

文章编号:1005-9737(2000)02-0010-04

中华鳖胚胎细胞体外培养的研究

吴康, 薛明强, 倪建国, 宋学宏, 贡成良

(苏州大学水产学院, 江苏苏州 215151)

摘要:研究中华鳖胚胎细胞体外培养适宜培养渗透压、培养基和培养温度等条件,并进行传代试验。结果表明,胚胎原代细胞在25~28℃,渗透压250 mmol/kg, RPMI-1640+10%小牛血清培养液及无CO₂的条件下,生长良好,72 h长满单层,并能顺利传代。细胞动力学试验表明:传代细胞1~3代为适应期、4~6代为旺盛期、7~9代为衰退期。第6代细胞染色体组型分析,其染色体为整二倍体,并未发生转化。

关键词:中华鳖;胚胎细胞;细胞培养

中图分类号:S966.5;Q813.1

文献标识码:A

近几年来,暴发性中华鳖病毒病(TSVD)^[1,2]已经成为困扰其养殖业发展的主要因素之一,并引起有关学者的极大关注^[3]。中华鳖病毒病的研究刚刚起步,有关中华鳖胚胎细胞体外培养未见报道,因而建立中华鳖细胞培养技术,进而建立其组织传代细胞株、细胞系,将有力推动中华鳖病毒病的基础研究和该病的防治研究。

1 材料和方法

1.1 试验溶液配制

1.1.1 细胞培养液 细胞培养基 RPMI-1640, TC199, MEM(Sigma 产品)按常规方法配制,分别用双蒸水、5 mol/L NaCl 溶液调节其渗透压至230 mmol/kg、250 mmol/kg、270 mmol/kg,并分别加110 IU/ml PG, 110 μg/ml STR,用7.5% NaHCO₃调节pH至7.0~7.2,0.22 μm 微孔滤膜除菌,4℃冷藏备用。

1.1.2 细胞洗涤液 参照1×Hank's 溶液配制法^[4],并通过改变NaCl浓度的方法调节其渗透压为250 mmol/kg。

1.1.3 组织消化液 用洗液配制0.25% Trypsin(日产分装1:250)作为组织消化液,配制0.1% Trypsin 作为细胞消化液,调节pH至7.2~7.4,0.22 μm过滤除菌,分装,-20℃冷冻备用。

1.2 实验胚胎准备

取中华鳖受精卵(胚验确定)数枚,消毒后,置于30℃孵化箱内孵化,参照常规甲鱼卵孵化法^[5],孵化15 d后,筛选出发育良好、胎动活泼(照卵器观察)的胚胎作为实验用胚胎。

1.3 渗透压和培养基对原代细胞生长的影响

采用无CO₂培养法。取实验用中华鳖卵数枚,表面消毒后,无菌取其胚胎,用洗液洗涤3次,去头、4肢、内脏,并剪成1 mm³左右组织块^[6],加入5~10倍体积组织消化液,28℃消化30 min,洗液洗涤3次,并加入少许洗液吹打分散组织,置于3种培养基及3种渗透压的9种处理细胞培养瓶中,每种处理重复3瓶,共计27瓶(各种培养基中均含10%的小牛血清),其细胞数均为1×10⁶ ml⁻¹,置于28℃生化培养箱中静置培养,根据培养密度(单层培养细胞长满程度),观察分析生长情况。

1.4 血清浓度对胚胎原代细胞生长的影响

从上述试验筛选出最适生长的渗透压为250 mmol/kg、RPMI-1640 培养基作为细胞基础培养基,加入小牛血清浓度分别为2.5%、5%、7.5%、

收稿日期:1999-06-19

作者简介:吴康(1965-),男,江苏南通人,苏州大学水产学院讲师,硕士,从事鱼病学基础研究。

10%、15%、20%, 每种处理各 3 瓶, 共计 18 瓶, 观察细胞生长情况。

1.5 传代细胞的培养

用渗透压为 250 mmol/kg, RPMI-1640 + 10% 小牛血清作为培养液, 将已长满单层的原代细胞, 按 1:2 分瓶传代培养, 并反复传代, 作 3、6、9 代细胞生长曲线。

1.6 传代细胞染色体组型分析

在已传至 6 代处于对数生长期细胞瓶中, 加入 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 秋水仙碱, 继续培养 6 h 后, 除去培养液, 用细胞消化液消化 3~5 min, 分散细胞后, 加新鲜的培养液终止消化 10 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 洗液洗涤备用, 染色体组型分析按培养细胞染色体分析法^[4]进行。

