

淡水鱼类细胞库的构建*

钱华鑫 曾勇 王凯 陈细华 鲁大椿

(长江水产研究所 淡水鱼类种质资源与生物技术实验室 荆沙市 434000)

沈锦玉 尹文林 曹铮 张念慈

(中国水产科学研究院鱼病实验室 湖洲 313001)

摘要 以几种淡水养殖鱼的组织和胚胎为材料, 经 12-24 个月的继代培养, 先后建立了鲢尾鳍细胞系 (简称 SCF)、鳙吻端细胞系 (简称 BHS)、团头鲂尾鳍细胞系 (简称 WCF)、银鲫囊胚细胞系 (简称 CGB)、鲤胚胎细胞系 (简称 CE) 和大鳞副泥鳅胚胎细胞系 (简称 LB)。上述细胞的最适培养温度是 25-28℃, 细胞形态分别以多角形的上皮样或梭状的成纤维样为主, 细胞染色体数已有正二倍体向异倍体变化的趋势。各细胞系已保存于液氮中。

关键词 淡水鱼类, 细胞培养, 细胞库

前言

鱼类细胞培养是开展鱼类病毒性病原、疫苗制备和鱼类细胞工程等研究的基础。国外自 1961 年建立第一个鱼类细胞以来, 至 1980 年统计已有 60 余株细胞, 并有专门机构保藏和出售各种细胞, 例美国的 ATCC。我国自七十年代开展鱼类细胞培养至今已有 20 余株细胞保存于建株单位的实验室^[1-6]。这些细胞的建立, 在鱼病防治和鱼类育种研究工作中起了积极作用, 长江水产研究所和浙江淡水所分别用草鱼肾细胞和吻端细胞培养草鱼出血病病原-呼肠孤病毒, 并在此基础上, 成功的研制了草鱼出血病细胞培养免疫灭活疫苗。中科院水生所于 1980 年用鲫鱼囊胚继代培养细胞作为供体进行同种鱼的核移植研究。陆仁后等 (1982 年) 通过人工诱导培养细胞获得四倍体细胞, 通过核移植获得四倍体个体的研究。我国自 1991 年中科院建立的第一个细胞库和武汉大学的中国异型培养物保藏中心均保存了大量细胞, 但鱼类细胞甚少。本课题旨在研究鱼类组织细胞体外培养技术、保存条件以及传代细胞的生物学特性, 在此基础上构建淡水鱼类细胞库, 为科学研究和渔业生产建立、收集和提供所需的鱼类细胞。

* 本文为实验室开放课题实 90-5 研究内容

材 料 和 方 法

实验用材料鱼取自本所试验场,体长5-15厘米的鱼种,在实验室内暂养一周,确无病症方可使用。

(一)原代细胞培养

1. 组织块培养法 本方法适用于鳍条或吻端等体表组织,在对鱼体作常规消毒后,直接用酒精棉球擦鱼的尾鳍或吻端部1-2次,剪下尾鳍的边缘或吻端的表皮,放入含有双抗的Hank's液的小烧杯中,用Hank's液清洗3-4次后,将组织剪成 1mm^3 小块,再用Hank's液漂洗一次后,加入少量含20%小牛血清的E-MEM或TC-199原代培养液(PH为7.0-7.2)。用无菌吸管将组织块均匀的平贴到细胞瓶内,轻轻的加入0.5毫升原代培养液,28℃培养,24小时后再加2毫升原代培养液,仍放在28℃培养箱内进行原代细胞培养。

2. 消化培养法 此方法应用于脏器组织。取材前,先用0.01%高锰酸钾溶液浸泡鱼体20分钟,刺脊髓致死,再用酒精棉球和碘酒涂擦解剖部位,剖开腹腔,以无菌手续取出所需的肝脏或肾脏,放到盛有双抗的Hank's液的器皿中,剥离并弃去血丝与筋膜等,用无菌小剪将组织剪碎,用Hank's液清洗3-4次,加入0.25%胰酶3-5毫升,于20℃保温20分钟,随时观察消化情况,待组织表面呈毛絮状,立即终止消化,倒去胰酶,用Hank's液洗一次后,加入适量原代培养液,用吸管轻轻吹打,使其分散成单个或几个细胞的小团,制成每毫升含 1×10^5 个细胞的悬液,以每瓶3毫升分装到细胞瓶内,放入28℃培养箱内进行原代细胞培养。

