

漠斑牙鲆胚胎细胞系的建立与鉴定

任国诚¹, 陈松林², 沙珍霞²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 是中国近年新开发的重要海水养殖鱼类, 本研究以漠斑牙鲆囊胚期胚胎为材料, 探索了鱼类胚胎细胞分离和培养的条件, 建立了漠斑牙鲆胚胎细胞培养技术。建立的漠斑牙鲆胚胎细胞系 (SFEC) 至今已经培养了 240 多天, 传至 80 多代。SFEC 的完全培养基采用添加抗生素、胎牛血清 (FBS)、花鲈血清 (SPS)、成纤维生长因子 (bFGF) 的 DMEM。SFEC 形态小而呈圆形、多边形, 在培养基中生长迅速。本实验检测了温度、胎牛血清浓度、成纤维生长因子对 SFEC 生长的影响。在 24~30 ℃ 之间 SFEC 生长良好, 但当温度低于 18 ℃ 时细胞生长速度明显减慢。在含 15% FBS 的培养基中, SFEC 生长速度明显比在含 7.5% FBS 的培养基中快, 在培养基中添加 bFGF 可以使细胞生长速度显著提高。SFEC 的二倍体核型为 $2n=6st+42t$ 。将 GFP 报告基因通过脂质体介导的方法转入 SFEC 中并成功地获得了表达, 转化率为 20%。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 579–583]

关键词:胚胎细胞系; 漠斑牙鲆; 核型; GFP 报告基因

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)04–0579–05

细胞系是鱼类病毒学、免疫学和功能基因组学研究的强有力的工具^[1–4], 也是研究生物进化、发育和遗传的良好材料。同时, 细胞系也是分离和鉴定鱼类病毒所必须的材料。鱼类的细胞培养起始于 20 世纪 60 年代初, 迄今为止, 已经建立的鱼类细胞系多为淡水鱼类和溯河性鱼类, 主要用于病毒学研究, 由海水鱼类建立的细胞系比较少^[5–11]。

漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 隶属鲽形目 (Pleuronectiformes), 鲆科 (Paralichthyidae), 牙鲆属 (*Paralichthys*), 原产于美国, 分布于大西洋美国佛罗里达州北部沿海和墨西哥湾沿海, 从 2001 年起陆续引进中国人工养殖。漠斑牙鲆是广盐性、广温性鱼类, 营养价值高, 在国内的养殖规模逐渐扩大, 但病毒病的暴发使漠斑牙鲆的死亡率大大增加。由于缺少细胞系, 对于病毒在海水鱼类养殖过程中的感染、发病作用机理还无法进行深入研究^[12–14]。同很多海水鱼类一样, 漠斑牙鲆雌性个体的生长速度比雄性个体要快, 如果能建立性别控制技术将带来巨大经济效益, 同时也能给其他鱼类的性别控制研究提供参考。漠斑牙鲆细胞系的建立有利于筛

选、分析性别相关基因、抗病基因及其他功能基因。国内外至今还未见漠斑牙鲆细胞系建立的报道。

1 材料与方法

1.1 原代培养和继代培养

本实验所用的漠斑牙鲆胚胎采自烟台海阳渔场。收集受精约 12 h 后的 50~70 枚漠斑牙鲆胚胎用于细胞培养。将收集的胚胎用 70% 的酒精消毒, 然后用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗, 置于培养皿中。在解剖镜下用尖头镊子将受精卵的卵膜撕开, 释放出细胞团块, 将卵膜从培养皿中除去, 将细胞团块轻轻吹打几次, 获得单个的细胞, 将细胞悬浮液转移到明胶处理过的 24 孔板里, 置于 24 ℃ 恒温培养箱中培养。完全培养基 SFECM1 是在 DMEM 中添加 20 mmol/L 的 Hepes, 100 U/mL 的青霉素, 100 μg/mL 的链霉素, 15% 的 FBS, 0.5% 的花鲈血清 (SPS) 和 2 ng/mL 的成纤维生长因子 (bFGF), 每隔 2~3 天更换 1 次培养基^[15–16]。

当细胞长满培养皿底部的 95% 时, 用胰酶 (含 Trypsin 0.05%, EDTA 0.02%, NaCl 0.08% 的磷酸缓冲液) 消化法将细胞按 1:2 比例进行继代培养。

收稿日期: 2007–01–29; 修订日期: 2007–03–30.

