

ICS 11.020  
CCS C 05



# 团 体 标 准

T/CRHA XXX—202X

## 类器官个体化抗肿瘤药物敏感性检测方法

The standard for individualized tumor organoid drug sensitivity testing methods

(征求意见稿)

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

中国研究型医院学会 发布

# 目 次

前言 .....	II
引言 .....	1
1 范围 .....	2
2 规范性引用文件 .....	2
3 术语和定义 .....	2
4.缩略语 .....	2
5 要求 .....	3
5.1 生物安全要求 .....	4
5.2 技术要求 .....	4
6 样本组织培养操作程序 .....	4
6.1 实验准备 .....	4
6.2 组织清洗 .....	4
6.3 组织剪切 .....	5
6.4 第一次组织消化 .....	5
6.5 第二次组织消化 .....	5
6.6 终止消化 .....	5
6.7 组织过滤 .....	5
6.8 去除红细胞 .....	5
6.9 制备细胞悬液 .....	5
6.10 接种细胞 .....	5
6.11 倒扣培养皿 .....	5
6.12 添加培养基 .....	5
6.13 培养过程应及时跟进样本情况 .....	6
6.14 样本培养结论 .....	6
7 药敏检测程序 .....	6
7.1 类器官药敏检测板制备 .....	6
7.2 药物接触实验 .....	7
7.3 药敏检测 .....	7
7.4 药敏数据分析及结果判定 .....	8
8 废弃物处理 .....	8
9 数据管理 .....	8
10 质量控制 .....	8
附录 A（资料性）肿瘤类器官药敏检测的方法原理 .....	10
附录 B（资料性）样本质量反馈 .....	11
附录 C（资料性）类器官的核酸与蛋白质提取 .....	12
参考文献 .....	12

# 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》给出的规则起草。

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。

本文件由中国研究型医院学会医疗信息化分会提出。

本文件中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：中日友好医院、解放军总医院第七医学中心、解放军总医院第二医学中心、中山大学肿瘤防治中心、南方医科大学南方医院、四川省肿瘤医院、湖南省人民医院、浙江省人民医院、复旦大学附属中山医院、复旦大学附属肿瘤医院、北京友谊医院、广州医科大学附属第一医院、广东省人民医院、北京大学深圳医院、北京大学口腔医院、北京安定医院、北京中医药大学第三附属医院、贵州医科大学附属医院、南京医科大学、广东省类器官工程技术研究中心、创芯国际生物科技（广州）有限公司。

本文件主要起草人：刘丽宏、刘虹麟、金鹏、宋鹏、孟元光、周雷、杨萌、崔慧娟、梁朝阳、杨猛、黄金昶、王树滨、李刚、杨盈赤、周承志、贾立群、张雷、娄彦妮、杨矜记、陈功、牟永告、漆松涛、何建行、董培、王坤、黄广龙、谢展鸿、杨牧、段华新、刘小珍、胡洁、张勇、吴小华、温灏、李鹏飞、李琴山、李砚川、万宇翔、刘轩、房青、周同亮、朱宇、邱培、阿力亚、徐丛。

# 引 言

个性化抗肿瘤药物敏感性检测是一项具有重要临床意义的医学研究技术。肿瘤的发展和治疗反应在不同个体之间存在巨大的差异，这使得传统的治疗方法无法满足每个患者的特定需求。因此，发展一种能够预测患者对特定药物的敏感性的方法变得至关重要。

类器官个性化抗肿瘤药物敏感性检测是一种新兴的技术，它利用体外培养的肿瘤组织或细胞，通过模拟体内肿瘤环境，评估不同药物对肿瘤的抑制效果。这种方法可以更准确地预测患者对不同药物的反应，从而为个性化治疗方案的制定提供有力的依据。

通过类器官个性化抗肿瘤药物敏感性检测，医生可以根据患者的肿瘤特征和药物敏感性结果，选择最适合的治疗方案。这种个体化的治疗方法可以提高治疗的效果，减少不必要的药物毒副作用，并提高患者的生存率和生活质量。