3. 囊胚细胞培养 将发育至囊胚期的胚胎放入无菌培养皿中,先用70%酒精浸泡30秒钟,然后用含双抗的Hank's液漂洗3-4次,再用0.1-0.5%的胰酶消化卵膜,用吸管将裸卵吸到另一个含有少量原代培养液的培养皿中,用无菌玻璃针切割囊胚组织,弃去卵黄,将囊胚吸到细胞瓶内,加入适量原代培养液,用吸管轻轻反覆吹打,使囊胚分散成单个或几个细胞的小团,并制成一定浓度的细胞悬液,分装,每瓶3毫升,放入25℃培养箱中培养,待24小时后,可观察细胞贴壁的情况。

(二)继代培养 用上述方法培养的原代细胞,在培养过程中根据培养液颜色(PH)的变化程度要适当更换部分培养液,以保证营养,更换量为原培养液的 $1/3$ - $1/2$,约经20天左右,待细胞基本长成单层,即可进行常规传代,五代前为原瓶传代,从第六代开始,细胞生长逐渐稳定,就可以一瓶传为两瓶,培养液的血清含量可降到10-15%(PH为7.2-7.4)。

(三)细胞生物学特性测定

1. 细胞形态 取一定浓度的传代细胞悬液,接种到预先放有小玻片的细胞瓶内,28℃培养3-4天,待小玻片上的细胞长成单层,先进行活体观察,然后固定、染色,在倒置显微镜下观察细胞形态和结构,并拍照。

2. 细胞生长速度 将制成每毫升含 1×10^5 个细胞的传代细胞悬液,分别接种到若干链霉素瓶内,每瓶1毫升,28℃培养,每隔24小时,任取2-3瓶培养细胞,消化计数,取每毫升细胞平均数,连续七天,绘出细胞生长曲线。

3. 细胞分裂指数 将制成一定浓度的传代细胞悬液, 接种到预先放有小玻片的细胞瓶内, 每瓶 3 毫升, 28℃ 培养, 每隔 24 小时任取一瓶, 取出小玻片, 甲醇固定, 姬姆萨液染色, 油镜下统计分裂相的千分比。

4. 细胞染色体分析 传代细胞接种 24 小时后, 用染色体常规制片法制片^[7], 选择分散较好的分裂相在油镜下统计染色体数目, 拍照, 并绘出染色体数目的分布图。

5. 细胞对温度的适应性 方法同测定细胞生长曲线, 只是将分装好的细胞分别放到五个不同温度下培养, 每隔 24 小时, 从每组中任取 2-3 瓶培养的细胞, 进行消化计数, 连续七天, 观察不同温度下细胞的生长状况, 并绘出五种温度培养下的细胞生长曲线。亦可用不同浓度的细胞在不同温度下培养, 观察细胞长满单层所需要的时间, 以了解细胞对温度的适应性。

6. 细胞的保存 将基本长成单层的传代细胞放入 10-15℃ 培养箱中, 经常观察细胞的贴壁情况, 并作不定期的传代培养试验。细胞长期保存采用 -196℃ 液氮冻存。

结 果 与 讨 论

(一) 原代培养及细胞系的建立

原代细胞经 20-30 天培养, 细胞长满单层, 经过 30-50 次传代培养, 分别建立了 SCF、BHS、WCF、CGB、CE 和 LB 六株细胞, 细胞生长基本正常, 但部分细胞有衰退现象, 表现为生长缓慢, 不易形成单层, 即使形成单层也很快从瓶壁上脱落而死亡。

(二) 细胞形态

经活体和染色后观察, SCF、WCF、CGB、CE 和 LB 五株细胞均为多角形上皮样细胞, BHS 为梭状的成纤维样细胞, 传代细胞多为单核, 有 1-2 个核仁。见图 1 和图 2。

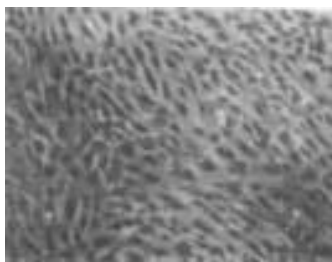


图 1 SCF 第 34 代细胞

Fig.1 The 34th generation cells of SCF strain



图 2 BHS 第 23 代细胞

Fig.2 The 23th generation cells of BHS strain

(三) 细胞生长速度

经连续七天对几株细胞的生长进行观察并统计细胞数, 其生长高峰与接种浓度有关, 一般在第五或第六天, 然后开始下降, 当传代细胞的浓度每毫升低于 1×10^4 个时, 达到高峰的时间就要延长。

