

锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性

肖 艺 曾令兵* 徐 进 周 勇

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223)

摘要 采用组织块移植培养技术, 对来源于锦鲤(*Cyprinus carpio*)鳍条组织的细胞进行原代培养, 建立了锦鲤鳍条组织细胞系, 已稳定传代60多次, 命名为Koi-Fin。锦鲤鳍条组织细胞为成纤维样细胞, 最佳培养基为MEME, 最适血清体积分数为10%, 最适培养温度为25 °C, 群体倍增时间为43.5 h。该细胞经液氮冷冻保藏12个月后采用台盼蓝染色, 约(80.21±5.84)%的细胞具有细胞活性, 复苏细胞生长旺盛。细胞染色体分析显示, 第16代锦鲤鳍条组织细胞的染色体数目为正常二倍体2n=100, 第40代细胞的染色体众数为52。病毒敏感性试验结果表明, Koi-Fin细胞系对锦鲤疱疹病毒(Koi Herpesvirus, KHV)敏感, 可产生典型细胞病变效应, 病毒滴度为 $10^{7.86\pm0.51}$ TCID₅₀/mL。针对锦鲤疱疹病毒胸苷激酶(thymidine kinase, TK)基因设计特异性引物进行PCR检测, 可扩增出病毒靶基因片段。

关键词 锦鲤; 鳍条组织; 细胞系; 生物学特性; 病毒敏感性

锦鲤(*Cyprinus carpio*), 又称“绯鲤”、“日本锦鲤”, 隶属于鲤形目(*Cypriniformes*)鲤科(*Cyprinidae*)鲤属(*Cyprinus*), 是通过对鲤鱼突变品系不断人工选育、定向培育而成的。锦鲤色彩绚丽、斑纹华丽、习性温顺, 是世界上最受欢迎的大型观赏鱼之一。此外, 锦鲤还是营养丰富、肉质细嫩的食用鱼。

近年来, 随着锦鲤养殖业的发展, 其病害问题日趋严重, 极大地影响了锦鲤养殖业、观赏业和国际出口贸易, 造成重大经济损失^[1-2]。锦鲤疱疹病毒由锦鲤疱疹病毒(Koi Herpesvirus, KHV)引起, 主要感染锦鲤和鲤鱼, 是一种高致病性疾病, 发病率和致死率均可高达80%~100%。1998年在以色列的Magan Michael地区暴发了锦鲤疾病, 导致出口损失近400万美元, 其病原为KHV^[3]。随后该病传播与蔓延到美国、欧洲、亚洲等地区^[4-6], 我国亦报道了该病的病例^[2,7]。近年来, 锦鲤疱疹病毒已经在我国池塘养殖鲤鱼中形成感染, 导致养殖鲤鱼发病, 造成重大经济损失。KHV对敏感细胞的嗜性特殊, 国外使用锦鲤鳍条细胞系KF-1和普通鲤鱼脑细胞系CCB培养KHV^[8]。汪海明等^[9]初步探讨了锦鲤鳍条细胞适宜消化方法和培养条件; 薛淑群等^[10]报道了鲤鱼尾鳍细胞的体外培养及其生长状态的研究, 但迄今国内尚未见到有关建立锦鲤细胞系以及利用锦鲤细胞系分离、鉴定锦鲤疱疹病毒报道。本研究通过对来源于锦鲤鳍条组织细胞进行离体培养, 成功建立

了可连续传代培养的锦鲤鳍条细胞系(Koi-Fin), 并进行了生物学特性和病毒敏感性研究, 不仅丰富了锦鲤来源的细胞资源, 而且为今后开展锦鲤疱疹病毒病流行病学特征、致病机理、诊断技术以及防控技术研究提供了重要的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼与病毒株 锦鲤, 体重约100 g, 体长约20 cm, 来源于中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验基地。试验前于实验室里暂养1周。锦鲤疱疹病毒由本实验室分离保存。

1.1.2 试剂与耗材 MEME、R1640、M199、L-15细胞培养基, 两性霉素B、青霉素/链霉素、Dulbecco's磷酸缓冲液(DPBS)、胰酶-EDTA、二甲亚砜(DMSO)、秋水仙素、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、细胞培养级纯水均购自Sigma公司; 精制胎牛血清(DFBS)为Hyclone产品; 胎牛血清(FBS)为杭州四季青产品; 生长因子EGF和FGF为Peprotech产品; DNAzol核酸提取试剂为Invitrogen产品; PCR用rTaq酶、dNTPs为TaKaRa公司产品。25 cm²、75 cm²细胞培养瓶, 15 mL、

