



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 肿瘤药物敏感性检测 3D 生物打印技术规范 第 2 部分：模型鉴定及质量控制规范

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

(本草案完成时间：)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 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》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

近年来，随着肿瘤精准医学的快速发展，基于3D生物打印的体外肿瘤模型因其在模拟肿瘤微环境、保留肿瘤异质性及预测药物反应等方面的显著优势，已成为肿瘤研究及个体化治疗的重要工具。相较于传统的二维（2D）细胞培养模型，3D生物打印肿瘤模型能够更真实地再现肿瘤组织的形态结构、细胞间相互作用及药物渗透特性，因此在药物筛选、疗效评估及机制研究中展现出更高的临床相关性。

然而，3D生物打印的广泛应用也面临着标准化和质量控制的挑战。由于技术路线多样，不同实验室或企业构建的模型在细胞来源、培养条件、形态特征及功能表现上可能存在显著差异，进而影响实验结果的可靠性和可重复性。此外，模型的质量缺陷（如细胞存活率低、遗传背景不稳定或微生物污染等）可能导致药物敏感性检测的偏差，甚至误导临床决策。因此，建立统一的3D生物打印肿瘤模型质量评价标准，规范其鉴定流程和质量控制指标，是推动该技术临床转化和产业化的关键前提。目前，国际范围内对3D生物打印肿瘤模型的质量控制尚缺乏系统性规范，难以全面评估模型的生物学特性与临床适用性。为填补这一空白，本文件针对3D生物打印肿瘤培养系统，提出了一套涵盖形态学、细胞活性、遗传稳定性、功能基因表达及微生物安全性等多维度的质量控制标准。通过强制性与推荐性指标的结合，确保模型在结构、功能及遗传层面与原始肿瘤组织的高度一致性，同时满足药物敏感性检测的精准性和可重复性要求。

本标准的制定旨在为医学实验室、科研机构及企业提供技术指导，规范并引导行业发展，促进3D生物打印肿瘤模型的规范化应用，并为未来相关行业标准或监管政策的完善提供参考依据。通过推动技术标准，助力肿瘤个体化治疗的精准化发展，最终惠及患者。

# 肿瘤药物敏感性检测 3D 生物打印技术规范

## 第 2 部分：模型鉴定及质量控制规范

### 1 范围

本文件规定了用于肿瘤药物敏感性检测3D生物打印培养系统模型的质量评价指标和评价方法，包括形态学、细胞活性、遗传稳定性、功能基因表达及微生物安全性等关键参数。

本文件适用于实验室开展的实体肿瘤药物敏感性检测3D生物打印肿瘤细胞培养模型的质量控制。

### 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

### 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

### 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

H&E: 苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin)

PBS: 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

PCR: 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RNA: 核糖核酸(Ribonucleic Acid)

STR: 短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

### 5 质量检测指标

#### 5.1 形态

利用3D生物打印培养系统生成的3D生物打印肿瘤模型在光学显微镜下应呈现与原发肿瘤组织一致的细胞形态学特征。

例如：人肝胆肿瘤细胞3D生物打印培养系统模型，应具备边缘清晰、透亮的状态。可看到边缘清晰的致密球体囊状形态结构和多细胞组成的细胞团结构。为类球状或者圆管状，中间为空腔，外侧为紧密接触的柱状上皮细胞。空腔及与外界交界处的边缘清晰，细胞透亮。其他组织来源模型需符合相应组织类型特征。

## 5.2 体外可培养

患者来源的肿瘤组织，通过机械和消化酶联用的方法获得单细胞悬液后，利用3D生物打印培养系统生成3D生物打印肿瘤模型，使用完全培养基可以在体外长期培养并扩增，核型正常，传代 10 代以上。

## 5.3 体外可重建

当3D生物打印肿瘤模型解离成 5-20个细胞组成的细胞球体后，仍能在体外重建成为新的3D生物打印肿瘤模型，新培养出的模型与原模型具有一致的形态结构、细胞组成、细胞核型等特征。

