

团体标准

《猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程》

（征求意见稿）

编制说明

《猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程》起草组

2024 年 10 月

一、工作简况

（一）任务来源

1.制定标准的意义

本标准是对猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程的制定。丰富的地方猪种资源是一个国家的战略资源,是目前和未来猪育种工作的基本素材,但是仅凭传统的活体保种方式存在较大的生物安全风险,采用“静态保种”的手段对地方猪种遗传资源进行备份显得尤为重要。体细胞冷冻保存技术属于“静态保种”的一种,具有费用低、方便管理、所占空间少且对供体动物影响小等特点,该技术常和体细胞克隆、体细胞核移植等技术相结合,从而复原或培育出与供体遗传信息一致的后代。

制定《猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程》旨在标准化实验流程,确保各研究机构或实验室之间的数据具有可比性与重复性,提高细胞分离与培养的成功率。同时,该规程有助于保障生物安全,减少实验过程中污染和传染的风险,确保操作者和环境的安全。此外,规程的实施推动了基因工程、疾病研究及药物筛选等前沿领域的发展,加速科研成果的产业转化。通过详细的操作规范,新从业者能够更快掌握核心技术,促进体细胞克隆和基因编辑技术的推广应用,为畜牧业与生物医药领域的协同发展奠定了基础。

2.任务来源

根据陕西省饲料协会《关于印发 2024 年团体标准立项的通知》,由陕西正能农牧科技有限责任公司等单位承担团体标准《猪

用配合饲料》制定工作。

标准制定任务下达后，成立了以胡建宏为首席专家的标准起草组，主要成员包括：胡建宏、冯贤铨、温飞、陈辉、高磊、李胜、陈晓旭、贾永宏、于太永、张毅、张曼、郭松茂、田佳卉、韩帅琪、胡张涛、杨晓茹。

标准起草单位包括：西北农林科技大学、陕西省畜牧产业试验示范中心、陕西省畜牧技术推广总站、大荔县畜牧发展中心。

（三）主要工作过程

1. 起草阶段

标准立项后，2024年6月，西北农林科技大学，陕西省畜牧产业试验示范中心和陕西省畜牧技术推广总站组织相关专家及科研人员成立标准编制小组，制定标准编制方案以及任务分工；2024年6月至7月，标准编制组查阅、收集、整理大量文献资料，召开标准编制会议，研讨确定标准的整体框架及主体内容，对标准的关键性或存在争议性的内容进行了初步探讨。

2024年8月至10月，深入学习农业农村部《全国畜禽遗传改良计划（2021-2035年）》，中国农业科学院、科技部、农业农村部关于“畜禽遗传资源体细胞库”建设项目，陕西省农业农村厅《陕西省畜禽遗传资源保护名录（2023年版）》（琼府办〔2022〕13号）、陕西省农业农村厅《陕西省“十四五”畜牧兽医发展规划》、以及《地方标准制定规范（DB61/T 1214-2020）》等法律法规和有关文件，广泛查阅、收集国内外相关文献资料；专家及技术人

员调研小组赴陕西省各地方猪种保种场开展问题调研，及时梳理总结调研情况，标准起草组在调研基础上编制形成了工作组讨论稿；而后经多次修改和完善，形成征求意见稿。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）编制原则

制定过程遵循全面、科学、合理、可行的原则，力求标准文本结构清楚、准确、与现行法律法规及相关标准相互协调，易于理解，具有适用性和可操作性。严格按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》进行编写，与现行法律、法规、强制性标准协调一致，没有冲突。

