

酶消化法制备奶牛乳腺上皮细胞及其 RNA 提取技术规程

Technical procedures for preparation by enzyme digestion method and
RNA extraction of bovine mammary epithelial cells

地方标准信息服务平台

2023-08-25 发布

2023-09-25 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。

本文件由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会（SAM/TC 19）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院。

本文件主要起草人：宋洁、王丽芳、胡耀、张腾龙、郭晨阳、钟华晨、刘嘉琳、杨健、狄彩霞、羿静、肖豆鑫、吴海霞、王春和、田志国、王利平、高新发、王晓辉、常月明、杨竹鸣、石文奎、褚文彬、马跃。

地方标准信息服务平台

酶消化法制备奶牛乳腺上皮细胞及其 RNA 提取技术规程

1 范围

本文件规定了奶牛乳腺上皮细胞培养及其RNA提取和质量鉴定的方法。
本文件适用于II型胶原酶法制备奶牛乳腺上皮细胞及其RNA提取和质量鉴定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

奶牛乳腺上皮细胞 bovine mammary epithelial cells

奶牛乳腺组织中唯一可以合成和分泌乳汁的高度分化的功能细胞。

3.2

角蛋白-18 cytokeratin18 (CK18)

上皮细胞特有的标志蛋白。

4 试剂和材料

4.1 试验试剂

DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液(含有10000 unit/mL青霉素和10000 ug/mL链霉素)、胰岛素转铁蛋白硒、氢化可的松、两性霉素B、表皮生长因子、胶原酶II、0.25%胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)、75%酒精、4%多聚甲醛、0.3%曲拉通(TritonX-100)、5%正常山羊血清、兔抗角蛋白18抗体、山羊抗兔IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、甘油、TRNzol裂解液、氯仿、异丙醇、无水乙醇、ddH₂O、西班牙琼脂糖、50×TAE、DNA片段标准参照物(DNA Marker DL 5000)、通用电泳加样缓冲液(6×Loading Buffer)、核酸染料、反转录试剂盒、实时荧光定量(RT-PCR)试剂盒。

4.2 试剂配制

4.2.1 3×PBS 缓冲液: 1×PBS 缓冲液(500 mL)中加入 3 mL 青链霉素混合液, 4 °C低温保存。

4.2.2 6×PBS 缓冲液: 1×PBS 缓冲液(500 mL)中加入 6 mL 青链霉素混合液, 4 °C低温保存。

- 4.2.3 II型胶原酶(0.5%)：称取75 mg II型胶原酶，在灭菌烧杯中加15 mL PBS缓慢吹打溶解，0.22 μm针式过滤器过滤，现配现用。
- 4.2.4 氢化可的松(0.1 mg/mL)：1 mg 氢化可的松溶于1 mL 乙醇溶液中，充分混匀至粉末完全溶解，用1×PBS定容至10 mL，用0.22 μm滤膜过滤后，按每管1 mL分装，封口冻存于-20 ℃。
- 4.2.5 两性霉素B(2.5 mg/mL)：25 mg 两性霉素B粉末溶于10 mL三蒸水中，吹打溶解后用0.22 μm针式过滤器过滤，按每管1 mL分装，封口冻存于-20 ℃。
- 4.2.6 表皮生长因子(10 μg/mL)：将0.1 mg的表皮生长因子溶解在10 mL的PBS中，按每管1 mL分装，封口冻存于-20 ℃。
- 4.2.7 完全培养基：将90 mL DMEM/F12培养基、10 mL FBS、4 mL青链霉素、0.5 mL胰岛素转铁蛋白硒、0.1 mL氢化可的松(4.2.4)、0.1 mL两性霉素B(4.2.5)、10 μL表皮生长因子(4.2.6)加入250 mL蓝盖瓶，混匀后4 ℃保存。
- 4.2.8 消化终止培养基：8 mL DMEM/F12培养基中加入2 mL FBS混匀，现配现用。
- 4.2.9 细胞冻存液：8 mL DMEM/F12培养基中加入1 mL FBS、1 mL DMSO混匀，现配现用。
- 4.2.10 1×TAE：1 mL 50×TAE加49 mL ddH₂O，定容后混匀。
- 4.2.11 琼脂糖凝胶(1%)：250 mL三角瓶中称0.3000 g琼脂糖，加入30 mL 1×TAE缓冲液(4.2.10)。
- 4.2.12 琼脂糖凝胶(2%)：250 mL三角瓶中称0.6000 g琼脂糖，加入30 mL 1×TAE缓冲液(4.2.10)。

