

## 皱纹盘鲍鳃细胞培养适宜条件的研究

### STUDY ON THE SUITABLE CONDITIONS OF THE GILL CELL CULTURE OF *Haliotis discus hannai* INO

崔龙波 魏峰 陆瑶华

(烟台大学生物化学系 264005)

关键词 皱纹盘鲍, 鳃, 细胞培养

近年来,我国皱纹盘鲍养殖业发展迅速,是北方沿海主要的养殖贝类之一。但各种病害亦随之而来,先是细菌病害居多,近几年又出现病毒性疾病<sup>[1]</sup>。发展鲍细胞培养技术,不仅对深入研究鲍病毒病带来了方便,而且也为鲍遗传学、细胞工程学等方面的研究提供了有利条件。本文对皱纹盘鲍鳃细胞培养的适宜条件进行了研究,以期建立鲍组织细胞的培养技术。

#### 1 材料与方 法

##### 1.1 材 料

动物:皱纹盘鲍取自烟台芝罘岛隆海养殖场,2龄,壳长4.0~5.0 cm,壳宽2.5~3.5 cm。培养基:MEM(GIBCO),M99(GIBCO),RPMI 640(GIBCO),DMEM(GIBCO),小牛血清(山东省医学科学院基础医学研究所提供)。

##### 1.2 方 法

无菌取出鲍鳃,用75%酒精棉球擦洗,后放置于消毒液<sup>[2]</sup>中30 min,再用含1%0.351 g/ml NaCl的Hank's液冲洗15次,将鳃剪碎成1 mm<sup>3</sup>左右,分装接种于培养瓶中。加入RPMI 640培养液,内含20%的小牛血清、100 IU/ml的青霉素、100 μg/ml的链霉素和1%的0.351 g/ml NaCl。pH 7.2,27℃温箱中培养。共做了8批实验,其中2批在5 d后细胞便长成单层。然后弃去组织块,用移液管吹打使单层细胞分散成悬液,进行细胞传代,按1:3比例分瓶。一般5 d后即长成单层,继续传代,用第10~18代细胞做下列实验,以传代后第5天的单层细胞覆盖面积的百分率为标准。

1.2.1 不同培养液的细胞培养 将上述 RP

MI 640 培养液中的 RPMI 640 分别换成 MEM, DMEM 和 M99。

1.2.2 不同 NaCl 浓度的细胞培养 将上述 RPMI 640 培养液中的 0.351 g/ml NaCl 依次换成 0, 0.5%, 1%, 2% 和 4%。

1.2.3 不同温度的细胞培养 将上述 RPMI 640 培养液中的细胞分别置于 24, 27, 30, 33 和 37℃ 培养。

1.2.4 不同小牛血清浓度的细胞培养 将上述 RPMI 640 培养液中的血清分别换成 10%, 15% 和 20%。

1.2.5 不同 pH 的细胞培养 将上述 RPMI 640 培养液中的 pH 值分别调成 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 和 7.6。

#### 2 结果与讨论

(1) RPMI 640, MEM, DMEM 和 M99 培养液第5天单层细胞覆盖面积均为100%(图1),说明这4种培养液均适宜于鳃细胞生长。李霞等用Eagle's MEM亦成功培养了鲍的鳃细胞<sup>[2]</sup>,因此鲍鳃细胞的适宜培养液范围较广。

(2) 含0, 0.5%, 1%, 2%和4%0.351 g/ml NaCl的RPMI 640培养液第5天单层细胞覆盖面积分别为70%, 80%, 100%, 100%和70%,其中第1, 第2和第5种浓度的鳃细胞贴壁不紧,摇晃即脱落。在培养液中加入NaCl是满足海洋动物渗透压的需要,渗透压

收稿日期:1999-08-25;修回日期:2000-03-09

的调节有多种方法,所用的盐的种类也比较多<sup>[4,5]</sup>,但对于鲍鳃细胞而言,每100 ml 培养液中加入0.351 g 的 NaCl 即可满足渗透压的需要。

(3) 在24,27,30,33和37℃下,第5天单层细胞覆盖面积分别为60%,100%,80%,30%和0,说明鲍鳃细胞的适宜培养温度为27℃左右。虾、贝等水生动物组织细胞的适宜培养温度基本上都在此范围<sup>[3]</sup>。

(4) 小牛血清浓度为10%,15%和20%时,第5天单层细胞覆盖面积分别为70%,100%和100%,因此鳃细胞培养液中的血清浓度应在15%~20%。

(5) 在pH值为6.8,7.0,7.2,7.4和7.6的条件下,第5天单层细胞覆盖面积分别为80%,100%,100%,100%和80%。作者曾测量了皱纹盘鲍血液的pH值为7.2,故鲍鳃细胞的培养液的适宜pH值为7.0~7.4之间。

鳃是贝类组织细胞培养中较易成活的组织,李霞等用 Eagle's MEM 培养液将鲍鳃细胞传代到第11代,但细胞并不贴壁<sup>[2]</sup>。作者现已成功将鳃细胞传代到第23代,而且细胞贴壁较紧,增殖较快。通过摸索,皱纹盘鲍的鳃细胞培养可选择 RPMI 640、MEM、DMEM 和 M99 多种培养液,在培养液中加入15%~20%小牛血清、1%~2%的0.351 g/ml NaCl,在温度27℃、pH

值7.0~7.4条件下,能在第5天获得覆盖面积为100%的单层细胞。

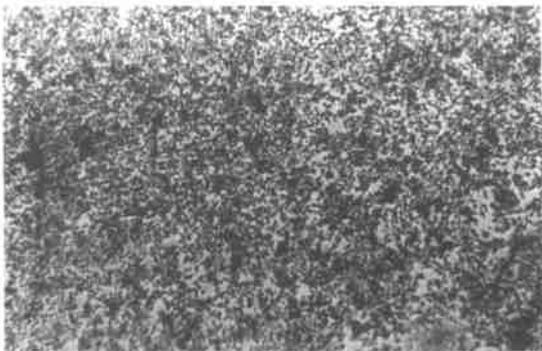


图1 第15代鳃细胞(用RPMI 1640培养液,×320)

#### 参考文献

- 1 李霞,王斌,刘淑范等。水产学报,1998,22(1):61~66
- 2 李霞,刘淑范。水产学报,1997,21(2):197~200
- 3 王立平,张晓华,刘镁等。海洋水产研究,1997,18(1):16~19
- 4 Lebel, J. M., Gard, W., Favrel, P. et al. . Bio. Cell, 1996, 86: 67~72

(本文编辑:李本川)