尽管类器官个性化抗肿瘤药物敏感性检测在理论上具有巨大的潜力，但目前仍面临一些挑战。例如，如何选择合适的肿瘤样本和培养条件，以及如何解读和应用检测结果等问题仍需要进一步研究和探索。总之，类器官个性化抗肿瘤药物敏感性检测是一项具有前景的医学研究技术，它有望为肿瘤患者提供更加个体化和精准的治疗方案，为抗肿瘤药物的研发和临床应用提供重要的指导。

# 类器官个体化抗肿瘤药敏感性检测方法

## 1 范围

本文件规定了临床应用中肿瘤类器官药敏检测的方法，包括样本组织培养操作程序、药敏检测程序等内容。

本文件适用于人源肿瘤类器官的培养、传代及靶向药、化疗药物的药敏检测。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489—2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求

GB 50346—2004 生物安全实验室建筑技术规范

YY 0569 II级 生物安全柜

JG/T 292 洁净工作台

T/CSCB 0001-2020干细胞通用要求

## 3 术语和定义

GB/T 38736—2020 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**类器官 organoids**

在细胞类型组成、形态结构和生理/病理功能等方面，干细胞或前体细胞在体外三维培养条件下，通过增殖、分化和自组织所形成的微型组织器官培养物，高度模拟体内对应组织器官（包括稳态和病理过程）的特征。

### 3.2

**肿瘤类器官培养物 organoid cultures of tumors**

由病理诊断为恶性肿瘤患者的自体肿瘤组织或细胞样本中提取的肿瘤细胞，在三维立体培养条件下形成的与其来源组织的细胞成分、组织结构及分子表型等关键特征具有相似性的三维多细胞培养物。

### 3.3

**类器官传代 organoid passage**

将已经培养到一定大小且状态良好的类器官，采用物理机械分离或联合酶消化的方法，分散成小细胞团或单细胞悬浮液。随后，这些细胞会再次被重新接种到原始培养条件相同的

培养体系中，以继续进行类器官的培养。新一代的类器官在形态和功能上与原始类器官具有相似特征。

### 3.4

#### 药敏检测 drug sensitivity testing

经过成功培养的肿瘤类器官将被接种到含有不同浓度化疗药物的多孔板（如384孔板或96孔板）或类器官芯片中。随后，通过培养和检测ATP含量或进行图像分析，可以计算肿瘤细胞对药物的抑制率，以评估药物的疗效和患者的敏感程度。

### 3.5

#### 半抑制浓度 half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>

指当给定药物或化合物对目标生物体或细胞的生物活性（通常是抑制或抑制率）达到50%时，给定药物或化合物的对应浓度。

注：在浓度等于IC<sub>50</sub>时，药物或化合物抑制了目标生物活性的一半。

### 3.6

#### 类器官参考品 organoid reference material

能够在一定代次范围内保持稳定（如病理、测序、肿瘤药敏等）的成系肿瘤类器官，药敏检测实验中作为阴性、阳性参考品。

注：参考品通常是经过验证的，并且具有已知的特性和性能，以便与其他类器官进行比较和验证。使用类器官参考品有助于确保研究结果的可靠性和可重复性。

### 3.7

#### 知情同意 informed consent

获取、处理、存储肿瘤组织的方法必须经过伦理委员会的批准。在确保充分尊重和告知人体组织提供者的权益的前提下，必须与提供者签署知情同意书。

注1：知情同意书应包括但不限于有关组织处理方案和潜在应用场的信息。

注2：需要采取措施来保护组织提供者的个人信息的隐私，绝对禁止泄露可识别供体及其亲属身份的信息，如姓名、肖像、证件信息、社会关系等。见GB/T 38736-2020第3.7条。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HBSS：平衡盐溶液（Hank's Balanced Salt Solution）

