

中国对虾肌肉组织原代细胞培养初探

DEVELOPMENT OF AN IN VITRO PRIMARY CELL CULTURE SYSTEM FROM MUSCLE TISSUE OF *Penaeus Chinensis*

张晓华¹ 宋晓玲² 王立平³

(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(² 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

(³ 山东省海洋药物科学研究所 青岛 266003)

本文在中国对虾肝胰腺细胞^[4]及上皮样细胞培养^①的基础上,应 TC 199 培养液,使用不同的培养成分和培养条件,摸索一种中国对虾肌肉组织原代细胞培养方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

中国对虾(*Penaeus chinensis*),雌性,体重量 90~110g。采自青岛太平角,海捕亲虾。

1.2 组织培养材料

试验用 4×10 孔平底培养板,天津有机玻璃制品厂产品。TC 199,日本 Nissui Seiyaku 公司产品。胎牛混合血清,购自山东省医学科学院基础医学研究所。对虾血清,用注射器心脏采血,离心取上清,除菌过滤。对虾肌肉浸出液,采用新鲜对虾肌肉组织,匀浆后粗滤,再除菌过滤。氨苄青霉素钠(Ampicillin sodium),瑞士 Bioren S. A 公司产品。硫酸卡那霉素,上海第四制药厂产品。制霉菌素(Mycostatin),美国 Sigma 公司产品。所有培养液的 pH 值都调整到 6.8~7.2。实验在紫外线杀菌 1h 以上的无菌室进行。

1.3 试验程序

在切取组织前,先将活虾用灭菌海水冲洗数次,再放到 70% 的酒精中浸泡 10min 以上,取出后用灭菌生理盐水冲洗 3~4 次。在无菌条件下剪取对虾的肌肉组织,再将组织剪成小于 1mm³ 的碎块,用 Hank's 液冲洗数次,再用弯头滴管将肌肉组织小块移入 40 孔组织培养板的各个孔中,孔中装有约 0.5ml 的各种培养液(表 1)。培养板放在含 5% CO₂ 的培养箱中培养,培养温度为 26℃。

培养细胞每天在 Olympus 倒置显微镜下观察,记录培养液、补充成分及培养条件对细胞存活和生长的影响。

2 实验结果

8 个并列实验的结果见表 1。以单层细胞覆盖面积的百分率为标准,所测试的培养液中提供最好结果的是 TC 199 培养液中加入有 20% 的胎牛混合血清、氨苄青霉素钠(100U/ml),硫酸卡那霉素(100U/ml),制霉菌素(20U/ml)和 NaHCO₃(0.3mg/ml)。培养液的最适渗透压约为 470m mol/kg。当肌肉组织在以上培养液中培养,培养温度为 26℃,并充以 5% CO₂,3d 中单层细胞的覆盖率为 90%。若每 4d 换 1 次培养液,细胞可培养约 15d。在上述培养中,肌纤维细胞占优势(图 1)。在肌肉组织培养中,可观察到分裂细胞,但分裂率不高。应用上述培养液和培养条件,可以从中国对虾的肌肉组织液中观察到覆盖面积约 90% 的肌纤维。

3 讨论

通过实验探索,作者建立了一个成功的对虾肌肉组织原代细胞培养方法。实验中,以 TC 199 为基础培养液试用了多种配方,以 TC 199 培养液加 20% 胎牛混合血清,在渗透压为 470m mol/kg 时最好。

对虾肌肉组织的培养温度,经多次试验结果,以 25~28℃ 为好,低于 25℃ 组织细胞生长缓慢,高于 30℃ 几乎不生长。一般脊椎动物细胞的培养基的适宜 pH 值为 7.2~7.4 之间,但对虾细胞在 pH 6.8~7.2 时的生长情况较好。