基金项目: 国家自然科学基金 (30170740); 国家 863 基础研究与发展 (2004AA626110).

作者简介: 任国诚 (1978–), 男, 博士研究生, 从事鱼类细胞生物学研究.

通讯作者: 陈松林. Tel: 0532–85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

当细胞长至一定数量后,进行冷冻保存:将已经消化好的细胞悬浮液与冷冻保存液(含 20% DMSO 的 SFECMI)在冷冻保存管中等体积混合,先在 -80°C 超低温冰箱中冷冻 4 h,再转入液氮(-196°C)中长期保存^[8-9]。

1.2 温度对细胞生长的影响

将 5×10^4 个漠斑牙鲆胚胎细胞(SFEC)接种在 12 孔培养板中,将培养板分别置于 12°C 、 18°C 、 24°C 和 30°C 培养箱中。在第 2、4、6 天,用血球记数板在显微镜下计算每孔细胞的数量^[15-16]。实验重复 4 次。

1.3 不同浓度 FBS 和 bFGF 对细胞生长的影响

将 1×10^5 个 SFEC 接种于 12 孔培养板中,置于 24°C 培养箱中培养。16~24 h 后,将原来的培养基去掉,换上含不同浓度 FBS 和 bFGF 的培养基。72 h 后,用血球记数板在显微镜下计算每孔细胞数量^[15-16]。实验重复 4 次。

1.4 染色体分析

SFEC 传至 40 多代时,进行核型分析。传代后的细胞在 25 cm^2 培养瓶中培养 24~36 h,在培养基中加入 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的秋水仙素,处理 4 h 后收集细胞,用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗处理 25 min,然后加入 1 mL 预冷的卡诺固定液,1 500 r/min 5 min,离心后加入预冷的卡诺固定液 5 mL,处理 5 min,重复 3 次。滴片时采用冷滴片法,空气中干燥后,用 5% 的 Giemsa 染色 25 min。最后进行核型分析并统计 100 个分裂相的染色体数目^[17-18]。

1.5 细胞转化

实验所用的 pCMV-EGFP 质粒由本实验室保

存,该质粒利用病毒 CMV 作为启动子。采用脂质体(Genejammer)法进行转化。将 3×10^5 SFEC 接种在 12 孔板上,16~20 h 后待细胞贴壁稳定,更换新鲜的完全培养基。转化前,用不含 FBS 和抗生素的 DMEM 将细胞洗 2 遍,换上不含 FBS 和抗生素的 DMEM 培养基。同时,将适量含 GFP 基因的质粒 DNA 和脂质体分别溶于不含 FBS 和抗生素的 DMEM 中,然后将两者以 $1\text{ }\mu\text{g}:6\text{ }\mu\text{L}$ 的比例混合,形成 DNA-脂质体混合物。将 DNA-脂质体混合物逐滴加到培养基表面,振动培养板,使混合物均匀分布在培养基中,培养 6 h 后,更换新鲜的完全培养基,继续培养 24~72 h 后,在荧光显微镜下观察荧光的表达。

2 结果与分析

2.1 胚胎细胞系的建立

将 SFEC 单细胞悬液置于 24 孔培养板中培养,12~24 h 后可观察到细胞贴壁,刚贴壁的细胞直径 $10\sim 25\text{ }\mu\text{m}$,随着细胞生长,细胞呈现出多种形态。2~3 d 后,培养孔里的细胞铺满底部,需要进行传代,以后每隔 3~4 d 传代 1 次。初期生长的细胞多呈上皮状和纤维状(图 1-A),在传至 20 多代后,上皮样细胞逐渐成为主要的形态,呈现为多边形、圆形、多角形(图 1-B)。至今 SFEC 已培养了 240 d,传至 80 多代,冷冻保存的细胞经解冻复活,成活率达到 70% 以上。

