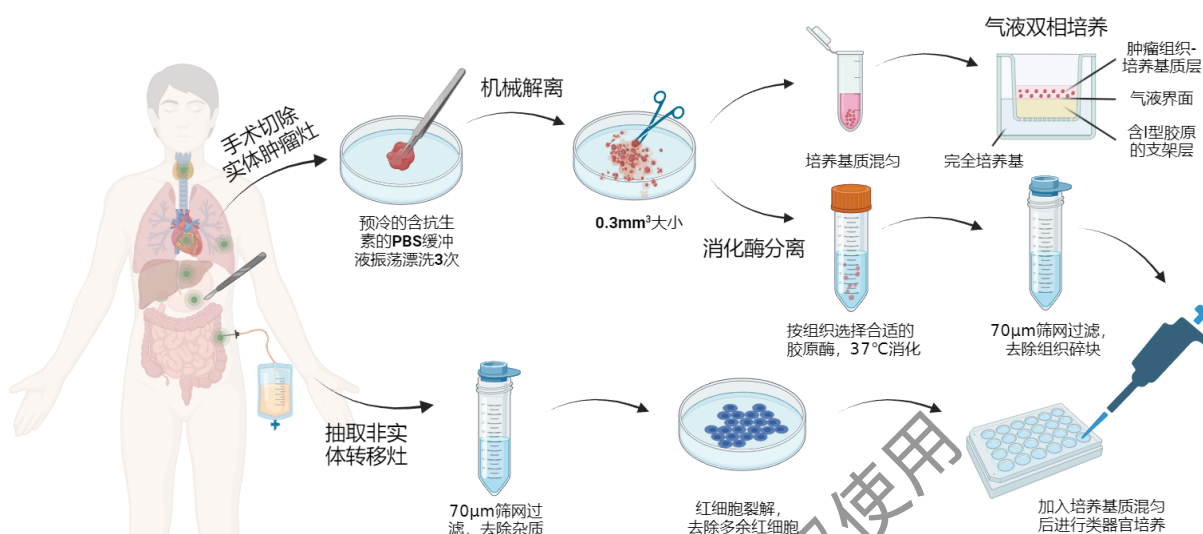


图 1 人胃肿瘤类器官构建流程图

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。

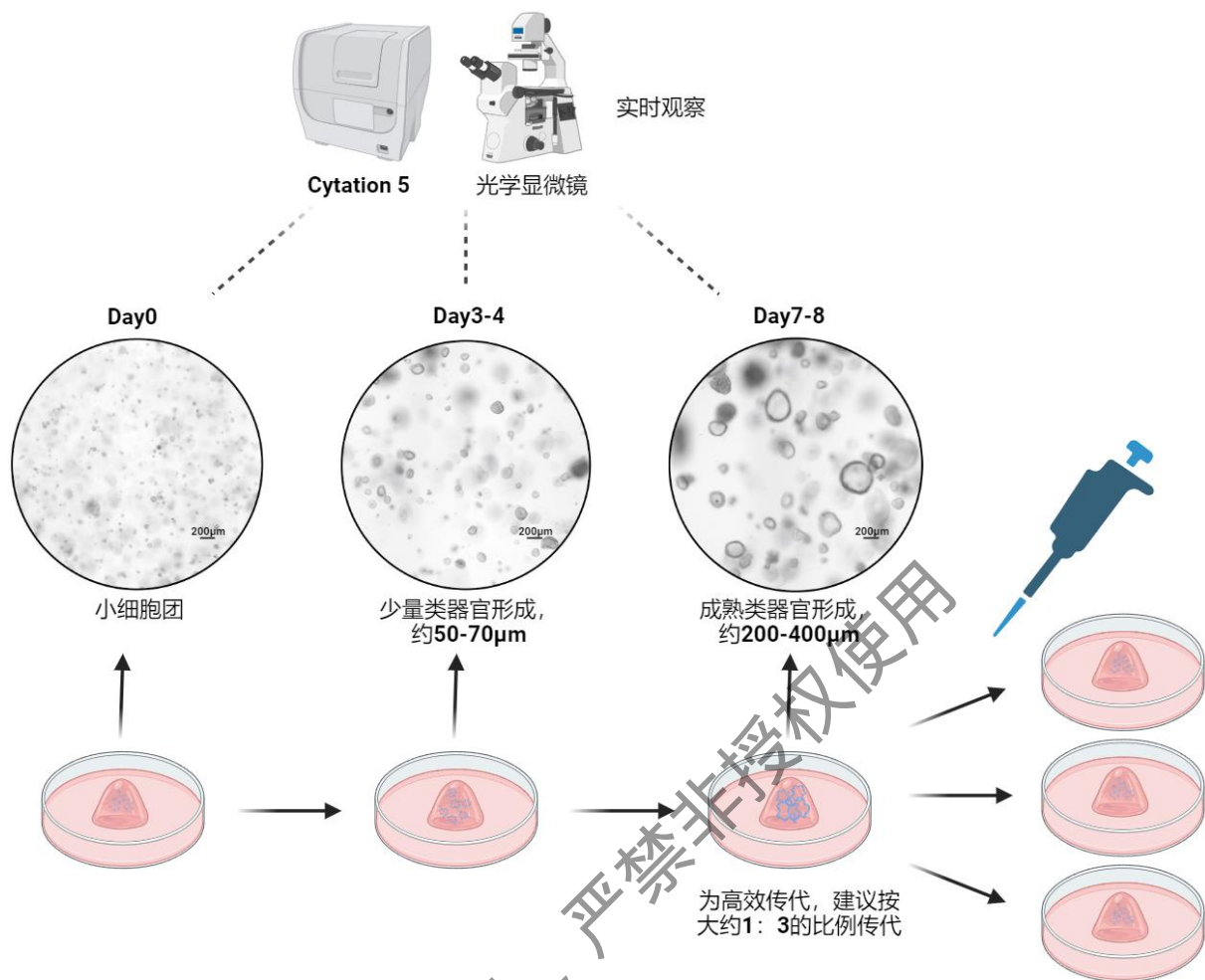


图 2 胃肿瘤类器官传代简化流程

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$, 120 \times 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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。

7. 类器官鉴定与质量控制

编号	检测指标	指标描述	强制 / 推荐检测	检测方法
7.1	形态	光学显微镜下观察人胃肿瘤类器官，其形态通常呈现为囊状，且有多层细胞形态。部分人胃肿瘤类器官呈现为实心球状或致密球体囊状。	强制	按照附录 D 检测。 参考文献[3]
7.2	体外可培养	从捐献者获得的人胃肿瘤组织，通过机械和消化酶联用的方法获得单细胞悬液，3D 培养方式生成胃肿瘤细胞类器官后，可以在体外维持长期培养，且核型正常，传代 10 代以上。	强制	显微镜观察，消化后 AO/PI 荧光染色检测细胞活力与死亡状态，H&E 染色和 FFPE 组织病理切片对比
7.3	体外可重建	当类器官解离为 5-20 个细胞左右的小团块后，仍能进行体外重建成为新的类器官，新培养出的类器官与原来类器官具有相同的形态、细胞组成、细胞核型等特征。	强制	显微镜观察。 参考文献[14]
7.4	原代肿瘤细胞存活率	新复苏的类器官存活率不低于 70%。且存活的类器官在体外可以进行连续传代培养。	强制	按照附录 D 检测。
7.5	染色体核型	正常核型应为 46, XY 或 46, XX。	推荐	按照附录 C 检测。
7.6	标志基因表达	增殖标志物 Ki67; 胃肿瘤标志物 CA19-9、CEA、CA72-4、CA50、CA24-2 等。	强制	基因表达按照附录 E 检测。 蛋白质表达按照

