

团 体 标 准

T/CVMA 325—2025

实验动物生物样本处理规范

Specification for processing laboratory animal biological materials

2025 - 11 - 17 发布

2025 - 11 - 17 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国食品药品检定研究院提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国科学院水生生物研究所、大连医科大学、吉林大学、中国水产科学研究院珠江水产研究所、东北农业大学、斯贝福（北京）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：巩薇、董浩、左琴、王学文、张乐颖、董青花、陈洪岩、潘鲁媛、王靖宇、袁宝、李凯彬、刘芳萍、战大伟。

中国兽医协会
CVMA

实验动物生物样本处理规范

1 范围

本文件规定了实验动物生物样本的样本处理准备、样本处理和处理后操作的要求。

本文件适用于实验动物组织、血液、唾液、精液、阴道内液、乳汁、尿液、粪便、核酸、蛋白质等生物样本的处理。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/Z 44314 生物技术 生物样本保藏 动物生物样本保藏要求

SF/T 0134 法医学生物检材核酸提取技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验动物 laboratory animal

经人工培育，对其携带微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的动物。

3.2

实验动物生物样本 laboratory animal biological materials

从实验动物个体或其衍生物中获得的各种生物材料，包括但不限于组织、血液、尿液、粪便、毛发、体液、细胞、遗传物质（如 DNA、RNA）、蛋白质等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediamine Tetraacetic Acid）

OCT: 最佳切片温度 (Optimum Cutting Temperature)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

5 实验动物生物样本的处理准备

5.1 样本处理方案的制定

提前制定详细的样本处理方案, 包括处理样本类型 (全血、血清、血浆、细胞、尿液、组织等)、处理方法、样本数量、样本标识等。

5.2 设备与耗材确认

根据处理方案、样本类型和规格等提前准备试剂和耗材。设备及耗材应符合GB/Z 44314要求。

5.3 样本储存条件确认

处理后的实验动物生物样本应根据样本类型、保存时长和后续实验需求, 提前确认储存条件是否满足。

5.4 个人防护准备

应根据处理对象的潜在风险, 正确使用适当的个体防护装备, 如手套、护目镜、防护服、口罩、帽子、鞋等。存在空气传播的生物安全风险时应进行呼吸防护, 呼吸防护面具、呼吸防护装置、正压服等在使用前要进行适配性测试。

5.5 场地、人员要求

场地应是专属场地, 不应用作办公场地; 场地有紫外和其他消毒设施, 涉及生物安全的样本处理的操作环境应符合GB 19489的相关要求。

实验动物生物样本处理的操作人员应经过相应的专业培训。

6 实验动物生物样本的处理

6.1 组织样本处理

6.1.1 快速冷冻处理

在新鲜组织样本取材后, 切割成合适大小的组织块 (一般为约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$), 盛装器皿应经无菌处理。样本处理应在离体 30 min 内进行, 放入液氮中快速冷冻不少于 15 min, 保存应在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或液氮罐中。

6.1.2 RNA保护剂处理

组织样本块厚度应控制在 0.5 cm 以内, 处理时间应在离体 3 min 内进行, RNA 保护剂液面应没过组织块, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱或液氮罐中保存。

6.1.3 OCT包埋处理

在 OCT 包埋模具中放入 OCT 包埋剂, 将提前分割至约为 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的新鲜组织块 (离体 30 min 内) 放入包埋模具中, 根据形状调整组织的位置, 继续加入更多的 OCT 包埋剂覆盖组织样本,

整个过程应避免在 OCT 包埋剂中产生气泡，去除任何产生在组织样本周围的气泡。将包埋好的组织放在液氮中冷冻至包埋剂与组织冻结成白色冰体。

6.1.4 石蜡包埋处理

6.1.4.1 **固定。**根据研究目的和组织类型将新鲜取材的组织样本分割至适宜大小，立即放置于 10 倍体积的固定液中。肺脏、心脏等组织可根据需求进行固定液灌注，以确保组织充分固定。待充分固定后再修切至 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 。

6.1.4.2 **脱水，**选择使用合适的水溶性有机溶剂进行组织梯度脱水，将组织中的水分充分置换。选择使用合适的透明剂，将组织中的有机溶剂充分置换。用融化的石蜡将组织中的透明剂充分置换。

6.1.4.3 **包埋。**组织样本经过固定脱水后，将组织样本放入石蜡包埋盒中并注入融化的石蜡，冷却凝固后形成石蜡组织块，即石蜡组织样本。

6.2 血液样本处理

6.2.1 血液样本在采集完成后，宜在 2 h 内完成血浆或血清等成分的分离处理。

6.2.2 血浆分离

6.2.2.1 根据不同实验需求，应选用含有适宜种类抗凝剂的抗凝采血管。

6.2.2.2 将装有血液样本的抗凝采血管放置于离心机中，离心力调至 $1500\text{ g} \sim 2000\text{ g}$ ，离心 10 min。

