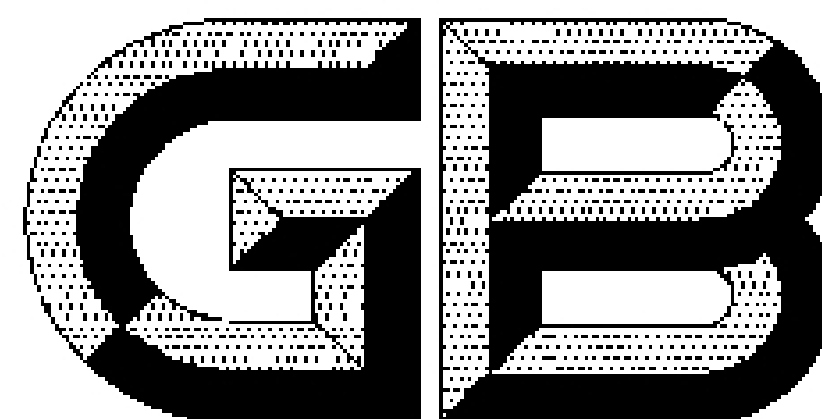




中华人民共和国国家标准

GB/T 24862—2010

畜禽体细胞库检测技术规程

Technical regulation of farm animals somatic cell bank detection

2010-06-30 发布

2011-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人：马月辉、关伟军、李向臣、于太永、李晗、何晓红、刘涛。



畜禽体细胞库检测技术规程

1 范围

本标准规定了畜禽体细胞库检测方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽体外培养细胞鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

细胞活率 cell motility rate

活细胞占总细胞的百分比。

3.2

细胞生长曲线 cell growth curve

在一代细胞生存期内,依据潜伏期、指数增长期、停滞期和衰亡期细胞动态变化的数值,以细胞培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标而绘制的细胞生长规律曲线。

3.3

核型 karyotype

体细胞分裂中期整套染色体按照其数目、长度、着丝点位置、随体、主缢痕和次缢痕等相对恒定特征排列起来的图像。

3.4

同工酶 isozyme

功能相同结构各异的一类催化酶。

3.5

汇合度 confluency

细胞占其培养表面的比例。

4 工作区条件

工作区一般要由准备室、缓冲间、无菌室、细胞保存室组成。

其中,缓冲间面积应不小于 3 m²,并设有更衣柜和紫外灯,紫外灯的强度不少于 1.5 W/m³。紫外线灯管距地面不应超过 2.5 m,每次照射时间为 20 min~30 min。无菌室无菌等级的最低标准应达到万级。

5 主要仪器、设备

电泳仪及电泳槽、超净工作台、冰箱、鼓风干燥箱、高压蒸汽消毒器、液氮生物容器、离心机、电子天平、恒温培养箱、CO₂ 培养箱、超纯水装置、凝胶自动成像分析系统和显微镜等。

6 清洗与消毒

6.1 玻璃器皿清洗与消毒

6.1.1 浸泡

所需的玻璃器皿在含有洗涤剂的清水中浸泡 12 h。

6.1.2 刷洗

选软毛毛刷,反复洗刷后用清水冲洗 3 次,三蒸水冲洗 3 次后,60 ℃下烘干后备用。

6.1.3 酸浸

酸浸时间为 24 h。

6.1.4 冲洗

酸浸后先用自来水反复冲洗 10 次以上,最后用重蒸水浸洗 3 次~5 次,烘干包装。

6.1.5 消毒

高压灭菌应以 0.14 MPa~0.16 MPa 的压力下持续 15 min~30 min。

6.1.6 初次玻璃器皿使用

初次使用玻璃器皿需要先经过浸泡和洗刷再置于 5% 稀盐酸溶液中浸泡 12 h 以上,其余操作同 6.1.3、6.1.4 和 6.1.5 等步骤。

6.2 金属器皿清洗与消毒

金属材质的器具除了没有酸浸处理步骤外,其余步骤同 6.1。

6.3 塑料与橡胶制品清洗与消毒

塑料和橡胶材质的器具用清水浸泡和冲洗同玻璃器皿清洗,之后还需要用 2% 的 NaOH 溶液浸泡 12 h,清水冲洗和烘干后用 1% 稀盐酸浸泡 30 min,再用清水和三蒸水分别冲洗 3 次,高压灭菌和烘干后备用。高压灭菌以 0.073 MPa 的压力下持续 10 min。