				附录 D.1.2 检测。
7.7	微生物	真菌、细菌、支原体、病毒等应为阴性。	强制	
7.8.1	细菌及真菌	真菌、细菌应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典(四部)》中“1101 无菌检查法”项检测。
7.8.2	支原体	支原体应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典(四部)》“3301 支原体检测法”项检测。
7.8.3	外源病毒因子	外源病毒因子应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典》中“3302 外源病毒因子检查法”项检测。
7.8.4	HBV	HBV 应为阴性。	强制	按照 WS/T 299—2022 核酸法检测。
7.8.5	HCV	HCV 应为阴性。	强制	按照 WS 213—2018 核酸法检验。
7.9	STR	体外培养的组织器官，应进行 STR 检测及分型鉴定，无样品间的交叉污染。受检组织器官 STR 位点的基因分型数据与其对应的标准细胞系(其原始组织或衍生细胞系)STR 基因分型数据进行比对，两者的匹配度应 $\geq 80\%$ 。	推荐	按照附录 B 检测。

8. 数据管理

宜结合类器官的使用目的，制订数据管理规范，包括但不限于数据内容及保存时间、数据管理与使用的权限及责任。详细的临床样本数据管理可参照国家药品监督管理局颁布的《药物临床试验质量管理规范》（GCP）中的数据管理部分内容。

9. 废弃类器官处置

类器官构建和传代过程中产生的废弃物处置应符合国家或地方法规和标准规范要求，符合 WS 233—2017 中 7.8 条规定，对于不合格的或者污染的一类器官细胞应遵循法律和实验室规定丢弃到指定地点，最终处置应交由经当地环保部门资质认定的医疗废物处理单位集中处置。同时应由专人进行书面记录，并存档。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附录 A

(资料性)

胃肿瘤类器官培养用试剂材料与操作技术要点

A.1 主要试剂材料

A.1.1 培养基主要构成

表 A.1 胃肿瘤类器官原发灶及转移灶类器官培养基的主要成份表

中文名称	英文名称
基础培养基	Advanced DMEM/F12
谷氨酰胺	GlutaMAX
4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液	HEPES
抗生素	Primocin
N-乙酰半胱氨酸	N-acetylcysteine
尼可酰胺	Niacinamide
血清添加剂	B27
血清添加剂	N2
表皮生长因子	EGF
成纤维细胞生长因子 10 ¹⁰	FGF10
胃泌素 I	Gastrin I
Wnt-3a 重组蛋白	Wnt-3a
R-Spondin1 重组蛋白	R-Spondin1
头蛋白	Noggin
TGFβ 抑制剂	A83-01
ROCK 抑制剂*	*Y-27632
*肿瘤类器官传代培养可选不加或低浓度使用	

A.1.2 类器官培养 3D 支架材料

3D 培养基质提取自基底膜的基质，主要由层粘连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成，还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。培养基质在室温条件下聚合形成具有生物学活性的三维支架，模拟体内细胞外基质的结构、组成、物理特性和功能。该结构不仅有利于体外细胞的培养和分化，而且能够为胃肿瘤细胞的生长提供支架。培

培养基在零度以下低温环境呈液态，故凡是涉及培养基的试验操作皆应置冰盒操作。

A.1.3 组织消化酶

胃肿瘤原发灶组织消化中涉及的消化酶主要有即IV型胶原酶、VI型胶原酶与II型分散酶。胃肿瘤实质转移灶组织根据转移灶位置选择合适的消化酶，涉及的消化酶主要有I型胶原酶、II型胶原酶、IV型胶原酶去氧核糖核酸酶、II型分散酶。以利于制备为单细胞悬液。