CO<sub>2</sub>：二氧化碳（Carbon Dioxide）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）

ATP：腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine Triphosphate)

GA：悬浮细胞缓冲液（Cell Suspension Buffer）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer solution）

CB3：吸附柱（Column Batch 3）

CR3：吸附柱（Column Reagent3）

CS：过滤柱（Column Separation）

GB：核酸与蛋白分离缓冲液（Nucleic acid and protein separation buffer）

GD：蛋白质杂质缓冲液（Guanidine Hydrochloride Buffer）

PW：去盐漂洗液（Phosphate Wash Buffer）

RDD: 缓冲液 (RNase-Free DNA Digestion Buffer)

RIPA: 裂解液 (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer)

## 5 要求

### 5.1 生物安全要求

开展肿瘤类器官及其体外药物敏感性检测实验活动对应的生物安全要求。

### 5.2 技术要求

#### 5.2.1 样本要求

新鲜的肿瘤样本组织或恶性积液。

#### 5.2.2 实验步骤要求 (肿瘤细胞提取、三维培养模型制备、培养、药敏板制备、药物接触、药敏检测及结果分析)

详见本文件第 6、7 章, 样本组织培养操作程序及药敏检测程序。

#### 5.2.3 实验质量控制要求

##### a) 肿瘤类器官建模质控

根据类器官形态、直径、透亮度等参数进行分析, 进行类器官活性、细胞量质控, 其中活性不低于 50%, 细胞量满足药敏检测需求;

当类器官传代后, 应能进行体外重建成新的类器官, 并且传代前后类器官的形态和特征应保持一致;

真菌、细菌、支原体等均为阴性;

类器官 H&E 染色后, 由具备病理鉴定资质的专业人员判定, 应符合肿瘤细胞特征: 核深染、异常和分裂像、核质比失调等。

##### b) 药敏质控及数据质控

类器官肿瘤细胞比例应不低于 70%;

阳性参考品药敏结果应为敏感、阴性参考品药敏结果应为耐药;

计算 Z factor (需大于或等于 0.5)。

Z factor 按照公式 (1) 计算

$$Z=1-[3 \times (\sigma_{\text{对照}} + \sigma_{\text{空白}}) / |\bar{x}_{\text{对照}} - \bar{x}_{\text{空白}}|] \dots \dots \dots (1)$$

式中:

Z—实验 Z factor;

$\bar{x}_{\text{对照}}$ —阴性对照发光值的平均值;

$\bar{x}_{\text{空白}}$ —空白对照发光值的平均值;

$\sigma_{\text{对照}}$ —阴性对照发光值的标准方差;

$\sigma_{\text{空白}}$ —空白对照发光值的标准方差。

## 6 样本组织培养操作程序

### 6.1 实验准备

使用前应将样本对应癌种的试剂盒组分提前解冻混匀。基质胶使用冰水浴解冻。

### 6.2 组织清洗

将样本组织转移至50mL离心管中，用含1%双抗及50ug/mL的庆大霉素无菌生理盐水对样本进行清洗3-5次（每次使用20ml-30mL 庆大霉素无菌生理盐水清洗）。

### 6.3 组织剪切

在冰盒上用无菌剪刀将组织剪成约1mm<sup>3</sup>小块。

### 6.4 第一次组织消化

使用5mL HBSS收集剪切好的组织于15mL离心管中，1200rpm，3min离心弃上清，向沉淀加入3mL 消化液I 于37°C摇床中震荡消化0.5-3小时。操作中应注意，消化结束前半小时将消化液II 置于37°C预热。

### 6.5 第二次组织消化

第一次消化结束后，加入5mL HBSS终止消化，1200rpm，3min离心弃上清，向沉淀中加入2mL提前预热的消化液II 于37°C摇床中继续消化5-10 min。