收稿日期: 2012-04-04 接受日期: 2012-05-02

国家现代农业产业技术体系建设专项资金(No.CARS-46-11)资助项目

*通讯作者。Tel: 027-87180158, E-mail: zenglingbing@gmail.com

50 mL离心管, 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL移液管, 1.8 mL细胞冻存管均购自Corning公司; 移液辅助器为HTL产品; 程序降温盒购自Nalgene公司。

1.1.3 主要仪器设备 II级生物安全柜(ESCO); 倒置显微镜(Nikon); CCD相机(Nikon NIS Elements F530); 低速冷冻离心机(3K15, Sigma); 恒温培养箱(Sanyo, MIR-153); 制冰机(Gelin); 液氮罐(MVE)。

1.2 方法

1.2.1 锦鲤鳍条组织原代培养 健康锦鲤在质量分数为20 mg/L的高锰酸钾溶液中浸泡30 min, 再用70%酒精擦拭鱼体表面后于II级生物安全柜内取鳍条组织。参考薛庆善^[1]和Freshney^[12]的原代细胞培养方法, 将鳍条组织置于含高浓度双抗的DPBS缓冲液(500 U/mL青霉素、500 µg/mL链霉素、12.5 µg/mL两性霉素B)中洗涤3~4次, 并剪成约1 mm³左右的碎块, 均匀移植到25 cm²培养瓶里, 倒置干贴1.5 h后添加3 mL含30%精制胎牛血清(DFBS)的MEME培养液(含200 U/mL青霉素、200 µg/mL链霉素、5.0 µg/mL两性霉素B以及适量的细胞生长因子bFGF和EGF), 于25 °C培养箱内原代培养。逐日观察鳍条组织块的贴壁以及从组织块中迁出细胞的生长情况。

1.2.2 锦鲤鳍条细胞的继代培养和细胞系的建立 当从组织块中迁出的细胞单层达到培养瓶面积70%时, 参照曾令兵等^[13]的方法进行细胞继代培养。

1.2.3 锦鲤鳍条细胞冻存与复苏 细胞冻存: 参考Freshney^[12]的方法, 选择形态均一、生长旺盛的细胞进行分批液氮保存。按照保存的细胞数量, 确定冷冻保存液的体积以及各组分的终浓度。首先配制一半体积的细胞冻存液(其中含20% DMSO、40% DFBS、40% MEME)并置冰上预冷。然后消化收集细胞, 加入与冻存液等体积的MEME制成细胞悬液, 再缓慢加入预冷的冻存液, 混合均匀, 以每管1 mL分装到细胞冻存管内。最后将细胞冻存管移入4 °C预冷的程序降温盒内, 置-80 °C过夜后, 转移到液氮罐里中保存。细胞复苏: 从液氮罐中取出冻存细胞, 立即置37 °C恒温水浴锅中, 使细胞悬液融化, 用移液管将细胞悬液转入培养瓶中, 添加4~5 mL含20% FBS的MEME培养液。同时取出部分细胞悬液与等体积的台盼蓝混匀, 显微镜下观察、计数活细胞的数量。细胞贴壁培养12 h后, 弃去旧培养液, 加入新鲜培养液继续培养, 观察细胞的生长状况。

1.2.4 锦鲤鳍条细胞最佳培养基的确定 选择MEME、M199、R-1640、L-15四种细胞培养基, 并添加终浓度为10%的FBS制备细胞培养液。调整细胞密度为 5.0×10^5 /瓶, 四种培养基各接种12瓶细胞并置于25 °C恒温培养箱里。每2 d从每个实验组里取出两瓶细胞, 用Trypsin-EDTA消化法收集细胞并计数, 共培养12 d, 连续计数6次, 绘制其生长曲线。

1.2.5 锦鲤鳍条细胞最适血清浓度的确定 分别配制FBS浓度为0%、5%、10%、20%的MEME培养液, 调整细胞密度为 5.0×10^5 /瓶, 四种血清浓度各接种12瓶并置于25 °C恒温培养箱里。实验设置同前, 每隔2 d从每个实验组里取出两瓶细胞, 用Trypsin-EDTA消化法收集细胞并计数, 共培养12 d, 连续计数6次, 绘制其生长曲线。