7 主要试剂与溶液配制

主要试剂与溶液配制参见附录 A。除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 一级用水的要求

8 体外培养细胞鉴定

8.1 细胞形态检测

8.1.1 光学显微镜检测

在倒置相差显微镜下,直接观察和记录培养细胞的形态和生长状况。刚贴壁细胞边界清晰,核呈圆形,核浆比率小,细胞排列整齐,无重叠生长。

8.1.2 Giemsa 染色检测

将盖玻片置于细胞培养瓶中,在 5% CO₂ 培养箱中 37 ℃ 培养,细胞形成单层后,取出盖玻片,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗,放在载玻片上,自然干燥。固定液固定 10 min,Giemsa 染色 2 min,置于显微镜下观察。正常细胞的细胞核被染成紫红色或蓝紫色,细胞质被染成浅红色。

8.2 微生物检测

8.2.1 细菌和真菌检测

取 5 μL 细胞悬液,置于 8 mL 无抗生素培养基中,混匀,300g 离心 5 min,重复 2 次。再用 2 mL 无抗生素培养基重悬,取 0.5 mL 接种到胰蛋白胨培养基中,置于 37 ℃ 培养箱以检测细菌;取 0.5 mL 接种到麦芽汁培养基中,置于 26 ℃ 培养箱以检测真菌。分别培养 2 周后,晃动悬液,置于显微镜下观察,无异物则细胞未受细菌和真菌污染。

8.2.2 支原体检测

将畜禽细胞接种到无抗生素的培养基中进行细胞单层培养,待盖玻片细胞汇合度达到 50%~60% 取出。PBS 漂洗,固定液浸泡盖玻片,固定 10 min 后再用 PBS 漂洗。将 Hoechst 33258 染液滴加到已固定的细胞上,染色 30 min。用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min~5 min。将 1 滴含 1% 封片液的 PBS 滴加到已染色的细胞上,翻转盖玻片盖于载玻片上。用 100 倍~400 倍荧光显微镜观察。细胞核外无蓝色荧光小点或丝状荧光物表明细胞未受支原体污染。

8.2.3 病毒检测

利用酶联免疫吸附试验、免疫酶试验、免疫荧光试验、血凝试验、血凝抑制试验、免疫酶组织化学、放射免疫测定等方法对畜禽体细胞库进行病毒检测。

8.3 细胞活率检测

细胞汇合度达到 80%~85%,常规法消化,制成 1.0×10^6 个/mL~ 3.0×10^6 个/mL 的细胞悬液。取一滴悬液和一滴 0.4% 台盼蓝溶液混匀,静置 2 min。用血球计数板计算细胞总数和未着色细胞数。

8.4 细胞生长周期鉴定

细胞汇合度达到 80%~85%,常规法消化,制成悬液,计数。分别向培养板 21 个孔接种 1.0×10^4 个~ 2.0×10^4 个细胞,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。每隔 24 h 计数 3 个孔内的细胞密度,用血球计数板计算细胞总数,取 3 孔的平均值,连续计数 7 d。以培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标,绘制细胞的生长曲线。正常生长曲线包括潜伏期、指数增长期、停滞期和衰亡期四个阶段。

8.5 细胞表面抗原检测

细胞接种在盖玻片上。用固定液固定,-20 °C 放置 20 min。弃去固定液,用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,加入血清,静置 20 min,用 PBS 洗去血清。加入相应的一抗,37 °C 孵育 30 min,室温放置 1 h~3 h。用 PBS 漂洗后,加入相应的二抗,37 °C 孵育 20 min。用 PBS 漂洗,封片,镜检。细胞表面特异性抗原与特异性抗体结合,荧光显微镜下进行观察。

8.6 细胞核型检测

8.6.1 秋水仙素处理

取对数生长期的细胞,加秋水仙素使其终浓度为 0.1 μg/mL~0.4 μg/mL。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 1 h~6 h,使大部分细胞处于分裂中期。

8.6.2 分裂相细胞采集

用常规方法消化收集细胞。转入 15 mL 离心管,以 300g 离心 8 min,收集细胞。

8.6.3 低渗

弃上清液,加入预热至 37 °C、0.075 mol/L(或 0.4%)KCl 溶液 2 mL,轻轻吹打,继续加至 10 mL,37 °C 温箱中温育 30 min~40 min。

