



# 团 体 标 准

T/CSCB 0020—2024

## 人 胆 囊 癌 类 器 官

Human gallbladder cancer organoids



2024-10-28 发布

2024-12-31 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 ..... 1

5 一般要求 ..... 2

6 技术要求 ..... 2

7 检验方法 ..... 3

8 使用说明 ..... 3

9 标签 ..... 4

10 运输和储存..... 4

附录 A（资料性） 类器官组织病理检测 石蜡包埋法 ..... 6

附录 B（资料性） 类器官基因突变检测 测序法 ..... 7

附录 C（资料性） 类器官存活率检测 钙黄绿素 AM 染色法 ..... 8

附录 D（资料性） 类器官 STR 鉴定 ..... 9

参考文献 ..... 11

中国细胞生物学学会  
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

## 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。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市肿瘤研究所、上海市第六人民医院、同济大学生命科学与技术学院、中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院）、复旦大学附属华山医院、中国科学院大学附属肿瘤医院（浙江省肿瘤医院）、天津医科大学总医院、天津市肿瘤医院、广州国家实验室、北京干细胞与再生医学研究院、中国科学院动物研究所、北京工商大学、复旦大学附属中山医院、复旦大学生物医学研究院、四川大学华西医学院、哈尔滨医科大学附属肿瘤医院、郑州大学、复旦大学附属肿瘤医院、山东省肿瘤医院、嘉兴市第二医院、中国科学技术大学生命科学与医学部、上海长征医院、云南大学生命科学院、复旦大学公共卫生学院、上海交通大学医学院附属瑞金医院、上海市浦东新区公利医院、广西医科大学国际教育学院、上海交通大学高等研究院、上海健康医学院、同济大学附属东方医院、华中科技大学同济医学院附属同济医院、上海交通大学附属同仁医院、浙江大学基础医学院、上海万何圆生物科技有限公司。

本文件主要起草人：刘颖斌、向冬喜、何爱娜、高绍荣、刘连新、王永刚、肖秀英、钟来平、程向东、宫婷、贾斌、王亚龙、赵同标、郝捷、马爱进、华国强、赵红玲、楼文晖、曹晖、储以微、杨庆诚、李志辉、王嘉倍、郑桐森、朱平平、张剑、周尊强、邢力刚、周长春、朱栋元、刘增军、陈刚、王晓光、刘天舒、崔越宏、单革、王湛、姜萌、张宁、刘泽兵、张子臻、朱寅杰、钱晓哲、林晓琳、韩婷、陈茂荣、邹华春、康文岩、许凤、高钢龙、康晓楠、龚帅、马秀梅、陈盛、曹杰、谢莹、王许安、张建明、孔宪明、董春燕、张勇、邹燕梅、汤丽娜、赵铜超、张剑军、徐鹏飞、牛耿明、魏桂英、徐鹤鸣、赵莎莎、刘晓、曹东艳、于斌。

# 人胆囊癌类器官

## 1 范围

本文件规定了人胆囊癌类器官的一般要求、技术要求、检测方法、检验规则、使用说明、标签、运输和储存。

本文件适用于胆囊癌患者来源的人胆囊癌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。

中华人民共和国药典（2020年版三部）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 类器官 organoids

由于细胞或前体细胞体外培养形成的，包含组织器官特异性的多种细胞，能自我更新，具有特定器官关键结构和功能特性的三维（3D）细胞培养物。

[来源：T/CSCB 0014—2022, 3.1, 有修改]

### 3.2

#### 人胆囊癌类器官 human gallbladder cancer organoids

由病理诊断为胆囊癌患者的胆囊肿瘤细胞培养而成的具有胆囊癌特征的三维（3D）细胞培养物。

### 3.3

#### 类器官传代 organoid passage

体外培养类器官经过物理、化学和/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

#### 类器官冻存 organoid 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

#### 类器官复苏 organoid thawing

冻存的类器官重新获得生长和代谢活力的过程。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3D: 三维(Three Dimension)  
DAB: 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine)  
DMSO: 二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide)  
DNA: 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)  
H&E: 苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin)  
PBS: 磷酸盐缓冲溶液(Phosphate-Buffered Saline)  
PCR: 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)  
STR: 短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

