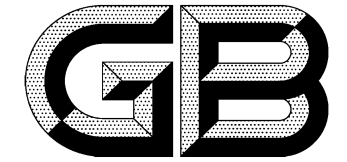


ICS 65.020.30  
B 40



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 24862—2010

GB/T 24862—2010

## 畜禽体细胞库检测技术规程

Technical regulation of farm animals somatic cell bank detection

中华人民共和国  
国家标准  
畜禽体细胞库检测技术规程  
GB/T 24862—2010

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字  
2010年7月第一版 2010年7月第一次印刷

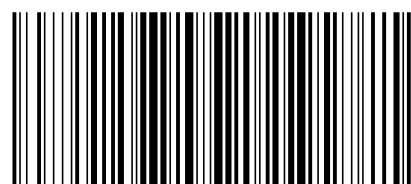
\*

书号: 155066·1-40181 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 24862-2010

2010-06-30 发布

2011-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

至完全溶解,分装到 1.5 mL 的小管中制成 Hoechst 33258 贮存液,−20 ℃下避光保存。将 1 mL 的贮存液加到 100 mL 的 PBS 中,搅拌 45 min,使终浓度达到 5.00 μg/mL,4 ℃条件下避光保存。

#### A. 12 封片液

将 22.2 mL 0.1 mol/L 柠檬酸与 27.8 mL 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  加入到 50 mL 甘油中,调 pH 至 5.5,4 ℃下保存备用。

#### A. 13 固定液

冰乙酸与无水甲醇以 1 : 3 的比例混合,现用现配。

#### A. 14 0.4%台盼蓝溶液

称取 0.40 g 台盼蓝,加少量 PBS 研磨粉碎后,再加 PBS 至 100 mL。

#### A. 15 秋水仙素溶液

称取 10 mg 秋水仙素,溶于 10 mL 超纯水配成贮存液,取 1 mL 秋水仙素贮存液与 9 mL 超纯水混合。

#### A. 16 Giemsa 工作液

称取 1.50 g Giemsa 干粉,量取 50 mL 甘油,在研钵内先用少量甘油与 Giemsa 研磨至无颗粒,再将剩余甘油混在一起,56 ℃加热 2 h 后,加入 50 mL 甲醇搅拌均匀,制成 Giemsa 贮存液,保存于棕色瓶中备用。1 mL 贮存液与 9 mL PBS 混合,制成 Giemsa 工作液,现用现配。

#### A. 17 蛋白提取液

将 TritonX-100 与 0.9% NaCl-0.06 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetra acetic acid,EDTA)溶液按 1 : 15 的比例混匀,4 ℃下贮存。

#### A. 18 胶工作液

A 液:称取 28.80 g 丙烯酰胺、8.00 g 甲叉双丙烯酰胺,用 100 mL 超纯水溶解;

B 液:称取 7.30 g 三羟甲基甲烷、48 mL 1 mol/L HCl、0.4 mL 四甲基乙二胺定容至 100 mL, pH 调至 8.9;

C 液:称取 38.00 g 丙烯酰胺、2.00 g 甲叉双丙烯酰胺、20 mL 甘油,定容至 100 mL;

D 液:13 mL 1 mol/L HCl、1.50 g 三羟甲基甲烷,定容至 100 mL,pH 调至 6.7;

E 液:称取 30.00 g 丙烯酰胺、0.80 g 甲叉双丙烯酰胺,定容至 100 mL;

F 液:四甲基乙二胺。

##### A. 18.1 家畜聚丙烯酰胺凝胶配方

分离胶用 13.35 mL 超纯水,7.5 mL 1.5 mol/L 三羟甲基甲烷,6 mL 40%丙烯酰胺,3 mL 2%甲叉双丙烯酰胺,150 μL 10%过硫酸胺,30 μL F 液;

浓缩胶用 6.5 mL 超纯水,1 mL C 液,2.5 mL D 液,65 μL 10%过硫酸胺,25 μL F 液。

家畜乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶所用凝胶配方相同。

##### A. 18.2 家禽聚丙烯酰胺凝胶配方

###### A. 18.2.1 苹果酸脱氢酶

分离胶:9.375 mL 超纯水,5.625 mL E 液,9.375 mL 1mol/L Tris-Cl(pH 8.8),0.625 mL 1%过硫酸胺,43.35 μL F 液;

## 前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:马月辉、关伟军、李向臣、于太永、李晗、何晓红、刘涛。

### 8.6.10 数据分析

统计 100 个分裂相以确定染色体数目。测量并计算染色体的相对长度、臂比值和着丝点指数,并确定染色体着丝点类型。

### 8.7 细胞同工酶检测

#### 8.7.1 样品制备

常规方法消化收集细胞,用 PBS 重悬,记数。用温育 PBS 洗细胞 3 次,离心,弃上清液。用蛋白提取液重新悬浮细胞,密度达  $5.0 \times 10^7$  个/mL。将细胞悬液移到 1.5 mL 离心管中,4 ℃ 下以 300g 离心 2 min,吸取上悬液,以每管 20  $\mu$ L 分装后置 -70 ℃ 贮存备用。

#### 8.7.2 制板和点样

灌注分离胶,待分离胶聚合好再加满浓缩胶,插上梳子。向上下槽缓缓加入稀释 10 倍的电极缓冲液至适量,用微量加液器向每个样品槽加入混有 1  $\mu$ L~2  $\mu$ L 溴酚蓝样品液 20  $\mu$ L~50  $\mu$ L。等量上样,放入 4 ℃ 冰箱。

#### 8.7.3 电泳

120 V 电泳,待溴酚蓝进入分离胶后调电压至 220 V。溴酚蓝迁移至下端 0.5 cm~1 cm 处停止电泳。

#### 8.7.4 染色

切去浓缩胶,用蒸馏水漂洗分离胶两次后,置 37 ℃ 温箱中避光保温染色 2 h,拍照。

## 畜禽体细胞库检测技术规程

### 1 范围

本标准规定了畜禽体细胞库检测方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽体外培养细胞鉴定。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

**细胞活率 cell motility rate**

活细胞占总细胞的百分比。

#### 3.2

**细胞生长曲线 cell growth curve**

在一代细胞生存期内,依据潜伏期、指数增长期、停滞期和衰亡期细胞动态变化的数值,以细胞培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标而绘制的细胞生长规律曲线。

#### 3.3

**核型 karyotype**

体细胞分裂中期整套染色体按照其数目、长度、着丝点位置、随体、主缢痕和次缢痕等相对恒定特征排列起来的图像。

#### 3.4

**同工酶 isozyme**

功能相同结构各异的一类催化酶。

#### 3.5

**汇合度 confluency**

细胞占其培养表面的比例。

### 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。

其中,缓冲间面积应不小于 3 m<sup>2</sup>,并设有更衣柜和紫外灯,紫外灯的强度不少于 1.5 W/m<sup>3</sup>。紫外线灯管距地面不应超过 2.5 m,每次照射时间为 20 min~30 min。无菌室无菌等级的最低标准应达到万级。

### 5 主要仪器、设备

电泳仪及电泳槽、超净工作台、冰箱、鼓风干燥箱、高压蒸汽消毒器、液氮生物容器、离心机、电子天平、恒温培养箱、CO<sub>2</sub> 培养箱、超纯水装置、凝胶自动成像分析系统和显微镜等。