4.3 试验材料

酒精灯、0.22 μm针式过滤器、25 cm²透气细胞培养瓶、6孔细胞培养板、瓷盘、15 cm镊子、眼科镊、眼科剪、手术剪、5 mL无菌无酶样品管、15 mL无菌无酶离心管、1.5 mL无菌无酶离心管、250 mL烧杯、250 mL蓝盖瓶、细胞冻存管、80目滤网、14 mm无菌细胞爬片、载玻片、无菌无酶枪头(10 μL、200 μL、1 mL、5 mL)。

4.4 仪器设备

天平(感量为0.0001 g)、生物安全柜、CO₂培养箱、高压蒸汽灭菌锅、倒置显微镜、低速离心机(转速不低于1300 rpm)、高速冷冻离心机(转速不低于12000 rpm)、4 ℃冰箱、-80 ℃冰箱、酶标仪、凝胶成像仪、电泳仪、电泳槽、制胶板、移液枪、血细胞计数板。

5 奶牛乳腺上皮细胞培养

5.1 原代培养

- 5.1.1 选取健康奶牛活体或屠宰后，采集色泽亮白的深层乳腺组织，迅速带回实验室。
- 5.1.2 将乳腺组织置于已用75%酒精擦拭消毒的搪瓷盘中，去除乳腺表层组织，避开泌乳导管和结缔组织部位，剪取1 cm³左右的深层腺泡，置于6×PBS缓冲液(4.2.2)中浸泡10 min，并清洗至溶液中无乳汁后，放入超净台。
- 5.1.3 在超净台中点燃酒精灯，依次摆放7个250 mL灭菌烧杯，从左往右分别倒入3杯150 mL 3×PBS缓冲液、1杯75%酒精、3杯3×PBS缓冲液(4.2.1)。
- 5.1.4 用灭菌长柄镊子夹取组织块，按序在7个烧杯中清洗30 s后转移至无菌一次性培养皿中。
- 5.1.5 在培养皿中再次剪去乳腺组织块表皮，剪取约2 mL组织块(1-2 mm³/块)至于5 mL样品管中，用眼科剪将组织块剪至糊状。
- 5.1.6 加入等量0.5%II型胶原酶(4.2.3)，颠倒混匀，放入37 ℃恒温培养箱中消化1 h。
- 5.1.7 消化结束后，于80目滤网上过滤消化液，并将滤液转移到15 mL离心管中，1300 rpm离心3

min。弃上清，用 5 mL 3×PBS 缓冲液重悬，1300 rpm 离心 3 min，重复 1~2 次。

5.1.8 细胞沉淀中加入 5 mL 完全培养基（4.2.7），吹散后移入 25 cm² 细胞培养瓶里，置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

5.1.9 培养第 5 天，取出培养瓶在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况，贴壁后更换完全培养基，此后每 2 天换一次液。

5.2 传代培养

5.2.1 倒置显微镜下观察细胞长满至 80% 以上后取出，弃上清，加入 5 mL 3×PBS 清洗。

5.2.2 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶，轻轻摇晃 30 s~60 s，弃上清，加入 5 mL 3×PBS 清洗一次，去除成纤维细胞。

5.2.3 再加入 2 mL 0.25% 胰蛋白酶后放入 37 °C 恒温培养箱中消化 8 min，显微镜下观察细胞脱壁呈亮圆点时，加入 2 mL 终止培养基（4.2.8）终止消化。

5.2.4 轻柔吹打培养瓶底后转移至 15 mL 离心管中，1300 rpm 离心 3 min。

5.2.5 弃上清，加入 5 mL 3×PBS 缓冲液重悬，1300 rpm 离心 3 min。

5.2.6 弃上清，在细胞沉淀中加入 5 mL 完全培养基吹打混匀，移入 25 cm² 细胞培养瓶里，置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

5.3 冻存

将传代后的细胞进行冻存。将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 8 min，3×PBS 洗涤并离心后，加入 1 mL 细胞冻存液（4.2.9），封口后置于细胞冻存盒中，迅速冻存于 -80 °C。

5.4 复苏

5.4.1 使用细胞时，将细胞从 -80 °C 冰箱取出，并迅速（90 s 内）在 37 °C 水浴锅中晃动融化，再转移到 15 mL 离心管中，加入 1 mL 完全培养基，1300 rpm 3 min 离心获得细胞沉淀。

5.4.2 用 PBS 洗涤细胞 1~2 次，1300 rpm 离心 3 min 弃上清，加入 5 mL 完全培养基悬浮细胞，转移至 25 cm² 细胞培养瓶，置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

5.5 接板

将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 8 min，3×PBS 洗涤并离心后，采用血细胞计数板计数，以 1×10⁵/mL 密度将细胞接种于 6 孔细胞培养板，每孔加 2.5 mL 完全培养基，每 24 h 换完全培养基。细胞汇合度达 80% 时进行试验处理。

5.6 角蛋白-18 鉴定（免疫荧光法）

5.6.1 先将 14 mm 无菌细胞爬片平放于未接种细胞 6 孔板底，按照 5.5 方法处理细胞，待细胞爬片上细胞汇合度达 80% 时，吸弃 6 孔板上清，用 3×PBS 洗涤细胞爬片。

5.6.2 细胞爬片用 4% 多聚甲醛于冰上固定 15 min，并用预冷 PBS 洗涤 2 次，每次 5 min。

5.6.3 用 0.3% TritonX-100 处理 5 min，PBS 清洗 3 次，5 min/次。

5.6.4 在 37 °C 下用 5% 正常山羊血清封闭 1 h 后，滴加兔抗角蛋白 18 抗体（1:100 稀释），在 4 °C 下孵育过夜，并用 PBS 洗涤 5 次，5 min/次。

5.6.5 滴加山羊抗兔 IgG（1:200 稀释），于 37 °C 避光振荡孵育 1 h，用 PBS 洗涤 3 次，5 min/次。

5.6.6 DAPI 避光孵育 2 min。最后用甘油封片于载玻片上，立即在倒置荧光显微镜下观察（见附录 A）。

6 乳腺上皮细胞总 RNA 提取及质量鉴定

6.1 总 RNA 提取

- 6.1.1 将铺满 6 孔板的细胞上清液弃去，3×PBS 缓冲液冲洗。
- 6.1.2 加入 1 mL TRNzol 裂解液，吹打混匀后，静置 5 min，吸入 1.5 mL 无菌无酶离心管中，充分震荡后静置 5 min，12000 rpm 4 °C 离心 5 min。
- 6.1.3 转移上清于新的 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 氯仿萃取 RNA，充分震荡混匀后静置 5 min，12000 rpm 4 °C 离心 15 min。
- 6.1.4 小心吸取上层水相于新的 1.5 mL 无菌无酶离心管中，加入等体积异丙醇上下颠倒混匀后静置 10 min，使 RNA 沉淀，12000 rpm 4 °C 离心 10 min。
- 6.1.5 弃上清，加入 1 mL 75%乙醇，轻柔晃动后静置 1 min~2 min，12000 rpm 4 °C 离心 5 min。
- 6.1.6 小心吸弃上清液，晾干后加 ddH₂O 20 μL~40 μL。

6.2 RNA 纯度检测

使用酶标仪核酸定量功能检测 RNA 纯度。将酶标仪专用 Nanoquant 板用 ddH₂O 校准后，RNA 点样 2 μL，测定 RNA 纯度。核酸的紫外吸收高峰为 260 nm，蛋白质的紫外吸收高峰为 280 nm。判断结果见附录 A。

