

ICS 65.020.30
CCSB 44

团体标准

T/CAA XXX—2022

梅花鹿体细胞冻存技术规范

Specification of somatic cell cryopreservation for sika deer

(征求意见稿)

2022-xx-xx发布

2022-xx-xx实施

中国畜牧业协会 发布

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。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：黑龙江八一农垦大学、哈尔滨工业大学、哈尔滨博蒙生物科技有限公司、黑龙江普惠特产有限公司、黑龙江省农垦科学院哈尔滨特产研究所、黑龙江省农业科学院。

本文件主要起草人：韩欢胜、王雪、郭喜明、郑家三、许艳丽、张爱忠、赵树臣、徐馨、赵晓静、王伟、梁宇祥、柴孟龙、道楞、赵育国、孙义乐、王敏、史文清、韦春波、张莹、李美鑫、贾志英、王峥、宋军、杜佩泽、尚念鹏。

梅花鹿体细胞冻存技术规范

1 范围

本文件规定了鹿体细胞冻存的基本要求、组织采集前准备、组织采集、细胞培养、细胞冷冻保存、冷冻细胞检测、冷冻细胞储藏与档案管理。

本文件适用于梅花鹿体细胞遗传资源的冷冻保存。

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。

NY/T 1900 畜禽细胞与胚胎冷冻保种技术规范。

3 术语定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞原代培养 primary cell culture

是指直接从体内取出的细胞、组织和器官分散成细胞后的第一次的培养物。

3.2

细胞传代培养 cell subculture culture

是指需要将培养的细胞分割成小的部分，重新接种到另外的培养器皿（瓶）内，再进行培养的过程。

3.3

细胞系 cell line

指原代细胞培养物经首次传代成功后所增殖的细胞群体，可泛指一般可能连续传代的细胞。

3.4

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 要求

4.1 实验室应干净、清洁、无菌，满足细胞培养条件。

- 4.2 细胞样品处理、培养和冻存操作应在超净工作台中进行。
- 4.3 体细胞冻存的鹿应健康、无传染性疾病。
- 4.4 操作人员应严格消毒，做好防护，带手套、口罩，穿工作服。

