

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T 1460—2023

地方猪耳缘成纤维细胞制备 与冻存技术规范

地方标准信息服务平台

2023-09-15 发布

2023-12-15 实施

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。

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。

本文件由重庆市农业农村委员会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：重庆市畜牧科学院、重庆市畜牧技术推广总站、四川省内江市农业科学院。

本文件主要起草人：龙熙、潘红梅、朱燕、郭宗义、张亮、周旗、任素碧、涂志、柴捷、易霞。

地方标准信息服务平台

地方猪耳缘成纤维细胞制备与冻存技术规范

1 范围

本文件规定了地方猪耳缘成纤维细胞制备和冻存的试验材料、仪器设备、采样要求、样品采集、样品处理、分离培养和冻存的要求。

本文件适用于地方猪耳缘成纤维细胞制备和冻存。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 3075 畜禽养殖场消毒技术

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耳缘成纤维细胞 ear margin fibroblasts

取自猪耳缘部位的组织，通过分离培养，获得的成纤维细胞。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMEM：杜氏培养基（Dulbecco's modified eagle medium）

DPBS：杜氏磷酸盐缓冲液（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline）

DMSO：二甲基亚砜（Dimethyl Sulfoxide）

5 试验材料、仪器设备

5.1 主要仪器设备及耗材

5.1.1 仪器设备。低温保存箱、二氧化碳培养箱、低速离心机、超净工作台、恒温水浴锅、显微镜、移液枪等。

5.1.2 消毒用品。75% 酒精、碘伏。

5.1.3 防护用品。防护服、口罩、无菌帽、橡胶手套等。

5.1.4 实验用具。耳缺钳、剪刀、镊子、刀片、细胞培养皿（瓶）、离心管、酒精灯、巴斯德吸管等。

5.2 实验用水及相关溶液

5.2.1 实验用水。应符合 GB/T 6682 中 4.2 二级水要求。

5.2.2 样品培养及保存液。样品培养及保存液配制方法见附录 A。

6 采样要求

6.1 采样猪只应为健康活体。濒危猪种可在死亡后 24 h 内采样。

6.2 采样用具应无菌。

6.3 采样人员安全防护应符合 NY/T 541 的要求。

6.4 采样场所消毒应按照 NY/T 3075 执行。

7 样品采集

7.1 选择耳缘避开大血管的较薄部位消毒，用耳缺钳取长宽 5 mm~6 mm 的样品。

7.2 清理样品上较长毛发后，转移至加有 75% 酒精的离心管中，摇晃震荡 30 s。取出样品，用 DPBS 将样品上的酒精冲洗干净，再移至加有 DMEM 的离心管中，封口、标记，放入低温保存箱。

7.3 在采样登记表（见附录 B）上登记。

7.4 采样结束，样品即送实验室。

7.5 废弃物应无害化处理。

8 样品处理

8.1 在超净工作台中，将样品转移至加有 75% 酒精的离心管中震荡摇晃 30 s，用 DPBS 清洗，去除毛发和表皮，再用 DPBS 将样品清洗干净。

8.2 将经 8.1 处理的样品置于 75% 酒精中浸泡消毒 30 s，再用 DPBS 清洗干净。

9 分离培养

9.1 原代细胞

9.1.1 将样品剪成小于 1 mm³ 的碎块，用巴斯德吸管转移至细胞培养皿（瓶）中，使其均匀分布于皿（瓶）底。

9.1.2 将培养皿（瓶）倒置，放于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养 4 h~6 h，每 2 h 观察 1 次。

9.1.3 样品块贴壁后，往培养皿（瓶）中加入 4 mL 预热至 37 °C 的 DMEM，12 h 后观察是否污染，若有污染丢弃或二次清洗。

9.1.4 每隔 1 d 观察细胞迁出及其生长状况。

9.1.5 标记细胞处理方式和细胞状态，记录细胞分离培养日志（见附录 C）。

9.2 传代细胞

9.2.1 在显微镜下观察原代细胞的汇合度，达到 70%~90% 时，进行传代培养。

9.2.2 超净台中剔除 9.2.1 培养皿（瓶）中的样品块，用 DPBS 清洗细胞 2~3 次，弃废液。向培养皿（瓶）中加入 1 mL 胰酶，放入培养箱中消化 3 min，取出培养皿（瓶），用显微镜观察细胞的脱壁

情况，待细胞变圆并大部分脱壁后，立即加入 2 mL DMEM 终止消化。将细胞悬液转移至离心管中，1 000 rpm 离心 5 min，留细胞沉淀。

9.2.3 加入 DMEM 重悬细胞，取细胞悬液均匀接种于 2 个细胞培养皿（瓶）中，标记为 P1 代细胞，放入二氧化碳培养箱中继续培养，每 2 d 换 1 次 DMEM。

9.2.4 细胞汇合度为 70%~90% 时，进行下一次传代。

9.2.5 标记细胞处理方式和细胞状态，记录细胞分离培养日志（见附录 C）。

10 冻存

10.1 弃去培养皿（瓶）中的培养液，用预热至 37 °C 的 DPBS 洗涤细胞 1~2 次。重复本文件 9.2.2 操作 1 次。

10.2 弃去细胞培养液，加入 20 °C~25 °C 的冷冻液，使细胞重悬浮，调整细胞密度为 $1\sim5\times 10^6$ 个/mL。冻存管分装，标记细胞来源、代次与冻存日期。

10.3 将分装好的细胞冻存管放入程序降温盒，-80 °C 冰箱中冷冻 8 h~16 h，转移至液氮罐中长期储存。

10.4 做好冻存记录。

地方标准信息服务平台

附录 A
(规范性)
样品培养及保存液配制方法

A.1 单个样品保存液配制

10 mL DMEM +500 μ L 胎牛血清+1 mL 100 \times 青霉素-链霉素-两性霉素，混匀后过滤除菌(0.22 μ m)，不得高压灭菌。配制完成后于 4 $^{\circ}$ C 保存，有效使用期不超过 21 d。

A.2 DPBS 配制

8 g 氯化钠，0.2 g 氯化钾，1.15 g 磷酸氢二钠，0.2 g 磷酸二氢钾，同时溶解于 1 L dd H₂O 中。过滤除菌(0.22 μ m)或高压灭菌。配制完成后于 4 $^{\circ}$ C 保存，有效使用期不超过 21 d。

A.3 DMEM (+10% 胎牛血清+1 \times 抗生素) 配制

500 mL DMEM +56 mL 胎牛血清+5.6 mL 100 \times 青霉素-链霉素-两性霉素，混匀后过滤除菌(0.22 μ m)，不得高压灭菌。配制完成后于 4 $^{\circ}$ C 保存，有效使用期不超过 21 d。

A.4 细胞冷冻液配制

70 mL DMEM +20 mL 胎牛血清+10 mL DMSO，混匀后过滤除菌(0.22 μ m)，不得高压灭菌。配制完成后于 4 $^{\circ}$ C 保存，有效使用期不超过 21 d。

地方标准信息服务平台