8.6.4 预固定

在温育后的悬液中加入新鲜固定液 1 mL,混匀,将悬液以 300g 离心 8 min,弃上清。

8.6.5 固定

加入新鲜固定液 5 mL,打匀,室温静置 20 min。300g 离心 8 min,弃上清。

8.6.6 重固定

重复 8.6.5 步骤,离心后留 1 mL~1.5 mL 上清液,混匀。

8.6.7 滴片

取 2 滴~3 滴细胞悬液,滴在倾斜 45°的预冷载玻片上,干燥。

8.6.8 染色

用 PBS(pH6.8)稀释 10 倍的 Giemsa 液染色 10 min,自来水冲洗,干燥。

8.6.9 封片

将载玻片二甲苯固定两次后,用中性树胶封片。

8.6.10 数据分析

统计 100 个分裂相以确定染色体数目。测量并计算染色体的相对长度、臂比值和着丝点指数,并确定染色体着丝点类型。

8.7 细胞同工酶检测

8.7.1 样品制备

常规方法消化收集细胞,用 PBS 重悬,记数。用温育 PBS 洗细胞 3 次,离心,弃上清液。用蛋白提取液重新悬浮细胞,密度达 5.0×10^7 个/mL。将细胞悬液移到 1.5 mL 离心管中,4 ℃ 下以 300g 离心 2 min,吸取上悬液,以每管 20 μ L 分装后置 -70 ℃ 贮存备用。

8.7.2 制板和点样

灌注分离胶,待分离胶聚合好再加满浓缩胶,插上梳子。向上下槽缓缓加入稀释 10 倍的电极缓冲液至适量,用微量加液器向每个样品槽加入混有 1 μ L~2 μ L 溴酚蓝样品液 20 μ L~50 μ L。等量上样,放入 4 ℃ 冰箱。

8.7.3 电泳

120 V 电泳,待溴酚蓝进入分离胶后调电压至 220 V。溴酚蓝迁移至下端 0.5 cm~1 cm 处停止电泳。

8.7.4 染色

切去浓缩胶,用蒸馏水漂洗分离胶两次后,置 37 ℃ 温箱中避光保温染色 2 h,拍照。



附 录 A
(资料性附录)
主要试剂及溶液配制

A.1 水

实验用水符合 GB/T 6682 一级用水的要求。

A.2 平衡盐溶液

生理盐水或 PBS 适用于细胞的漂洗。

A.3 PBS

称取 4.00 g NaCl、0.10 g KCl、1.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.10 g KH_2PO_4 ，加超纯水定容至 500 mL，调节 pH 至 7.2，高压灭菌，密封后置于 4 ℃ 条件下贮存。

A.4 生理盐水

称取 4.50 g NaCl，加入 500 mL 超纯水，高压灭菌，密封后置于 4 ℃ 条件下贮存。

A.5 培养基

85%~90% 的高糖最低限量必需培养基(minimum essential medium, MEM)适用于家禽细胞的培养；85%~90% 的高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)适用于家畜细胞的培养。用于过滤培养基的滤膜直径为 0.22 μm 和 0.45 μm 。

A.6 血清

10%~15% 的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)适合于家畜和家禽细胞的培养。

A.7 消化液

称取 0.10 g 或 0.25 g 胰蛋白酶干粉，溶于 PBS 中，调 pH 至 7.2~7.4，定容至 100 mL。无菌操作台内，0.22 μm 滤膜过滤除菌、分装，密封后置于 -20 ℃ 条件下贮存。

A.8 冻存

MEM 或 DMEM 的基础培养基加入终浓度为 10% 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和 20%~50% FBS，0.22 μm 滤膜过滤除菌，密封后置于 -20 ℃ 条件下贮存。

A.9 胰蛋白胨培养基

称取 3.00 g 大豆胰蛋白胨，溶于 100 mL 超纯水中，调 pH 至 7.3，高压灭菌 15 min~20 min。

A.10 麦芽汁培养基

称取 2.00 g 麦芽汁，溶于 100 mL 超纯水中，调 pH 至 3~4，高压灭菌 15 min~20 min。

A.11 Hoechst 33258 工作液

称取 5.00 mg Hoechst 33258，和 10.00 mg 硫柳汞，溶于 100 mL PBS，置于棕色瓶中，搅拌 30 min

至完全溶解,分装到 1.5 mL 的小管中制成 Hoechst 33258 贮存液,−20 ℃下避光保存。将 1 mL 的贮存液加到 100 mL 的 PBS 中,搅拌 45 min,使终浓度达到 5.00 μg/mL,4 ℃条件下避光保存。

A. 12 封片液

将 22.2 mL 0.1 mol/L 柠檬酸与 27.8 mL 0.2 mol/L Na_2HPO_4 加入到 50 mL 甘油中,调 pH 至 5.5,4 ℃下保存备用。

