

DB24

黑 龙 江 省 地 方 标 准

DB24/T XXXX—XXXX

奶牛趾间皮肤外植体构建技术规程

起草人：郑家三

单位：黑龙江八一农垦大学

手机号码：13836965155

邮箱：zjs3399@yahoo.com

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

黑龙江省市场监督管理局

发 布

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020 《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。

本文件由黑龙江省市场监督管理局提出并实施。

本文件起草单位：黑龙江八一农垦大学、东北农业大学。

本文件主要起草人：郑家三、刘云、张鹤飞、周志新、葛延松、徐恩爽、韩欢胜、王峥、孙悦、杨春雪、田雪。

奶牛趾间皮肤外植体构建技术规程

1 范围

本标准规定了奶牛趾间皮肤外植体构建操作技术规程。

本标准可为奶牛蹄部趾间皮肤感染性疾病的研究提供基础。

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。

3 术语定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 皮肤外植体

从活体动物切取下来进行培养的那部分皮肤组织叫做皮肤外植体。

4 要求

4.1 外植体皮肤来源的要求

4.1.1 以新屠宰的奶牛蹄部趾间皮肤为实验样本。

4.1.2 外植体所用的皮肤需从无蹄部疾病且蹄形结构良好的奶牛后蹄处采集。

4.2 实验人员要求

4.2.1 实验人员应具备一定的兽医外科知识，且熟练掌握兽医外科手术操作。

4.2.2 实验人员应熟练掌握组织/细胞培养技术。

4.2.3 实验人员应熟练掌握病理组织学和免疫组织化学知识，并熟悉病理切片制作方法。

4.2.4 实验人员应具备分析病理组织切片的技术能力。

5 外植体构建方法

5.1 培养基配置

5.1.1 运输培养基

DMEM/F-12 1:1 培养基内添加 1%青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液（100 X），5 µg/mL 硫酸庆大霉素，1% L-谷氨酰胺。

5.1.2 洗涤培养基

DMEM/F-12 1:1 培养基内添加 1 %青霉素+链霉素+两性霉素 B（100 X），2 µg/mL 硫酸庆

大霉素。

5.1.3 组织培养基

DMEM 高糖与 DMEM/F-12 1:1 培养基以 3:1 比例混合，添加 1 %青霉素+链霉素+两性霉素 B (100 X)，5 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸庆大霉素，1% L-谷氨酰胺，4 U/ml 胰岛素，0.4 $\mu\text{g/ml}$ 氢化可的松，10% 胎牛血清。

5.2 样本的采集、运输

选取新屠宰的、无蹄部疾病且蹄形结构良好的黑白花奶牛。首先用清水和皮肤清洁剂反复冲洗蹄部直至表面无污物，随后用无菌手术刀片和剪刀去除趾间皮肤被毛，PBS 缓冲液冲洗后，更换新的无菌手术刀切除全部趾间皮肤，PBS 冲洗后立即放入准备好的运输培养基中，冰上运输回实验室。

5.3 奶牛趾间皮肤外植体的组装

将采集的趾间皮肤用 8 mm 皮肤活检打孔器无菌收集外植体皮肤，并浸入预热至 37℃ 的洗涤培养基中，室温下洗涤 3 次，15 min/次。

取 500 μL 体积分数为 1.2% 的琼脂糖作为底座置于 12 孔培养板最下层，为皮肤外植体提供物理支撑，其上覆盖 0.5 cm^2 无菌手术纱布，洗涤后的外植体置于纱布和琼脂糖底座的顶部（图 1）。添加组织培养基至表皮与真皮交界处，形成气相与液相交替的培养系统。将组装的外植体模型置于 37℃、5% CO_2 湿化培养箱中培养，每 12 h 换液 1 次，于培养 0、12、24、36、48 和 72 h 收集 2 块皮肤外植体，分别固定于 4% 多聚甲醛和保存于 -80℃ 冰箱中。

