

ICS 65.020.30

CCS B 43

团 体 标 准

T/CAAA XXX-XXXX

家禽遗传资源保护技术规程 鸡胚胎 组织及成纤维细胞

Technical specifications for Conservation of Poultry Genetic
Resources—Chicken Embryo Tissue and Fibroblasts

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-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。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：扬州大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、江苏省家禽科学研究所、浙江省农业科学院、浙江省畜牧技术推广与种畜禽监测总站、浙江光大农业科技发展有限公司、广西金陵家禽育种有限公司、江苏立华牧业有限公司、浙江振鸣禽业有限公司、广西富凤农牧集团有限公司、如东县狼山鸡种鸡场、扬州翔龙禽业发展有限公司、扬州市廷丰农牧发展有限公司。

本文件主要起草人：牛英杰、李碧春、孙研研、陈国宏、韩威、王德前、应永飞、左其生、靳锴、陈继兰、刘莉君、易振华、黄超、程立力、娄起华、韦宗海、余洋、张吉发、张钰、李冰、翟飞。

家禽遗传资源保护技术规程 鸡胚胎组织及成纤维细胞

1 范围

本文件建立了鸡胚胎组织及成纤维细胞遗传资源保护操作流程，规定了工作区条件、基本要求、胚胎组织采集、成纤维细胞原代培养、传代培养、冷冻保存和解冻的技术要求，描述了质量检测和档案记录的方法。

本文件适用于鸡胚胎组织及成纤维细胞收集、保存和质量检测。

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 5458 液氮生物容器

GB/T 14174 大口径液氮容器

GB/T 40454 家禽孵化良好生产规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡胚胎组织 chicken embryonic tissue

取自孵化9日龄~11日龄的鸡胚胎，经去除头部、尾部、四肢、内脏及骨骼后，获得的适用于成纤维细胞分离培养的组织。

3.2

鸡成纤维细胞 chicken fibroblast

从孵化9日龄~11日龄的鸡胚胎组织中分离并经体外培养获得的细胞。细胞中央有卵圆形胞核，胞体通常铺展较充分，胞质向外延伸形成突起，生长时呈放射状。该类细胞具有较强的增殖能力与分化潜能，且在长期培养中能保持遗传特性的稳定。

4 技术流程

鸡胚胎组织及成纤维细胞遗传资源保护的技术流程包括胚胎组织采集、成纤维细胞培养和冷冻保存。技术流程见图1。

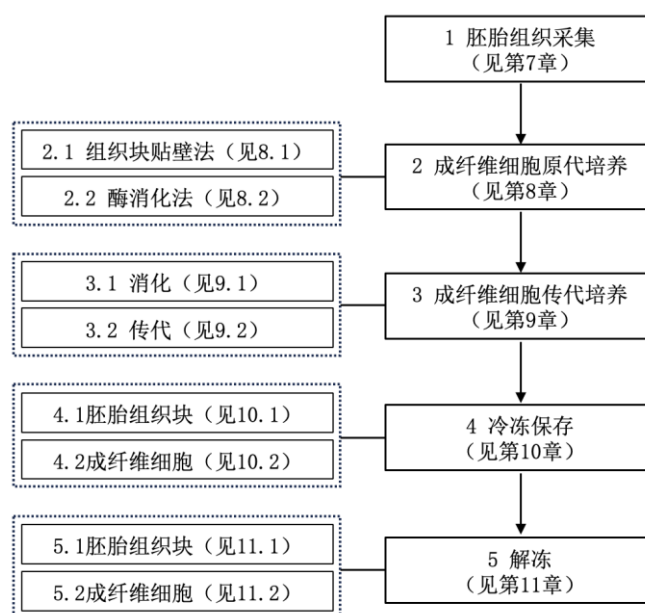


图1 技术流程图

5 工作区条件

无菌室洁净度应达到万级，超净工作台洁净度应达到百级。

6 基本要求

6.1 供体来源

- 6.1.1 《国家畜禽遗传资源品种名录》中所列的品种或配套系。
- 6.1.2 具有特殊表型变异的品系，如多趾和匍匐性状等突变群体。
- 6.1.3 培育的近交系和特定性状专门化选育品系。
- 6.1.4 商业化纯系。

6.2 数量

- 6.2.1 每个鸡品种（品系）应从不少于 30 个家系的鸡胚中采集胚胎组织和成纤维细胞。每个家系应采集不少于 2 个鸡胚，雌雄各半。
- 6.2.2 若家系数量少于 30 个，应从全部家系的鸡胚中采集胚胎组织和成纤维细胞。每个家系应采集不少于 2 个鸡胚，雌雄各半。
- 6.2.3 若无家系记录，每个鸡品种应从不少于 60 个鸡胚中采集胚胎组织和成纤维细胞，雌雄各半。