## 5.4 细胞活性

①基础活性：通过机械和消化酶联用的方法从原始肿瘤组织获得的单细胞悬液细胞活性应 $\geq 20\%$ （台盼蓝染色法）。

②3D生物打印肿瘤模型在体外培养7天后，应保持较高的细胞活性，以确保药物敏感性检测结果的可靠性和临床相关性。3D生物打印肿瘤模型体外培养7天后细胞活性应不低于50%（Calcein-AM/PI双染法）。

③经过3D生物打印培养系统培养后的肿瘤细胞，冻存后再复苏细胞活性应 $\geq 20\%$ （台盼蓝染色法），且存活的肿瘤细胞可以利用3D生物打印培养系统继续传代培养。

## 5.5 染色体核型

正常核型应为正常二倍体核型（46, XY/46, XX），无重大结构异常。

## 5.6 标志基因表达

3D生物打印培养系统建立的模型在体外培养7天后应具备与原肿瘤组织匹配的肿瘤相关基因表达。

例如：干性相关基因SOX9、EpCAM、LGR5等、增殖标志物Ki67、肝胆癌细胞中:AFP, CA19-9, CK-19, CEA, GS, HSP70, TBX3, GPC3, MUC1, IL-6, IDH 1/2、肠癌: CDX2、CK20等。

## 5.7 微生物

真菌、细菌、支原体、外源病毒因子等应为阴性。

## 6 检测方法

### 6.1 形态

①观察与成像：分别在第1、3、5、7、10、14天使用倒置相差显微镜（4×、10×、20×、40×物镜）观察并记录形态特征，需包含至少3个独立视野的清晰图像。

②在20倍视野下计数细胞团数目。细胞团数目不少于30个/视野表明生长状态良好。

③生长活力好的3D生物打印肿瘤模型平均直径约30-100  $\mu\text{m}$ 。

### 6.2 体外可培养

显微镜观察，每代次使用台盼蓝染色检测细胞活性（按照附录A检测），记录增殖速率及形态稳定性；相关指标参照其他指标检测方法。

### 6.3 体外可重建

显微镜观察；相关指标参照其他指标检测方法。

### 6.4 细胞活性

按照附录A、B检测。

### 6.5 染色体核型

应遵循中华人民共和国药典（2020年版，第三部分）“用于生物制品生产的动物细胞的制备和质量控制”中的方法。

#### 6.6 标志基因表达

按照附录D、附录E检测。

#### 6.7 微生物

- A) 真菌、细菌应按照《中华人民共和国药典（四部）》中“1101无菌检查法”项检测。
- B) 支原体应按照《中华人民共和国药典（四部）》“3301支原体检测法”项检测。
- C) 外源病毒因子应为阴性。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。

## 附录 A

(资料性)

## 细胞计数以及活性检测 (台盼蓝染色法)

## A.1 原理

台盼蓝是一种重要的染色剂, 广泛用于选择性地将死细胞或组织染成蓝色。当细胞受损或死亡时, 台盼蓝可以进入细胞。加入台盼蓝后在显微镜下观察, 可见死细胞呈现明显的蓝色并膨大, 无光泽; 而具有完整细胞膜的活细胞不着色并保持正常形态, 有光泽。通过二者的形态及颜色差异可分别对活细胞和死细胞进行计数。

## A.2 试剂:

4%台盼蓝染液

配制方法:

- a) 称取台盼蓝粉末 4g, 加双蒸水 100ml, 混匀。
- b). 用滤纸过滤, 4 度保存。
- c). 使用时, 用 PBS 稀释至 0.4%

## A.3 仪器和设备:

显微镜、血细胞计数板

## A.4 检测方法:

- a). 收集目标细胞并制成细胞悬液后, 并作适当稀释 (10<sup>6</sup> 个细胞/mL)。
- b). 吸取 90μL 重悬液至无菌细胞离心管中, 加入 10μL 台盼蓝染色液, 轻轻混匀。
- c). 吸取 10μL 经过染色的细胞, 在 3min 内用血细胞计数板在显微镜下分别计数活细胞和死细胞。

细胞存活率计算见公式 (A.1)。

$$X = L / (L + D) \times 100 \% \quad \text{A.1}$$

式中:

X-细胞存活率;

L--活细胞数量,单位为个每毫升(个/mL);

D--死细胞数量,单位为个每毫升(个/ml)

## 附录 B

(资料性)