### 6.6 终止消化

待消化完成后，加入5mL HBSS 终止消化，1200rpm，3min离心弃上清。

### 6.7 组织过滤

加入5mL HBSS重悬沉淀，使用100μm细胞筛网过滤收集滤液，将滤液1200rpm，离心3min，弃上清收获细胞沉淀。

### 6.8 去除红细胞

加入2mL红细胞裂解液重悬细胞沉淀，室温放置2-5min后，加入4mLHBSS 溶液稀释终止，1200rpm，离心3min，弃上清收获细胞沉淀。

注1：当组织过滤后的沉淀颜色偏红时可通过本步骤去除多余的红细胞，其他情况下本步骤非必须。

### 6.9 制备细胞悬液

用少量培养液重悬细胞沉淀，细胞计数后用培养液稀释制备10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> cell/30ul的细胞悬液。

### 6.10 接种细胞

取适当体积（不超过200μL）的基质胶（4°C预处理融化）与细胞悬液（不超过200μL）按照1-1.5:1的比例充分混匀，避免产生气泡，用移液器将混有细胞的胶滴到60mm 培养皿中，每滴约50μL。

注2：为避免基质胶凝固，应将其置于冰盒上操作。

### 6.11 倒扣培养皿

将接种后的培养皿放入CO<sub>2</sub>培养箱内37°C静置2min，轻晃胶滴无明显流动后小心倒扣，待其充分凝固（约30min）。

### 6.12 添加培养基

加入2-4mL的培养液，置于培养箱内于37°C、5%的CO<sub>2</sub>浓度条件下培养。每隔3-5天更换一次培养液，一般情况下培养4-10天可得到类器官。

### 6.13 培养过程应及时跟进样本情况

每个2-3天观察一次并拍照，4X一张，20X两张（命名规则：编号-代次-培养时间-倍数&序号；如1000-P1-培养0天-20X1）；样本交接至下一实验时要求记录样本情况及照片。

### 6.14 样本培养结论

应在样本接收24小时内出具《样本质量反馈表》（见附录A）。培养3-10天后，出具《类器官培养情况反馈表》至医生，医生根据筛药数量确定筛药方案反馈至实验室。

## 7 药敏检测程序

### 7.1 类器官药敏检测板制备

#### 7.1.1 实验前准备

生物安全柜紫外线消毒30min，通风备用。4°C提前预冷384孔板10min，准备冰盒，冰水，并在显微镜下拍照（4×一张，20×两张，命名规则：编号-交接-4×1，编号-交接-20×1等）；

#### 7.1.2 类器官消化

类器官消化操作如下：

- a) 将培养皿中的培养基吸出；若出现胶滴散了的情况，需先离心收集细胞；1200rpm，3min 离心后去除上清；
- b) 向培养皿中加入凝胶消化液（35×10mm 培养皿加 2mL；60×15mm 培养皿加 5mL），将胶滴吹散，37°C消化 2-5min，每间隔 2 分钟吹打类器官并在显微镜下观察，待观察到类器官消化成均一的含 3-5 个细胞的细胞团时，加入 1.5 倍凝胶消化液体积的 HBSS 终止消化（见图 1）；
- c) 1200rpm，3min 离心，弃上清后，用 HBSS 重悬，再 1200rpm，3min 离心，弃去上清。