(四) 细胞分裂指数

六株细胞分裂指数的高峰在第一或第二天, 以后逐渐降低, 分裂指数值在 20-38 之间。

(五) 细胞染色体分析

对六株细胞染色体数的测定结果来看, 除 BHS 细胞外, 均属二倍体细胞, 但其染色体数目的分布范围较广, 除 SCF 第 40 代细胞的染色体众数为 48, 占 70% (见图 3), 属正常二倍体外, 其余四株细胞染色体数为: WCF 第 40 代染色体数分布范围是 43-100, 中心为 48-49, 主峰为 48, 属二倍体细胞。CGB 细胞染色体数分布为 62-182, 主峰为 156 ($2n$), 属正常二倍体。LB 第 27 代和 CE 第 24 代细胞染色体数的分布范围, 前者是 32-96, 后者为 43-156, 主峰分别为 48 和 100, 所以均属二倍体细胞。唯 BHS 细胞第 12 代的染色体众数为 48, 而到第 22 代细胞的中心已趋向 67-74, 已属异倍体细胞。Wolf (1969) 认为: 已检查过染色体数目的鱼类细胞系, 几乎全部是异倍体细胞系, 与哺乳类动物相似的鱼类二倍体细胞系是存在的, 但很少。Wolf 还指出“在所有的动物细胞系中, 在获得无限期培养的潜能时, 总是伴随着改变成为异倍体染色体组成^[10]……”。我们实验的结果也表明这一点。经过离体培养的细胞, 特别是多次传代的细胞, 普遍存在着染色体数目的变化^[3,8,9]。这是因为离体培养细胞的培养条件不可能与动物体内的条件完全一致, 况且在动物细胞中尚存在着高频率的染色体重排, 遗传信息的脱离和位置效应等。离体细胞的生存条件不如体内稳定, 更易出现变化, 所以在建立细胞株时, 应保存染色体数尚未出现变化的低代细胞, 并尽可能保持培养条件的一致, 以减少或延迟染色体数目的变化。图 4 和图 5 为 SCF 和 BHS 细胞的染色体图象。

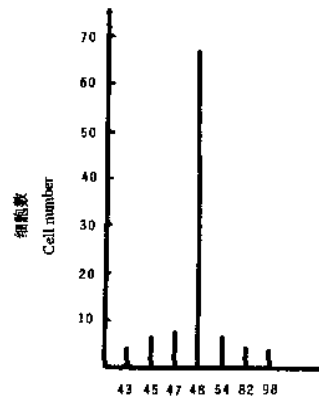


图 3 SCF 第 40 代染色体数分布图

Fig.3 The distribution of chromosome numbers of the 40th generation of SCF strain



图 4 SCF 细胞染色体图象

Fig.4 The chromosome of SCF cell



图 5 BHS 细胞染色体图象

Fig.5 The chromosome of BHS cell

(六) 细胞对温度的适应性

经培养试验,淡水养殖鱼类细胞能在 10–39℃ 较宽的范围内生长,最适培养温度是 25–28℃。图 6 表示 SCF 细胞在五种温度培养的细胞生长曲线,从图中可看出,4℃ 细胞基本不生长,37℃ 时前三天细胞生长很快,以后开始下降,42℃ 时细胞到第四天全部死亡,在 15℃ 和 28℃ 时细胞生长较好,但在 15℃ 时达到高峰的时间稍长,在 28℃ 培养的细胞,生长比较稳定,未出现明显高峰。表一为 BHS 细胞不同浓度在不同温度条件下培养细胞长成单层所需要的时间,经观察,细胞在 39℃ 是呈悬浮状态,甚至死亡,4℃ 不贴壁生长,在 14℃ 时细胞浓度每毫升超过 1×10^5 个,培养 15 天也能长满单层,形态也很好,低于此浓度细胞不贴壁或少量贴壁但不生长,在 35℃ 时细胞略比其它适温温度长得快,但细胞形态较差。由此看来,鱼类细胞体外培养的最适温度与其在自然环境中最适生长温度基本一致,而不同细胞对温度的敏感也有一定的差异。

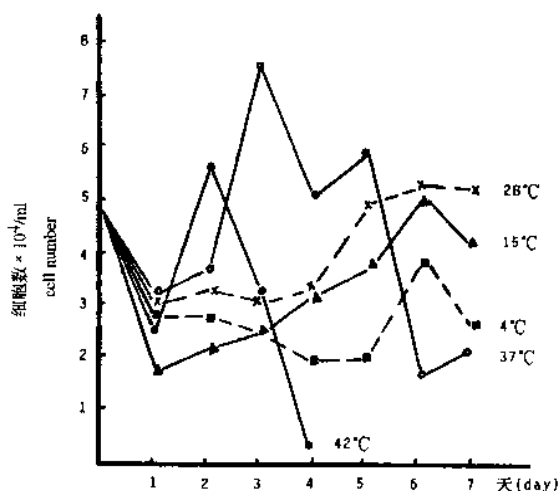


图 6 SCF 第 41 代细胞不同温度下生长曲线
Fig.6 The growth curve of the 41th generation cells of SCF at different temperatures

表 1 不同浓度的 BHS 细胞在不同温度条件下长满单层时间
Table 1 The time used by BHS cells growth to monoayer at different temperatures and different initial cell concentration

接种浓度 Cell number 天数 Day 温度℃ Temperature	3×10^6 个 / ml	1.2×10^5 个 / ml	6×10^4 个 / ml	3×10^4 个 / ml
4	/	/	/	/
14	ND	16	/	/
18	8	12	13	/
25	1	2	7	0
28	1	2	7	10
30	1	2	7	10
35	1	2	7	10
39	/	/	/	/

ND: 没有做.