## 细胞计数以及活性检测 (钙黄绿素-AM/PI 双染法)

## B.1 原理

活/死细胞双染试剂盒可同时对活细胞和死细胞进行荧光染色。该试剂盒包含钙黄绿素-AM和碘化丙啶(PI)两种溶液,分别用于染色活细胞和死细胞。其中钙黄绿素-AM,即钙黄绿素的乙酰羟甲基酯,具有高度亲脂性和细胞膜透过性。尽管钙黄绿素-AM自身并非荧光分子,但活细胞中的酯酶可以催化钙黄绿素-AM生成钙黄绿素,从而发出强烈的绿色荧光( $\lambda_{ex}$  490 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm)。因此钙黄绿素-AM只能染色活细胞。而核染色染料PI不能透过活细胞的细胞膜。但可以透过死细胞膜的变性区域到达细胞核,并与细胞中的DNA双螺旋结构结合,从而发出红色荧光( $\lambda_{ex}$  535 nm,  $\lambda_{em}$  617 nm)。

## B.2 试剂配制

a).  $1\times$  Assay Buffer (反应缓冲液) 的配制

取  $10\times$  Assay Buffer 母液,按 1:9 比例用无菌去离子水稀释,混匀后获得  $1\times$  Assay Buffer,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用(现配现用)。

## b). 染色工作液的配制

b.1 将 Calcein-AM (2 mM) 和碘化丙啶 (PI, 1.5 mM) 母液室温平衡 20-30 min。

注:建议首次使用时分装母液,避免反复冻融。

b.2 取  $5\ \mu\text{L}$  Calcein-AM (2 mM) 和  $15\ \mu\text{L}$  PI (1.5 mM), 加入 5 mL  $1\times$  Assay Buffer, 混匀后终浓度为:

Calcein-AM:  $2\ \mu\text{M}$

PI:  $4.5\ \mu\text{M}$

## B.3 检测方法:

a). 将 3D 生物打印肿瘤模型培养基吸弃,加入 PBS 清洗 2-3 遍,然后弃除 PBS;

b). 每孔加入  $500\ \mu\text{L}$  染色工作液,混匀,  $37^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20min;

c). 荧光显微镜下使用  $490\pm 10\text{nm}$  激发滤片同时检测活细胞(黄绿色荧光)以及死细胞(红色荧光)。

使用  $545\text{nm}$  的发射滤片仅能观察到死细胞。用显微镜和图像采集类软件对 3D 生物打印肿瘤模型进行断层扫描,层间高度设置在  $10\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$  范围内,将扫描后的图像叠加为一张平面图,然后对最终叠加平面图中的细胞进行计数。

d). 选取不低于 6 个视野,分别计数活细胞和死细胞。细胞存活率计算见公式 (B.1)。

$$X = L / (L + D) \times 100 \% \quad \text{B.1}$$

式中:

$X$ -细胞存活率;

$L$ --活细胞数量,单位为个每毫升(个/mL);

$D$ --死细胞数量,单位为个每毫升(个/mL)

## 附录 C

(资料性)

## 3D 生物打印肿瘤模型的形态学及荧光标记鉴定

C.1 试验当天保证细胞处于对数生长期，肿瘤细胞成球状态良好（3D 生物打印肿瘤模型细胞团直径建议不低于 30  $\mu\text{m}$ ）。移液器吸去培养基，每孔添加 1ml 的 PBS，使用宽口吸头收集 3D 生物打印肿瘤模型在 15ml 离心管中；4℃ 静置 10min，300g、4℃ 离心 5min 后弃去上清。

## C.2 石蜡切片制作

① PFA 固定：用 10 mL 4% PFA 固定 3D 生物打印肿瘤模型结构，室温下放置 30-60 分钟。固定结束后，300g 4℃ 离心 5min 弃去上清；加入 5ml PBS，300g、4℃ 离心 5min 弃去液体。

② 加入模型收集液（根据液态生物材料类型选择），置于 37℃ 摇床孵育 30min；300g、4℃ 离心 5min 后弃去上清；加入 1ml PBS 重悬移入 1.5ml EP 管，300g、4℃ 离心 5min 弃去液体。

