

金鱼尾鳍组织的体外培养及血清对其生长的影响

贺丽君, 戚艺华, 聂峰光

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 采用组织块培养法对金鱼不同组织进行培养, 并研究了血清对细胞生长的影响. 在 26°C 温度下, 采用添加 15% 胎牛血清的 199 培养基成功地获得了金鱼尾鳍细胞系. 以 2×10^5 个/ml 的细胞密度接种时, 细胞倍增时间为 3.3 d, 金鱼尾鳍细胞培养系统中的最适血清浓度为 15%.

关键词: 金鱼; 细胞培养; 血清

中图分类号: Q813.1⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)03-0328-03

1 前言

我国鱼类组织培养的研究始于 70 年代初期. 目前见诸文献报道的鱼类细胞系包括 ZC-7901, CIK, HGC-87, HCC-87, TQ-8801, FG, SPS, SPH^[1-5]. 这些细胞系为鱼类病毒学、免疫学、细胞学等方面的研究提供了良好的实验材料.

金鱼(*Carassius auratus*)是最著名的观赏鱼类, 有极高的经济价值. 它还是从事生物变异、遗传进化、胚胎发育和环境保护等研究的优良实验材料. 目前, 国内有关金鱼细胞体外培养的研究尚未见报道.

对金鱼细胞进行体外培养不仅可用于相应病毒的增殖和诊断, 而且还可为细胞骨架、细胞系统发生和发育学等方面的分子水平和细胞水平研究^[6-8]提供实验材料. 本工作对金鱼组织进行了体外培养, 并以所获得的金鱼细胞为材料研究了不同血清浓度下细胞的生长情况.

2 材料和方法

一龄金鱼红龙睛由中国科学院发育研究所提供.

采用组织块培养法, 将剪碎的组织接种于 6 孔细胞培养板(Costar), 置于 26°C 恒温培养箱中进行静置培养. 原代培养和传代培养均采用添加 15%胎牛血清(FBS, 天津川页生化制品有限公司)的 199 培养基(Gibco). 待细胞形成单层后, 用胰蛋白酶消化, 进行传代培养.

在上述培养条件下, 采用血球计数板进行细胞计数. 根据每日计数结果, 以培养时间为横坐标, 以细胞密度为纵坐标, 绘制第 10 代细胞的生长曲线.

以血清浓度分别为 20%, 15%, 10%, 0 的 4 种培养液培养第 13 代细胞, 绘制不同血清浓度下细胞的生长曲线.

3 结果与讨论

3.1 不同组织的培养结果

表皮、口、背、尾、肝、肾等组织在培养过程中均有细胞迁出, 但尾鳍细胞生长状态良好, 最先形成单层. 对尾鳍细胞进行传代, 接种量为 2×10^5 个 /ml 时, 大约 4~5 d 便可传代 1 次.

3.2 尾鳍细胞系的形态特征

细胞为贴壁细胞. 细胞类型以成纤维样细胞为主, 呈梭形, 也有部分呈鳞形. 在传代过程中, 鳞形细胞逐渐被梭形细胞取代, 细胞具单核(图 1).

3.3 细胞的生长速度

在细胞传至第 10 代时, 以 2×10^5 个/ml 的细胞密度接种, 测得第 10 代时的生长曲线(图 2).

从图可以看出, 所培养的金鱼尾鳍细胞在前 4 天数量不断增加, 之后数量开始有所下降, 但下降缓慢, 表明细胞在接种后, 生长旺盛. 至第 4 天后, 随着代谢的继续进行, 由于营养成分的消耗以及代谢产物的积累, 细胞数量缓慢降低, 细胞的倍增时间为 3.3 d.

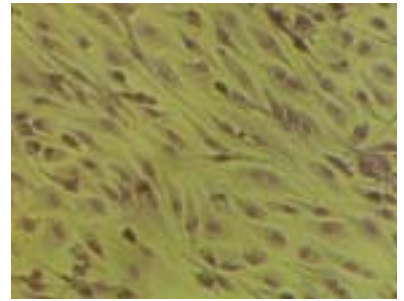


图 1 金鱼尾鳍组织第 10 代细胞

Fig.1 Cells derived from caudal fin of goldfish after 10 passages (Giemsa stain, $\times 100$)