/: 细胞接种后不长.

ND: not determined

/: no cell growth

(七)细胞的保存与复苏

传代细胞在 10–15℃ 中保存的时间和效果因不同的细胞株或同一细胞株的不同代相差

很大,例 SCF 第 25 代细胞在 15℃ 中保存 122 天,细胞开始脱落,但尚能传代,有一瓶第 34 代的细胞保存了 270 天,细胞仍能正常传代。LB 细胞在 10℃ 中保存 60 天,细胞已老化脱落,而 CE 细胞保存到 90 天仍未脱落,且能正常传代。所以在 10-15℃ 中保存的细胞要经常检查,一般以 30 天传代一次为宜。液氮保存的细胞,经观察,在复苏后,有一短暂的恢复期,7-10 天长满单层,并可继续传代。

细胞库的构建

构建鱼类细胞库的关键之一是细胞的保存条件和技术,迄今为止,较好的方法仍是 -196℃ 液氮冻存,国内外已建立的动植物细胞均采用此法保存。据报导,在液氮中保存的细胞不会改变其特性,并可无限期保存。我们于 1992 年保存的细胞,经复苏后,细胞形态未见变化,至于染色体数是否有变,尚待进一步观察。实验室短期保存采用稍低的 10-15℃ 环境中保存。通过近三年工作,我实验室已具有构建淡水鱼类细胞库的基本条件和技术力量,可同时收集并保存 40-60 株鱼类细胞。

参 考 文 献

- [1] 张念慈等, 1981. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901 S1 的建立和特性观察。水产学报, 5 (2): 111-120.
- [2] 左文功等, 1984. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立。淡水渔业, (2): 38-39.
- [3] 陈敏容等, 1985. 鲤鱼异倍体细胞系的建立及其生物学特性。水产学报, 9 (2): 121-130.
- [4] 张念慈等, 1991. 团头鲂尾鳍细胞系 TQ-8801 的建立。科技通报, (2): 87-89.
- [5] 李焕林等, 1988. 草鱼吻端成纤维细胞系 PSF 的建立及其生物学特性。中国水产科学院学报, 1(1): 1-8.
- [6] 魏彦章等, 1986. 草鱼尾鳍组织二倍体细胞系 GCCF-2 的建立及其生物学特性的分析。10(3).
- [7] 余先觉主编, 1989. 中国淡水鱼类染色体。140~142. 科学出版社。
- [8] YUANAN Lu et al, 1990. Fish cell lines: Establishment and characterization of three new cell lines from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). 1990. 26(3): 275-279.
- [9] Wharton et al. 1977. Fish cell culture: characteristics of a cell line from the silver perch, *Bairdiella chrysura*. In Vitro. 13(6): 389-397.
- [10] Wolf et al. 1969. Fish cell and tissue culture. in : Hoar, W. S. and Randall, D. J. (ed): fish physiology. 3: N. Y., Academic press.

CONSTRUCTION OF FRESHWATER FISH CELL BANK

Qian Huaxin Zeng Yong Wang Kai Chen Xihua Lu Dachun

(Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology Laboratory, Shashi 434000)

Shen Jinyu Yin Wenlin Cao Zheng Zhang Nianci

(Laboratory of Fish Diseases, Chinese Academy of Fishery Sciences, Hu Zhou 313001)

ABSTRACT Silver carp caudal fin cell line (SCF), bighead snout end cell line (BHS), Wuchangfish caudal fin cell line (WCF). *Carassius gibelio* blastula cell line (CGB-9101) and common carp embryonic cell line (CE) were constructed after 12-24 months' subculture of the tissues and embryos of cultured freshwater fish mentioned above. Besides, Common carp and scattered scale mirror carp caudal fin cell lines are also under construction. The optimum temperature for cell culture of the above cell lines are 25-28°C. The cellular morphology is mainly epithelioid or fibroid. The chromosome number tends to convert orthoploid into heteroploid. Each cell line is under preservation in liquid nitrogen.

KEYWORDS Freshwater fishes, Cell culture, Cell bank