③ 称量 0.2 至 0.4g 琼脂糖，加入至烧杯或者小试剂瓶内，加入 10ml 左右 PBS。微波炉高火融化，每隔 5s 暂停打开，观察，重复数次至琼脂糖融化完全；待琼脂糖溶液降温至 50-60℃，取 20-50ul 融化琼脂糖溶液，加入至 1.5ml EP 管重悬细胞团沉淀，冰上放 30min，待其凝固。

④ 脱水：取出已凝固的含有细胞团沉淀的琼脂糖块，在梯度乙醇中脱水，70%、80%、90%和 95% 乙醇各 1h，100%乙醇 30min，待其凝固；融蜡：提前 4h 左右打开烘箱，65℃ 溶蜡；透明：将脱水完成后的琼脂糖块转移至组织包埋盒中（二甲苯处理前需一直浸泡在无水乙醇中），将包埋盒转移至二甲苯中 5min 处理两次。因二甲苯有毒性，需在通风良好区域进行操作，取出时尽量沥尽残留二甲苯；浸蜡：透明化处理完成后立即转入已经融化的蜡缸中，60℃ 浸蜡 2h 后，更换新的蜡缸再次浸蜡 2h；包埋：包埋在冰盒上进行，将融好的纯蜡倒入蜡盒三分之一处，将琼脂块放置于中间位置，然后再滴蜡包埋直到倒满。待蜡块完全凝固后，小心脱下模具。

## C.3 H&amp;E 染色

① 脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 10min；二甲苯 II 10min；无水乙醇 I 5min；无水乙醇 II 5min；95%酒精 5min；90%酒精 5min；80%酒精 5min；70%酒精 5min；蒸馏水洗；

② 苏木素染细胞核：切片入 Harris 苏木素染 3-8min，自来水洗；

③ 分化（洗去非细胞核染色）：2-5s，自来水洗 2-5s，洗净（或者是 1%的乙醇盐酸溶液用作分化液）；

④ 返蓝：返蓝液 5-10s 或者自来水（碱性）1min 左右，自来水洗干净（5s）；伊红染细胞质：切片入伊红染液中染色 1-3min，自来水洗；

⑤ 伊红染细胞质：切片入伊红染液中染色 1-3min，自来水洗；

⑥ 脱水封片：将切片依次放入 95%酒精 I 5min；95%酒精 II 5min；无水乙醇 I 5min；无水乙醇 II 5min；二甲苯 I 5min；二甲苯 II 5min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片；

⑦ 显微镜镜检，图像采集分析。

## C.4 免疫组化染色

① 脱蜡复水：按照二甲苯 I（10 min），二甲苯 II（10 min），二甲苯 III（10 min），无水乙醇 I（5 min），无水乙醇 II（5 min），95%酒精（3 min），90%酒精（3 min），80%酒精（2 min），70%酒精（2 min），蒸馏水 I（3 min），蒸馏水 II（3 min）的顺序完成组织的脱蜡复水（注：操作流程并不固定，根据自己的组织适当调整即可）。

② 抗原修复：配制柠檬酸盐抗原修复液（PH6.0），采用微波炉进行抗原修复，首先中高火（80%火力）8 min，然后停火 8 min，最后中低火（50%火力）7 min，待其自然冷却后，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

③ 抗原修复：配制柠檬酸盐抗原修复液（PH6.0），采用微波炉进行抗原修复，首先中高火（80%火力）8 min，然后停火 8 min，最后中低火（50%火力）7 min，待其自然冷却后，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

④ 封闭：清洗完毕，轻轻吸干水分，用组化笔在组织周围画圈，圈住整个组织，而后滴加山羊血清室温封闭 1h，封闭结束后，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

⑤ 一抗孵育：滴加一抗，4℃，孵育过夜。孵育结束，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

⑥ 二抗孵育：滴加荧光二抗，放入暗盒内避光室温孵育 1h（注：此后所有步骤均需避光操作），孵育结束，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min。

⑦ DAPI 染色：采用 DAPI 染液室温避光染色 10 min，用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。轻轻蘸干水分，滴加抗荧光衰减封片剂，盖上盖玻片。

⑧ 观察：在荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察目的蛋白的分布情况。

### C.5 3D 生物打印肿瘤模型的荧光标记鉴定

① PFA 固定：用 10 mL 4% PFA 固定 3D 生物打印肿瘤模型结构，室温下放置 30-60 分钟。固定结束后，300g 4℃离心 5min 弃去上清；加入 5ml PBS，300g、4℃离心 5min 弃去液体。

