

DB65

新疆维吾尔自治区地方标准

DB 65/T 3502—2013

绵羊耳缘皮肤组织成纤维细胞体外培养 技术规程

The Technology Procedures of Sheep Ear Skin Fibroblast in vitro Culture

地方标准信息服务平台

2013-08-10 发布

2013-09-10 实施

新疆维吾尔自治区质量技术监督局 发布

前 言

本标准根据GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》要求编写。

本标准由新疆维吾尔自治区畜牧厅提出。

本标准由新疆维吾尔自治区畜牧厅归口。

本标准由新疆畜牧科学院畜牧科学研究所负责起草。

本标准主要起草人：田可川、黄锡霞、詹振宏、吴伟伟、徐新明、田月珍、张艳花、哈尼克孜、狄江、石刚、付雪峰、于丽娟、玛尔孜亚、阿扎提、拉扎提、阿米娜、马依拉·吐尔逊、艾买提·买买提、刘春洁。

地方标准信息服务平台

绵羊耳缘皮肤组织成纤维细胞体外培养技术规程

1 范围

本标准规定了绵羊耳缘皮肤组织的成纤维细胞体外培养的术语和定义、工作区条件、材料与方法。本地方标准适用于绵羊耳缘皮肤组织成纤维细胞原代培养、细胞冻存、细胞复苏、细胞传代等。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 成纤维细胞 fibroblast

以绵羊组织或胎儿为材料，体外培养、分离出的梭形或不规则形细胞。胞质近中央处有椭圆形胞核，胞体一般铺展很开，细胞之间排列疏松，有较大细胞间隙。

3.2 超低温保存 cryopreservation

在液氮中冷冻保存遗传物质的技术。

3.3 原代细胞培养 primary cell culture

将成纤维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。

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。

5 材料与方法

5.1 材料

成年绵羊耳缘皮肤组织。实验室进行处理。

5.2 药品与试剂

5.2.1 药品

Dulbecco's改良培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 粉剂;胰蛋白粉末 (1:250);胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS);Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) 溶液;羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, Hepes)。

5.2.2 试剂及配制方法

实验用水按照GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》中一级用水的要求制备。

5.2.2.1 DMEM 培养液配制方法

先往烧杯中放入100mL~200mL高温灭菌的DPBS，称量药品，待前一药品融后，再称下一药品，补足DPBS至1000mL，搅匀，用0.22μm微孔针式过滤器过滤除菌，置于4℃冰箱保存。

5.2.2.2 胰蛋白酶溶液配制方法

用20mL的DPBS将胰蛋白酶粉末调成糊状，补足DPBS至100mL。搅匀，用0.22 μ m微孔针式滤器过滤除菌，4 $^{\circ}$ C冰箱内过夜，置于-20 $^{\circ}$ C保存。

5.2.2.3 胎牛血清（FBS）处理方法

将装有胎牛血清的试剂瓶放入56 $^{\circ}$ C的水浴锅内，温浴30min，分装成小管放入-20 $^{\circ}$ C的冰箱内保存。

5.3 仪器设备

CO₂恒温培养箱；显微镜；高速离心机；超净工作台；蒸汽灭菌器；精密电子天平；冰箱。离心管；试管架；移液枪及枪头（1000 μ L，200 μ L，20 μ L）；培养皿；容量瓶；溶液瓶；称量用具；血球计数板及其它实验室常用物品。

5.4 培养方法

5.4.1 细胞原代培养

本标准采用了3种不同的培养方法对进行细胞原代消化培养。

5.4.1.1 皮肤小块消化培养方法

5.4.1.1.1 绵羊耳缘皮肤样品：用75%的乙醇消毒皮肤并且剃毛，切割皮肤样品。皮肤样品放在盛有DPBS的50mL离心管，轻轻晃动清洗。

5.4.1.1.2 把样品放在60mm的组织培养皿的盖上，表皮面向上，展开样品，用两把眼科镊子将皮下组织从真皮面上刮除，用外科解剖刀把皮肤切成0.5cm宽的小条。

5.4.1.1.3 将样品分入两个平皿中：一份用0.25%胰蛋白酶溶液在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育30min~60min消化，另一份用0.25%胰蛋白酶溶液在冰箱中4 $^{\circ}$ C过夜消化，把样品放在培养皿的盖上，表皮组织面向上，用两把眼科镊子刮落表皮组织。

5.4.1.1.4 把皮肤样品放入盛有DPBS的离心管中，轻轻摇动清洗样品。

5.4.1.1.5 把真皮样品放在培养皿的盖上，用解剖刀把样品切成2mm³~3mm³的小方块。

5.4.1.1.6 把5块~10块皮肤小片放在35mm培养皿中央，在皮肤样品上轻轻盖上一个灭菌的22mm盖玻片。

5.4.1.1.7 加50 μ L~100 μ L 4 $^{\circ}$ C完全培养液到盖玻片下的空间，不要有气泡，再加1m~2mL的4 $^{\circ}$ C完全培养液到皿中，动作要轻。

5.4.1.1.8 放入CO₂培养箱，每隔3d~4d在显微镜下观察细胞生长情况，每隔3d~4d换一次液，不要晃动盖玻片，一直要保留到培养的细胞汇合在一起。

5.4.1.1.9 根据汇合情况移开盖玻片，用4 $^{\circ}$ C DPBS洗平皿两遍去除血清。

5.4.1.1.10 加1mL 4 $^{\circ}$ C胰酶溶液，在37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育3min~5min，期间定期在显微镜下观察，只要成纤维细胞变圆，立即加入1mL冰冷的完全培养液抑制胰酶消化，吹打收获细胞，用镊子移开原皮肤样品。