（二）主要内容的依据

本标准的章节由范围、规范性引用文件、术语和定义、供体选择、主要仪器耗材及溶液配制、组织块获取、原代培养、传代培养、细胞冻存、质量检测等 10 节内容组成。

本标准制定了《猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程》，主要内容如下：

1. 范围

本操作规程规定了猪种质资源保护过程中体细胞（成纤维细胞）分离培养与鉴定的具体操作步骤。

本规程适用于酶消化法分离培养猪体细胞。

2. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引

用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

NY/T 3075 畜牧养殖场消毒技术

DB65/T 3502-2013 绵羊耳缘皮肤组织成纤维细胞体外培养
技术规程

3. 术语与定义

3.1 成纤维细胞（Fibroblast）

取自猪耳缘部位的组织，通过分离培养，获得成纤维细胞。成纤维细胞是一种形态多样的细胞类型，呈梭型或不规则三角形，具有卵圆形的核和突起的胞质。

3.2 细胞培养（animal cell culture）

细胞培养是从动物体中取出相关的组织，将它分散成单个细胞，然后放在适宜的培养条件下，让这些细胞生长和增殖的技术。

3.3 细胞传代（Cell passage）

细胞传代是细胞培养过程中的一项基本技术，是指将培养的细胞在一定的条件下进行分离、再培养的过程。

4. 供体选择

原则一：符合品种特征、特性。

原则二：生产性能良好，机体健康的青年猪种。

原则三：系谱清晰完整，三代以内无血缘关系。

5. 主要仪器、耗材及溶液配制

5.1 采样所需物品

采样记录本、记号笔、灭菌盒、剃毛器、耳缺钳、剪刀、镊子、手术刀片、手术刀柄、灭菌 PBS (1×)、生理盐水、碘伏、医用酒精、酒精棉球、口罩、一次性纸杯、手套、防护服、50 mL 无菌无酶离心管、双抗、DMEM 组织保存液。

5.2 主要仪器和耗材

倒置显微镜或生物显微镜、高压灭菌锅、超净工作台、车载冰箱、恒温水浴锅、CO₂ 培养箱、离心机、细胞计数板、巴士吸管、枪头、移液器、细胞培养皿、1.5 mL 细胞冻存管、40 μm 细胞滤网、15 mL 离心管、0.22 μm 滤器、一次性灭菌注射器、一次性橡胶手套、口罩、帽子。

5.3 溶液配置

20% FBS 细胞培养液：78 mL gibco DMEM/F12+20 mL FBS +2 mL 双抗。

2% I 型胶原酶：0.1g I 型胶原酶溶于 50 mL 无血清的 DMEM/F12 中，滤器过滤后使用。

冻存液配制将 DMEM：FBS：DMSO 按照 6：3：1 配制，如 10 mL 冻存液=6 mL DMEM+3 mL FBS+1 mL DMSO。

6 组织块获取

猪绑定后，使用剃毛器刮净猪耳缘毛发，并用 5%碘酒或酒精进行消毒。使用缺耳钳快速剪取耳缘的皮肤组织块，将组织块放入盛有酒精中刷洗 1min，在含有 5%双抗的 PBS 中清洗三遍。

最后将组织块转移至 DMEM 组织保存液中（含 2% 双抗），用封口膜封口，4 °C 条件下带回实验室进行后续试验。

7 原代培养

步骤一：将耳组织块浸泡三次酒精后，转移至 PBS（含有 2% 双抗）中清洗三次，随后将其转入超净工作台中。

步骤二：使用手术刀片刮去组织块表皮及皮下组织，保留真皮层，PBS 冲洗两次后，将组织用无菌的剪刀剪成 1 平方毫米小块。

步骤三：用巴氏吸管将组织块转移至 15 mL 离心管，使组织自然沉淀，移去上清液注入新的 PBS（含有 2% 双抗），冲洗三次至于冰上备用。

步骤四：弃去离心管中的 PBS，加入三倍体积的 0.25% 胰蛋白酶，置于培养箱中消化 20min，每分钟 1000 转（r/min）离心 5min。

步骤五：弃去胰蛋白酶消化液，加入五倍体积一型胶原酶（浓度为 2%），37 °C 消化 60min，每隔 10min 摇晃一次。

步骤六：消化完毕后，加入等体积的 20% 完全培养基终止消化，反复吹打，使用 40 μm 细胞筛进行过滤。

步骤七：将所得细胞悬液通过 1000 rpm 离心 5min，去上清，取沉淀，加入 20% 完全培养基重悬沉淀并接种于细胞皿中，放入培养箱进行培养，待 72h 后更换培养基。