1.2.6 锦鲤鳍条细胞最适培养温度的确定 选择15 °C、20 °C、25 °C、30 °C四个不同培养温度, 使用添加10% FBS的MEME培养液, 调整细胞密度为 5.0×10^5 /瓶, 四个不同培养温度各接种12瓶细胞并置于恒温培养箱里。每2 d从每个实验组里取出两瓶细胞, 用Trypsin-EDTA消化法收集细胞并计数, 共培养12 d, 连续计数6次, 绘制其生长曲线。

1.2.7 锦鲤鳍条细胞群体倍增时间测定 取对数生长期的细胞, 用0.25%的Trypsin-EDTA消化, 收集计数细胞, 使用含10% FBS的MEME培养, 调整细胞终浓度至 1.0×10^5 /mL, 按每孔1 mL的量接种至24孔板里, 置于25 °C恒温培养箱。每隔12 h取出3孔细胞消化并分别计数, 共培养6 d, 连续计数12次。以培养时间(d)为横坐标, 细胞浓度为纵坐标, 绘制生长曲线; 根据公式 $T = t \times \lg 2 / \lg(N_t/N_0)$ 计算细胞的群体倍增时间, 其中 N_t 为 t 时间的细胞数, N_0 为接种细胞数。

1.2.8 细胞染色体分析 分别取第16代、第40代锦鲤鳍条细胞, 传代培养24 h后, 更换新鲜培养基, 加入终质量浓度为1 µg/mL的秋水仙素, 继续培养13~16 h, 用Trypsin-EDTA消化细胞单层并离心收集细胞。参照Wang等^[14]的方法进行染色体制片, 高倍显微镜下观察中期染色体, 统计计数染色体数目。

1.2.9 病毒敏感性试验 传代培养锦鲤鳍条细胞, 待细胞形成汇合单层后, 吸弃培养基, 每25 cm²细胞瓶加入0.5 mL锦鲤疱疹病毒液, 病毒的感染复数MOI(multiplicity of infection)为1 PFU/cell, 吸附1 h, 期间每间隔15~20 min轻微晃动培养瓶1次以便均匀吸附。吸附结束后, 吸弃多余病毒液, 添加5 mL含2%

FBS的MEME细胞培养维持液。同时设置阴性空白对照, 即25 cm²细胞瓶添加0.5 mL MEME培养液模拟感染, 其它操作同试验组。采用微量培养板(Corning)培养法测定病毒滴度, 按Reed-Muench法计算病毒滴度^[15]。

1.2.10 锦鲤疱疹病毒PCR检测 待病毒感染的锦鲤鳍条组织细胞出现典型细胞病变效应(CPE)达70%以上时, 收获细胞培养物, -80 °C与室温反复冻融两次后, 3 000 r/min、4 °C离心30 min, 将上清于4 °C、28 000 r/min离心2 h, 收集沉淀用DNAzol试剂提取病毒基因组DNA。参照水生动物疫病诊断手册(2009年)推荐的KHV病毒PCR检测方法, 针对病毒胸苷激酶(thymidine Kinase, TK)基因合成引物并进行PCR扩增。引物序列: KHV-tkF: 5'-GGG TTA CCT GTA CGA G-3', KHV-tkR: 5'-CAC CCA GTA GAT TAT GC-3', 扩增产物长度为409 bp。PCR扩增条件为: 3 μL病毒基因组DNA, 5 μL 10×PCR buffer, dNTPs 2 μL, 引物KHV-tkF、KHV-tkR(20 μmol/L)各1 μL, rTaq 0.5 μL(2.5 U), 补水至50 μL。混匀后进行PCR扩增。PCR扩增反应条件为: 首先94 °C预变性5 min; 然后95 °C 1 min、55 °C 1 min、72 °C 1 min, 40次循环; 再72 °C保温10 min; 最后4 °C保温。反应结束后, 取5 μL PCR产物用1%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