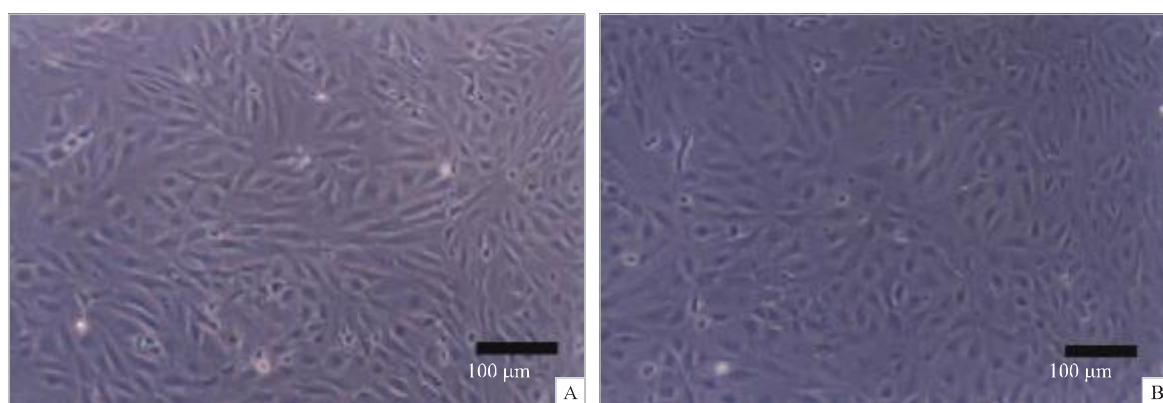


图1 第17代 SFEC(A)和第40代 SFEC(B)形态

Fig.1 Morphological characters of SFEC at generations 17 and 40

2.2 温度对细胞生长的影响

在 12~24 ℃ 之间, SFEC 的生长速度随着温度的升高而增高, 虽然细胞在 24 ℃ 和 30 ℃ 时生长都良好, 但在 30 ℃ 时生长速度开始下降, 在 12 ℃ 和 18 ℃ 时, 细胞生长速度的下降尤为显著 (图 2)。

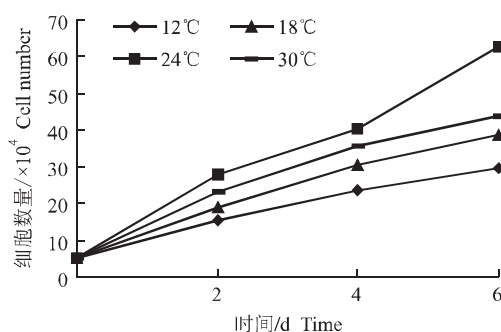


图 2 不同温度下 SFEC 的生长状况

Fig.2 Growth and proliferation of SFEC under different temperature

2.3 FBS 和各种生长因子浓度对细胞生长的影响

SFEC 在含 15% FBS 的培养基 (SFECM1) 中的生长速度比在含 7.5% FBS 的培养基 (SFECM2) 中明显要快, bFGF 的缺失 (SFECM3) 对细胞生长具有明显影响, 而 SPS 缺失 (SFECM4) 对细胞生长影响不大 (图 3)。

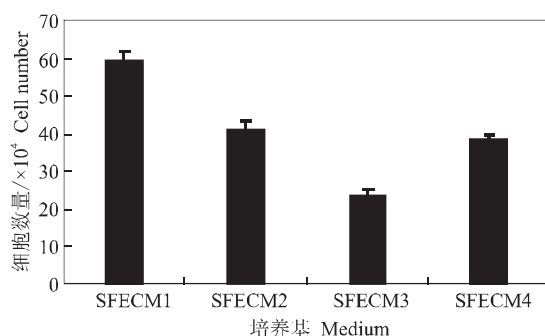


图 3 FBS 和生长因子不同浓度对 SFEC 生长的影响

Fig.3 Effect of fetal bovine serum and growth factors on SFEC growth and proliferation

SFECM1: 15% FBS, 2 ng/mL bFGF, 0.5% SPS; SFECM2: 7.5% FBS, 2 ng/mL bFGF, 0.5% SPS; SFECM3: 15% FBS, 0.5% SPS; SFECM4: 7.5% FBS, 2 ng/mL bFGF.