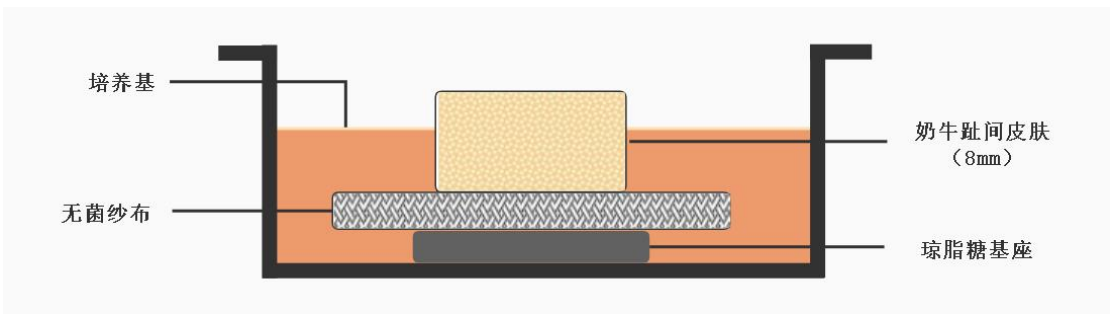


图 1 皮肤外植体模型组装图

6 奶牛趾间皮肤外植体可行性检测

6.1 皮肤组织切片制作

采用黑龙江八一农垦大学动物科技学院病理课题组的国家发明专利方法《动物组织石蜡切片的绿色环保制作技术》制作石蜡组织切片。

6.2 病理组织学检查

按照苏木素伊红（HE）染色试剂盒说明书的步骤对组织切片进行 HE 染色，随后封片显微镜下观察，根据建立的评分标准对出现不同病理变化的皮肤外植体进行评分，评分标准如下所示。

表 1 皮肤外植体病理组织学评分表

皮肤外植体病理组织变化	评分
表皮细胞变性（坏死） 出现以下描述的表皮和真皮所有变化现象	0 分 (组织不可行)
多灶性表皮下裂 基底层细胞空泡化（表皮变性） 外分泌腺、白细胞和表皮细胞出现核固缩和脱离，显示自溶迹象 伴有中性粒细胞变性的基底层细胞多灶性固缩	1 分 (组织不可行)
角质形成细胞凋亡 基底层细胞空泡化 上皮裂开 小汗腺和周围神经有自溶的迹象，一些滤泡上皮细胞 (脱落)也有自溶的迹象。	1.5 分 (组织可行)
棘细胞层出现核固缩现象 毛囊周围的一些基底下裂隙 腺体内很少有脱落的上皮细胞	2 分 (组织可行)
散在凋亡的角质形成细胞	2.5 分 (组织可行)
可观察到正常的组织结构和活力，偶尔在分泌腺内有少量脱落的上皮细胞。	3 分 (组织可行)

6.3 Caspase-3 蛋白表达检测

按照 SP 检测试剂盒说明说的步骤对组织切片进行免疫组织化学检测，随后封片显微镜下观察，对皮肤外植体中Caspase-3 凋亡蛋白的阳性表达进行评分。选择5个不同高倍视野，根据以下指标对阳性细胞强度进行评分。

- 1) 阳性率：阳性细胞数/细胞总数×100%，反映阳性细胞所占百分比。对细胞阳性比率进行评分：0～5%为 4 分，6%～25%为 3 分，26%～50%为 2 分，51%～75%为 1 分，>75%为 0 分。
- 2) 阳性细胞着色强度：测量区域平均阳性强度为 0, 1, 2, 3 分，阴性无着色，计 3 分；弱阳性淡黄色，计 2 分；中阳性棕黄色，计 1 分；强阳性棕褐色计 0 分。
- 3) 阳性评分：阳性综合评分为阳性细胞着色强度分值×阳性细胞比率分值，数据越小说明综合阳性强度越强。

6.4 TUNEL 细胞凋亡检测

按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书的步骤对组织切片进行染色，Dapi 复染后封片观察，计算视野内 1000 个细胞中阳性细胞所占观察同类细胞的百分比，细胞凋亡率=凋亡细胞数量/1000×100%。对细胞凋亡率进行评分：细胞凋亡率在 0~5%为 4 分，6%~25%为 3 分，26%~50%为 2 分，认为模型可行；细胞凋亡率在 51%~75%为 1 分，>75%为 0 分，认为模型不可行。

7 奶牛趾间皮肤外植体可行性评分标准

模型可行性根据病理组织学检查评分、阳性综合评分和细胞凋亡率评分综合评定。病理组织学检查评分>1.5 分、阳性综合评分>1 分、细胞凋亡率评分>1 分的外植体模型认为是可行的。