8 传代培养

步骤一：当细胞的汇合达到 80%时，弃去原有的细胞培养液，加入 PBS 液洗涤三遍。

步骤二：吸去 PBS，再加入 3 mL 0.25%的胰蛋白酶消化液，轻轻摇动使之均匀分散布满整个皿底。

步骤三：放入 37 °C 的培养箱中约 3min 后，在显微镜下观察细胞的形态。

步骤四：细胞出现 60%变圆并开始脱落时，立即加入 1 mL FBS 终止消化。

步骤五：加入 1 倍体积的细胞培养液，使用移液枪反复吹打，使细胞团分散成单个细胞。

步骤六：直至细胞全部脱落，收集细胞沉淀，再根据沉淀的细胞量进行倍比稀释计数，按照 3×10^5 个每毫升 (cells/mL) 的密度进行传代培养。

步骤七：细胞汇合达到 80%左右继续进行传代或冻存。

9 细胞冻存

步骤一：当细胞汇合至 80%处于对数生长期时，吸弃原有的细胞上清液，加入 PBS 清洗 2 次。

步骤二：加入 3 mL 0.25%的胰蛋白酶 37 °C 培养箱进行消化。

步骤三：3min 后显微镜下观察，60%的细胞开始变圆开始脱落时，立即加入含 1 mL FBS 终止消化。

步骤四：用移液枪吹打皿底数次，收集培养液，1200 rpm 离心 5min。

步骤五：去除上清，加入 4 °C 预冷的细胞冻存液，并调整细胞密度至 5×10^5 个每毫升（cells/mL）。

步骤六：按 1 mL/管的细胞悬液分装于无菌的细胞冻存管中，严密封口。

步骤七：注明物种、细胞名称、家畜性别，细胞代数、冻存编号、冻存日期等信息。

步骤八：放入零下 80 °C 冷冻，过夜后移入液氮进行长期保存。

10 质量检测

10.1 体细胞的鉴定

步骤一：取第三代体细胞接种至 24 孔细胞培养板中，每孔 1×10^4 个细胞。

步骤二：当细胞融合度达到 70% 时，弃去培养基，PBS 洗第三次。

步骤三：取 500 μ L 4% 多聚甲醛室温固定 10min。

步骤四：PBS 清洗三次，并添加 0.3% Triton X-100 室温渗透破膜 10min。

步骤五：用 PBS 洗三次，加入封闭液（PBS+5% 猪封闭血清）室温孵育 1h。

步骤六：加入一抗（Vimentin 波形蛋白单克隆抗体，用 PBS 按照 1: 100 倍稀释），4 °C 孵育过夜。

步骤七：24h 后，从 4 °C 冰箱中取出复温 1h；弃一抗，PBS

漂洗三次。

步骤八：加入二抗，置 37℃ 避光孵育 2h。

步骤九：弃二抗，用 PBS 漂洗，用 DAPI 复染标记细胞核；最后用 PBS 清洗，在荧光倒置显微镜下观察并计数，计算阳性细胞数比例。

10.2 体细胞数量测定

将血球计数板及盖片用擦试干净，并将盖片盖在计数板上；将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间；静置 3min；镜下观察，计算计数板上 5 个中方格的细胞总数（4 角和正中），压线细胞只计左侧和上方的。

计算公式：细胞数/ml = 5 个中方格中的细胞数 × 5（即计数室 25 个中方格的总精子数） × 10（1 平方毫米内的细胞数） × 1000（每毫升中细胞数）。

注意：每样品观察上下两个计数室，取平均值，如二个计数室计数结果误差超过 5%，则应重检。

10.3 体细胞活率测定

步骤一：取 10 μl 细胞悬浮液与 10 μl 0.4% Trypan Blue 等体积混合均匀于 1.5 ml 离心管中，染色 2~3min。

步骤二：吸取少许悬液置于血球记数板上，加上盖片。

步骤三：镜下取 3 个任意视野，分别记录死细胞和活细胞数，合并计算细胞活率。

步骤四：每样品观察两个次，取平均值，如次计数结果误差

超过 5%，则应重检。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析、综述报告

1. 试验论证的主体

试验论证的主体为本标准编制主持单位**西北农林科技大学**。

2. 试验验证的方法、手段

试验验证的方法、手段主要包括试验调查、会议研讨、委托检验、查阅文献、征求意见、标准审定等。

（二）技术经济论证、预期的经济效果

猪体细胞的冷冻保存在遗传资源保护、科研和产业应用方面具有重要意义。首先，它为濒危和地方特色猪种提供了长期保存基因资源的手段，防止这些资源因自然灾害或市场变化而丢失。其次，冷冻保存的体细胞可用于体细胞克隆和基因编辑，支持品种复兴与育种优化，加速种业发展。此外，科研领域依赖这些细胞开展遗传病研究和基因组学探索，为农业和生物医学的进步奠定基础。与此同时，这种技术减少了对活体育种的依赖，降低了饲养成本，并为未来应对疫病和气候变化提供了可靠的种群恢复手段。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

国内大多数体细胞分离培养技术大多数关于特种经济动物，如：鹿、马、虎等，而对于家畜猪的体细胞分离培养技术的研究

较少。本标准立足于我国地方猪种种质资源实际情况，注重资源质量和生物安全性，保证标准技术先进性、经济合理性、切实可行及可操作性，未引用国际和国外标准。

五、与现行的法律法规和强制性国家标准的关系

本标准严格按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》进行编写，与现行法律、法规、强制性标准协调一致，没有冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、标准作为强制性或推荐性标准的建议

建议本标准作为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织实施、技术措施、过渡办法等）

建议该标准颁布实施后，在团体内及时宣传贯彻，规范猪体细胞分离培养与鉴定技术。团体以外的单位也可以推广使用。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。