

天祝白牦牛肾组织成纤维细胞系的建立与生物学特性研究

冯若飞¹, 马忠仁¹, 关伟军², 李明生¹, 乔自林¹, 冯玉萍¹, 周雪雁¹

(1. 西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 采集天祝白牦牛胚胎肾组织, 用胰蛋白酶热消化法制备原代细胞, 通过差速消化和差速贴壁法继代培养和细胞纯化, 扩增至 F₃ 代后冷冻保存, 并对复苏细胞的形态、活力、生长曲线、荧光蛋白质粒转染表达、核型以及乳酸脱氢酶同工酶等生物学特性进行了分析。结果显示, 原代和传代细胞生长形态良好, 群体倍增时间为 27.2 h; 染色体 2n=60; 二倍体为 74%, 占主体; 乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱有明显特征, LDH₅ 浓度较高, 活性较强; 外源质粒在该细胞中能进行复制和表达; 细菌、真菌、病毒、支原体检测呈阴性。表明本研究已成功建立天祝白牦牛肾组织成纤维细胞系, 该细胞系的建立, 使天祝白牦牛这一国家重要种质资源在细胞水平上得以保存, 也为基因组文库和体细胞克隆等研究提供了理想的生物材料。

关键词: 天祝白牦牛; 肾组织; 成纤维细胞系; 生物学特性

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)06-0726-07

Establishment and Characteristics of Tianzhu White Yaks Kidney Explant Fibroblast

FENG Ruo-fei¹, MA Zhong-ren¹, GUAN Wei-jun², LI Ming-sheng¹,

QIAO Zi-lin¹, FENG Yu-ping¹, ZHOU Xue-yan¹

(1. The Key Bio-engineering and Technology Laboratory of National Nationality Commission, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The Tianzhu White yaks kidney explant was cultured with trypsinization and then subcultured. Observations on morphology, dynamic growth, fluorescein plasmid transfection and expression, and analysis of karyotype, isoenzyme of lactate dehydrogenase were carried out. The results showed that population doubling time of cells (PDT) was 27.2 h; the chromosomes were 60 and diploid cells were dominant of 74%. The banding patterns of the isoenzyme of lactate dehydrogenase had significant difference. As follow, the LDH₅ was higher and stronger; the exogenous plasmid could copy and express in the cell, tests for bacteria, fungi and yeasts, virus and mycoplasma were negative. Those showed that the cell line was successful, and it make the Tianzhu White yaks, a national important genetic resource preserved in cell level, as well as will provide an ideal experimental material for genetic studies.

Key words: Tianzhu White yaks; kidney explant; fibroblast cell line; biological characteristics

白牦牛产于甘肃天祝, 是世界独一无二珍贵畜种。20 世纪 80 年代, 天祝白牦牛经过专家调查论

证,确定为“国内外牦牛中极其珍贵的地方类群”,被载入《中国牛品种志》和《甘肃省畜群品种志》。1996年,国家级天祝白牦牛种质资源保护项目正式被国家农业部批准立项,为白牦牛畜种的发展提供了有力的保障。但保护这一物种基因资源,维护生物多样性,维持其种群数量等任务仍十分艰巨。本研究从培养和保存二倍体稳定细胞—成纤维细胞入手,对该细胞系的生物学特性进行研究,以期使这一稀有品种的遗传资源从细胞水平上长期保存下来,同时也为构建基因组文库,体细胞克隆,基因遗传多样性研究等提供理想的生物学材料^[1-3]。

1 材料与方法

1.1 材料

CK40-32PH 型倒置相差显微镜(Olympus)、CK41 型荧光倒置相差显微镜(Olympus)、3110 型 CO₂ 培养箱(Thermo)、普通生物显微镜(Olympus)、MP120 型便携式酸度计(METTLER TOLEDO)、液氮贮存器(Thermo)、DYY-12 型电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂)、AR2140 型电子天平(奥豪斯公司)、生物洁净工作台等。