② 加入 0.125% Triton X-100 破膜液，室温作用 10 min，PBS 漂洗 3 次（5 min/次）后用 10% 与二抗同源血清室温封闭 1 h，减少非特异性结合。

③ 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℃孵育过夜后 PBS 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。

④ PBS 漂洗 3 次后加入 DAPI 衬核液，室温作用 10 min 后 PBS 漂洗 3 次。共聚焦显微镜 Z-stack 扫描（步进 2 μm），使用 ImageJ/Imaris 软件三维重建。

## 附录 D

### (资料性)

#### 3D 生物打印肿瘤模型的遗传特征分析

##### D.1 3D 生物打印肿瘤模型样本收集

待肿瘤细胞长到足够数量后(收集细胞数量不低于  $10^6$  个),将孔板中的培养基去除,加入 1ml 的 PBS 清洗 1 遍。去除 PBS 后,加入模型收集液(根据液态生物材料类型选择),置于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 30min。加入 1mL 无动物源性重组胰酶,吹打均匀,使消化酶与细胞团进行充分的接触与消化。2 min 后,将细胞溶液转移至 Nuclease-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。

##### D.2 转录组测序(RNA-seq)

将 D.1 中收集的细胞沉淀用  $1\times$  PBS 洗两遍后,加入 1 mL Trizol 吸打混匀,室温放置 5 min 使细胞完全裂解。后对 3D 生物打印肿瘤细胞及对应的原发肿瘤组织进行转录组测序,分析基因表达谱,评估体外模型与原发肿瘤在转录水平的相似性。通过差异表达分析、通路富集等方法,验证 3D 生物打印肿瘤模型能否保留原发肿瘤的关键分子特征和功能通路活性。

##### D.3 全外显子组测序(WES)

使用基因测序仪对 D.1 中收集的细胞沉淀及对应的原发肿瘤组织进行全外显子组测序,分析突变谱(如 SNV、Indel、CNV 等),评估体外模型与原发肿瘤的遗传相似性。同时可结合转录组测序数据,分析基因突变与表达调控的关联性,全面评估模型的生物学代表性。

D.4 通过批量 DNA 测序高通量检测 3D 生物打印肿瘤模型的变异等位基因频率,揭示肿瘤细胞比例,确定 3D 生物打印肿瘤模型的肿瘤细胞纯度。

## 附录 E

(资料性)

## 3D 生物打印肿瘤模型的标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法

## E.1 3D 生物打印肿瘤模型样本制备

待肿瘤细胞长到足够的数量后(收集细胞数量不低于  $10^6$  个),将孔板中的培养基去除,加入 1ml 的 PBS 进行清洗 1 遍。去除 PBS 后,加入模型收集液(根据液态生物材料类型选择),置于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 30min。加入 1mL 无动物源性重组胰酶,吹打均匀,使消化酶与细胞团进行充分的接触与消化。2 min 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;

## E.2 裂解处理

用  $1\times$  PBS 洗两遍加入 1 mL Trizol 吸打混匀后,室温放置 5 min 使细胞完全裂解。

E.3 加入  $200\ \mu\text{L}$  氯仿(氯仿替代物),反复颠倒混匀 15 s。在 12000 rpm 条件下  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。

E.4 取上层水相于一新的离心管中,每管中各加  $600\ \mu\text{L}$  异丙醇,轻轻混匀,室温放置 12min,  $12000g$ ,

$4^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。

E.5 弃去上清液,每管中加入 1mL 的 75%无水乙醇轻轻洗涤沉淀,  $12000g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 5 min。(此步骤重复 2 次)。

E.6. 弃去上清液,室温干燥 5-10 min,注意不要干燥过分,否则会降低 RNA 的溶解度。

E.7. 将 RNA 溶于  $30\text{-}50\ \mu\text{L}$  无酶无菌水中,可立即用于分子生物学实验;或者将 RNA 储存于  $-80^{\circ}$  备用。

## E.8 RNA 质量检测

E.8.1. 打开取样臂,用移液枪吸取  $1\ \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  滴加到检测平台上,调零;

