



中华人民共和国国家标准

GB/T 24863—2010

畜禽细胞体外培养与 冷冻保存技术规程

Technical regulation of farm animals cell culture and cryopreservation

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:关伟军、马月辉、李向臣、李晗、闫雷、赵倩君、宫雪莲。

畜禽细胞体外培养与 冷冻保存技术规程

1 范围

本标准规定了畜禽体细胞保存方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽细胞体外培养与保存。

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

体细胞体外培养 *in vitro* somatic cell culture

将体细胞在模拟体内生存环境的体外条件中进行培养,使细胞生长增殖,并保留其完整结构和功能特性的方法。

3.2

原代细胞培养 *primary cell culture*

将体细胞在模拟体内生存环境中进行培养,使细胞生长增殖达到可传代状态的培养方法。

3.3

细胞冷冻保存 *cell cryopreservation*

将体外培养细胞与冻存液按一定比例混匀后,按设定的降温速率降温,使其于液氮中长期保存的过程。

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,紫外灯的强度为不少于 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

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、CO₂ 培养箱、超纯水装置和显微镜等。

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,最后用超纯水浸洗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 试剂与培养液

7.1 水

实验用水符合GB/T 6682一级用水的要求。

7.2 平衡盐溶液

生理盐水或磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)适用于细胞传代前漂洗细胞。

7.2.1 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。

7.2.2 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。

7.3 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。

7.4 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。用直径为0.22 μm和0.45 μm滤器过滤。

7.4.1 MEM(含Earle's盐)培养基

称取9.60 g MEM,溶于1 000 mL超纯水中,加入2.20 g NaHCO_3 ,使最终pH为7.2~7.4,用0.22 μm的滤器进行过滤、分装。从每瓶中取3 mL~5 mL用于检菌,其余置于4℃条件下贮存。

7.4.2 高糖DMEM培养基

称取13.40 g DMEM,溶于1 000 mL超纯水中,加入3.70 g NaHCO_3 ,使最终pH为7.2~7.4,用0.22 μm的滤器进行过滤、分装。从每瓶中取3 mL~5 mL用于检菌,其余置于4℃条件下贮存。

7.4.3 全培养基

培养基检菌3 d后,取出未被污染的MEM或DMEM培养基加入特级FBS,使其终浓度为10%。用0.22 μm的滤器过滤、分装。从每瓶中取3 mL~5 mL用于检菌,其余置于4℃条件下贮存。

7.5 消化液

称取 0.10 g(用于家禽)或 0.25 g(用于家畜)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 滤器过滤除菌、分装,密封后-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

7.6 冻存液

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,密封分装,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

8 体细胞体外培养与保存

8.1 样品采集

8.1.1 家畜样品采集

采集家畜耳缘组织、脏器。耳缘组织采集需先用 75% 的酒精对采样部位进行消毒,剪净耳毛后再进行消毒采样;采集脏器样品时要用生理盐水冲洗干净。根据实验需要选取大小适中的组织样品,放入 5 mL 备有 PBS 或相应基础培养基的离心管中,封口后立即标记样品名称、性别、年龄、采样地点、采样部位、个体编号和采样时间等信息,并在记录本上记录。

8.1.2 家禽样品采集

采集家禽皮肤、适当日龄的胚胎组织,其余步骤同 8.1.1。

8.2 样品运输

样品放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的采样箱后应迅速运往实验室。保存在 PBS 中的样品应在 24 h 内进入原代培养阶段。保存在基础培养基中的样品应在 48 h 内带回实验室进行原代培养。

8.3 原代细胞培养

8.3.1 家畜细胞原代培养

在室温下的超净工作台中用 PBS 清洗家畜样品后,将组织样品剪成 1 mm^3 大小的组织块,均匀涂于培养瓶底壁,倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度的培养箱中培养,待组织块微干并黏附在培养瓶底部后加入适量全培养基浸润组织样品,直至组织样品贴壁牢固时翻瓶加液进行原代培养。

8.3.2 家禽细胞原代培养

家禽的胚胎需要去掉脑、眼、四肢和内脏,其余步骤同 8.3.1。

8.4 传代培养

8.4.1 家畜细胞传代培养

当家畜细胞汇合达到培养瓶底壁的 80%~85% 时,弃去培养基,用生理盐水或 PBS 清洗 3 次,加入适量的 0.25% 的胰蛋白酶到培养瓶顶壁,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中放置 5 min,翻瓶,再置于培养箱中作用 30 s,倒置显微镜下观察到细胞质回缩,细胞间隙增大时,拍打培养瓶使细胞分散。然后立即加入全培养基,分瓶培养。

8.4.2 家禽细胞传代培养

培养家禽细胞时,加入适量的 0.10% 胰蛋白酶,立即翻瓶,其余步骤同 8.4.1。

8.5 细胞冷冻保存

传 3 代后,细胞汇合达到培养瓶底壁的 80%~85%,按常规法消化细胞,加入全培养基,制成均匀的单细胞悬液,计算细胞总数。300g 离心 8 min,弃上清,根据细胞总数加入适量冻存液混匀,使细胞密度达到 1.0×10^6 个/mL~ 3.0×10^6 个/mL,按每管 1 mL 分装于冻存管中,标明细胞名称、冻存管编号、性别和冻存日期。将冻存管放入程序降温盒中置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 5 h~6 h 或将冻存管放入程序降温仪 5 h~6 h 降温至-70 $^{\circ}\text{C}$ 后,立即转入液氮中长期保存。