MEM(HyClone)、胎牛血清(HyClone)、胰蛋白酶(Gibco)、DMSO(Sigma)、PBS(自制)、0.85% NaCl(自制)、青霉素、链霉素(国产)、秋水仙素(Sirius 进口分装)、Giemsa 染料(Amresco)、Trypan-blue(Sigma)、THIO(DIFCO)、TSB(DIFCO)、Hoechst33258(Sigma)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV,中国兽药监察所 OregonC₂₄V 株)、丙烯酰胺(Acr,国产)、甲叉双丙烯酰胺(Bis,Cx bic 进口分装)、吩噻硫酸甲酯(PMS,Generay Blotech Co. Lta)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT,Generay Blotech Co. Lta)、辅酶 I (NAD⁺, AMRESCO)、四甲基乙二胺(TEMED, Sigma)、TritonX-100、红色荧光蛋白质粒(pDsRed-Monomer-N1, Clontech)、脂质体(Lipofectamine™ 2000, invitogen)等。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 所有样品均采自天祝县某屠宰场。在屠宰场选取受孕母牛,屠宰剖开腹腔后,剪取子宫,用线绳扎住宫颈,立即放入 8~12℃ 的标本箱中并与冷媒保持一定距离,在 6 h 内运输到实验室;在生物洁净工作台内无菌取出胎牛,剖开胎牛腹腔,将其整个肾脏取下,置于已消毒的 φ90 mm 培养皿并做好标记。

1.2.2 原代培养 用 0.25% 胰蛋白酶热消化的方法^[4]分离细胞并进一步培养,原代培养接种浓度约 5.0×10^5 /mL,置于培养箱(CO₂ 浓度 5%, 37℃)中培养。视原代细胞的贴壁生长情况,在视野中出现大量细胞明显贴壁时,换加等量的新鲜细胞培养液继续培养。

1.2.3 传代培养 当培养的细胞 80%~90% 汇合后,采用常规的方法^[5]进行传代,在传代时采用差速消化和差速贴壁法^[6],纯化成纤维细胞。视细胞生长和代谢物情况进行换液,适时观察拍照记录,同时也可进行相应的生物学特性研究。

1.2.4 细胞保存 采用液氮超低温保存(-196℃),冻存前 24 h 更换新鲜培养液,常规法消化细胞,制备成细胞悬液后通过计数计算细胞总量。以 1 000 r/min 离心 10 min 弃上清再重复离心 1 次,尽量除去胰蛋白酶。加入 4℃ 预冷的冻存保护液(90% FBS+10% DMSO 或 70% MEM+20% FBS+10% DMSO),调整细胞密度约 3.0×10^6 /mL。每支冻存管中装约 1 mL 后封口,标明日期、品种、细胞名称和培养代数。冻存管置于 4~8℃ 使其 DMSO 充分渗透到细胞内,平衡 2 h,移到液氮罐液氮表面以上预冷,再每隔一定时间向下降一定高度,约 2 h 完全放入液氮罐底部。

1.2.5 细胞复苏 从液氮中取出冻存管,立即投入 39~40℃ 水中快速晃动,直至冻存液完全融解,最好在 90 s 内完成复温过程。移入洁净工作台中加入约 10 mL (50 mL 培养瓶)培养液,置 5% CO₂ 培养箱中培养,2 h 后换加等量的新鲜细胞培养液以降低 DMSO 对细胞的损害作用。根据以下试验进展情况,及时进行传代。

1.2.6 细胞活力检测 用台盼蓝染料排除法^[6],将待检细胞复苏后稀释 10 倍制成细胞悬液,取细胞悬液 0.5 mL+1% 台盼蓝染液 0.5 mL,混匀。血球计数板计数^[7],健康活细胞胞体完整,细胞透明,不着色,凡着色呈蓝色者均为死细胞。活细胞和死细胞分别计数,计算活细胞占细胞总数的百分数即细胞活力。冻存前和复苏后细胞分别计数 1 000 个细胞,并计算细胞活力。

1.2.7 复苏细胞生长曲线 将复苏后传代 1 次的细胞,调整终浓度为 1.0×10^4 /mL 并接种到 24 孔培养板上,继续培养,连续计数 7 d,每次计数 3 个孔,将计数结果应用 SPSS10.0 软件进行处理,绘制生长曲线并求得倍增时间参数(PDT)^[8]。