6.3 健康状况

采集胚胎组织和成纤维细胞的早期胚胎来源种群的健康状态应良好，无传染性及其遗传性疾病，并符合《种用动物健康标准》的要求。

7 胚胎组织采集

7.1 供体种蛋按 GB/T 40454 的规定孵化至 9 d~11 d。用 75%乙醇对蛋壳消毒后，置于超净工作台。

7.2 用无菌镊子在蛋壳中部轻敲开一小口，沿横向环绕一周，将蛋壳分离为上下两部分。取出完整鸡胚，去除附着于胚胎表面的羊膜、绒毛膜等胚胎外膜。将剥离后的鸡胚转移至盛有无菌磷酸盐缓冲液的培养皿中清洗 2 次。

7.3 去除鸡胚的头部、尾部、四肢、内脏及主要骨骼后，将胚胎组织移入离心管中，剪碎至 $1\text{ mm}^3\sim 2\text{ mm}^3$ 大小，用 PBS 清洗 3 次~4 次。操作过程中应保持组织块湿润。

8 成纤维细胞原代培养

8.1 组织块贴壁法

8.1.1 向胚胎组织块中加入 1 mL 完全培养基，用巴斯德吸管吹打均匀后转移至 T25 培养瓶中，均匀铺于瓶底。

8.1.2 将 T25 培养瓶置于 37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中，倒置培养 4 h~6 h 后加入 5 mL 完全培养基，缓慢翻转培养瓶继续培养。

8.1.3 首次换液应在接种后 36 h~48 h 进行，弃去含有未贴壁组织及细胞碎片的培养上清，更换为新鲜完全培养基。此后视细胞生长状态继续培养或传代。

8.2 酶消化法

8.2.1 向胚胎组织块中加入 0.25%胰蛋白酶溶液，于 37 °C 条件下消化 10 min~20 min。消化期间，每隔 5 min 轻柔振荡或吹打混匀一次。消化结束后，立即加入 2 倍~3 倍消化液体积的完全培养基以终止消化。

8.2.2 将消化混合物经 100 μm 无菌滤布或细胞滤器过滤，以去除未充分消化的组织团块。收集滤液，采用 300 g 离心 5 min~7 min，弃去上清液。

8.2.3 用适量完全培养基重悬细胞沉淀，进行细胞计数。按 2×10^5 个/平方厘米~ 3×10^5 个/平方厘米的密度将细胞悬液接种于培养皿中，置于 37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

8.2.4 首次换液应在接种后 36 h~48 h 进行，弃去含有未贴壁细胞及细胞碎片的培养上清，更换为新鲜完全培养基。此后视细胞生长状态继续培养或传代。

9 成纤维细胞传代培养

9.1 消化

9.1.1 待成纤维细胞汇合度达 80%~90%时，吸弃培养液，用 PBS 清洗 2 次，加入预热的 0.25%胰蛋白酶溶液消化 1 min~2 min。

9.1.2 倒置显微镜下观察，待大部分细胞变圆并脱离瓶壁时，加入 2 倍~3 倍体积的完全培养基终止消化，用移液枪轻轻吹打制成细胞悬液。

9.1.3 若采用组织块贴壁法进行原代培养，应将细胞悬液经 100 μm 滤布或细胞滤器过滤，去除残留组织块。

9.2 传代

将细胞悬液经 300 g 离心 5 min~7 min, 弃去上清液, 用完全培养基重悬细胞沉淀, 按 1:3~1:5 的传代比例接种至新的细胞培养皿中, 并标记细胞名称、代数、日期及品种信息, 置于 37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。每 2 d 换液 1 次, 待细胞汇合度达 80%~90% 时进行传代或冻存。

10 冻存

10.1 胚胎组织块

10.1.1 向按 7.3 制备并清洗后的胚胎组织块中, 加入 3 mL~6 mL 操作液。随后, 在持续摇晃离心管的条件下, 逐滴缓慢加入等体积冻存液, 确保充分混匀。

10.1.2 将组织块与冻存液的混合物在室温平衡 10 min~15 min, 用无菌吸管轻轻吹打, 使组织块分散于悬液中。按每管约 1 mL 的体积分装至 2 mL 无菌冻存管内, 并严密封口。

10.1.3 冻存管标记品种、组织名称、冻存管编号、冻存日期。用于集中存放冻存管的储存盒标记品种、遗传材料类型、冻存管数量、制作单位。

10.1.4 将标记好的冻存管立即移入程序降温冻存盒, 置于-80 °C 冰箱中冻存 8 h~12 h。初步冻存后, 迅速将冻存管转移至预先标记好的储存盒中, 并立即移入液氮中长期保存。