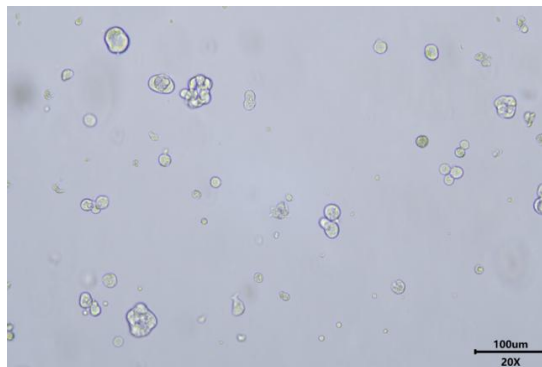


图1 类器官消化后的细胞团形态图

#### 7.1.3 类器官接种

类器官接种操作如下：

- a) 用 200µL 对应癌种类器官培养基重悬后进行细胞计数，约每孔 2000 活细胞进行类器官接种；

- b) 基质胶与细胞悬液按 1-1.5:1 的比例进行充分稀释混匀后, 用单通道移液器将混合胶以 10 $\mu$ L/孔分液到 384 孔板中。(阴性对照组一般设置 12 孔, 其余为加药组), 此操作应在冰盒进行;
- c) 基质胶与对应癌种培养基按 1-1.5:1 的比例进行充分稀释混匀后, 以 10 $\mu$ L/孔分液到 384 孔板中, 作为空白组(一般设置 6 孔);
- d) 轻轻敲打 384 孔板四周, 使胶液在 384 孔板底部分布均匀;
- e) 完成后放置于培养箱 30min 后, 以 54 $\mu$ L/孔加入对应癌种培养基(培养基提前预热);
- f) 类器官接种完成后, 向药物测试孔以及阴性对照孔周边的空孔中, 加入 40 $\mu$ L 生理盐水溶液, 并在显微镜下拍照(阴性对照孔 10 $\times$ 一张, 20 $\times$ 两张, 命名规则: 编号-铺板-10 $\times$ 1, 编号-铺板-20 $\times$ 1 等)。

## 7.2 药物接触实验

药物接触实验操作如下:

- a) 待类器官生长良好后, 可进行加药实验, 加药一般在类器官接种到 384 孔板 2 天后进行;
- b) 加药前显微镜观察每孔样本状态, 剔除异常孔, 并进行半量换液(换 20 $\mu$ L 补 20 $\mu$ L), 并在显微镜下拍照(阴性对照孔 10 $\times$ 一张, 20 $\times$ 两张, 命名规则: 编号-加药-10 $\times$ 1, 编号-加药-20 $\times$ 1 等);
- c) 实验设置阴性对照组、空白组、药物测试组、阳性质控组、阴性质控组, 按照如下要求进行处理:
  - 1) 空白组: 不含类器官的孔为空白孔, 每个板设置 6 复孔, 不添加药物, 补充 6 $\mu$ L 培养基;
  - 2) 阴性对照组: 接种有类器官的孔, 但是不添加药物接触, 补充 6 $\mu$ L 培养基;
  - 3) 药物测试组: 接种有类器官的孔, 添加药液 6 $\mu$ L;
  - 4) 阳性质控组: 接种有参考品类器官的孔, 添加阳性药物接触, 补充 6 $\mu$ L 培养基;
  - 5) 阴性质控组: 接种有参考品类器官的孔, 添加阴性药物接触, 补充 6 $\mu$ L 培养基;
- d) 药物储液板配制: 将药液母液在药板上稀释至 40 $\times$ , 再进行 4 倍稀释, 共 6 个浓度梯度, 其中培养板悬浮液体积为 54 $\mu$ L, 则吸取 6 $\mu$ L 药液加入到细胞培养板中, 使最终药物最高使用浓度 4 $\times$ , 加药前需对方案进行核对, 一人加药, 一人确认;
- e) 加药完毕后, 置于恒温培养箱于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 4 天。

## 7.3 药敏检测

药敏检测操作如下:

