

团 体 标 准

T/CSCB XXXX—XXXX

人肝、胆、胰类器官构建技术指南

Guideline of Human Organoid Construction

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国细胞生物学学会发布

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：中国医学科学院生物医学工程研究所、天津医学健康研究院、中国科学院分子细胞卓越创新中心、复旦大学附属中山医院、上海市东方医院（同济大学附属东方医院）、山东大学基础医学院。

本文件主要起草人：

人肝、胆、胰组织类器官构建技术指南

1 范围

本文件规定了人源的肝、胆、胰类器官的构建、传代、保藏及复苏的指导意见。

本文件适用于运用人源的肝、胆、胰类器官的构建、传代、保藏和复苏。

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，标注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求
GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求
GB/T 39767 人类生物样本管理规范
T/NAHIEM 6 医学研究伦理委员会通用要求
T/CSCB 0013-2022 人肠道类器官

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、祖细胞或前体细胞体外培养形成，由组织器官特异性的多种类型细胞组成，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

诱导多能干细胞 induced pluripotent stem cells

一类通过细胞重编程技术人工诱导获得的、具有类似于胚胎干细胞特性的干细胞

3.3

成体干细胞 adult stem cells

位于各种组织中未分化的干细胞。

3.4

转分化的肝细胞 transdifferentiated hepatocytes

体细胞（如成纤维细胞）通过基因的选择性表达或者基因重编程，转变为基因表达和功能上都与肝细胞相似的细胞。

3.5

类器官培养基 culture medium of organoid

能够实现体外模拟肝、胆、胰细胞生长所需微环境，诱导肝胆胰祖细胞、成体干细胞或多能干细胞分化为各种类型的肝细胞、胆管细胞或胰腺细胞，同时能够持续维持肝、胆、胰细胞的特性，实现肝、胆、胰活组织类器官的长期培养的培养介质。

3.6

三维培养水凝胶 hydrogel for organoids culture

三维培养水凝胶是能够给类器官提供一定的孔隙和刚性的基质环境，帮助形成和维持稳定的组织结构，支持类器官的生长和分化，为类器官的生长提供组织支架。

3.7

传代 passage

体外培养类器官经过物理、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。

3.8

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。

3.9

复苏 organoid thawing

冻存的类器官重新获得生长活力的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EBV：人类疱疹病毒（Epstein Barr Virus）

HAV: 甲型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus)
HBV: 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
HCV: 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)
HIV: 人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)
HCMV: 人巨细胞病毒 (Human Cytomegalo Virus)
HTLV: 人类嗜T细胞病毒 (Human T-lymphotropic Virus)
TP: 梅毒螺旋体 (Treponma Pallidum)

5 基本原则

- 5.1 符合伦理: 类器官的构建、传代、保藏及复苏过程中, 应当符合伦理规范。
- 5.2 安全优先: 应当保证实验操作人员和样本的安全。
- 5.3 质量可控: 根据不同类型的类器官实施有针对性的质量检测与控制方法。
- 5.4 可以追溯: 应当做好全程的信息记录和归档, 便于进行追溯。

6 样本采集

6.1 总则

- 6.1.1 对于使用人源组织构建的类器官, 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。
- 6.1.2 其他途径获取用语构建类器官的细胞, 应符合相应的伦理规范。
- 6.1.3 类器官的生产和研究方案应由伦理审查委员会审查通过。
- 6.1.4 应对样本组织供者个人信息进行隐私保护。
- 6.1.5 应对样本进行微生物安全检查, 真菌、细菌、支原体、EBV、HAV、HBV、HCV、HIV、HCMV、HTLV、TP应为阴性。
- 6.1.6 应做好采集信息的登记, 并和样本提供者的资料一起保存、档案管理, 便于进行追溯。

6.2 采集与运输要求

- 6.2.1 肝、胆、胰组织样本采集与处理应由接受过专业训练的人员进行。
- 6.2.2 样本和细胞的运输过程中应保护样本避免发生外源性污染, 同时应避免对环境造成生物污染。