2 结果

2.1 原代培养

锦鲤鳍条组织接种到培养瓶后, 1~2 d内有细胞从组织块周围迁出, 4 d左右即可形成生长晕(图1)。



图1 原代培养第4 d的Koi-Fin细胞
Fig.1 Primary culture of Koi-Fin cells, d4

随着培养时间的增加, 大约8~10 d迁出的细胞在组织块的周围形成单层(图2), 16 d后单层细胞面积约占细胞培养瓶底70%左右。



图2 原代培养第10 d的Koi-Fin细胞
Fig.2 Primary culture of Koi-Fin cells, d10

2.2 继代培养和细胞系建立

首次传代细胞在4~8 h后即可贴壁生长, 约5 d能生长成汇合单层, 细胞形态为成纤维样。连续传代12次以后, 传代细胞约2 d即可汇合成细胞单层, 5 d可形成致密细胞单层。锦鲤鳍条细胞已连续传代培养60多次, 细胞的形态与生长稳定(图3)。



图3 传代培养的第48代Koi-Fin细胞
Fig.3 Subculture of Koi-Fin cells at 48th passage

2.3 细胞冻存与复苏

Koi-Fin细胞复苏后贴壁快速, 生长形态、状况与没有冻存的细胞基本相似, 未出现明显差别。复苏细胞用台盼蓝染色, 经细胞统计计数, 约(80.21±5.84)%的细胞不着色, 具有细胞活性。

2.4 最佳培养基的确定

锦鲤鳍条细胞在添加10% FBS的MEME、M199、R-1640、L-15培养基里均能生长与增殖, 2~8 d间细胞呈近指数增长。细胞统计计数结果显示: 锦鲤鳍条细胞在MEME、M199培养基中增殖速度最快, 培养6 d形成致密细胞单层, 细胞数目超过 2.5×10^6 个。在细胞状态以及单层维持时间方面, MEME培养基优于M199培养基。在R-1640培养基中, 细胞能正常生长, 但增殖速度较为缓慢, 培养至第8 d才形成致密细胞单层。在L-15培养基里, 锦鲤鳍条细胞增殖速度最慢, 细胞数目最高达 2.0×10^6 个(图4)。

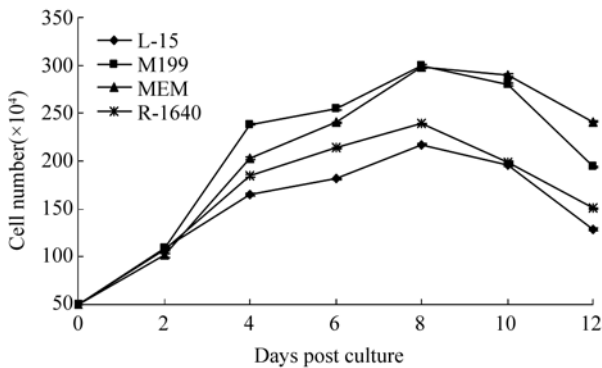


图4 Koi-Fin细胞在不同培养基中的生长比较

Fig.4 Comparative growth of Koi-Fin cells cultured in different media

2.5 最适血清浓度的确定

使用MEME培养基, 分别添加0%、5%、10%、20% FBS, 在25 °C培养锦鲤鳍条细胞, 细胞数量统计计数结果显示: 在不含FBS即0%的MEME培养基中, 锦鲤鳍条细胞贴壁较少, 不能生长以及形成细胞单层。在含5% FBS的培养基中, 锦鲤鳍条细胞可正常贴壁、生长, 但细胞的增殖速度缓慢, 到第6 d才形成细胞汇合单层。在含10%和20% FBS的MEME培养基中, 细胞生长增殖迅速, 2~4 d间呈近指数生长, 培养至第8 d细胞数目超过 3.0×10^6 个; 在细胞单层的稳定性、保持时间以及培养基成本方面, 含10% FBS的培养基优于20% FBS的培养基(图5)。

2.6 最适培养温度的确定

使用添加10% FBS的MEME培养基, 分别在15 °C、20 °C、25 °C、30 °C四个不同温度条件下培养锦鲤鳍条细胞, 细胞统计计数结果显示: 在15 °C培养条件下, 细胞能正常贴壁, 但生长速度缓慢, 细