## 5 一般要求

### 5.1 原材料

5.1.1 原材料的获取及其在研究中的使用应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.2 根据使用目的,人胆囊癌类器官研究和生产组织应建立相应的供者评估标准。

### 5.2 过程和信息管理

5.2.1 应对人胆囊癌类器官的原材料获取、制备、检测、运输和储存等过程中影响产品质量的关键因素进行记录,并建立唯一标识,确保能够对过程进行溯源。

5.2.2 应明确记录的最短保留时间,确保记录完整性和记录存储的安全性。

## 6 技术要求

### 6.1 形态

人胆囊癌类器官在光学显微镜下呈现出致密球体囊状、类球状或者圆管状等多种形态特征。

### 6.2 组织病理学特征

6.2.1 类器官中的细胞应与原肿瘤组织中的肿瘤细胞的异型性特征保持一致,如核深染、核分裂象异常、核质比例失调等。

6.2.2 应对类器官进行相关标志物的免疫组化检测,检测结果应与原肿瘤组织结果基本一致。检测的标志物包括但不限于 CK19 和 CK7。

### 6.3 遗传特征

应对类器官进行基因变异检测,检测结果应与原肿瘤组织的基因变异结果基本一致。检测的基因包括但不限于 *FGFR2* 及 *IDH1/2*。

### 6.4 体外培养及生长

6.4.1 从胆囊癌患者来源的人胆囊癌组织或细胞,初次在体外构建成人胆囊癌类器官后,应能传代至少 3 代。

6.4.2 当类器官传代后,应能在体外重新生长成为新的类器官,且与传代前类器官的形态、组织病理学特征和遗传特征应保持一致。

### 6.5 类器官存活率

复苏的人胆囊癌类器官存活数量应不低于冻存前数量的 50%,且存活的类器官在体外应能进行传

代培养。

## 6.6 微生物

应对真菌、细菌、支原体、病毒进行检测并记录。

## 6.7 STR

应与供体 STR 一致。

# 7 检验方法

## 7.1 形态

体外三维培养类器官,使用光学显微镜观察。

## 7.2 组织病理学特征

参照附录 A 进行检测。

## 7.3 遗传特征

参照附录 B 进行检测。

## 7.4 体外培养及生长

体外三维培养类器官可通过光学显微镜进行拍照,显微镜附带比例尺进行类器官的直径测量,并进行数量统计。

## 7.5 存活率

参照附录 C 检测。

## 7.6 微生物

### 7.6.1 真菌及细菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“1101 无菌检查法”检测。

### 7.6.2 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“3301 支原体检查法”检测。

### 7.6.3 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“3302 外源病毒因子检查法”检测。

## 7.7 STR

参照附录 D 检测。

# 8 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 名称；
- b) 代次；
- c) 数量；
- d) 生产日期；
- e) 生产批号；
- f) 生产组织；
- g) 储存条件；
- h) 运输条件；
- i) 联系方式；
- j) 使用方法；
- k) 执行标准号；
- l) 生产地址；
- m) 邮政编码；
- n) 注意事项。

注：根据用户需求，提供内毒素结果。

## 9 标签

应至少包括以下内容：

- a) 名称；
- b) 代次；
- c) 数量；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 生产日期。

## 10 运输和储存

### 10.1 运输

10.1.1 根据人胆囊癌类器官的使用要求，选择合适的运输方式和运输条，保证人胆囊癌类器官生物学特性、安全性、稳定性和有效性。

10.1.2 人胆囊癌类器官的运输宜考虑但不限于人胆囊癌类器官特性、承载人胆囊癌类器官的容器、运输路线、运输条件、运输设备、运输方式、运输风险和保障措施等因素。

10.1.3 运输条件的控制应包括但不限于温度范围、振荡、无污染、设备性能和适当的包装等。

10.1.4 应根据用户要求提供相应的随行检验文件和技术指导文件。

10.1.5 应在必要时检查运输中的包裹，并在可能的情况下添加新的冷冻源（如干冰和液氮）以保持适宜的运输温度。

### 10.2 储存

10.2.1 应采取优化后的冻存程序和方法以最大限度地减少冻融过程中对人胆囊癌类器官的损伤，以确保其正常功能不过多受冻融影响。

10.2.2 应记录人胆囊癌类器官的冻存信息，包括但不限于：

- a) 名称；

- b) 批号；
  - c) 数量；
  - d) 传代次数；
  - e) 冷冻日期；
  - f) 冻存液成分；
  - g) 操作者姓名。
- 10.2.3 应对人胆囊癌类器官储存条件进行记录,包括但不限于:
- a) 储存条件；
  - b) 储存日期；
  - c) 储存期限；
  - d) 储存人员。