10.1.5 每个胚胎应冻存不低于 5 管胚胎组织。

10.1.6 液氮贮存容器应符合 GB/T 5458、GB/T 14174 的要求。

10.2 成纤维细胞

10.2.1 待细胞汇合度达 80%~90% 时按 9.1 进行消化处理。将细胞悬液转移至离心管中, 采用 300 g 离心 5 min~7 min, 弃去上清液。在细胞沉淀中加入 1 mL 操作液重悬, 计数后稀释至 2×10^6 个/毫升~ 6×10^6 个/毫升。

10.2.2 向细胞悬液中逐滴缓慢加入等体积冻存液, 边加边轻轻混匀, 用吸管将 1 mL 细胞悬液分装至规格为 1.5 mL 或 2.0 mL 的无菌冻存管中, 严密封口。

10.2.3 冻存管标记品种、细胞名称、冻存管编号、冻存日期。用于集中存放冻存管的储存盒标记品种、遗传材料类型、冻存管数量、制作单位。

10.2.4 将冻存管移入程序降温冻存盒, 置于-80 °C 冰箱中冻存 8 h~12 h 后, 转移至液氮罐中长期保存。

10.2.5 每个胚胎应冻存不少于 5 管成纤维细胞, 细胞密度应不低于 1×10^6 个/毫升。

10.2.6 液氮贮存容器应符合 GB/T 5458、GB/T 14174 的要求。

11 解冻

11.1 胚胎组织块

11.1.1 从液氮中取出冻存管, 迅速置于 37 °C 水浴中, 轻轻摇动, 待管内冰块即将消失时移至室温溶解。

11.1.2 将解冻的组织块悬液缓慢转移至含 10 mL 完全培养基的离心管中, 轻轻吹打混匀。

11.1.3 采用 300 g 离心 5 min~7 min, 弃去上清液后, 按组织块贴壁法进行培养。

11.2 成纤维细胞

11.2.1 从液氮中取出冻存管, 迅速置于 37 °C 水浴中, 轻轻摇动, 待管内冰块即将消失时移至室温溶解。

11.2.2 将解冻的细胞悬液缓慢转移至含 10 mL 完全培养基的离心管中，轻轻吹打混匀。

11.2.3 采用 300 g 离心 5 min~7 min，弃上清液，加入 1 mL 完全培养基重悬细胞，将细胞悬液转移至 T25 培养瓶中，补充培养液至 5 mL，于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

12 质量检测

每管胚胎组织块解冻后培养获得的细胞数应不低于 1×10^6 个。每管成纤维细胞解冻后细胞活力应不低于 80%，生长曲线和核型应正常。检测合格率应不低于 70%。

13 档案记录

包括供体鸡来源、胚胎组织块和成纤维细胞信息、冻存数量、制作单位、出入库档案、质量检测方法等。记录表格参见附录 B。

附录 A

(资料性)

试剂的配置

A.1 完全培养基

在高糖 DMEM 培养基中加入 10%的胎牛血清，用 0.22 μm 的滤器过滤后分装，置于 4℃ 条件下保存。

A.2 操作液

CO₂ 非依赖培养基中加入 2.0 mM GlutaMax 和 10%的胎牛血清，用 0.22 μm 的滤器过滤后分装，置于 4℃ 条件下保存。

A.3 冻存液

在操作液中加入体积分数为 20%的二甲基亚砜，混匀后即得冻存液。宜现用现配。

附录 B

(资料性)

鸡胚胎组织和成纤维细胞冷冻保存技术资料

胚胎组织块冷冻记录信息见表 B. 1。

表 B. 1 胚胎组织块冷冻记录表

供体来源：_____ 品种：_____ 遗传材料类型：_____ 制作单位：_____

胚胎编号	胚龄	冻存日期	冻存管号	冻存数量(支)	存储盒号	盒内位置	提漏号	液氮罐号	备注

胚胎组织块出入库记录信息见表 B. 2

表 B. 2 胚胎组织块出入库记录表

品种：_____ 细胞名称：_____ 制作单位：_____

冻存管号	入库日期	入库数量(支)	存放位置	出库日期	出库数量(支)	用途	领用人	剩余数量(支)	备注

成纤维细胞冷冻记录信息见表 B. 3。

表 B. 3 成纤维细胞冷冻记录表

供体来源：_____ 品种：_____ 遗传材料类型：_____ 制作单位：_____

胚胎编号	胚龄	冻存管号	代次	冻存日期	冻存数量(支)	密度	存储盒号	盒内位置	提漏号	液氮罐号	备注

胚胎组织块出入库记录信息见表 B. 4。

表 B. 4 成纤维细胞出入库记录表

品种：_____ 细胞名称：_____ 制作单位：_____

冻存管号	代次	入库日期	入库数量(支)	存放位置	出库日期	出库数量(支)	用途	领用人	剩余数量(支)	备注

参 考 文 献

- [1] 《国家畜禽遗传资源品种名录》 畜资委办[2025]18号
 - [2] 《种用动物健康标准》 中华人民共和国农业农村部公告 第574号
-