

CS 65.120

CCS B46

团 体 标 准

T/SXSL XXX-20XX

猪体细胞分离培养与鉴定 技术操作规程

Operating Procedures for isolation, culture and identification
of somatic cells from pigs

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

陕西省饲料协会 发布

前言

本规程按照GB/T1.1-2020《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。

本规程起草单位: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。

本规程主要起草人:胡建宏、冯贤辮、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。

猪体细胞分离培养与鉴定技术操作规程

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 1 分钟, 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20分钟, 每分钟1000转 (r/min) 离心5分钟。

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60分钟,每隔10分钟摇晃一次。

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 um细胞筛进行过滤。

步骤七:将所得细胞悬液通过 1000 rpm 离心 5 分钟,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 72 小时后更换培养基。

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 3 分钟后,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。

步骤三:3分钟后显微镜下观察,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5分钟。

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℃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 10 分钟。

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

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

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℃孵育过夜。

步骤七:24 小时后, 从 4℃冰箱中取出复温 1 小时; 弃一抗, PBS 漂洗三次。

步骤八:加入二抗, 置 37℃避光孵育 2 小时。

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 3 分钟; 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 $\times$ 5 (即计数室 25 个中方格的总精子数) $\times$ 10 (1 平方毫米内的细胞数) $\times$ 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 μ L 细胞悬浮液与 10 μ L 0.4% Trypan Blue 等体积混合均匀于 1.5 ml 离心管中, 染色 2~3 分钟。

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%,则应复检。