1.2.8 复苏细胞染色体分析 按照常规方法进行染色体制片^[5,9-10],Gimesa 染色后油镜下观察并照相。对 50 个铺展完好的中期相统计染色体数目,并进行核型分析。

1.2.9 同工酶分析 首先收集细胞,用 PBS 清洗,约 5×10^7 /mL 细胞重悬,制备酶的提取液。回收上清液,贮存于 -70°C 。采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法^[11-12]对样品进行分析。电泳结束后,将浓缩胶割去,同酶试剂反应,孵化 5~20 min,洗胶、干燥、检测^[12]。

1.2.10 细菌、真菌、支原体检测

1.2.10.1 细菌、真菌检测: 所有的待检细胞在无抗生素培养液中培养,传代后 3 d 内进行检测。在原代培养和传代同时,显微镜下观察有无活动的黑色颗粒;并取 2 mL 细胞培养液分别加入 TSB 和 THIO 培养基中,培养 14 d,观察培养基有无颜色变化;

1.2.10.2 病毒检测: 日常培养中,在相差显微镜下注意观察有无蚀斑、空斑等病毒损伤情况;另外随机挑选细胞进行外源因子试验^[13]。

1.2.10.3 支原体检测: 培养法及 DNA 荧光染色法^[14]对复苏后传代细胞悬液进行检测。

1.2.11 荧光蛋白质粒转染表达 选取致密度达 70%~80%且生长旺盛、形态好的细胞,用 PBS 漂洗细胞 2 次,将 DNA、脂质体和不含血清的培养液的混合物滴加在待转染的细胞表面,于 CO_2 培养箱中继续培养 5~24 h,倒掉转染液,加入含血清的培养液,于培养箱中继续培养细胞,在 488 nm 蓝色荧光激发下观察红色荧光蛋白的表达结果,并拍照。

2 结果

2.1 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞形态学观察

1~2 d 后便可见大量上皮样细胞与成纤维样细胞混杂生长,4~6 d 后便可铺满瓶底。细胞经传代、筛选纯化后,成纤维细胞生长逐渐占优势,经 2~3 次传代,即可完全排除上皮型细胞。细胞贴壁后大致呈梭形或不规则形,细胞核位于中央,胞质外伸出 2~3 个长短不同的突起,生长时呈放射状、漩涡状走向,细胞界限不清晰;原代细胞及传代后细胞见图 1、2。

2.2 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞冻存前及复苏后细胞活率

天祝白牦牛肾组织成纤维细胞冻存前细胞活力

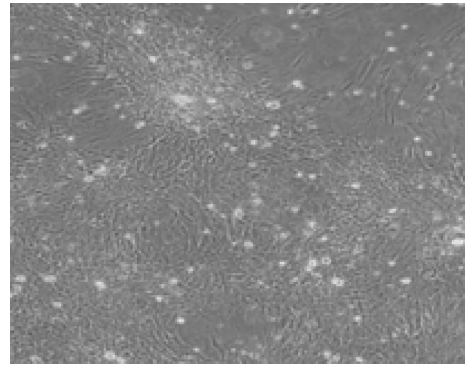


图 1 天祝白牦牛肾组织成纤维原代细胞

Fig. 1 Primary explant culture fibroblasts of kidney from Tianzhu White yak (96 h, $\times 40$)

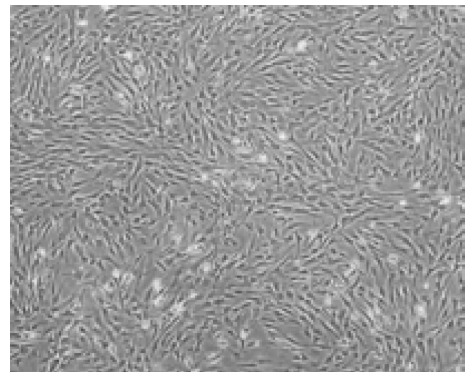


图 2 天祝白牦牛肾组织成纤维 F₃ 代细胞

Fig. 2 F₃ explant culture fibroblasts of kidney from Tianzhu White yak (72 h, $\times 40$)