2 结果

2.1 渗透压和培养基对原代细胞生长的影响

9 种处理中, 培养温度 (28℃)、血清浓度 (10%)、培养时间 (72 h) 均一致, 结果见表 1。

表 1 渗透压和培养基对原代细胞生长的影响

Table 1 Effects of osmolarity and media on growth of primary cells

试验号 Test No.	基础培养基 Media	渗透压/(mmol·kg ⁻¹) Osmolarity	培养密度/% Culture density
1	RPMI-1640	230	15
2	RPMI-1640	250	100
3	RPMI-1640	270	20
4	TC199	230	10
5	TC199	250	85
6	TC199	270	15
7	MEM	230	5
8	MEM	250	70
9	MEM	270	5

表 1 表明, 中华鳖胚胎原代细胞对培养液中渗透压敏感, 对培养基种类并不十分苛求, 在无 CO₂ 状态下, 生长尚好。其中, 以 250 mmol/kg 为最适渗透压, 以 RPMI-1640 为最适培养基。

2.2 血清浓度对原代细胞生长的影响

从表 1 中筛选出细胞生长情况最好的 250 mmol/kg、RPMI-1640 作为基础培养液。分别加入 2.5%、5%、7.5%、10%、15%、20% 的小牛血清, 其它培养条件不变作原代细胞培养。按细胞贴壁时间、出现大量分裂时间以及长满单层所需时间, 分析细胞生长情况, 结果见表 2。

表 2 血清浓度对原代细胞生长的影响

Table 2 Effects of serum concentration on growth of primary cells

试验号 Test No.	血清浓度/% Serum concentration	细胞贴壁 时间/h Adhesion time	出现大量分 裂相时间/h Fission time	长满单层 时间/h Monolayer time
1	2.5	4~6	无明显分裂相 No fission	不生长 No growth
2	5	4~5	少量分裂相 Less fission	不能长满单层 No covering
3	7.5	3~4	14~16	90~96
4	10	2~3	6~8	64~68
5	15	2~3	6~8	64~68
6	20	2~3	12~14	72~74

表 2 表明, 小牛血清浓度小于 5% 时原代细胞生长不好, 甚至不生长; 小于 7.5%, 细胞生长缓慢; 10% 和 15% 时细胞生长良好; 20% 时由于血清浓度过高影响细胞生长。从表 1、2 筛选出渗透压 250 mmol/kg, RPMI-1640 + 10% 小牛血清作为最佳细胞培养液进行胚胎原代细胞及传代细胞培养试验。

2.3 原代细胞的培养

胚胎经消化的细胞呈圆形, 培养 3 h 后开始贴壁, 大部分细胞呈纤维状; 8 h 后出现大量细胞分裂相; 64~68 h 后细胞长满单层, 并有大量菊花样式生长中心。原代单层细胞见图 1。

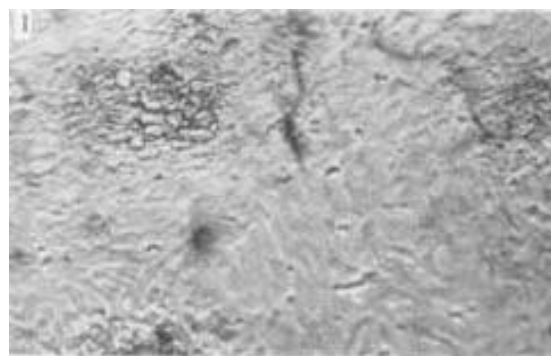


图 1 原代细胞单层 (×300)

Fig. 1 Primary culture cells

2.4 传代细胞的培养

2~3 代后的细胞, 2~3 h 开始贴壁; 8 h 后出现大量细胞分裂相; 60~64 h 后细胞长满单层, 仍然有少量菊花样生长中心。传至 4~6 代后, 细胞进入旺盛期, 1.5~2 h 开始贴壁, 6 h 后出现大量细胞分裂相, 50~56 h 长满单层, 菊花样生长中心消失。5

代单层细胞见图2。传至7~9代后,出现明显衰老现象,细胞发黑、细胞间隙增大;9代后,96 h才能形成稀疏单层,第10代细胞只有少量细胞贴壁,不能生长单层。9代细胞见图3。

3、6、9代细胞生长曲线见图4。



图2 5代细胞单层($\times 120$)

Fig.2 Fifth generation culture cells



图3 9代细胞单层($\times 120$)

Fig.3 Ninth generation culture cells

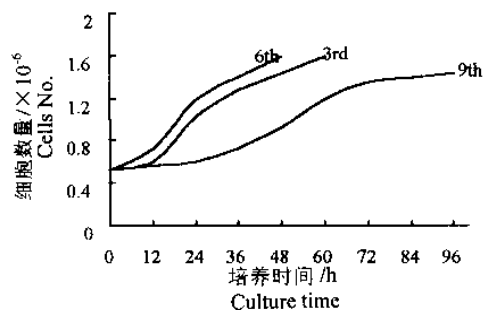


图4 3、6、9代细胞生长曲线

Fig.4 The cells growth curves in 3rd, 6th and 9th generations

2.5 传代细胞染色体组型分析

试验观察到64个染色体分散比较好的图像,计算后有58个是由66条染色体组成,占90%以上,其它图像由于制片关系染色体条数分别为58、59、62、64。因而可以确定染色体数为66条,与中华鳖体细胞染色体数一致。该传代细胞为整二倍体,未发生转化,染色体中期分裂相见图5。