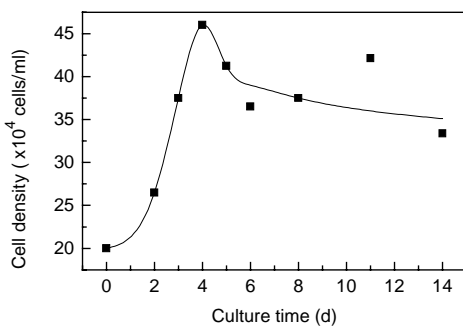


图 2 第 10 代金鱼尾鳍细胞生长曲线

Fig.2 Growth of cells derived from caudal fin of goldfish after 10 passages

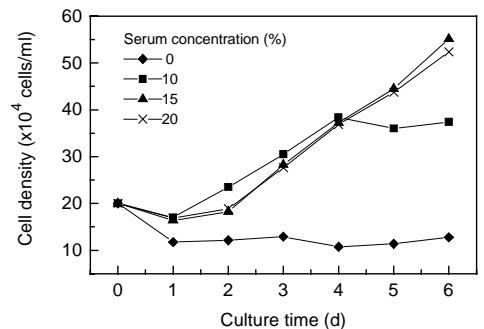


图 3 血清浓度对第 13 代细胞生长的影响

Fig.3 Effect of serum concentration on cell growth after 13 passages

3.4 血清对细胞生长的影响

在细胞传至第 13 代时, 以相同细胞密度接种, 分别用不同血清浓度的 199 培养基培养细胞, 绘制不同血清浓度时细胞的生长曲线(图 3). 结果表明:

(1) 在血清浓度为 0 的培养条件下, 由于缺乏生长因子、贴壁因子和扩展因子等成份, 贴壁细胞的数量少, 并且贴壁细胞仅能维持生存, 不能很好生长. 实验过程中的细胞密度基本维持在 1.1×10^5 个/ml.

(2) 在血清浓度为 10% 的培养条件下, 细胞经过 1 d 延迟后, 进入旺盛增长期, 密度不断提高. 随着营养成分的消耗, 代谢产物的积累, 至第 5 d, 细胞生长开始进入稳定期. 最高细胞密度为 3.8×10^5 个/ml.

(3) 在血清浓度为 15% 和 20% 条件下, 细胞经过 2 d 的延迟期后, 均进入生长期, 生长趋势差别不大. 由于两培养系统中血清浓度较高, 进入第 5 d 后, 仍有足够的营养成分供给细胞生长所需. 因此, 细胞数量在 6 d 的培养中不断增加. 最高细胞密度均为 5.0×10^5 个/ml 以上. 细胞生长是各种因素综合作用的结果. 图 2, 3 两次实验中所用细胞代数不同、状态不同、接种过程中可能存在一定误差及细胞代数低时细胞生长可能会不稳定, 使得两次结果有一定差异. 如果接种量、细胞状态等均相同, 其总趋势还是一致的. 就实验结果而言, 图 3 更接近以后的实验结果.

3 结论

与其它 5 种组织比较,尾鳍组织在体外的生长情况最好,细胞呈纤维样单核细胞,在以 2.0×10^5 个/ml 密度接种时,细胞倍增时间为 3.3 d. 血清对金鱼尾鳍细胞的良好生长具有重要作用. 根据培养时间、培养成本和可获得最高细胞密度 3 项指标,金鱼尾鳍细胞培养系统中的最适的初始血清浓度为 15%.

参考文献:

- [1] 董裳亮, 李宏, 苗宏志, 等. 牙鲆鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立 [J]. 生物工程进展, 1997, 17(3): 3.
- [2] 李亚男, 张义, 毛树坚. 两株鱼类细胞系——草鱼尾鳍组织细胞系(HGC-87)及鲫鱼腮盖膜细胞系(HCC-87)的建立 [A]. 毛树坚. 生命科学论文集 [C]. 杭州: 杭州大学出版社, 1992. 112-119.
- [3] 张念慈, 尹文林, 沈锦玉, 等. 团头鲂尾鳍细胞系 TQ-880 的建立 [J]. 科技通报, 1991, 7(2): 87-89.
- [4] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 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.
- [5] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S₁ 的建立 [J]. 实验生物学报, 1981, 14(1): 101-109.
- [6] CHOU S-C, YANG C F, Kimler VA, et al. Reversible Dedifferentiation and Redifferentiation of a Melanized Cell Line from a Goldfish Tumor [J]. Cell Differentiation and Development, 1989, 28: 105-118.
- [7] Yasuhira S, Mitani H, Shima A. Enhancement of Photorepair of Ultraviolet-induced Pyrimidine Dimers by Preillumination with Fluorescent Light in the Goldfish Cell Line — The Relationship between Survival and Yield of Pyrimidine Dimers [J]. Photochemistry and Photobiology, 1992, 55: 97-101.
- [8] Essani K, Granoff A. Amphibian and Piscine Iridoviruses Proposal for Nomenclature and Taxonomy Based on Molecular and Biological Properties [J]. Intervirology, 1989, 30: 187-193.

Culture of Cells from Caudal Fin of Goldfish and the Effect of Serum on Cell Growth

HE Li-jun, QI Yi-hua, NIE Feng-guang

(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., CAS, Beijing 100080, China)

Abstract: The present study was for providing experimental materials for virology, molecular biology and cell biology. Culture of cells from different tissues and the growth of cells in medium with different serum concentration were investigated. A cell line derived from caudal fin of goldfish, *Carassius auratus*, was developed successfully using explant techniques. The cell line grew well in Medium 199 supplied with 15% FBS at 26°C. The duplication time of the cell line was 3.3 d at a plating density of 2.0×10^5 cells/ml. It is proved that the cultures in Medium 199 supplied with 15% FBS showed the best result.

Key words: *Carassius auratus*; cell culture; serum