- a) 加药培养 96 小时后, 进行药敏检测实验;
- b) 取出培养板, 在显微镜下拍照(阴性对照孔 10 $\times$ 一张, 20 $\times$ 两张, 命名规则: 编号-检测-10 $\times$ 1, 编号-检测-20 $\times$ 1 等);
- c) 样本处理和质控:
  - 1) 机器质控: 用 ATP 制作一条标准曲线, ATP 最高浓度为 1000nM, 进行 4 倍梯度稀释, 共 6 个浓度梯度, 每孔体积 40 $\mu$ L, 并加入 40 $\mu$ L 发光试剂, 用酶标仪进行检测, 制作标准曲线, 要求 R<sup>2</sup>>0.99;
  - 2) 样本质控: 在样本检测时同上操作, 在培养板上制作一条标准曲线。
- d) 将细胞培养板原孔培养液用单通道移液器移液 40 $\mu$ L, 然后加入 30 $\mu$ L 发光增强液, 4 $^{\circ}$ C 静置 60 分钟后, 将 40 $\mu$ L 发光试剂加入细胞培养板空白孔、阴性对照孔、药物测试孔中;

- e) 室温（约 25℃）震荡 2min，以促进细胞的裂解，孵育 8min，使发光信号趋于稳定；
  - f) 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测；
- 待检测完成后，导出数据，做好标记，剔除孔需做好标记。

注1：接种类器官时应保证混合胶温度在4℃ 以下，防止胶液凝固。

注2：接种类器官期间可用移液枪轻轻吹打类器官胶液，防止因类器官沉淀而引起的接种不均匀的现象。

注3：加药操作尽量避免气泡产生，不同药物之间需更换枪头。

注4：发光试剂储存于-20℃，必须在冷水或室温下解冻后使用，使用前进行分装，避免反复冻融（不超过5次）。

#### 7.4 药敏数据分析及结果判定

药品数据分析及结果判定按如下要求：

- a) 样本孔 ATP 浓度计算：

将药物测试孔与对照孔发光均值代入标准曲线，得到 ATP 浓度值。

- b) 相对肿瘤抑制率计算：

$$\text{相对抑制率} = 1 - \frac{\text{药物测试孔 ATP 浓度}}{\text{对照孔 ATP 浓度}} \times 100\%$$

- c) 药物 IC<sub>50</sub> 计算：

根据药物不同浓度下的相对抑制率，使用 GraphPad Prism 软件计算该药物的 IC<sub>50</sub> 值。

- d) 药敏结果的判定

按照表 1 判定药物的敏感性结果。

表 1

IC <sub>50</sub>	药物敏感性判断结果
IC <sub>50</sub> >1×	不敏感
IC <sub>50</sub> ≤1×	敏感

注：最终筛选结果准确性经由临床治疗结局判定，文献报道达 80% 以上。

## 8 废弃物处理

在类器官的构建、传代、组织样本获取、培养、鉴定、冻存等操作过程中所产生的废弃物，必须遵守生物样本处置与管理规范以及相关医疗废物处理规范，应按照GB 19489—2008中7.19和GB/T 38736—2020中3.1的要求，将不合格或者污染的类器官细胞等废弃物妥善处置于指定地点。

## 9 数据管理

建议根据类器官的具体用途，制定数据管理规范，其中应包括数据内容和保存期限，数据管理的权限和责任等方面的要求。对于详细的临床样本数据管理，可以参考国家药品监督管理局发布的《药物临床试验质量管理规范》（GCP）中有关数据管理的相关部分内容。

## 10 质量控制

类器官的质量控制具有与传统细胞培养不同的特点,包括但不限于对类器官团的生长活力评估、类器官细胞悬液数量评估、类器官单细胞悬液活力评估以及类器官中免疫学标记物的表达评估等方面。有关类器官培养状态的鉴定请参见附录 B。对于与类器官相关的实验,DNA、RNA和蛋白质的提取操作请参考附录 C。

## 附录 A

(资料性)

### 肿瘤类器官药敏检测的方法原理

#### A.1 药敏检测方法原理

将含有肿瘤细胞的肿瘤组织或体液,在体外培养扩增为能高度还原体内肿瘤的遗传学与生物学特征的微小肿瘤,即肿瘤替身——肿瘤类器官。在体外对肿瘤类器官进行药物干预,获得抗肿瘤药物敏感性实验结果,为临床医生制定患者个体化精准药物治疗方案,提供科学依据。