A.1.4 类器官冻存液

类器官冻存液为无血清冻存液，一般宜含有 10%的二甲基亚砷(DMSO)。

A.2 胃肿瘤类器官培养操作要点

A.2.1 类器官污染的处置

胃肿瘤类器官培养过程中应定期观察、拍照，每 3-4 天更换一次类器官培养基。一般在第 3-4 天于倒置显微镜下可以观察到少量 50-70 μm 的类器官小球，到第 7-8 天可观察到 200-400 μm 的胃肿瘤类器官。定期观察有利于及时发现污染。如果在培养 3 天内出现培养基浑浊，提示可能有霉菌和细菌污染，需及时采取丢弃处理。

A.2.2 类器官培养物接种注意事项

将细胞悬液与培养基按照 1:1 混匀吹打，吹打过程中切忌产生大量气泡，以免影响后续培养物接种。24 孔板可提前于 37°C 培养箱预热 30min，以加速培养基的凝固。

A.2.3 类器官传代注意事项

胃肿瘤类器官可以连续传代超过 10 代或持续培养 6 个月以上。与类器官有关的试验研究宜在连续传代 10 代以内或者持续培养 6 个月内进行。

A.3 类器官冻存注意事项

冻存前每孔加入 500 μL 类器官收集液，将类器官吸至试管内，按照 50 μL 胶加 500 μL 类器官收集液，置于冰上 60min，去除培养基，离心清洗后，加入细胞消化酶消化 3-5min，使其消化成单细胞悬液，离心获取细胞沉淀后加入适量类器官冻存液混匀（1mL 左右），分装于 500 μL 低温冻存管中，放入程序性冻存盒内于 -80°C 深低温冰箱过夜保存，次日将冻存管转移至液氮罐中长期保存。

A.4 类器官复苏注意事项

从液氮罐中取出的类器官冻存管要快速放入 37°C 水浴锅中使其尽快融化。吸出类器官冻存物移至 15mL 无菌离心管中，再加入 10 倍体积的复苏培养基混匀。之后操作同前述的类器官传代培养过程。

附录 B

(资料性)

短串联重复序列 (STR) 检测

STR 检测流程详见图 B.1，先提取细胞 DNA，然后进行 PCR 扩增及测序，最后进行结果分析。



图 B.1 STR 检测流程

人源类器官 STR 鉴定结果判定标准：

受检类器官 STR 位点的基因分型数据与其对应的标准细胞系（其原始组织或衍生细胞系）STR 基因分型数据进行比对：

B.1 若两者的匹配度 $\geq 80\%$ ，则判定受检细胞系为标准细胞系或为标准细胞系的衍生细胞系。

B.2 若两者的匹配度在 56%-80%之间，建议结合细胞系形态、细胞系特异性标记物等辅助分析进行综合判断。

B.3 若两者的匹配度 $\leq 56\%$ ，则判定受检细胞样本与其对应的标准细胞系不相关。

附录 C

(资料性)

染色体核型检测

C.1 试验当天保证细胞处于对数生长期，一般一个 6cm 的培养皿细胞长到 80% 的密度能做一次试验。

C.2 将待测细胞从 37°C, 5%CO₂ 培养箱中拿出, 添加秋水仙素(终浓度为 0.2 μg/mL), 摇匀后 37°C 孵育 1-2h。

C.3 等待的同时, 配制低渗溶液 0.075M KCL(配制: 8mL 无菌水+44.7mg KCL), 放入 37°C 水浴预热。

孵育后的细胞用胰酶消化, 1200r/min, 离心 5min, 收集于离心管中, 去除上清液, 用 8mL 低渗液重悬, 打匀后放 37°C 水浴箱 40min。

C.4 加入新鲜配制的固定液(甲醇/冰乙酸=2/1-3/1) 2mL 混匀, 室温下放 10min 后, 1000r/min 离心 10min, 去上清液(留 500 μL, 先将底部细胞吹匀), 新加入 8mL 固定液, 1200r/min, 离心 10min, 重复三次后, 滴片, 放入 80°C 烘箱老化 3h。

C.5 再将烤干的玻片放入新鲜配制的胰酶(0.25%) 中消化 1min (严格控制时间) 后, 再放入吉姆萨染液中染色 5-10min (先用 1 片染 5min, 根据颜色调整后面的染色时间), 取出用流水冲去染液后, 在显微镜下观察结果。