2.4 核型分析

SFEC 传至 45 代时进行了染色体核型分析, 在统计的 100 个分裂相中, 染色体数目为 24~72 条,

具有二倍体染色体数目 ($2n=48$) 的分裂相占全部分裂相的 60% (图 4-A)。虽然染色体数目分布不均匀, 但二倍体染色体数目出现频率是最高的, 其他非整倍体只占了很小的比例。对含有正常二倍体染色体数目的分裂相 (图 4-B) 进行核型分析, 发现 48 条染色体中有 3 对近端着丝点染色体和 21 对端着丝点染色体 (图 4-C)。

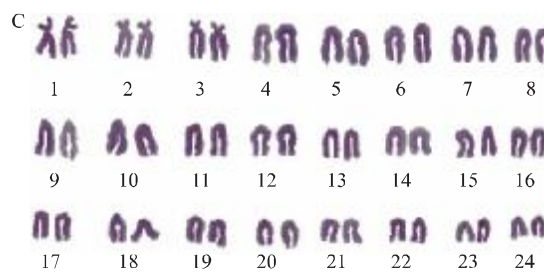
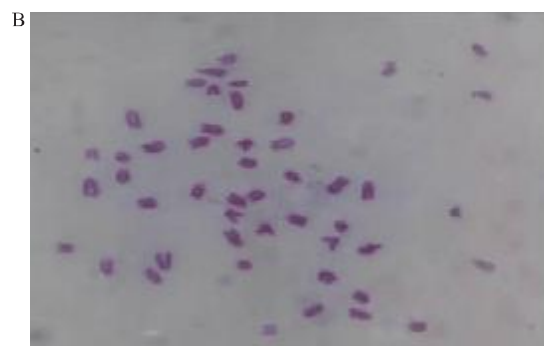
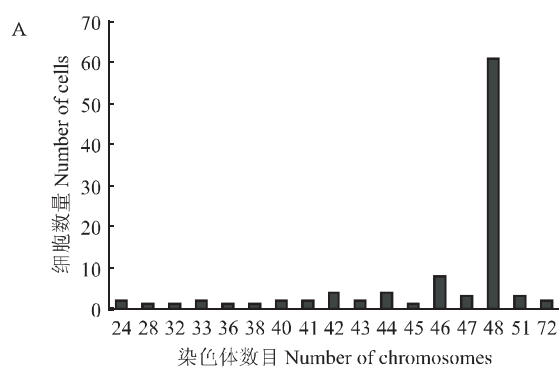


图 4 第 45 代 SFEC 染色体数目分布 (A)、二倍体中期分裂相 (B) 和核型 (C)

Fig.4 Chromosome number distribution (A), metaphase (B) and diploid karyotype (C) of SFEC at generation 45

2.5 GFP 基因在 SFEC 中的表达

通过脂质体 (Genejammer) 法成功地将线性化的 pCMV-EGFP 质粒转入到 SFEC 中, 并在转化后的 48h 观察到了 EGFP 基因的表达 (图 5)。在大约

20%的细胞中,EGFP 基因得到了表达,这证明应用脂质体法可以成功的对 SFEC 进行转化,并且 CMV 启动子可以在 SFEC 中启动 EGFP 基因的表达。