7 类器官的构建

7.1 单细胞悬液的制备

7.1.1 对于人源组织来源的样本，宜先去除样本中的坏死和钙化组织，清洗组织并分离为小体积组织团块。

7.1.2 采用酶解法，将组织分离为单细胞悬液。根据需要，可二维培养扩增细胞。

7.1.3 对于其他来源的构建类器官的细胞，应参照相关扩增培养、诱导分化或转分化技术，制备出用于构建肝、胆、胰类器官的单细胞悬液细胞。

7.2 类器官的构建

7.2.1 采用合适类器官培养方法（如水凝胶法、悬浮培养法等）形成细胞的三维培养体系，加入适用于组织生长的类器官培养基进行类器官培养，使之生长为与肝、胆、胰组织结构及功能类似的类器官。

7.2.2 应根据细胞的种类及状态，加入相应的生长因子、交联剂以及抗菌素等物质，以便类器官可以顺利的形成和生长。

8 类器官的培养与传代

8.1 类器官的培养

8.1.1 应每天观察类器官的生长状态，隔 2-3 天更换新鲜的培养基。

8.1.2 培养基及其他添加剂应符合相应质量要求。使用动物血清时，应无特定动物源性病毒的污染。

8.1.3 对于可持续增殖的类器官，一般宜在其直径达到 150 μm 后进行进一步的传代和保存。

8.2 类器官的传代

8.2.1 根据类器官的组织特性和结构强度选择合适的消化酶，消化类器官并分离单细胞或者小细胞簇悬液。

8.2.2 参照 7.2 类器官的构建方法构建新的类器官。

8.3 质量控制与生物安全

8.3.1 应定期对类器官样本进行标志蛋白检测，肝类器官 ALBUMIN 阳性率应大于 80%，胆类器官 KRT19 阳性率应大于 80%，胰腺类器官 PDX1 阳性率应大于 80%。

8.3.2 应定期对类器官进行微生物安全检查，真菌、细菌、支原体应为阴性。

8.3.3 从供者来源的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 3 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。复苏成功率应在 50%以上。

8.3.4 对于可传代的类器官传代后，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分化为新的细胞类型的能力。

8.3.5 类器官的 STR 应与供体或所来源的细胞一致。

9 类器官的冻存与复苏

9.1 类器官的冻存

9.1.1 参照8.2类器官的传代方法，将状态良好的类器官进行适当消化处理，分离出单细胞或者小细胞簇。

9.1.2 添加相应体积的细胞冻存保护液重悬细胞，制备成均一的细胞或细胞簇悬液。。

9.1.3 缓慢降温，放入液氮或-80℃冰箱低温保存。应标明类器官名称，细胞来源、数量、代次、日期、培养条件等信息。

9.2 类器官的复苏

9.2.1 从液氮容器中取出含有类器官的冻存管，直接浸入37℃水浴锅中，并不时摇动使其尽快融化。

9.2.2 使用至少5-10倍体积的培养基稀释冻存液，离心后，弃上清，选择合适的培养基重悬细胞进行类器官的培养及传代。

10 废弃类器官的处理

类器官构建与传代过程中产生的生物学废弃物，应严格按照 GB 19489 中 7.19 与 GB/T 39767 中 9.2 的要求规范操作。对于不合格或污染的类器官应遵循《生物医疗废弃物处理规范》丢弃至指定地点。