附录 D

(资料性)

胃肿瘤类器官鉴定

D.1 类器官形态学鉴定

D.1.1 显微镜下培养形态评估

将胃肿瘤类器官培养皿置于倒置显微镜下，在 20 倍视野下计数类器官数目。类器官数目不少于 60 个/视野表明类器官生长状态良好。生长活力好的类器官平均直径约为 200-400 μm 。若个别类器官体积过大（可达 600 μm ）则提示类器官趋向衰老，应尽早传代，以防止衰老的类器官影响类器官传代。

D.1.2 肿瘤类器官的形态学及免疫标记鉴定

胃肿瘤组织或者胃肿瘤类器官成功构建后，通过制备冰冻切片或者石蜡包埋切片，进行苏木素/伊红染色（H&E）进行形态学鉴定，通过免疫荧光或者免疫组化染色进行生物标志物检测。增殖标志物 Ki67；胃肿瘤标志物 CA19-9、CEA、CA72-4、CA50、CA24-2 等。同时进行类器官整体染色：培养大小约 150-300 μm 的类器官，加入类器官收集液，置于冰上放置 1h 以溶解培养基质，预冷 PBS 缓冲液漂洗类器官，低速离心（600r/min）2 次。加入 0.125% Triton X-100 破膜液，室温作用 10min，室温 PBS 缓冲液漂洗 3 次后封闭用血清（10%二抗血清）封闭 1h。将类器官分别放置相应染色组别的共聚焦小室中，10% 二抗血清作为配制一抗的稀释液，根据不同稀释比配制一抗抗体组合，滴加一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后 PBS 缓冲液漂洗 3 次。不同组别分别滴加各种荧光标记的二抗，室温避光作用 1h。缓冲液加入水性封片剂，避光湿盒保存，共聚焦显微镜下观察采集图像并三维重建类器官结构。

D.2 类器官存活率评估

D.2.1 胃肿瘤组织消化

胃肿瘤组织酶解后获得单细胞悬液，采用 AO/PI 荧光染色进行活细胞计数。将离心后的细胞沉淀用 Advanced DMEM/F12 培养基重悬，经吹打均匀后吸取 10 μL 置于 0.5mL 的 EP（eppendorf）管，向 EP 管中加入 10 μL AO/PI 染液充分混匀，染色 3min，取 20 μL 细胞悬液加入血细胞计数板，利用自动细胞分析仪检测细胞数量及活率。

注：活细胞比率应>90%可用于类器官细胞培养。

D.2.2 类器官传代及冻存复苏

类器官传代前、酶解为 5-20 个细胞的小细胞团后以及类器官复苏后，应使用 D.2.1 中方法进行类器官存活率计算。如果要利用类器官进行药物筛选或者化合物安全性评价，则使用商品化的 CellTiter-Glo® 发光法细胞活力检测试剂盒对类器官的活力进行检测。

D.3 胃肿瘤类器官遗传特征分析

D.3.1 使用基因测序仪对胃肿瘤类器官和相应的原发性肿瘤组织进行全外显子组测序 (WES)，揭示胃肿瘤类器官的遗传特征，或 SNP/STR(单核苷酸多态/短串联重复)分析所获得的类器官可与原发性肿瘤组织相匹配。确定所构建的胃肿瘤类器官确实可以代表患者肿瘤。

D.3.2 通过批量 DNA 测序检测胃肿瘤类器官的变异等位基因频率，揭示肿瘤细胞比例，确定胃肿瘤类器官的肿瘤纯度。

D.3.3 在类器官培养过程中，如果在形态上有区别，可以手动将类器官从培养物中取出，或根据其密度或大小进行分离，建议在分离后进行检查以确认取出的类器官的身份，例如，用定量 PCR 检测组织特异性标记或用 DNA 测序检测突变的缺失。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附录 E