#### A.2 仪器设备及试剂耗材

##### A.2.1 仪器设备

离心机、细胞培养箱、生物安全柜、35×10mm、60×15mm培养皿、100 $\mu$ m细胞筛网、384孔板、96孔板、显微镜、高压灭菌锅、0.1 $\mu$ L~2.5 $\mu$ L、2 $\mu$ L~20 $\mu$ L、20 $\mu$ L~200 $\mu$ L移液器、超净工作台、化学发光仪。

##### A.2.2 耗材和试剂

符合GB/T 6682一级水标准的实验用水、庆大霉素、生理盐水、HBSS缓冲液、消化液I、消化液II、红细胞裂解液、基质胶、凝胶消化液、类器官培养基(主要由基础培养基、生长因子和抑制剂组成,为细胞生长和类器官形成提供必要的营养物质和活性成分)。

附录 B  
(资料性)  
样本质量反馈

样本质量反馈应参照表 2 进行评分。

表2 样本质量反馈表

变量	分类	评分标准*	样本评分
取材方式	活检	4	
	手术	8	
	恶性积液	10	
病灶特征	复发灶/转移灶	6	
	原发灶	10	
样本重量	< 0.2g	0	
	0.2 ~ 0.5 g	6	
	> 0.5g	10	
样本离体时间	> 120 min	0	
	30~120 min	8	
	<30 min	15	
样本保存时间	>24 h	0	
	12~24 h	5	
	<12 h	10	
消化后细胞数量	<10 <sup>5</sup>	0	
	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup>	10	
	>10 <sup>6</sup>	20	
消化后细胞活力	<15%	0	
	15%~50%	15	
	>50%	25	
其他	-	扣分项	
总分	-	-	
检测人		检测时间	

注：样本评分≤40 表示样本质量偏差，药敏实验失败风险较大；40~80 表示样本质量中等；≥80 表示样本质量良好。

## 附录 C

(资料性)

### 类器官的核酸与蛋白质提取

#### C.1 DNA提取

- a) 类器官需要先消化制备为细胞悬液，然后在11200×g离心1min，弃上清，加200μl悬浮细胞缓冲液GA，振荡使细胞彻底悬浮；
- b) 加入20μl 蛋白酶K (Proteinase K) 溶液，混匀；
- c) 再加入200μl 核酸与蛋白分离缓冲液GB，充分颠倒混匀，70°C放置10min，溶液应当变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠；
- d) 加入200μl无水乙醇，充分振荡混匀15s，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠；
- e) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CB3中(吸附柱放入收集管中)，13400×g离心30s，倒掉废液，将吸附柱CB3放回收集管中；
- f) 向吸附柱CB3中加入500μl去除蛋白质杂质缓冲液GD(已按照说明加入无水乙醇)，13400×g离心30s，倒掉废液，将吸附柱CB3放入收集管中；
- g) 向吸附柱CB3中加入600μl去盐漂洗液PW(已按照说明加入无水乙醇)，13400×g离心30s，倒掉废液，将吸附柱CB3放入收集管中；
- h) 重复操作步骤 g)；
- i) 将吸附柱CB3放回收集管中，13400×g离心2min，倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；
- j) 将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50~200μl的DNA洗脱缓冲液TE，室温放置2~5min，13400×g离心2min，将溶液收集到离心管中。

#### C.2 RNA 提取

- a) 收集细胞：待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清洗1遍。去除PBS后，加入1ml的无动物源性重组胰酶，并用1ml量程的移液枪将基质胶打散，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；
- b) 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；
- c) 将所有溶液转移至过滤柱CS上(过滤柱CS放在收集管中)，13400×g离心2min，收集滤液；
- d) 向滤液中加入1倍体积70%乙醇(通常为350μl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)，13400×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) 向吸附柱CR3中加入350μl去蛋白液RW1，13400×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；
- f) DNase I工作液的配制：取10μl DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中，加入70μl去除DNA缓冲液RDD，轻柔混匀；
- g) 向吸附柱CR3中央加入80μl的DNase I工作液，室温放置15min；
- h) 向吸附柱CR3中加入350μl去蛋白液RW1，13400×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；
- i) 向吸附柱CR3中加入500μl漂洗液RW(按照说明加入乙醇)，室温静置2min，13400×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；
- j) 重复步骤i)；
- k) 离心(13400×g, 2min)，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；