5.4.1.1.11 收集成纤维细胞悬液加入新的培养皿，加入一定量的培养液，放入CO₂培养箱培养。每隔3d~4d观察细胞生长情况并换液。

5.4.1.2 皮肤组织块直接培养法

5.4.1.2.1 绵羊耳缘皮肤样品：用75%的乙醇消毒皮肤并且剃毛，切割皮肤样品。

5.4.1.2.2 用DPBS洗涤3次，并剔除脂肪，结缔组织，血液等杂物。

5.4.1.2.3 用手术剪将样品剪成1mm³小块，再用DPBS洗3次，转移至新皿中。

5.4.1.2.4 加入培养液，放入CO₂培养箱中。每隔3d~4d观察细胞生长情况并换液。

5.4.1.3 细胞消化培养法

5.4.1.3.1 绵羊耳缘皮肤样品：用75%的乙醇消毒皮肤并且剃毛，切割皮肤样品。

5.4.1.3.2 用DPBS洗涤3次，并剔除脂肪，结缔组织，血液等杂物。

5.4.1.3.3 用手术剪将样品剪成1mm³小块，再用DPBS洗3次，转移至离心管中。

- 5.4.1.3.4 将所得样品分为两份：一份视组织块的量加入（5~6）倍的 0.25%胰蛋白酶溶液，在 37℃ 中消化 20min~40min，每隔 5min 振荡一次，或用枪吹打一次，使细胞分离；另一份组织块加入同样的 0.25%胰蛋白酶溶液，在 4℃ 冰箱中过夜消化，次日取出进行后面步骤。
- 5.4.1.3.5 加入 3mL~5mL 培养液以终止胰蛋白酶消化作用。
- 5.4.1.3.6 静置 5min~10min，使未分散的组织块下沉，取悬液加入到离心管中。
- 5.4.1.3.7 1000r/min，离心 10min，弃上清液。
- 5.4.1.3.8 加入 DPBS 液 5mL，冲散细胞，再离心一次（1000r/min，5min），弃上清液。
- 5.4.1.3.9 加入培养液 1mL~2mL（视细胞量），血球计数板计数。
- 5.4.1.3.10 将细胞调整到 5×10^5 个/mL 左右，转移至 25mm 培养皿中，放入 CO₂ 培养箱 37℃、5%CO₂ 下培养。每隔 3d~4d 观察细胞生长情况并换液。
- 5.4.2 细胞冻存步骤
 - 5.4.2.1 在细胞汇合前，将细胞同培养液一起吸出，放入 4mL 离心管中。
 - 5.4.2.2 往培养皿中加入 1mL 胰蛋白酶溶液进行消化，摇晃 4、5 次，使胰蛋白酶溶液与细胞充分接触。
 - 5.4.2.3 离心（1000r/min 5min），吸出含酶的上清溶液。
 - 5.4.2.4 将细胞生长面洗脱，用 1.5mL 培养液再次悬浮，离心（1000r/min，5min），再用 1mL 冻存液重新悬浮细胞。
 - 5.4.2.5 加入适量冻存液，为冻存准备。
 - 5.4.2.6 将 1mL 细胞移至 1.5mL 离心管中，放在冻存盒中放入 4℃ 冰箱 2h 左右，取出放入 -20℃ 冰箱过夜，次日将其移至 -80℃ 冰箱内，最后放入袋里投入液氮罐中。
- 5.4.3 细胞复苏方法
 - 5.4.3.1 解冻

将冻存管从液氮中取出，迅速投入 42℃ 水浴中，不停地晃动（约 1min，或放到管内溶液恰好完全溶解）时放入超净工作台内。
 - 5.4.3.2 加液

加培养液低速离心（1200r/min，2min），弃去上清，再用培养液重复洗一次。用移液器将细胞移入加有培养液的培养皿中，轻轻吹打均匀，放置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养，过夜培养后，换液继续培养。
 - 5.4.4 细胞传代方法
 - 5.4.4.1 吸去或倾出旧培养液

用 DPBS 轻缓漂洗培养物 2~3 次，尽量洗去残余血清，弃去平衡盐溶液；把平皿倾斜，用移液器将液沿着皿壁缓缓注入平皿内，放平，轻轻晃动几下，倾斜平皿吸出 DPBS。
 - 5.4.4.2 消化细胞

向培养器皿内加入 0.25% 胰蛋白酶后，在 37℃ 条件下消化 5min~15min；加胰酶盖住整个平皿底部，放入培养箱 10min 左右。
 - 5.4.4.3 终止消化

吸去或倾出消化液，立即加入血清培养液；用移液器吸取培养器皿内的培养液，反复吹打（吹打时动作不宜过猛）器皿底部，使已经消化的细胞脱离器皿底壁。将用培养液悬浮的细胞接种在新的培养皿内，把培养皿送入 37℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养。
 - 5.4.5 绘制传代细胞生长曲线步骤
 - 5.4.5.1 将冻存复苏后的传代细胞培养至细胞汇合，用 0.25% 胰蛋白酶液消化，制成细胞悬液转移至 24 孔培养板，每孔加入 0.5mL 的细胞悬液，入 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

5.4.5.2 每隔 24h 用胰蛋白酶液消化 3 孔细胞，血球计数板进行计数，每孔细胞重复 3 次计数，以提高计数准确性，求平均值，连续计数 7d。

5.4.5.3 绘制细胞生长曲线：以培养天数为横坐标，细胞数位为纵坐标绘制细胞生长曲线图。

5.4.5.4 按下列公式(1)计算细胞密度：

$$\text{细胞密度(个/mL)} = (\text{4大方格细胞总数}/4) \times 10^4 \text{(个/mL)} \dots\dots\dots (1)$$

地方标准信息服务平台