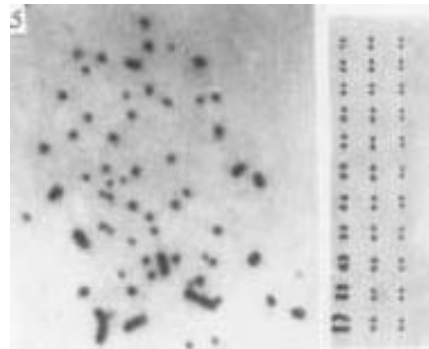


图5 6代细胞染色体中期分裂相($\times 2000$)

Fig.5 The chromosome of 6th generation culture cells

3 讨论

中华鳖胚胎细胞培养成功,为深入系统研究中华鳖病毒病提供了实验技术手段,也为中华鳖气单胞菌病原毒素在其直接宿主细胞水平上致病机理的研究提供了良好的实验材料。此外,人工培养胚胎细胞,对于探索常规抗生素的毒副作用,解决中华鳖养殖业中普遍存在的滥用抗生素问题,有着重要的理论意义和实际意义。

目前,有人成功地用EPC(鲤鱼上皮瘤细胞系)^[2]增殖中华鳖病毒(TSV),用该细胞增殖系统开发细胞苗,可能存在以下制约因素:EPC是致瘤细胞,对中华鳖有致瘤危险性;对中华鳖而言,EPC为外源细胞,增殖后病毒存在变异的可能;经EPC增殖后纯化的病毒,难免混入其它抗原,降低免疫效果。用未转化的中华鳖胚胎培养细胞作为增殖系统,可克服上述缺点,为进一步开发细胞苗提供新的途径。

经无CO₂培养,中华鳖胚胎细胞能顺利传至9代,初步说明,中华鳖胚胎细胞培养不需要苛刻的实验条件,这为今后大规模细胞苗研制提供了良好基础。由于实验条件限制,目前尚未作无CO₂培养与CO₂培养的对照试验,这项工作有待深入进行。

参考文献:

- [1] 张奇亚. 中华鳖 *Trionyx sinensis* (Weigmann) 病害及其防治研究的动态[J]. 现代渔业信息, 1997, 2(4): 3-7.
- [2] 张奇亚, 等. 中华鳖病毒病原的发现[J]. 科学通报, 1996, 41(21): 1987-1990.
- [3] 吴 康. 一种新病毒病—甲鱼红底板病原初报[J]. 畜牧与兽医, 1996, (2): 47-49.
- [4] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [5] 王殿坤. 特种水产养殖[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 284-286.
- [6] 杜 平. 医用实验病毒学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1984. 99-100.
- [7] 左文功. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 11-17.
- [8] Chen SS N, Chi S C, Kou G H, et al. Cell culture tissues of grass prawn *Penaeus monodon* [J]. Fish Pathology, 1986, 21: 161-166.
- [9] Chen S N, Shih H H, Kou G H. Primary cell cultures from tissues of penaeid shrimps and their susceptibilities to monodon-type baculovirus (MBV)[A]. Rep Fish Dis(XVI)[C]. 1995. 1-14.

Embryo cell cultures in vitro from *Trionyx sinensis*

WU Kang, XUE Ming-qiang, NI Jian-guo, SONG Xue-hong, GONG Cheng-liang
(Aquaculture College, Suzhou University, Suzhou 215151, China)

Abstract: The optimum medium, osmolarity and culture temperature for the embryo cells from *Trionyx sinensis* cultured in vitro and the growth behaviors of primarily cultured and subcultured embryo cells were studied. RPMI-1640 medium with 10% calf bovine serum was found to provide the best results. The optimum osmolarity for embryo cells culture in RPMI-1640 medium were approximate 250 mmol/kg, an optimum temperature range of 25~28℃ and incubation in a normal atmosphere. Under the above conditions, monolayers of primarily cultured embryo cells were routinely obtained with 100% confluence within 72 h and the primarily cultured cells can also be successfully subcultured under the same condition. The cell kinetic assay indicates that there are an adaptable growth period in 1st~3rd generations, a fast growth period in 4th~6th generations and a degenerating period in 7th~9th generations. Kary type analysis indicates that 6th generation of the cells are deploids in the chromosomes without transformation.

Key words: *Trionyx sinensis*; embryo cells; cell culture