(资料性)

标志基因检测实时荧光定量 PCR 法

E.1 肿瘤类器官样本制备

体外培养的肿瘤类器官，吸掉培养基。加入等体积的 PBS 缓冲液 (pH 为 7.4)，吸掉缓冲液。重复一次。

E.2 肿瘤类器官 RNA 提取

E.2.1 收集细胞：待肿瘤类器官长到一定的数量后，将 24 孔板中的培养基去除，加入 1mL 的 PBS 缓冲液进行清洗 1 遍。去除 PBS 缓冲液后，加入 1mL 无动物源性重组胰酶，并用 1mL 量程的移液枪将培养基质打散，以利于消化酶与类器官进行充分的接触与消化。30min 后，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中离心 (300×g, 5min)，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清；

E.2.2 裂解处理：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RL (350μL)，旋涡振荡；

E.2.3 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上(过滤柱 CS 放在收集管中)，13,400×g 离心 2min，收集滤液；

E.2.4 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇 (通常为 350 μL 或 600μL)，混匀 (此时可能会出现沉淀)，得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中 (吸附柱 CR3 放入收集管中)，13,400×g 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.5 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400×g 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.6 DNase I 工作液的配制：取 10 μL DNase I 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中，加入 70 μL 去除 DNA 缓冲液 RDD，轻柔混匀；

E.2.7 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μL 的 DNase I 工作液，室温放置 15min；

E.2.8 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400×g 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.9 向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 漂洗液 RW (按照说明加入乙醇)，室温静置 2min，13,400×g 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.10 重复步骤 2.9；

E.2.11 离心 (13,400×g, 2min), 收集上清液至指定容器中, 集中进行生物无害化处理。将吸附柱 CR3 置于室温放置至少 2min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液;

E.2.12 将吸附柱 CR3 转入一个新的 RNase-Free 离心管中, 加入 30-100 μL RNase-Free ddH₂O, 室温放置 2min, 离心 (13,400×g, 2min), 得到 RNA 溶液。

E.3 类器官 cDNA 制备

取 1μg 在 E.2.12 步骤提取的 RNA, 利用水浴锅, 按照商品化 RNA 逆转录试剂盒进行类器官 RNA 逆转录, 操作按照试剂盒说明书进行。

E.4 基因表达情况确定

取 E.3 类器官 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR 仪, 按照商品化应该定量 PCR 扩增试剂盒说明书及相关基因引物, 进行实时荧光定量检测, 得到内参基因及目标基因表达值。

内部讨论资料, 严禁非授权使用

参考文献

- [1] 科学技术部, 卫生部. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则, 2003.
- [2] 中华人民共和国国务院. 中华人民共和国人类遗传资源管理条例. 2019-05-28.
- [3] 中国细胞生物学学会. T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [4] 国家药品监督管理局, 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 药物临床试验质量管理规范. 2020-04-23.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 全国临床检验操作规程. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015
- [7] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459(7244): 262-5.
- [8] Barker N, Huch M, Kujala P, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1):25-36
- [9] Yan HHN, Siu HC, Law S, et al. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell* 2018; 23(6): 882-97
- [10] Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, et al. Divergent routes toward Wnt and R-spondin niche independency during human gastric carcinogenesis. *Cell*, 2018, 174(4):856-869, e17
- [11] Vlachogiannis GHS, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science (New York, NY)* 2018; 359(6378): 920-6.
- [12] Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, et al. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin-1 Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. *Cell* 2018; 174(4): 856-69.
- [13] Gao M, Lin M, Rao M, et al. Development of Patient-Derived Gastric Cancer Organoids from Endoscopic Biopsies and Surgical Tissues. *Ann Surg Oncol* 2018; 25(9): 2767-75.
- [14] Bergin CJ, Benoit YD. Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to evaluate cancer stem cell activity. *STAR Protoc*. 2022 Mar 4;3(1):101218. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101218. PMID: 35265864; PMCID: PMC8899043.