6.2.2.3 离心机停止后，取出采血管（不可颠倒），血样分为三层：上层为浅黄色澄清的血浆层；中层为灰白色的白膜层；下层为暗红色的红细胞层。

6.2.2.4 使用合适的移液枪或一次性巴氏吸管小心吸取血浆层，避免破坏白膜层。

6.2.2.5 将血浆分装至冻存管中。

6.2.3 白膜层回收

在吸出血浆后，用移液枪或一次性巴氏吸管吸取白膜层，将白膜层注入冻存管中。

6.2.4 血清分离

6.2.4.1 将装有血液样本的普通血清管（无添加剂采血管）室温静置 1 h 或快速血清管（含促凝剂采血管）室温静置 5 min 或惰性分离胶促凝管（含惰性分离胶和促凝剂采血管）室温静置 30 min。

6.2.4.2 然后将采血管放置于离心机中，离心力调至 $1500\text{ g} \sim 2000\text{ g}$ ，离心 10 min。

6.2.4.3 离心机停止后，取出采血管。血样分为两层（普通或快速血清管），上层为浅黄色澄清血清层，下层为暗红色的血凝块层；或三层（惰性分离胶促凝管），上层为浅黄色澄清血清层，中层为透明的分离胶层，下层为暗红色的血凝块层。

6.2.4.4 使用合适的移液枪或一次性巴氏吸管小心吸取血清层，避免吸取血凝块层或分离胶层，将血清分装至冻存管中。

6.2.5 血凝块回收

在吸出血清后，用移液枪或一次性巴氏吸管挑取血凝块，将血凝块置于冻存管中。

6.2.6 外周血单个核细胞提取

6.2.6.1 取新鲜抗凝血（一般为 EDTA 抗凝血），进行血浆分离（可选）。

- 6.2.6.2 向上步少浆血中加入全血稀释液（少浆血：全血稀释液为 1:1），小心混匀（可选）。
- 6.2.6.3 根据血量准备合适体积的离心管，将适量体积的细胞分离液（具体参考试剂说明）注入离心管中。
- 6.2.6.4 将血样小心加于细胞分离液之液面，置水平离心机中（离心条件参考试剂说明）离心。
- 6.2.6.5 离心后，离心管中由上至下细胞分为四层：第一层为血浆层，第二层为环状乳白色单个核细胞层，第三层为透明分离液层，第四层为红细胞层。
- 6.2.6.6 收集第二层单个核细胞至另一干净离心管中，加入适量细胞洗涤液，离心，弃去上清，将沉淀细胞重新悬起，重复洗涤 2 次。
- 6.2.6.7 收集所得血液中的单个核细胞按预期要求进行下一步处理。

6.3 唾液样本的处理

- 6.3.1 根据预期研究目的，可选择添加合适的唾液保存液(如脱氧核糖核酸酶（DNase）抑制剂、核糖核酸酶（RNase）抑制剂、蛋白酶抑制剂、叠氮化钠等)。

6.3.2 唾液样本离心处理方法

根据预期研究目的，可选择以下方法之一对唾液进行离心处理：

- a) 唾液样本直接分装。
- b) 唾液样本经10000 g ~ 16000 g, 4 °C, 15 min离心后，吸取获得无细胞上清液，混匀并分装。
- c) 唾液样本经10000 g ~ 16000 g, 4 °C, 15 min离心后，去除唾液上清后获得唾液沉淀，混合并分装。

6.4 精液样本的处理

- 6.4.1 精液样本在处理前宜首先检查其活率和密度，然后确定稀释倍数。
- 6.4.2 将精液与稀释液同时置30 °C左右的恒温箱或水浴锅内，进行短暂的同温处理。
- 6.4.3 将稀释液缓慢加入盛放精液样本的容器,并轻轻摇动,使之混合均匀。如做高倍稀释(20倍以上)时，分两步进行，先加入稀释液总量的1/3 ~ 1/2，混合均匀后再加入剩余的稀释液。
- 6.4.4 稀释完毕后，再进行活率密度检查，如活率与稀释前一样，则可进行分装、保存。

6.5 阴道内液样本的处理

- 6.5.1 根据后续实验用途选取适应的保存液。
- 6.5.2 阴道内液样本采集完后，将拭子头放入盛有保存液的保存管中，折断拭子，保留拭子头在保存管中，盖上管盖，振荡10 ~ 20 次，使得保存液充分浸润拭子头。
- 6.5.3 如采用冲洗法进行采集，则将阴道冲洗液直接加入盛有保存液的保存管中，盖上管盖，振荡混匀即可。
- 6.5.4 应用于检查雌性动物的生理周期等特征时，直接进行涂片染色。

6.6 乳汁样本的处理

- 6.6.1 为维持样本的完整性，宜在采集后4 h内，在2 °C ~ 8 °C条件下对乳汁样本进行保存或处理。

6.6.2 乳汁样本可能含细胞和其他成分，宜在等分分样和储存前将其他成分进行分离。

6.6.3 乳汁样本经10000 g~16000 g，4℃，15 min离心后，吸取获得无细胞上清液，混匀并分装。将离心后去除上清后获得的乳汁样本沉淀，混合并分装。