5 组织采集前准备

应调试设备，准备消毒器械，配制试剂，具体参见附录 A。

6 组织采集

6.1 保定

应对采样鹿进行保定，机械保定或麻醉保定。

6.2 取样

6.2.1 采集鹿耳缘（尖）组织。

6.2.2 除耳毛。鹿保定好后按实际采样组织面积的 1.2 倍用剃毛工具除净采样部位耳毛。

6.2.3 消毒。按 75 % 酒精、5 % 碘酒、75 % 酒精、生理盐水的先后顺序，对剃毛后的采样部位进行消毒脱碘清洗。

6.2.4 取样。用采样钳快速剪取耳缘（尖）组织样。

6.2.5 涮洗。将组织样本用 75 % 酒精喷雾消毒，并快速放入含 2 % 双抗的 PBS 缓冲溶液中涮洗 3 遍。

6.2.6 封存。将涮洗后的组织样快速的放入含有 2 % 双抗的 PBS 缓冲液的 15 mL 的离心管中，用封口膜封口。

6.2.7 标记。记录样本名称、性别、年龄、采样地点、采样部位、个体编号及采样时间等信息，具体参见附录 C。

6.2.8 运送。放入保温箱冷藏条件下 4 h 内运回实验室，尽快进行原代培养。

7 细胞培养

7.1 原代培养

7.1.1 将组织样放入培养皿再次消毒，用含有 2 % 双抗的 PBS 缓冲溶液中反复洗涤 3 次。

7.1.2 在皿中用镊子进一步去掉组织块表皮上的耳毛。

7.1.3 用 PBS 缓冲液清洗后将组织块转移到新皿中，剪成 1 mm³ 左右的碎块。

7.1.4 用 1.6 mg/mL 的胶原酶 IV 消化 5 min。

7.1.5 将终止消化的组织块移入到 15 mL 离心管中，在 1200 转/分条件下离心 5 min。

7.1.6 离心后用 10 % FBS 培养液将组织块重悬接种到 24 孔板中。

7.1.7 将培养板放入 5 % CO₂、37.0 °C 的饱和湿度培养箱中进行培养。

7.1.8 隔天换液，重新加入 10 % FBS 培养液，2 d 后停止换液。

7.1.9 停止换液后按正常程序继续培养。

7.2 传代培养

7.2.1 原代培养中细胞增殖至培养板底壁的 80 %~85 % 时，可进行传代培养。

7.2.2 传代培养步骤

传代培养按以下步骤操作：

- a) 弃掉培养液，用 PBS 清洗后加入 0.25 % 胰蛋白酶 37.0 °C 消化 3 min~5 min；
- b) 在显微镜下观察，当细胞由梭形变为圆形时立即添加 10 % FBS 培养液终止消化，制成细胞悬液；
- c) 将细胞悬液移至离心管中，1000 g/min 离心 5 min 后弃去上清，用 10 % FBS 培养液重悬细胞；
- d) 用血球计数板或细胞计数仪计数细胞，调整细胞密度为 5.0×10^5 个/mL，按本文件 7.1 的条件进行传代培养。

8 冷冻保存

8.1 原代培养细胞和传代培养细胞均可进行冷冻保存。

8.2 细胞冷冻保存

8.2.1 对数生长期的细胞在冻存前 24 h 须更换新鲜全培养液。

8.2.2 按原代细胞消化方法逐步处理细胞，用 PBS 清洗胰酶消化，制备成单细胞悬液。

8.2.3 将细胞悬液收集于 15 mL 离心管中，1000 g/min 离心 5 min 后弃去上清。

8.2.4 逐次加 4 °C 预冷的冻存液，用血球计数板计数，调整密度到 1.0×10^5 个/mL~ 5.0×10^5 个/mL。

8.2.5 轻轻吹打使细胞重悬，将细胞液按 1 mL/每管分装在冻存管中，严密封口。

8.2.6 在冻存管上按附录 B 编号方法，标明细胞名称、冻存管编号、性别、冻存日期、代次等。

8.2.7 将冻存管投入冻存盒中-80 °C 过夜后，液氮中保存。

8.2.8 做好相应记录，记录表参见附录 C 中表 C.2。

8.3 复苏

8.3.1 从液氮中取出细胞冻存管，快速投入 37 °C~40 °C 水浴中不断摇动，待冷冻液彻底解冻后取出，用 75 % 酒精消毒冻存管。

8.3.2 吸出细胞悬液，放入离心管中，加入 10 倍体积的细胞培养液，1 000 g/min 离心 5 min，弃上清，再重复清洗一次，重悬。

8.3.3 将细胞稀释至所需浓度，进行培养。

9 质量检测

应按 NY/T 1900 规定的方法进行。

10 储藏

10.1 抽检细胞复苏后细胞存活力 $\geq 75\%$ 可进行储藏。

10.2 应进行分装储藏。

10.3 不应与牛羊等其他动物的细胞同储。

10.4 应防止异物进入液氮罐内，液氮总量不足 1/3 时，应及时补充。

10.5 取放冷冻细胞时，连同盛细胞的提筒或其它细胞包装提到液氮罐颈部，快速取放。

10.6 冷冻细胞需向另一个容器转移时，在容器外停留时间不应超过 5 s，如时间太长，应先装在已盛好液氮的容器中，在浸泡状态下处理。

11 档案管理

应对记录材料进行归档，并安排专人负责管理。记录表参见附录 C 中表 C.3。

附录 A
(资料性)