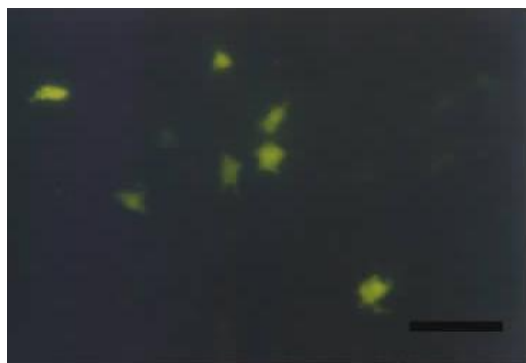


图5 GFP 基因在 SFEC 中的表达

Fig.5 Expression of GFP gene in SFEC

3 讨论

本实验从漠斑牙鲆囊胚期胚胎中建立了漠斑牙鲆胚胎细胞系。该细胞系生长稳定,具有正常的二倍体核型,至今已培养了 240 多天,传至 80 多代。

漠斑牙鲆胚胎细胞在 12~30 ℃ 的温度范围内都能生长,24 ℃ 时生长速度达到最快,是其最适宜生长温度,温度过高或过低都会使其生长减慢,温度低于 18 ℃ 时生长速度下降尤为显著。在一定浓度范围内,SFEC 的生长速度随 FBS 浓度的增高而加快,SFEC 在 FBS 浓度为 15% 的培养基中生长速度明显比在 FBS 浓度为 7.5% 的培养基中要快。在人类细胞中,bFGF 能促进人类黑色素细胞有丝分裂^[19],在斑马鱼中,bFGF 也能促进黑色素细胞的有丝分裂^[20]。本研究通过对比 SFEC 在含有和缺失 bFGF 的培养基里生长的差异,证明 bFGF 是一种能促进 SFEC 有丝分裂的因子,并推测其在其他鱼类细胞培养中也有同样作用^[8-9,21-22]。细胞的冷冻保存对于长期保存细胞来说是十分重要而且是必须的,本研究通过冷冻保存实验证明 SFEC 可以在液氮中长期保存,而且在解冻复活后复活率达到 70% 以上。

整倍体核型是鉴定一个细胞系的重要参数。本实验通过对漠斑牙鲆胚胎细胞进行核型分析发现,有 61% 的细胞具有二倍体染色体数目 ($2n=48$),具有二倍体核型的细胞所占比例接近于或高于其他所

报道的鱼类细胞系^[8-9]。在细胞转化方面,目前转化效率相对较高的方法有电穿孔法和脂质体法。这两种方法在真核细胞中都取得了较好的转化率。脂质体法简单易行,已证实能够用于多种类型的细胞转化。本实验以 GFP 基因为报告基因,通过脂质体 (Genejammer) 介导漠斑牙鲆胚胎细胞的转化,转化率达到 20% 左右,证实了脂质体法适用于漠斑牙鲆胚胎细胞的转化,GFP 基因在 SFEC 中成功的表达,为进一步进行基因打靶和功能基因分析研究奠定了基础。

目前,中国各种重要海水养殖鱼类的养殖规模逐渐扩大,但病毒病造成鱼群大量死亡,成为制约养殖业发展的瓶颈,因此,鱼类病毒学、功能基因组学已成为鱼类研究的重点和热点。细胞系是一种非常便捷的提纯、分离病毒的工具。由于缺少细胞系,很多研究工作难以开展或进展缓慢。同时,细胞系也是筛选、分析抗病功能基因的很好的材料。在很多海水养殖鱼类中,雌性个体生长速度都比雄性个体快,通过性别控制,实行单性养殖将会提高产量,降低成本,获得良好的经济效益。漠斑牙鲆胚胎细胞系的建立为这一研究方向提供了良好的实验材料,以漠斑牙鲆胚胎细胞系为材料将漠斑牙鲆建成性别控制模式鱼类具有重大意义,也将为其他鱼类性别控制研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Hightower L H, Renfro J L. Recent applications of fish cell culture to biomedical research [J]. J Exp Zool, 1998, 248: 290 - 302.
- [2] Bahich H, Borenfreund E. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review [J]. Toxicol Vitro, 1991, 5: 91 - 100.
- [3] Bols N C, Lee L E J. Technology and uses of cell culture from tissues and organs of bony fish [J]. Cytotechnol, 1991, 6: 163 - 187.
- [4] Wise J P Sr, Winn R N, Renfro J L. Generating new marine cell lines and transgenic species [J]. J Exp Zool, 2002, 15: 292 - 295.
- [5] Fryer J L, Lannon C N. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fish [J]. J Tiss Cult Methods, 1994, 16: 87 - 94.
- [6] Bejar J, Borrego J J, Alvarez M C. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata*) [J]. Aquaculture, 1997, 150: 143 - 153.
- [7] Chen S L, Hong Y, Scherer S, et al. Lack of ultra-violet light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. Gene, 2001, 264: 197 - 203.