6.3 RNA 质量检测

- 6.3.1 微波炉加热 1%琼脂糖凝胶（4.2.11）约 30 s，待溶液透明澄清取出，晾到 60 °C~70 °C 后，加 2 μL 核酸染料，摇匀。
- 6.3.2 先插入梳子，再倒胶，厚度 3 mm~5 mm，避免气泡。
- 6.3.3 将制好的胶放入电泳槽，点样孔位于负极处，倒入 1×TAE 缓冲液（4.2.10），高出胶面 1 mm。
- 6.3.4 将 5 μL RNA 样品与 1 μL 6×loading buffer 混匀后加样 5 μL，并以 DNA Marker DL 5000 作为对照。
- 6.3.5 打开电泳仪开关，设置电压 120 v，时间 18 min。
- 6.3.6 当条带电泳到一半时停止，于凝胶成像仪照胶观察。完整的 RNA 电泳图谱中 28 s 和 18 s 两条带明亮且边缘清晰，28 s 条带的亮度约为 18 s 条带的 2 倍，5 s 条带亮度比较低，则认为 RNA 质量较好（见附录 A）。

7 乳腺上皮细胞分泌功能鉴定（α s1-酪蛋白 RT-PCR 产物电泳法）

7.1 引物设计

根据 GeneBank (NCBI) 中的 α s1-酪蛋白基因编码区序列，设计引物。

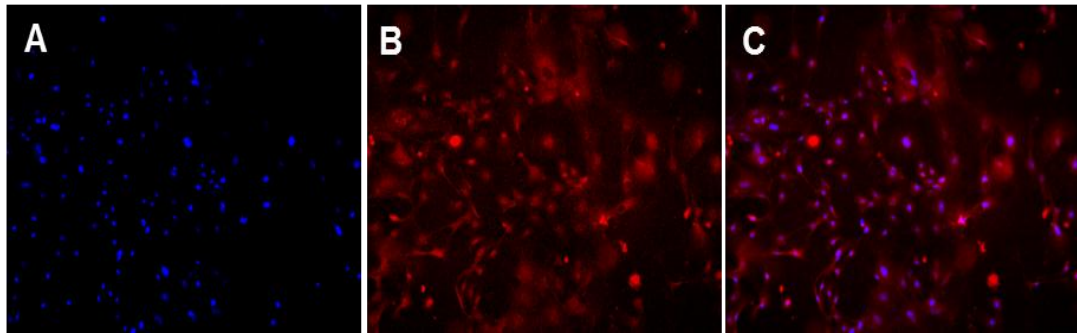
7.2 RT-PCR 产物电泳检测

提取奶牛乳腺上皮细胞总 RNA，并进行质量鉴定（6）。用反转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒进行扩增反应，扩增产物于 2%琼脂糖凝胶（4.2.12）、4-10 V/cm 电压条件下，电泳 20 min，检测 α s1-酪蛋白目的基因 CSN1S1 片段大小。

附录 A
(规范性)

奶牛乳腺上皮细胞鉴定及 RNA 质量鉴定

A.1 奶牛乳腺上皮细胞角蛋白-18 鉴定见图 A.1。



图A.1 奶牛乳腺上皮细胞角蛋白-18 鉴定

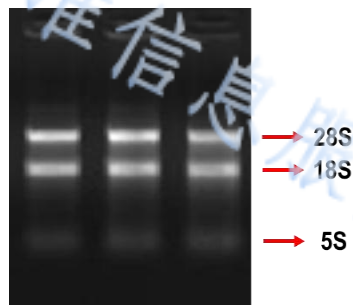
注：A：蓝色荧光标记的细胞核；B：红色荧光标记的角蛋白-18；C：合图。

A.2 RNA 纯度判定标准见表 A.1。

表A.1 RNA 纯度判定标准

项目	范围	结果
OD260/OD280 值	1.8~2.0	RNA 纯度较好
	<1.8	样品有蛋白质或酚污染
	>2.0	RNA 存在降解

A.3 奶牛乳腺上皮细胞 RNA 电泳图谱见图 A.2。



图A.2 奶牛乳腺上皮细胞 RNA 电泳图谱