附录 A

（规范性）

标志蛋白检测 流式细胞分析法

A.1 仪器和设备

A.1.1 流式细胞仪。

A.1.2 水平离心机。

A.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为去离子水。

A.2.1 磷酸盐缓冲液：PH 7.4。

A.2.2 多聚甲醛（PFA）。

A.2.3 牛血清白蛋白（BSA）：纯度>98%。

A.2.4 抗人ALBUMIN抗体、抗人KRT19抗体、抗人PDX1抗体及同型对照抗体。

A.2.5 按照相应要求配制流式检测所需的液体：固定液、洗涤液、抗体稀释液。

A.3 样品保存

洗涤液和固定后的样品于2℃~8℃保存。相关抗体遵说明书保存。

A.4 检测步骤

A.4.1 收集单细胞

根据类器官的结构强度选择合适的消化酶，消化类器官。使用水平离心机（A.1.2），250g离心3 min，弃上清，收取细胞。

A.4.2 固定

加入适量固定液固定，然后用适量洗涤液洗涤3次~5次，使用水平离心机（A.1.2），250g离心3 min，弃上清。细胞重悬后4℃保存，或直接进行检测。

A.4.3 穿膜

用适量洗涤液重悬细胞，将细胞悬液等分为两份，分别作为实验组和同型对照组。离心后加入适量穿膜液穿膜，然后用洗涤液洗涤2次~3次，使用水平离心机（A.1.2），250g离心3min，弃上清。

A.4.4 一抗孵育

按照抗体说明，根据类器官的类型，用抗体稀释液按比例稀释相应的抗体（肝类器官：抗人ALB抗体；胆类器官：抗人KRT19抗体；胰类器官：抗人PDX1抗体）（A.2.4）。按照对应的抗体亚型和浓度，配制同型对照抗体。用稀释后的抗体（A.2.4）和同型对照抗体分别重悬实验组和同型对照组的细胞。随后，按照抗体说明选择合适的条件孵育一抗，室温避光孵育30 min后用洗涤液洗涤3次~5次（可根据抗体说明书做调整），使用水平离心机（A.1.2），

250g离心3min，弃上清。

A.4.5 二抗孵育

对应一抗抗体源性及其亚型选择合适的二抗。按照抗体说明，用抗体稀释液稀释抗体，并分别重悬上述两组细胞，室温避光孵育30min。

A.4.6 过滤上机

二抗孵育完成后，用洗涤液洗涤3次~5次，使用水平离心机（A.1.2），250g离心3min，弃上清。用洗涤液重悬细胞，并经滤网（直径70 μm ）过滤除去细胞团块后转入流式管，上机检测。

A.5 数据处理

利用相关流式细胞分析软件处理原始数据：首先根据细胞颗粒度（SSC）和透光性（FSC）参数鉴别活细胞类群，并排除细胞碎片及多细胞聚团。根据同型对照组在特定通道的荧光强度设置阴性对照，进而分析实验组的细胞分群情况及阳性细胞比例。肝类器官ALBUMIN阳性细胞比例应>80%，胆类器官KRT19阳性细胞比例应>80%，胰类器官PDX1阳性细胞比例应>80%。

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)

细胞类型标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法

C.1 仪器和设备

C.1.1 聚合酶链式反应 PCR 仪。

C.1.2 实时荧光定量 PCR 仪。

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 商品化 RNA 提取试剂盒

C.2.3 商品化 RNA 反转试剂盒。

C.2.4 商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒

C.2.5 管家基因及目标基因 qPCR 引物，

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。

C.3.2 类器官 RNA 提取

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

C.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(C.1.1)，按照商品化 RNA 反转试剂盒(C.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。

C.3.4 基因表达情况确定

取 C.3.3 类器官 RNA 反转产物，利用实时荧光定量 PCR 仪(C.1.2)，结合商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒(C.2.4)及相关引物(C.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，得到管家基因的表达值 CtH 及目标基因表达值 CtM。

C.3.5 目标基因表达情况分析

以管家基因表达作为参照，得到目标基因的表达水平为： $X=CtM/CtH$ 。

C.4 计算与分析

按照 C.3.1~C.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。

C.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D
(规范性)
人源类器官 STR 鉴定

D.1 仪器和设备

D.1.1 离心机。

D.1.2 PCR 仪

D.1.3 电泳仪。

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 样品保存

样品制备好后，于-80℃以下保存。

D.4 检测步骤

D.4.1 样品制备

将类器官在水凝胶中培养至稳定生长状态，用移液器吹打水凝胶，至水凝胶破碎后，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

- 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 A260/A280的比值在1.8~2.0之间；
- c) DNA样本要求：DNA体积≥20 μL，浓度>50 ng/μL

D.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。

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。类器官原肿瘤组织的扩增条带应该一致。

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。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。

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。