平均达到 95.4%,复苏后平均达到 93.3%,细胞在冻存前和复苏后均有较高的存活力,达到 90% 以上。

2.3 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞生长的动态观察

接种密度为 1×10^4 /mL,每周换液 3 次。经 SPSS 软件统计和计算,得其最大增值浓度 40.5×10^4 /mL,其平均倍增时间为 27.2 h,绘制细胞生长曲线见图 3。

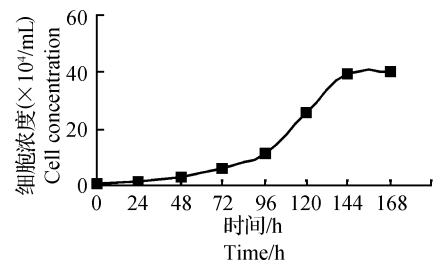


图 3 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞生长曲线

Fig. 3 The growth curve of Tianzhu White yak kidney fibroblasts

2.4 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞染色体观察

天祝白牦牛体外培养的成纤维细胞正常染色体数为 $2n=60$, 包括 29 对常染色体和 1 对性染色体, 常染色体 29 对为端着丝点染色体, 性染色体 X 和 Y 染色体为近中着丝粒染色体, 计数 50 个细胞染色体数目时, 对 $2n=60$ 的进行统计, 为 74%, 染色体中二倍体占主体。染色体的特征见表 1、2 和染色体核型见图 4、5。

表 1 天祝白牦牛成纤维细胞染色体特征(♂)

Table 1 Chromosome characteristics(♂)

编号	相对长度	类型	编号	相对长度	类型
No.	Relative length	Type	No.	Relative length	Type
1	5.74±0.13	T	17	3.15±0.17	T
2	5.37±0.19	T	18	3.11±0.15	T
3	4.81±0.14	T	19	3.01±0.07	T
4	4.72±0.21	T	20	2.96±0.13	T
5	4.31±0.15	T	21	2.87±0.20	T
6	4.07±0.12	T	22	2.82±0.18	T
7	4.07±0.09	T	23	2.78±0.07	T
8	3.70±0.11	T	24	2.77±0.09	T
9	3.70±0.05	T	25	2.67±0.15	T
10	3.70±0.19	T	26	2.65±0.13	T
11	3.66±0.16	T	27	2.63±0.19	T
12	3.61±0.04	T	28	2.59±0.04	T
13	3.52±0.02	T	29	2.59±0.12	T
14	3.33±0.18	T	X	5.86±0.06	SM
15	3.19±0.11	T	Y	0.90±0.19	SM
16	3.15±0.13	T			

表 2 天祝白牦牛成纤维细胞染色体特征(♀)

Table 2 Chromosome characteristics(♀)

编号	相对长度	类型	编号	相对长度	类型
No.	Relative length	Type	No.	Relative length	Type
1	5.80±0.08	T	17	3.00±0.08	T
2	8.20±0.12	T	18	2.95±0.24	T
3	4.91±0.15	T	19	2.84±0.21	T
4	4.83±0.04	T	20	2.84±0.31	T
5	4.26±0.23	T	21	2.78±0.20	T
6	4.01±0.24	T	22	2.76±0.16	T
7	3.98±0.08	T	23	2.62±0.13	T
8	3.83±0.09	T	24	2.62±0.21	T
9	3.82±0.21	T	25	2.61±0.22	T
10	3.80±0.31	T	26	2.58±0.17	T
11	3.72±0.24	T	27	2.43±0.09	T
12	3.52±0.26	T	28	2.40±0.05	T
13	3.31±0.15	T	29	2.34±0.15	T
14	3.19±0.14	T	X	5.78±0.16	SM
15	3.14±0.09	T	X	5.72±0.14	SM
16	3.08±0.01	T			

2.5 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞同工酶分析

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对天祝白牦牛肾组织成纤维细胞的乳酸脱氢酶进行了测定, 并与大通牦牛肾组织成纤维细胞电泳图谱进行比较, 结果见图 6。从图中看出, 天祝白牦牛乳酸脱氢酶同工酶显示 LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄、LDH₅ 5 条谱带, 大通牦牛只显示 4 条谱带, 缺 LDH₅ 谱带, 二者比较, 对应谱带的浓度明显不同。