① 王立平、张晓华等,1995。海洋水产研究,待刊。

收稿日期:1995 年 11 月 20 日

表 1 中国对虾肌肉组织在不同培养条件下的培养结果

试验编号	培养液	血清类型	渗透压 (mmol/kg)	CO ₂ (%)	温度 (°C)	时间 (d)	最大覆盖面积 (%)
1	TC199 培养液 ¹⁾	20% 胎牛混合血清	470	5	26	3	90
2	TC199 培养液 ¹⁾	10% 胎牛混合血清	470	5	26	3	50
3	TC199 培养液 ^{1), 2)}	10% 胎牛混合血清	728	5	26	3	15
4	TC199 培养液 ^{1), 3)}	10% 胎牛混合血清	750	5	26	3	25
5	TC199 培养液+ 10% 虾肉浸出液 ^{1), 2)}	10% 胎牛混合血清	728	5	26	3	20
6	TC199 培养液+ 10% 虾肉浸出液+ 10% 虾血清 ^{1), 2)}	10% 胎牛混合血清	728	5	26	3	25
7	TC199 培养液 ^{1), 2)}	20% 胎牛混合血清	728	5	26	3	25
8	TC199 培养液 ^{1), 3)}	20% 胎牛混合血清	750	5	26	3	30

1) 培养液中加入下列各物质: 氨苄青霉素钠、硫酸卡那霉素、制霉菌素、NaHCO₃; 2) 参照 Chen 等(1989)的方法, 再加入下列物质各 1%: 10.42g/L NaCl, 1.8g/L KCL, 5.1g/L CaCl₂, 10.8g/L MgSO₄, 11.8g/L MgCl₂; 3) 参照 Luedeman 等(1992)的方法, 再加入下列物质各 1%: NaCl(5m ol/L), MgCl₂(2m ol/L)。

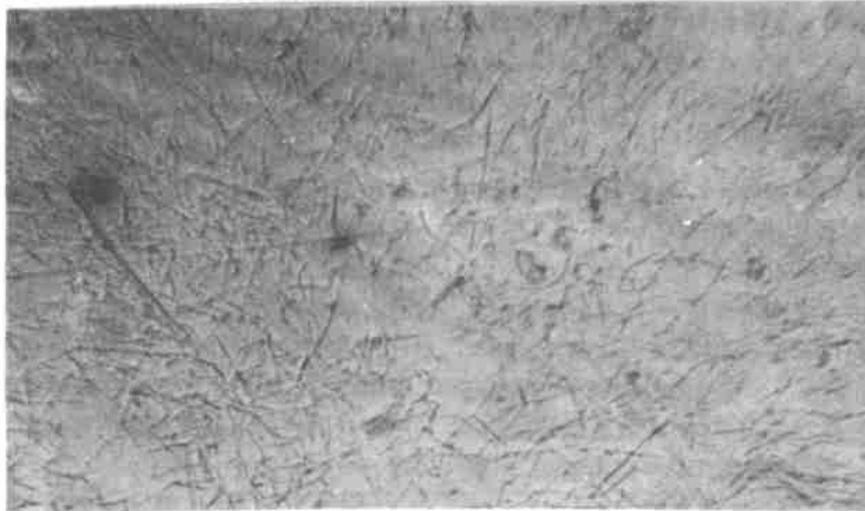


图 1 中国对虾肌肉组织用 TC 199 培养液加 20% 胎牛混合血清, 在 40 孔组织培养板培养 3d 的肌纤维显微照片。培养液的渗透压为 470mmol/kg (× 300)

海洋动物与陆生动物的生活环境有很大差异, 用于其组织和细胞培养的培养液的渗透压似乎应有所不同。作者在实验中参考了 Chen 等^[1]和 Luedeman 等^[8]的方法, 用 NaCl, MgCl₂ 等盐溶液增加培养液的渗透压, 但效果都不甚理想(表 1)。造成这种结果差异的原因可能有二: 一是 Chen 等用的培养液和本文用的培养液都不是完全的人工培养液, 其组成复杂, 未知因素较多, 其试验结果可能受多种因素的综合影响。二是 Chen 等分别用的是蓝对虾(*P. stylirostris*)和斑节对虾(*P. morodon*), 而本文作者用的是中国对虾, 不同种

的对虾细胞培养所需的渗透压可能有差异。总之, 作者用 TC 199 培养液加 20% 胎牛混合血清, 在温度 26°C, 5% CO₂ 存在下培养中国对虾肌肉组织的原代细胞, 获得了细胞在 3d 中的覆盖面积为 90% 的良好结果。

参考文献

- [1] Chen, S. N. et al., 1986. *Fish Pathology* 21: 161-166.
- [2] Hu, K. and L. P. Wang, 1990. *Asian Fisheries Science* 3: 299-307.
- [3] Lightner, D. V. et al., 1983. *J. Invert. Pathol.* 42: 62-70.