

日本对虾血淋巴和肌肉的原代培养 *

王军霞¹ 王维娜¹ 王安利¹ 王亚斌²(¹ 河北大学生命科学学院 保定 071002)(² 保定市环境监测站 保定 071000)

提要 以日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 为实验材料研究肌肉组织和血淋巴的体外培养, 初步建立了适合日本对虾细胞培养的条件体系。在此条件下培养原代细胞存活时间最多达 2 个月。

关键词 日本对虾 (*Penaeus japonicus*), 血淋巴, 肌肉, 细胞培养

中图分类号 Q2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)03-0061-03

近年来为了寻求虾蟹类疾病防治的新途径, 解决长期困扰虾蟹类养殖业发展的有关病害问题, 对虾蟹类的免疫机理方面的研究空前活跃^[1-2]。日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 是中国一种重要的海水养殖经济动物, 由于其生命力强, 味美价高, 已成为继中国对虾后另一对虾养殖品种^[3], 因此迫切需要展开对日本对虾免疫机理的研究。在免疫机理方面, 血淋巴的免疫防御功能是最基础、最重要的研究方向^[4]。细胞培养做为一种潜在的工具在虾类疾病的诊断及探针技术的应用开发方面已受到日益广泛的关注^[5], 但在日本对虾细胞培养方面, 仅 Itami 等报道了淋巴器官的体外培养^[6], 至今未见日本对虾血淋巴的原代培养的研究报道。本研究首次对日本对虾血淋巴和肌肉组织进行了原代培养的尝试。

1 材料和方法

1.1 实验材料

日本对虾 (平均体长 10.6075 cm, 平均体质量 9.7353 g) 取自河北省白洋淀, 实验前在含青霉素 1 000 IU/mL, 链霉素 1 000 μg/mL 的充气海水中暂养 24 h。

1.2 细胞培养

实验选用 M199 (Gibco) 为基础培养基, 参考 Tong 等^[7]配制日本对虾培养基, 培养基中各组分如表 1 所示。培养液 pH 值调至 7.1, 无菌条件下, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 冷冻保存, 2 周内使用。取暂养日本对虾, 用质量分数为 75% 酒精擦洗头胸甲, 无菌条件下用

卡介苗注射器小心地从心脏抽取血淋巴, 接种于 24 孔培养板, 每孔加入 1 mL 培养基; 肌肉组织培养则用无菌器械剖取肌肉, 无菌 PBS 清洗, 用眼科剪将组织

表 1 日本对虾培养基的组分

Tab.1 The medium composition of *Penaeus japonicus*

成分	含量
199	9.50 g/L
NaCl	6.20 g/L
KCl	0.60 g/L
NaHCO ₃	3.96 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.02 g/L
葡萄糖	0.50 g/L
精氨酸	0.43 g/L
蛋氨酸	0.12 g/L
谷氨酰胺	1.00 g/L
青霉素	100 U/mL
链霉素	100 μg/mL
卡那霉素	100 U/L
FBS	150 mL/L

* 河北省重大科技攻关计划项目 859329 号; 河北大学动物学重点学科资助项目。

第一作者: 王军霞, 出生于 1974 年, 硕士, 助教, 目前在研课题项目: 对虾病毒性流行病防治技术研究。E-mail: wangjunxia@sohu.com

收稿日期: 2002-07-08; 修回日期: 2002-08-30

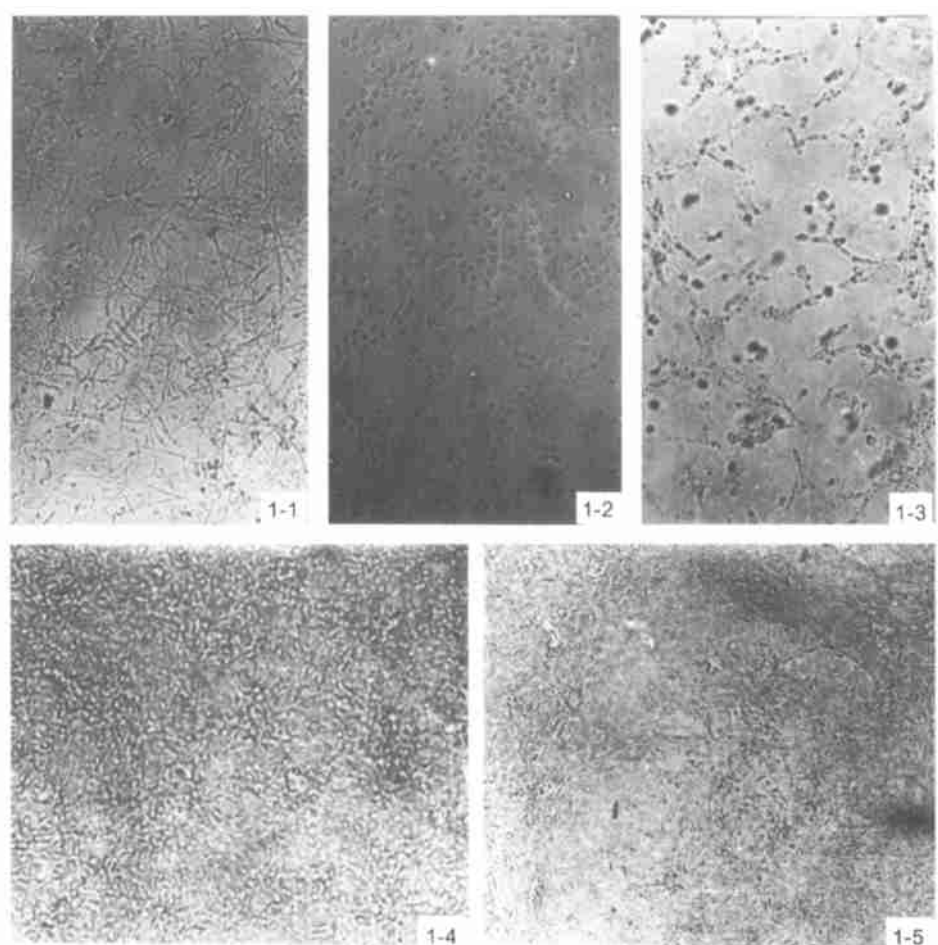


图1 体外培养的日本对虾肌纤维和血淋巴(×480)