## 附录 A

(资料性)

### 类器官组织病理检测 石蜡包埋法

#### A.1 仪器和设备

A.1.1 石蜡包埋仪器。

A.1.2 石蜡切片机。

A.1.3 光学显微镜。

#### 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 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。

A.2.2 H&E 染色试剂:苏木精、伊红。

#### A.3 检测步骤

##### A.3.1 样品准备和固定

取体外培养的各类器官,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。

##### A.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。

##### A.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。

##### A.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。

#### A.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 B

(资料性)

### 类器官基因突变检测 测序法

#### B.1 仪器和设备

离心机。

#### B.2 试剂

按相应要求准备的细胞 DNA 抽提试剂盒。

#### B.3 样本保存

样品制备好后,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 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

按细胞 DNA 抽提试剂盒说明书对类器官基因组 DNA 进行提取。

##### B.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。

#### B.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。

## 附 录 C

(资料性)

### 类器官存活率检测 钙黄绿素 AM 染色法

#### C.1 仪器和设备

C.1.1 倒置显微镜。

C.1.2 荧光显微镜。

#### 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 细胞级别 DMSO。

C.2.2 pH 为 7.4 的 PBS。

C.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 AM 溶液。

#### C.3 检测步骤

##### C.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。

##### C.3.2 活类器官数量计数

试验时,取出已经配制好的钙黄绿素 AM 储存液,加入钙黄绿素 AM 溶液到培养基中至终浓度为  $0.2\ \mu\text{mol/L}$ 。随后在  $37\ ^\circ\text{C}$  条件下孵育 60 min。到达时间后,用 PBS 缓慢清洗掉带有钙黄绿素 AM 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。

#### C.4 类器官存活率计算

类器官存活率按照公式(C.1)进行计算:

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

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。

#### C.5 结果分析

按照 C.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。

#### C.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 D**  
(资料性)  
**类器官 STR 鉴定**

**D.1 仪器和设备**

- D.1.1 离心机。
- D.1.2 PCR 仪。
- D.1.3 毛细管电泳仪。
- D.1.4 微量紫外分光光度计。

**D.2 试剂**

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

**D.3 样本保存**

样品制备好后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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**

- D.4.2.1 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。
- D.4.2.2 微量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。
- D.4.2.3 DNA 样本要求:DNA 体积 $\geq 20\text{ }\mu\text{L}$ ,浓度 $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

**D.4.3 PCR 扩增**

- D.4.3.1 按照标准 PCR 扩增方法对 STR 位点进行扩增,也可按照经过质检合格的商业化试剂盒说明书进行。
- D.4.3.2 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。
- D.4.3.3 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。

**D.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一致。

## D.5 结果分析

**D.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。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。

**D.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] GB/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求
- [2] GB/T 42466—2023 生物样本库多能干细胞管理技术规范
- [3] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
- [4] T/CSCB 0009—2022 人干细胞研究伦理审查技术规范
- [5] T/CSCB 0014—2022 人肠癌类器官
- [6] 涉及人的生物医学研究理论审查办法(中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会令 第11号)
- [7] 涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法(国卫科教发〔2023〕4号)
- [8] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.中国临床肿瘤学会(CSCO)胆道恶性肿瘤诊疗指南 2023 [M].北京:人民卫生出版社,2023.
- [9] Yoshimasa Saito, Toshihide Muramatsu, Yae Kanai, et al. Establishment of Patient-Derived Organoids and Drug Screening for Biliary Tract Carcinoma[J]. Cell Reports. 2019; 27: 1265-1276.