图 4 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞染色体核型(♂)

Fig. 4 Metaphase chromosome and its karyotype of Tianzhu White yak(♂)

2.6 荧光蛋白质粒转染表达

天祝白牦牛肾组织成纤维细胞经脂质体介导红色荧光蛋白质粒(pDsRed-Monomer-N1)转染后 12 h 即可见发红色荧光的细胞, 分布均匀, 但强度较弱。转染 24 h 后阳性细胞明显增多, 强度增强(图

7)。

2.7 污染的检测

2.7.1 细菌和真菌检测 每次处理细胞时(如: 换液、传代、冻存等)用肉眼检查污染, 同时借助显微镜检查污染, 已建库保存的细胞中没有发现污染的特



图 5 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞染色体核型(♀)

Fig. 5 Metaphase chromosome and its karyotype of Tianzhu White yak(♀)

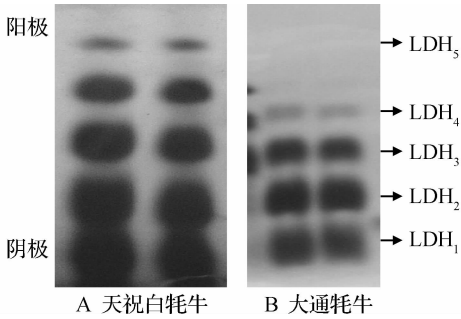
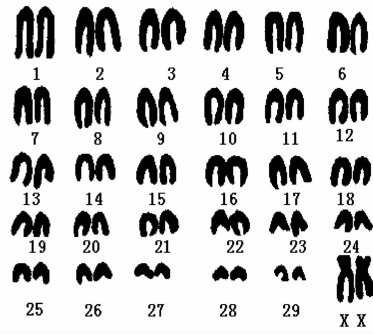


图 6 天祝白牦牛肾组织与大通牦牛肾组织乳酸脱氢酶同工酶谱带

Fig. 6 The banding patterns of LDH isozyme the fibroblast cells (A: The White yak; B: Datong yak)

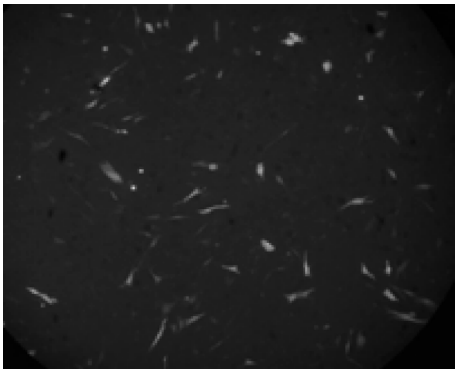


图 7 pDsRed-Monomer-N1 转染的天祝白牦牛肾组织成纤维细胞 (24 h, ×100)

Fig. 7 Fibroblasts transfected by pDsRed-Monomer-N1 vector

征,将被检细胞的培养液加入到 TSB 和 THIO 中进行培养,结果培养基均清亮透明,且 THIO 培养基分层明显,也未发现污染,阴、阳性对照成立。

2.7.2 病毒检测 A 直接观察

每次处理细胞时(如:换液、传代、冻存等)用显微镜观察细胞的形态情况,冻存前培养和复苏后被检的细胞形态正常,有的细胞培养到 15 代时生长仍良好且形态没有发生改变。

B 牛肾原代细胞病变法

经冻融处理后的待检细胞液,将其接种到 BVDV 敏感的单层牛肾原代细胞(朶里巴牛肾细胞),培养 144 h 后观察细胞 CPE。试验设立的阴性对照(图 8)和阳性对照(图 9)组均成立,待检细胞均没有出现 CPE。

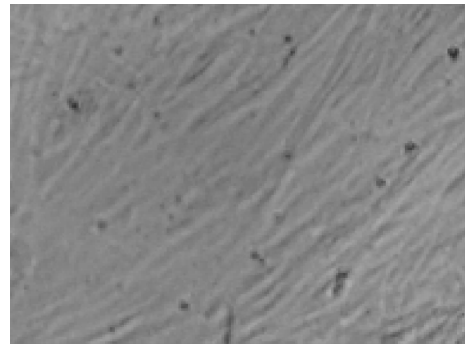


图 8 未见 CPE 牛肾原代细胞 (×100)