l) 将吸附柱CR3转入一个新的RNase-Free离心管中，加入30~100 $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O室温放置2min，离心（13400 $\times$ g，2min），得到RNA溶液。

### C.3 蛋白质提取

- a) 收集细胞：待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进行清洗1遍。去除PBS后，加入1ml的无动物源性重组胰酶，并用1ml量程的移液枪将基质胶打散，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 $\times$ g，5min），收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清；
- b) 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RIPA（50 $\mu$ l/孔）及蛋白酶抑制剂，旋涡振荡，将其转移至EP管中，置于冰上裂解30min；
- c) 蛋白收集：离心（4 $^{\circ}$ C，12000 $\times$ g，15min），收集上层蛋白溶液；
- d) 蛋白定量：使用BCA试剂盒进行蛋白定量；
- e) 蛋白变性：加入适量上样缓冲液，金属浴100 $^{\circ}$ C，15min，使蛋白变性；
- f) 蛋白储存：短期内使用蛋白可置于-20 $^{\circ}$ C储存，长期储存置于-80 $^{\circ}$ C。

## 参 考 文 献

- [1] Ellingson BM, Gerstner ER, Lassman AB, Chung C, Colman H, Cole PE, Leung D, Allen JE, Ahluwalia MS, Boxerman J, Brown M, Goldin J, Nduom E, Hassan I, Gilbert MR, Mellinghoff IK, Weller M, Chang S, Arons D, Meehan C, Selig W, Tanner K, Alfred Yung WK, van den Bent M, Wen PY, Cloughesy TF. Hypothetical generalized framework for a new imaging endpoint of therapeutic activity in early phase clinical trials in brain tumors. *Neuro Oncol.* 2022 Aug 1;24(8):1219-1229. doi: 10.1093/neuonc/noac086. PMID: 35380705; PMCID: PMC9340639.
- [2] Fetah KL, DiPardo BJ, Kongadzem EM, Tomlinson JS, Elzagheid A, Elmusrati M, Khademhosseini A, Ashammakhi N. Cancer Modeling-on-a-Chip with Future Artificial Intelligence Integration. *Small.* 2019 Dec;15(50):e1901985. doi: 10.1002/sml.201901985. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31724305; PMCID: PMC6929691.
- [3] Tang Y, Xu Q, Yan M, Zhang Y, Zhu P, Li X, Sang L, Zhang M, Huang W, Lin L, Wu J, Xin Y, Fu J, Zhang L, Zhang S, Gu J. Autologous culture method improves retention of tumors' native properties. *Sci Rep.* 2020 Nov 24;10(1):20455. doi: 10.1038/s41598-020-77238-0. PMID: 33235257; PMCID: PMC7686378.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 中国抗癌协会肿瘤多学科诊疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤内分泌专业委员会. 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022 年版). *中国癌症杂志*, 2022, 32(7):657-668.
- [7] 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.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2020. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [9] 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. 第4版 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [10] Wang, H. M., et al. (2023). "Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study." *Cell Rep Med*: 100911.
- [11] Wang, T., et al. (2023). "Patient-Derived Tumor Organoids Can Predict the Progression-Free Survival of Stage IV Colorectal Cancer Patients After Surgery." *Dis Colon Rectum*.
- [12] Cao, Y., et al. (2022). "Patient-Derived Organoid Facilitating Personalized Medicine in Gastrointestinal Stromal Tumor With Liver Metastasis: A Case Report." *Front Oncol* 12.
-