E.8.2. 放下取样臂,用移液枪吸取  $1\ \mu\text{L}$  样品滴加到检测平台上,按“Measure”键;

E.8.3. 记录 A260/280 比值和 RNA 浓度;

E.8.4. 用干净的吸水纸擦去上下检测平台上的样品。

## E.9 cDNA 制备

取  $1\ \mu\text{g}$  提取的 RNA,利用水浴锅,按照商品化 RNA 反转试剂盒进行 RNA 反转,操作按照试剂盒说明书进行。

## E.10 基因表达情况确定

取 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。

## 注意事项:

1、Trizol 提取法实验操作全程都要在冰上,防止 RNA 降解。

2、Trizol 法提取某些样本 RNA 时产量较少，加入异丙醇后可置于-20℃冰箱过夜，增加 RNA 沉降量，多提取几份最后溶解沉淀时将沉淀合并。

3、不建议使用两种不同的试剂进行实验，因为两种试剂平行对比，同一产物  $T_m$  值不同可能是不同试剂的促解链成分或含量不一样，导致同一产物解链温度  $T_m$  值不一样。

4、 $C_t$  值偏大， $\geq 35$  模板量太少，调整加入模板量，尽量使  $C_t$  值落在 15-30 范围内。

5、溶解曲线出双峰，双峰、杂峰  $T_m$  在 80℃之前可能存在引物二聚体，建议降低引物浓度，重新设计引物；可能模板量过低，促使引物二聚体的形成，建议提高模板量。

6、溶解曲线出双峰，双峰、杂峰  $T_m$  在 80℃之后引物特异性过差导致非特异性产物扩增，建议 Blast 检查引物特异性或重新设计引物。gDNA 污染可通过 NRC 进行确认，若 NRC 有  $C_t$  值可重新制备模板。

7、溶解曲线前端起杂峰，可能是 ROX 浓度与机型不匹配，建议取消 ROX 校正查看溶解曲线是否恢复正常。

## 参 考 文 献

- [1]中华人民共和国药典(2020年版)
- [2]T/CAMDI 122-2023 3D 生物打印肿瘤模型的通用要求
- [3]Bergin C, Benoit YD. Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to evaluate cancer stem cell activity}. STAR Protoc, 2022, 3(1)101218.
- [4] Xu H, Jiao D, Liu A, Wu K. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine. *J Hematol Oncol*. 2022 May 12;15(1):58.
- [5] Sun H, Sun L, Ke X, Liu L, Li C, Jin B, Wang P, Jiang Z, Zhao H, Yang Z, Sun Y, Liu J, Wang Y, Sun M, Pang M, Wang Y, Wu B, Zhao H, Sang X, Xing B, Yang H, Huang P, Mao Y. Prediction of Clinical Precision Chemotherapy by Patient-Derived 3D Bioprinting Models of Colorectal Cancer and Its Liver Metastases. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Jan;11(2):e2304460.
- [6]Broutier l, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*. 2017;23(12):1424-1435.
- [7] Xie F, Sun L, Pang Y, Xu G, Jin B, Xu H, Lu X, Xu Y, Du S, Wang Y, Feng S, Sang X, Zhong S, Wang X, Sun W, Zhao H, Zhang H, Yang H, Huang P, Mao Y. Three-dimensional bioprinting of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. *Biomaterials*. 2021 Jan;265:120416.
- [8] Sun H, Wang Y, Sun M, Ke X, Li C, Jin B, Pang M, Wang Y, Jiang S, Du L, Du S, Zhong S, Zhao H, Pang Y, Sun Y, Yang Z, Yang H, Mao Y. Developing Patient-Derived 3D-Bioprinting models of pancreatic cancer. *J Adv Res*. 2024 Sep 14:S2090-1232(24)00413-2.
- [9] 孙铭浩, 杨华瑜, 孙乐家, 等. 3D生物打印肿瘤模型诊治平台质量控制标准[J]. 肿瘤, 2023, 43(07):559-569.
- [10]Yang R, Qi Y, Zhang X, Gao H, Yu Y. Living biobank: Standardization of organoid construction and challenges. *Chin Med J (Engl)*. 2024 Dec 20;137(24):3050-3060.