Fig. 8 Normal primary kidney cells of bovine (Negative)

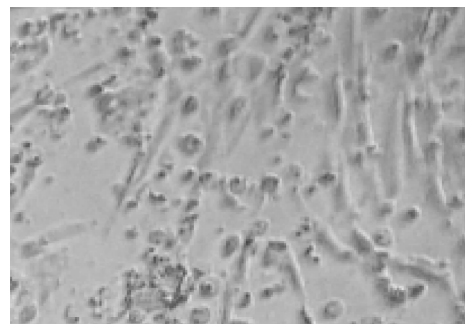


图 9 出现 CPE 牛肾原代细胞 (×100)

Fig. 9 CPE of primary bovine kidney cells (Positive)

2.7.3 支原体检测 A 培养法:

把经冻融处理后的待检细胞接入专用支原体琼脂培养基中培养 14 d 后,阳性对照(ATCC15531 株,图 10)、阴性对照成立时,加入待检细胞液的平皿上均没有出现支原体菌落,表明细胞没有被支原体污染。

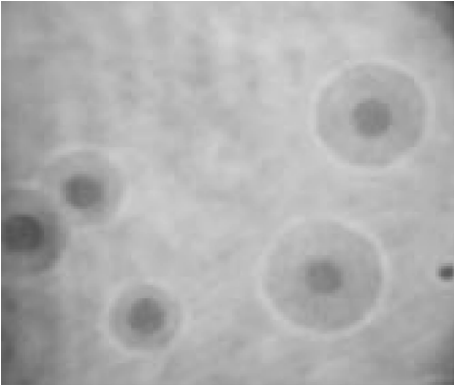


图 10 支原体 ATCC15531 的菌落
Fig. 10 Mycoplasma colony($\times 100$)

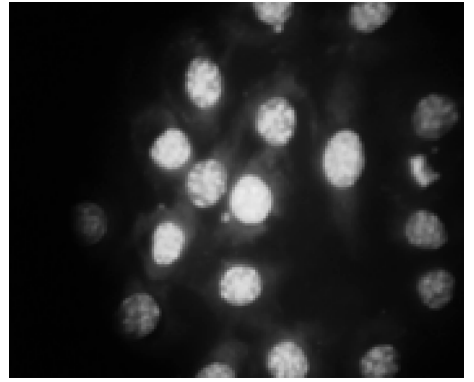


图 12 支原体阴性对照荧光照片
Fig. 12 Fluorescence picture for mycoplasma negative($\times 100$)

B DNA 荧光染色法:

待检细胞用荧光染料(Hoechst 33258)染色后,在阳性对照(ATCC15531 株,图 11)、阴性对照(图 12)成立时,待检细胞核外均没有出现荧光,进一步确认了以上结果。

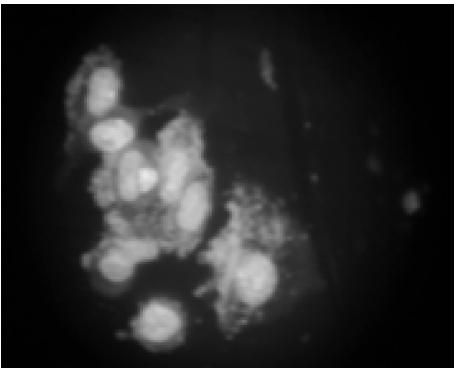


图 11 支原体阳性对照荧光照片
Fig. 11 Fluorescence picture for mycoplasma positive($\times 100$)

3 讨论

天祝白牦牛肾组织成纤维细胞传代培养第 4 天进入指数生长期,到第 7 天生长进入平稳状态,倍增时间为 27.2 h,最大增殖浓度为 40.5×10^4 /mL,表明该细胞系生长较慢,且细胞胞体较大。冻存前后

细胞活力用 t 检验方法统计, $t = 0.031 < t_{0.05}$, $P > 0.05$,表明冻存前后细胞活力差异不显著,说明冻存的各项条件对细胞没有损伤,细胞在生长时健康状况良好,培养条件适宜;染色体数目为 30 对,其中二倍体细胞占主体,冻存复苏细胞染色体没有异常表现,说明该细胞系为稳定二倍体细胞系,随着传代数增加,细胞染色体有发生改变的趋势,超二倍体出现的频率增大,由于需要保存的是二倍体细胞,所以细胞冻存应当尽量在培养代数早期进行。

由于同工酶在种与种之间,甚至种内之间存在多态性,因此,通过色谱或电泳得到的同工酶图谱是区别种间细胞系的一个极好的方法^[15-16],在细胞系鉴定的质量控制以及种间污染检测中,同工酶多态性生化分析被认为是标准方法,在世界几个重要的生物资源中心如 ATCC, ECACC, DSMZ 等,常使用这种方法对细胞的种间污染进行检测^[15-17]。对天祝白牦牛成纤维细胞系的 LDH 同工酶酶谱进行了检测,从结果来看,LDH 有 5 条区带,与大通牦牛肾组织的谱图比较,多了 LDH₅,且 LDH₅ 染色浓度较深,活力较高,说明该细胞系没有种间污染,且存在明显的种别特征;外源质粒(pDsRed-Monomer-N1)能在保存的天祝白牦牛成纤维细胞内进行有效复制、转录、翻译和翻译后修饰,能用于瞬时转染和永久表达系的建立,这为以后对白牦牛的结构基因组、功能基因组以及转基因研究等工作提供了依据^[16]。

本研究对白牦牛肾组织成纤维细胞的生物学特性检测项目与美国 ATCC 细胞库进行比对,除了致癌性、药物敏感性没有进行,其他项目检测方法基本一致,且检验结果也符合 CAL 特征要求^[18]。表明通过本项研究建立了性质稳定的天祝白牦牛肾组织

成纤维细胞系,该细胞系的建立,使天祝白牦牛这一国家重要种质的遗传资源在细胞水平上得以保存下来,也为相关遗传学研究提供了有效的理论依据和理想的生物材料。

参考文献:

- [1] 吴克亮,李藏兰.天祝白牦牛产业发展的调查[J].中国畜牧杂志,2004,40(11):34-35.
- [2] 阎 萍,伊世东.牦牛遗传资源保护及综合开发利用[J].畜牧与兽医,2005,37(4):21-22.
- [3] 吴常信.动物遗传资源保存的理论与技术[J].云南大学学报,1999,21:7-10.
- [4] FRESHNEY R I.动物细胞培养基本技术指南[M].章静波,徐存拴等译.第4版.北京:科学出版社,2003:192-194,284-285.
- [5] 程宝鸾.动物细胞培养技术[M].广州:华南理工大学出版社,2003:99-106.
- [6] 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001:197-198.
- [7] 罗立新,潘 力,郑穗平.细胞工程[M].广州:华南理工大学出版社,2003:63-64.
- [8] 严泉剑,郭金龙,刘恩靖,等.绘制细胞生长曲线及细胞群体倍增时间的简化计算[J].前卫医药杂志,2000,17(4):228-229.
- [9] 潘求真,田 亮,徐曙光,等.体外培养山羊成纤维细胞系方法的建立[J].中国农业大学学报,2006,11(1):29-34.
- [10] 刘有清,刘晓晴,傅佩胜.青山羊染色体研究[J].内蒙古农牧学院学报,1993,14(4):116-120.
- [11] 良宋平.生物化学与分子生物学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2003:35-41.
- [12] 张学舜.牦牛等13种畜禽LDH同工酶的研究[J].中国兽医杂志,1992,2:25-27.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005年版)[M].北京:化学工业出版社,2005:14-15.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005年版)[M].北京:化学工业出版社,2005:75-77.
- [15] 鄂 征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1994:11-13.
- [16] 周向梅,马月辉,关伟军,等.北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(3):209-215.
- [17] DREXEL H G, DIRKS W G, MACLEOD R A F, et al. Sensitivity hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations[J]. Keukemia, 1999, 13:1 602-1 606.
- [18] 何 申. ATCC 美国所属培养的细胞库[M]. China Academic Journal Electronic Publishing House, 1994-2006:52-56.