- [8] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch blastula embryo[J]. *Aquaculture*, 2003, 218: 141 – 151.
- [9] Chen S L, Ye H Q, Sha Z X, et al. Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas[J]. *J Fish Biol*, 2003, 63: 795 – 805.
- [10] 杨先乐. 鱼类组织培养的回顾与展望[J]. *水产学报*, 1999, 23: 74 – 81 (增刊).
- [11] Chi S C, Hu W W, Lo B J. Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides*: a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV) [J]. *J Fish Dis*, 1999, 22: 173 – 182.
- [12] Chang S F, Ngho G H, Kueh L F S, et al. Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation [J]. *Aquaculture*, 2001, 192: 133 – 145.
- [13] 孙修勤, 曲凌云, 张进兴. 牙鲆淋巴囊肿病毒的病原性和免疫原性[J]. *高技术通讯*, 2000, 9: 19 – 21.
- [14] 徐洪涛, 朴春爱, 姜忠良, 等. 养殖牙鲆淋巴囊肿病原的研究. [J]. *病毒学报*, 2000, 16: 223 – 226.
- [15] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder for virus isolation [J]. *Dis Aqu Org*, 2004, 60: 241 – 246.
- [16] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot [J]. *Aquaculture*, 2005, 249: 63 – 68.
- [17] Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Hereditas*, 1964, 52 (2): 201 – 220.
- [18] Liu J, You F, Wang X C, et al. Chromosome and karyotype evidence of artificial induced gynogenesis in the olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Ocean Limnol Sinica*, 1999, 30: 68 – 72.
- [19] Halaban R, Langdon R, Birchall N, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107: 1 611 – 1 619.
- [20] Bradford C S, Sun L, Barnes DW. Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3: 78 – 86.
- [21] Sun L, Bradford C S, Ghosh C, et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4: 193 – 199.
- [22] Hong Y, Winkler C, Scharl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*) [J]. *Mech Develop*, 1996, 60: 33 – 44.

Development and characterization of a continuous embryonic cell line from southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)

REN Guo-cheng¹, CHEN Song-lin², SHA Zhen-xia²

(1. College of Marine Life Science, China Ocean University, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A continuous cell line, SFEC (southern flounder embryonic cell line), was established from embryos at gastrula stage of a marine cultured fish, southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) and was cultured for more than 240 d with more than 80 generation. The SFEC cells were cultured in DMEM medium supplemented with antibiotics, fetal bovine serum (FBS), sea perch serum (SPS), basic fibroblast growth factor (bFGF). The cells were small and round in shape and grew actively and stably in medium. Effects of temperature, FBS and bFGF concentration on the growth of SFEC cells were evaluated. The cells grew well in the temperature range of 24 – 30 °C, but had a reduced growth rate at temperature below 18 °C. The growth of SFEC cells in medium containing 15% FBS was higher than that in medium containing 7.5% FBS. Addition of bFGF to the medium significantly increased growth rate of SFEC cells. Chromosome analysis revealed that SFEC cells have a normal diploid karyotype with $2n = 6st + 42t$. GFP reporter gene was successfully transferred into SFEC cells and expressed. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 579 – 583]

Key words: embryonic cell line; southern flounder; *Paralichthys lethostigma*; karyotype; reporter gene

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn