



中华人民共和国国家标准

GB/T 38788—2020

猪多能干细胞建系技术规范

Technical specification for establishment of porcine pluripotent stem cells

2020-04-28 发布

2020-11-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、东北农业大学、华中农业大学、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：韩建永、张金颖、郅明雷、刘忠华、苗义良、刘志国、李奎、牟玉莲、马爱进。



猪多能干细胞建系技术规范

1 范围

本标准规定了猪多能干细胞建系的一般要求、技术要求、证实方法。
本标准适用于猪诱导多能干细胞和猪胚胎干细胞建系。

2 规范性引用文件

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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

干细胞 stem cell

一类能够自我更新,具有多向分化潜能,能分化形成多种细胞类型的细胞。

3.2

多能干细胞 pluripotent stem cell

能够分化成多种类型细胞的干细胞,包括胚胎干细胞、核移植胚胎干细胞、诱导多能干细胞等。

3.3

胚胎干细胞 embryonic stem cell

源自早期胚胎中内细胞团的初始未分化细胞,可在体外“无限制地”自我更新,并且具有向三胚层细胞分化潜能的干细胞。

3.4

诱导多能干细胞 induced pluripotent stem cell

一类通过细胞重编程技术人工诱导获得的,具有类似于胚胎干细胞特性的干细胞。

3.5

核移植胚胎 nuclear-transferred embryo

通过显微操作将细胞核注射到去核卵母细胞中,经体外培养发育成的胚胎。

3.6

孤雌胚胎 parthenogenetic activated embryo

处于第二次减数分裂中期的成熟卵母细胞不经精子受精作用,而在理化因素的刺激下发生卵裂发育成的胚胎。

3.7

体外受精胚胎 in vitro fertilized embryo

精子和卵子在体外人工控制的环境中完成受精而发育成的胚胎。

3.8

初始态 naive-state

能够实现生殖系嵌合发育或者四倍体嵌合发育能力的多能干细胞所具有的多能性状态。

3.9

激发态 primed-state

具有体外自我更新和三胚层分化能力但不具有生殖系嵌合发育或者四倍体嵌合发育能力的多能干细胞所具有的多能性状态。

3.10

拟胚体 embryoid body

将多能干细胞在体外悬浮培养形成的具有内、中、外三个胚层祖细胞的细胞聚集体。

3.11

畸胎瘤 teratoma

来源于多能干细胞,含有内、中、外三个胚层组织成分的良好肿瘤。

3.12

嵌合体动物 chimera

由两种或两种以上具有不同遗传特性的细胞系组成的聚合胚胎发育形成的动物个体。

3.13

饲养层细胞 feeder cell

经药物或辐射处理失去分裂增殖能力,用来支持多能干细胞或其他类型细胞体外培养的一类细胞。

3.14

细胞冻存 cell cryopreservation

将细胞保存在低温环境中,使其暂时脱离生长状态但最大限度保持活性的细胞储存操作。

3.15

细胞复苏 cell thawing

将保存在低温环境中的细胞解冻之后重新培养,使其恢复活力的操作。

4 一般要求

干细胞的来源和胚胎获得方式应符合生命伦理与社会道德规范。

5 技术要求

5.1 猪诱导多能干细胞建系外源因子的导入和克隆挑取

5.1.1 外源因子的导入包括整合和非整合两种方式,整合的方法可以通过逆转录病毒和慢病毒等载体导入外源因子,将外源基因整合到宿主细胞基因组中。非整合的方法可以通过腺病毒、仙台病毒、表达质粒、Episomal 系统等载体导入外源因子,外源因子不整合到基因组上。

5.1.2 每日观察并记录经外源因子诱导后的猪成纤维细胞生长状态,3 d~4 d 可以出现明显的细胞增殖和细胞形变,7 d~14 d 内出现克隆。待克隆出现后,挑取边缘清晰、形态饱满的单克隆进行酶消化,并接种到饲养层细胞上继续传代培养。

5.2 猪胚胎干细胞建系胚胎的选择和源头细胞分离方法

5.2.1 用于猪胚胎干细胞建系的胚胎应选择高质量的体内胚胎或体外培养获得的胚胎,体外培养胚胎可选择核移植胚胎、孤雌胚胎、体外受精胚胎或聚合胚胎等。根据细胞培养体系的不同应选择不同发育

时期的胚胎进行建系,4-8 细胞时期胚胎、桑葚胚时期胚胎、早期囊胚的内细胞团、晚期囊胚的内细胞团以及球形胚胎的上胚层细胞等。

5.2.2 用于猪胚胎干细胞建系的源头细胞可用全胚接种法,将获得的早期胚胎直接接种到相应的饲养层细胞上,待其贴壁形成原代克隆后进行传代培养;机械切割法,用胚胎分割刀或细玻璃针分割胚胎,获得内细胞团细胞进行接种培养;酶消化法,将去掉透明带的囊胚置于 0.25%胰蛋白酶-0.04%EDTA 的细胞消化液中消化使滋养层细胞脱落获得内细胞团细胞进行接种培养。

5.3 细胞培养及传代

5.3.1 将细胞接种在状态良好,密度适宜的饲养层细胞上,每天观察细胞生长状态,及时更换新鲜培养基。培养基中应添加相应信号通路的小分子抑制剂或细胞因子。培养基、细胞因子和小分子应符合相应质量要求。使用动物血清时,应无特定动物源性病毒的污染。

5.3.2 原代猪胚胎干细胞克隆传代时,由于克隆细胞数较少且对酶的作用敏感,因此可采用机械分割的方法进行传代;待细胞数增多,状态稳定后可用较为温和的酶进行消化传代。

5.4 猪多能干细胞的鉴定

5.4.1 细胞形态特征

根据培养体系的不同,细胞可呈现两种不同的形态。一种为边界清晰,形态扁平,呈上皮样的激发态细胞;另一种为边界清晰,排列紧密,克隆立体的初始态细胞。不同形态细胞图参见附录 A。

5.4.2 碱性磷酸酶染色

对猪多能干细胞进行碱性磷酸酶染色,多能性较好的干细胞系应呈 AP 阳性,多能性较弱或无多能性的细胞系 AP 染色呈弱阳性或阴性。

5.4.3 多能性基因表达

猪多能干细胞应表达核心多能性基因 POU5F1、NANOG、SOX2 等;可表达 KLF4、KLF2、REX1、NROB1、ESRRB、ZIC3、LIN28A、LIN28B、DNMT3B、PRDM14、STAT3、TCF3、TFCP2L1 等多能性基因;猪多能干细胞应表达干细胞表面特异性标记蛋白 SSEA-1 或 SSEA-4,可表达 SSEA-3、TRA-1-81 和 TRA-1-60 等。

5.4.4 核型分析

猪多能干细胞应具有正常稳定的二倍体核型,雌性多能干细胞系应包括 18 对常染色体和一对性染色体(XX),雄性多能干细胞系应包括 18 对常染色体和一对性染色体(XY)。

5.4.5 X 染色体激活

在雄性的猪多能干细胞系中,只有一条 X 染色体,处于激活状态;在雌性的猪多能干细胞系中,初始态的细胞两条 X 染色体应处于激活状态 XaXa,激发态的细胞其中一条 X 染色体应处于失活状态 XaXi。

5.4.6 畸胎瘤形成

猪多能干细胞注射到免疫缺陷小鼠的皮下或肾囊中可在注射部位形成畸胎瘤实体,能够观察到具有内胚层、中胚层和外胚层三个胚层的组织。

5.4.7 生殖腺嵌合能力

将猪多能干细胞注射到猪早期胚胎内,注射的细胞应能在胚胎中嵌合并增殖;将嵌合胚胎移植到受体子宫,能够获得具有生殖系嵌合能力的嵌合体动物。

5.5 细胞冻存

细胞冻存时应进行梯度降温,冷冻速度开始为 $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,当温度低于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时可加速,到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之后可保存在液氮中。冻存过程中应标明细胞名称、数量、代次、日期、培养条件、操作者等信息。

5.6 细胞复苏

从液氮容器中取出冻存管,直接浸入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中,并不时摇动令其尽快融化。复苏后的细胞应能够正常增殖并维持多能性状态。

6 证实方法

6.1 细胞形态学试验

100 倍或 200 倍光学显微镜下观察细胞形态。

6.2 细胞标志蛋白检测

6.2.1 样品准备和固定

收集单细胞,250 g 离心 3 min。弃上清液,加适量固定液冰上放置 10 min,然后用适量洗涤液洗涤 3 次~5 次,每次 3 min~5 min。

6.2.2 封闭和通透

用封闭通透液重悬细胞并把细胞分成两等份,分别作为实验组和 Isotype 同型对照组,冰上孵育 20 min,然后用洗涤液清洗一遍。

6.2.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

6.2.4 过滤上机

用洗涤液重悬细胞,然后通过 $40\text{ }\mu\text{m}$ 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪应用手册上机检测。

6.2.5 圈门设定原则

首先根据颗粒度和透光性设门圈出目标细胞分群 1,排除死细胞和其他杂细胞,然后根据 Isotype 同型对照组荧光强度,在分群 1 的基础上画出阳性细胞群 2,排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体同型对照 Isotype 作为阴性对照。

6.2.6 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析,具体参考其软件使用说明。

6.3 畸胎瘤形成检测

6.3.1 细胞样品的准备

离心收集细胞于离心管中,用生理盐水轻轻重悬细胞,避免形成气泡或者残留细胞团块。实验室要求应符合 GB 19489 的规定,实验用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.3.2 细胞移植

用注射器将 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个猪多能干细胞注射到 6 周龄~8 周龄的免疫缺陷型小鼠皮下,或肌肉,或睾丸白膜下的生精小管周隙等部位。

6.3.3 畸胎瘤收样及处理

猪多能干细胞注射约 6 周~10 周后(确保畸胎瘤不超过荷载小鼠体重的 15%),对小鼠实施安乐死。剥离受体小鼠上的畸胎瘤并进行切割(体积不大于 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$),将畸胎瘤组织块用 4% 多聚甲醛进行 4℃ 过夜固定。

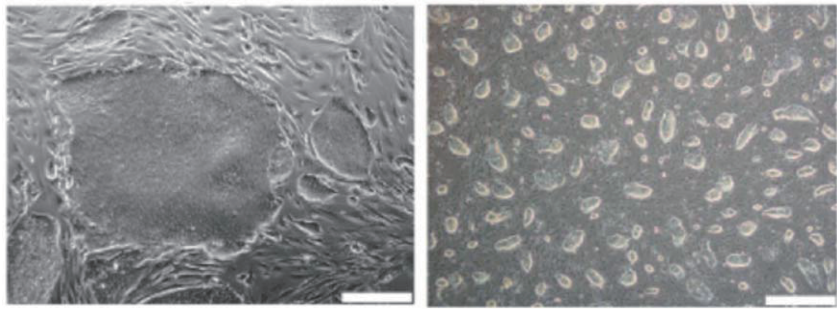
6.3.4 石蜡切片及 HE 染色

对上述固定好的样本进行石蜡包埋、切片和 HE 染色,镜下观察并拍照。观察到来源于三个胚层的组织,如:内胚层来源的消化道上皮腺体样组织、中胚层来源的软骨组织,以及外胚层来源神经组织等,即证明所接种的猪多能干细胞具有向三个胚层组织分化的多能性。

附 录 A
(资料性附录)
猪多能干细胞图

A.1 猪诱导多能干细胞图

猪诱导多能干细胞见图 A.1。



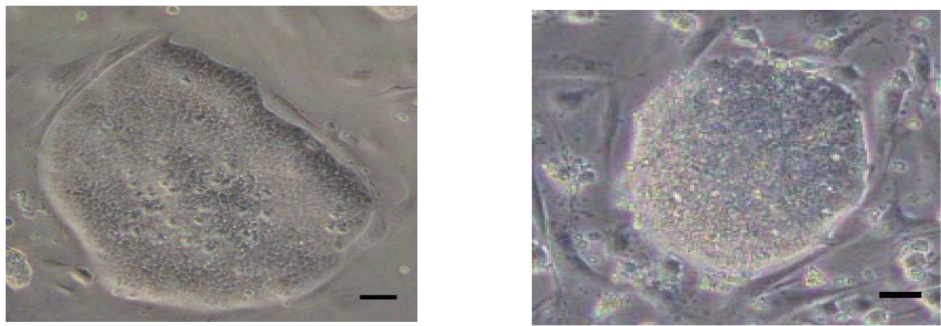
a) 激发态的猪诱导多能干细胞克隆 b) 初始态的猪诱导多能干细胞克隆

注：标尺为 200 μm 。

图 A.1 猪诱导多能干细胞图

A.2 猪胚胎干细胞图

猪胚胎干细胞见图 A.2。



a) 激发态的猪胚胎干细胞克隆 b) 初始态的猪胚胎干细胞克隆

注：标尺为 50 μm 。

图 A.2 猪胚胎干细胞图