细胞冷冻常用器材、药品和试剂表

A.1 组织取样表

细胞冷冻常用器材、药品和试剂见表 A.1。

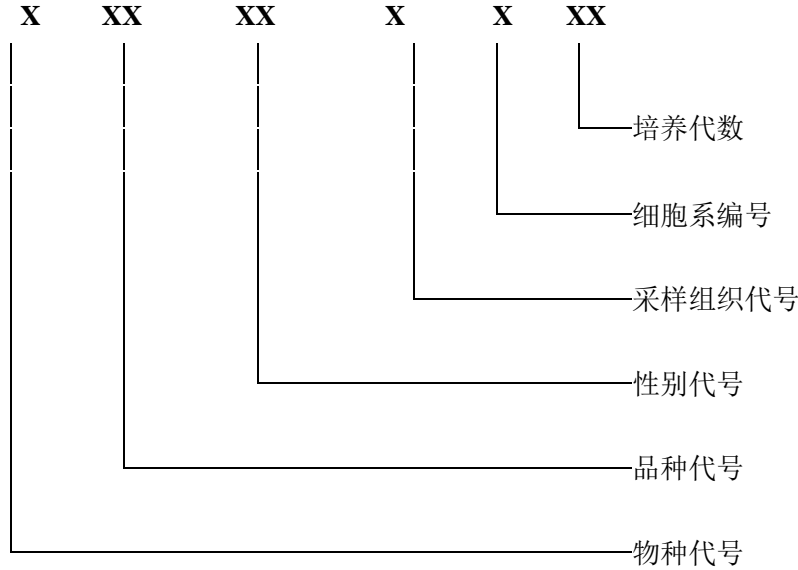
A.1 细胞冷冻常用器材、药品和试剂表

序号	品名	单位	数量	规格
1	手术剪	个	2	
2	剃毛剪/打毛剪	个	1	
3	手术刀	个	2	
4	一次性手套/口罩	包	适量	
5	镊子	把	适量	
6	75 %酒精棉球	瓶	适量	
7	碘酒棉球	瓶	适量	
8	2 %双抗 PBS 溶液		适量	
9	生理盐水	瓶	适量	
10	75 %酒精	瓶	适量	
11	麻醉药/苏醒药	盒	适量	
12	无菌离心管	个	适量	
13	冰袋	袋	适量	
14	保温箱	个	1	
15	超净工作台	个	1	
16	CO ₂ 培养箱	台	1	
17	恒温水浴锅	台	1	
18	显微镜	台	1	
19	消毒剪刀	把	1	
20	离心机	台	1	
21	液氮灌	个	2	10 L、30 L
22	酒精灯	个	1	
23	移液枪	把	适量	
24	细胞计数板	个	适量	
25	冰箱	台	1	
26	细胞冻存管	个	若干	
27	工作服	件	适量	
28	记号笔	支	适量	
29	消毒刀片	个	适量	
30	封口膜	包	适量	
31	24 孔培养板	个	若干	
32	培养皿	个	若干	
33	离心管	包	若干	5 mL、10 mL、15 mL
34	新吉尔灭消毒液	瓶	适量	
35	75 %酒精	瓶	适量	
36	PBS 溶液			
37	细胞冻存液			
38	胶原酶消化液			
39	0.25 %胰蛋白酶			
40	10 % FBS 培养液			

附录 B
(资料性)
细胞冻存管编号方法

B.1 细胞冻存管编号方法

细胞系命名采用6级命名法，细胞冻存管编号由物种代号、品种代号、性别代号、采样组织代号、细胞系编号、培养代数六部分九位字母和数字组成，排列顺序如下：



注1：物种代号由一位大写字母组成，应由物种英文名称首字母代表，如梅花鹿英文名Sika deer由S代表。

注2：品种代号：由二位大写字母组成，应由品种名汉字字母代表，8个梅花鹿品种对应的代号为吉林梅花鹿（JL）、双阳梅花鹿（SY）、西丰梅花鹿（XF）、东丰梅花鹿（DF）、四平梅花鹿（SP）、兴凯湖梅花鹿（XK）、敖东梅花鹿（AD）、东大梅花鹿（DD）。

注3：性别代号：由二位数字组成，公鹿应由数字11代表、母鹿应由数字12代表。

注4：采样组织代号：由一位大写字母组成，应由采样组织的英文名首字母代表，如耳组织由E代表。

注5：细胞系编号：由一位数字组成，应与细胞系对应，如1细胞系第用1代表。例：同一物种同一性别，取3头不同的个体耳缘组织，就有3个细胞系。

注6：培养代数：由一位大写字母和一位数字组成，传代培养应用F代表，传代培养的代数应用数字代表，如第1代细胞用F1代表。

示例：兴凯湖品种梅花鹿母鹿耳缘成纤维细胞系1第2代细胞，细胞冻存管编号为“SXK12E1F2”。

附录 C
(资料性)

组织取样、细胞冻存、冷冻细胞储藏记录表

C.1 组织取样表

组织取样记录见表 C.1。

表 C.1 组织取样记录表

序号	物种	品种	耳号	年龄	性别	地点	部位	时间	采样人	记录人	备注

C.2 细胞冻存记录表

细胞冻存记录表见表 C.2。

表 C.2 细胞冻存记录表

序号	细胞系名称	冷冻日期	冻存信息					操作者	记录人	备注
			冻存容器编号	冻存盒(袋)号码	冻存量 mL/管	冻存数 /管	密度 亿/mL			

C.3 冷冻细胞储藏记录表

冷冻细胞储藏记录见表 C.3。

表 C.3 冷冻细胞储藏记录表

序号	冻存管号	储存罐号	提漏号/袋号	小筒号	冻存信息					备注
					冻存时间	代次	数量	密度	复苏活力	