A. 13 固定液

冰乙酸与无水甲醇以 1 : 3 的比例混合,现用现配。

A. 14 0.4%台盼蓝溶液

称取 0.40 g 台盼蓝,加少量 PBS 研磨粉碎后,再加 PBS 至 100 mL。

A. 15 秋水仙素溶液

称取 10 mg 秋水仙素,溶于 10 mL 超纯水配成贮存液,取 1 mL 秋水仙素贮存液与 9 mL 超纯水混合。

A. 16 Giemsa 工作液

称取 1.50 g Giemsa 干粉,量取 50 mL 甘油,在研钵内先用少量甘油与 Giemsa 研磨至无颗粒,再将剩余甘油混在一起,56 ℃加热 2 h 后,加入 50 mL 甲醇搅拌均匀,制成 Giemsa 贮存液,保存于棕色瓶中备用。1 mL 贮存液与 9 mL PBS 混合,制成 Giemsa 工作液,现用现配。

A. 17 蛋白提取液

将 TritonX-100 与 0.9% NaCl-0.06 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetra acetic acid,EDTA)溶液按 1 : 15 的比例混匀,4 ℃下贮存。

A. 18 胶工作液

A 液:称取 28.80 g 丙烯酰胺、8.00 g 甲叉双丙烯酰胺,用 100 mL 超纯水溶解;

B 液:称取 7.30 g 三羟甲基甲烷、48 mL 1 mol/L HCl、0.4 mL 四甲基乙二胺定容至 100 mL,pH 调至 8.9;

C 液:称取 38.00 g 丙烯酰胺、2.00 g 甲叉双丙烯酰胺、20 mL 甘油,定容至 100 mL;

D 液:13 mL 1 mol/L HCl,1.50 g 三羟甲基甲烷,定容至 100 mL,pH 调至 6.7;

E 液:称取 30.00 g 丙烯酰胺、0.80 g 甲叉双丙烯酰胺,定容至 100 mL;

F 液:四甲基乙二胺。

A. 18.1 家畜聚丙烯酰胺凝胶配方

分离胶用 13.35 mL 超纯水,7.5 mL 1.5 mol/L 三羟甲基甲烷,6 mL 40%丙烯酰胺,3 mL 2%甲叉双丙烯酰胺,150 μL 10%过硫酸胺,30 μL F 液;

浓缩胶用 6.5 mL 超纯水,1 mL C 液,2.5 mL D 液,65 μL 10%过硫酸胺,25 μL F 液。

家畜乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶所用凝胶配方相同。

A. 18.2 家禽聚丙烯酰胺凝胶配方

A. 18.2.1 苹果酸脱氢酶

分离胶:9.375 mL 超纯水,5.625 mL E 液,9.375 mL 1mol/L Tris-Cl(pH 8.8),0.625 mL 1%过硫酸胺,43.35 μL F 液;

浓缩胶:6.4 mL 超纯水,1.3 mL E 液,1.3 mL 1mol/L Tris-Cl(pH 6.8),1 mL 1% 过硫酸胺,10 μ L F 液。

A. 18.2.2 乳酸脱氢酶

分离胶:5.69 mL 超纯水,5.11 mL A 液,2.84 mL B 液,11.36 mL 0.1% 过硫酸胺;

浓缩胶:6.5 mL 超纯水,1 mL C 液,2.5 mL D 液,65 μ L 10% 过硫酸胺,25 μ L F 液。

A. 19 电泳指示剂的配制

称取 1.0 mg 溴酚蓝,用 10 mL 蒸馏水溶解后,定容至 100 mL。

A. 20 乳酸脱氢酶染色液

A 液:称取 100.00 mg 乳酸钙,溶于 20 mL 0.05 mol/L Tris-Cl(pH 8.0)中;

B 液:称取 5.00 mg 噻唑蓝(thiazolyl blue,MTT),溶于 1.0 mL 超纯水中;

C 液:称取 2.50 mg 吩嗪硫酸钾酯(phenazine methosulfate,PMS),溶于 1.0 mL 超纯水中;

D 液:称取 10.00 mg 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD)。

染色前,将 A 液、B 液、C 液和 D 液混合后,倒入 20 mL 2% 琼脂溶液中,混匀。

A. 21 苹果酸脱氢酶染色液

A 液:称取 350.00 mg DL-苹果酸,溶于 25 mL 0.1 mol/L Tris-Cl(pH8.0)中;

B 液:称取 15.00 mg MTT,溶于 1.5 mL 超纯水中;

C 液:称取 5.00 mg PMS,溶于 1.0 mL 超纯水中;

D 液:称取 10.00 mg NAD。

将 A 液、B 液、C 液和 D 液混合后,倒入 25 mL 2% 琼脂溶液中,混匀。