1-1 体外培养 24 h 的日本对虾肌纤维; 1-2 体外培养 24 h 的日本对虾血淋巴形态; 1-3 细胞之间的结网现象; 1-4 体外培养 1 周后日本对虾血淋巴形成的细胞单层; 1-5 细胞单层与染菌区之间的界沟。

Fig. 1 The muscle fibre and hemolymph of *Penaeus japonicus* cultured in vitro (×480)

1-1 The muscle fibre of *P. japonicus* cultured 24 h; 1-2 The hemolymph of *P. japonicus* cultured 24 h; 1-3 Contaction of net among hemolymph; 1-4 Cell monolayer of *P. japonicus* after one week incubation; 1-5 Channel between cell monolayer and contaminate area.

剪为 1 mm³ 小块, 吹打分散, 接种于 24 孔培养板, 26℃, 5%CO₂ 培养箱中培养, 每天用 OLYMPUS 倒置显微镜观察, 记录培养基对细胞生长的影响。

2 结果与讨论

2.1 日本对虾肌肉组织原代培养

日本对虾肌肉组织接种 24 h 后, 即可见到肌纤维的贴壁, 大量肌纤维分散于培养板中(图 1-1), 这种条件下体外培养的肌纤维存活时间可达 52 d。

2.2 日本对虾血淋巴的原代培养

体外培养的日本对虾血淋巴有两种不同的形态: 圆形淋巴样细胞和多形吞噬样细胞(图 1-2), 多形吞噬样细胞按细胞伸展形态分为向四周伸展的多边形不规则细胞和向两极伸展的 I 型细胞, 这与胡珂对体外培养中国对虾血细胞分类结果一致^[1]。多形吞噬样细胞之间, 胞质相连, 形成结网现象(图 1-3)。多形吞噬样细胞形态多样, 包括纤维形、梭形、不规则的三角形、多边形等。体外培养中发现多形吞噬样细胞存活时间较短, 而圆形淋巴样细胞存活时间较长, 可达

2个月。

体外培养的血淋巴1周后形成连续的细胞单层(图1-4),培养26d后,发现此细胞单层中靠近边缘部分有1/6区域染菌,细胞轮廓不清,结构被破坏。在染菌区和细胞单层区之间有一道明显界沟,界沟中几乎没有细胞,但也没有发现病菌(图1-5)。这种共生状态维持了21d,最终污染霉菌而死亡。抗菌因子是无脊椎动物免疫防御反应的一个重要组成部分,主要存在于动物的血淋巴中,细菌进入到机体后,对虾血淋巴能够在短时间内清除细菌而使自身免于受侵害,血淋巴抗菌因子在其免疫防御反应中起到了积极的作用^[2]。因而血淋巴表现有一定的抗菌活力。本实验中,体外培养的血淋巴同样表现出一定抗菌活力,感染细菌在一段时间内无法扩大感染区域。近年来,随着对虾类免疫系统研究的逐步深入,一些研究结果显示虾血清存在与脊椎动物免疫球蛋白(Ig)功能非常类似的特异性物质^[8],章跃陵研究表明日本对虾血清中确实存在类免疫球蛋白样物质^[8],本研究中是否这类物质在和抗菌因子同时起作用,使染菌区域暂时不能跨过界沟,尚有待进一步研究,这对研究对虾抗病机制

具有重要意义。

参考文献

- 1 胡珂,王立平,段爱梅.中国对虾的组织培养.水产学报,1990,15(4):328-331
- 2 李春猛,战斌,马蛙,等.中国对虾血淋巴抗菌活力的测定.青岛海洋大学学报,1999,29(4):599-603
- 3 梁虹.日本对虾的饲料及营养学研究进展.保定师专学报,2000,13(4):51-57
- 4 蒋琼,王雷,罗日祥.中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选.水产学报,2001,25(4):359-362
- 5 Toullec J Y. Crustacean primary cell culture: A technical approach. Methods in Cell Science, 1999(21):193-198
- 6 Itami T, Maeda M, Kondo M, et al. Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Methods in Cell Science, 1999(21):237-244
- 7 Tong S L, Mao H Z. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues. Aquaculture, 1996(147):151-157
- 8 章跃陵,彭宣宪,王三英.日本对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究.海洋科学,2001,25(5):37-41

PRI MARY CULTURE OF HE MOLYMPH AND MUSCLE OF *Penaeus japonicus*

WANG Jun Xia¹

WANG Wei Na¹

WANG An Li¹

WANG Ya Bin²

(¹ College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002)

(² Environment Monitor Bureau in Baoding, Baoding 071000)

Received: Jul., 8, 2002

Key Words: *Penaeus japonicus*, Hemolymph, Muscle, Cell culture

Abstract

Hemolymph and muscle of *Penaeus japonicus* cultured in vitro were studied. A cell culture system was devised for the shrimp. Hemolymph in vitro could survive for 2 months.

(本文编辑:刘珊珊)