6.7 尿液样本的处理

6.7.1 预处理

6.7.1.1 防腐处理。应根据研究方案或样本检测目的，添加合适的防腐剂（如甲醛、甲苯、硼酸、叠氮钠等）。

6.7.1.2 蛋白酶抑制处理。应根据研究方案或样本检测目的，确定是否加入蛋白酶抑制剂以防止样本中蛋白质降解。

6.7.1.3 核酸保护处理。应根据研究方案或样本检测目的，确定是否加入核酸保护液以防止样本中核酸分子降解。

6.7.2 分装处理

完成预处理的样本在储存前可根据研究方案或样本检测目的采用以下分装处理方式之一选择适宜的分装量进行分装（分装过程中，确保满足使用要求的同时避免了对样本的反复冻融）：

- a) 未经离心处理的尿液样本可直接分装成全尿样本进行储存或后续应用研究。
- b) 尿液样本经离心处理后获得的尿液上清，可直接分装后进行储存或后续应用研究。
- c) 尿液样本经离心处理后获得的尿沉渣样本，可根据不同的研究方案添加相应的试剂（如戊二醛或甲醛固定液、核糖核酸保护液等），再进行分装储存或后续应用研究。
- d) 经特殊处理的尿液样本（如膜干燥真空保存部分尿液成分）应按要求及时处理。

6.8 粪便样本的处理

6.8.1 采用称重法将1 g~2 g粪便分成若干个小样本置于冻存管中，含特定保存液的粪便采样管一般直接冷冻保藏。

6.8.2 原始粪便样本可进一步处理以获得相关衍生物，如DNA等。应针对影响粪便DNA质量的关键步骤，建立、成文并执行质量控制程序，评估DNA的重要质量特性，包括稳定性及满足预期研究用途等特性。

6.9 核酸样本的处理

6.9.1 核酸样本的处理，包括DNA提取和RNA提取。

6.9.2 实验室的环境和设施应符合GB/T 27025的规定。为了有效防止核酸污染，实验室宜根据预处理步骤设置不同的工作区域，所有实验操作宜在规定的区域进行。

6.9.3 应尽量选择新鲜的样本进行核酸样本的提取。

6.9.4 核酸提取宜使用商品化试剂，具体操作流程宜参照商品化试剂的使用说明书。无商品化试剂或相应的使用说明书时，可参考SF/T 0134的相关规定进行操作。

6.9.5 核酸提取可采用全自动核酸提取工作站，具体步骤参照工作站的操作说明书进行。

6.9.6 核酸提取过程中应避免物理因素（如剪切力、高温等）、化学因素（如强酸、强碱等）和生物因素（如核酸酶等）的破坏，保证一级结构的完整性。

6.10 蛋白质样本的处理

6.10.1 所有前处理步骤应尽量保证在冰上或4℃以下低温操作，并尽可能缩短操作时间以减小蛋白质降解几率。

6.10.2 制塑剂、聚乙二醇等表面活性剂属于污染物，容易影响数据质量，应避免使用含此类污染物的枪头、EP管或冻存管处理和保存样品。

6.10.3 应选择溶解性强的蛋白质裂解液裂解样品，亦可采购样品溶解效果好的商品化蛋白质裂解液。

6.10.4 血清、血浆、唾液、尿液等样品中含有高丰度蛋白质（白蛋白、免疫球蛋白等），会极大降低质谱对其他中、低丰度蛋白质的鉴定效率，若检测目标为中、低丰度蛋白，应采用高丰度蛋白质去除试剂盒，以去除高丰度蛋白质，或采用低丰度蛋白质富集试剂盒，以富集低丰度蛋白质。

7 实验动物生物样本的处理后操作

处理完成后应按照国家相关法规对样本处理过程中产生的医疗废物进行分类处理。对处理区域设备进行清洁消毒，生物样本进行物理隔离及保存。整理资料，包括样品编号、处理时间、处理人员、样本数量和质量等信息或数据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国务院令424号《病原微生物实验室生物安全管理条例》
 - [2] GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
 - [3] GB/T 38576 人类血液样本采集与处理
 - [4] GB/T 38735 人类尿液样本采集与处理
 - [5] GB/T 40352.1 人类组织样本采集与处理 第1部分：手术切除组织
 - [6] GB/T 41908 人类粪便样本采集与处理
 - [7] GB/T 42060 医学实验室 样品采集、运送、接收和处理
 - [8] SZDB/Z 186 用于高通量测序研究的人类血液样本采集、处理、运输和储存规范
 - [9] SZDB/Z 244 生物样本库中人类组织样本收集、处理、运输和储存规范
 - [10] T/CNSS 017 研究用人乳样本的采集与储存规范
 - [11] DB11/T 2313 临床生物样本库运行质量技术要求
-