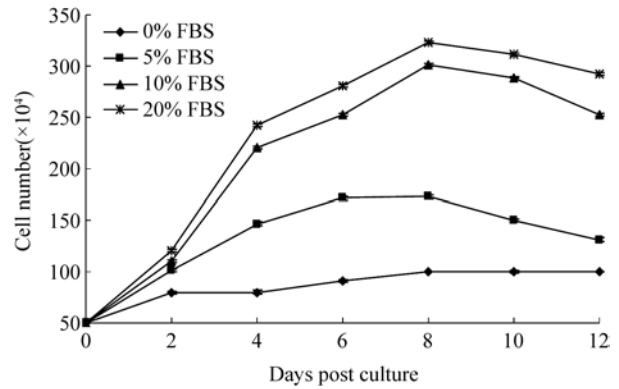


图5 Koi-Fin细胞在不同血清浓度条件下的生长比较

Fig.5 Comparative growth of Koi-Fin cells cultured at different concentrations of fetal bovine serum

胞数目最高至 8.5×10^5 个; 在20 °C培养条件下, 细胞能稳定增殖, 形成单层, 但速度较为缓慢。在25 °C培养条件下, 细胞生长增殖迅速, 细胞单层稳定, 培养至第8 d细胞数目达 3.0×10^6 个; 在30 °C培养条件下, 细胞培养至第6 d其数目达 2.8×10^6 个, 但细胞单层不稳定, 出现脱落或死亡细胞, 细胞数目下降(图6)。

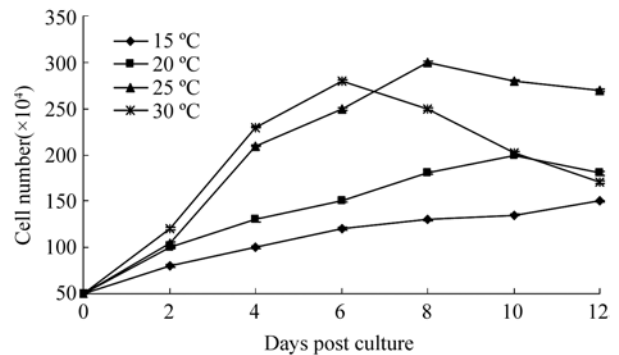


图6 Koi-Fin细胞在不同培养温度下的生长比较

Fig.6 Comparative growth of Koi-Fin cells cultured at different temperatures

2.7 细胞倍增测定

从第23代锦鲤鳍条细胞的生长曲线(图7)可以看出, 细胞贴壁、生长、增殖过程中的前1.5 d为迟缓期, 1.5~3.5 d处于对数期, 3.5~4.5 d为平台期, 4.5 d后进入衰退期, 大约6 d完成一个生长周期。通过公式计算, 第23代鳍条细胞的群体倍增时间为43.5 h, 表明锦鲤鳍条细胞具有旺盛的生长增殖能力。

2.8 染色体分析

锦鲤鳍条细胞染色体数目统计计数结果显示,

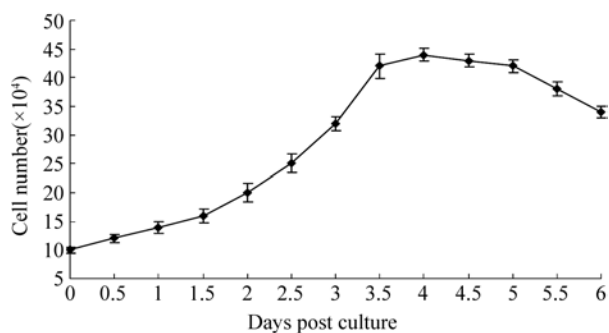


图7 第23代Koi-Fin细胞的生长曲线

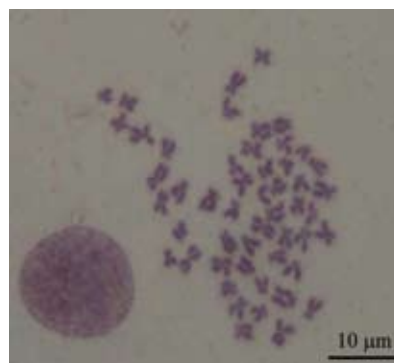
Fig.7 Growth curve of Koi-Fin cells at 23th passage

图9 第40代Koi-Fin细胞染色体

Fig.9 Koi-Fin cell chromosomes at 40th passage

第16代锦鲤鳍条细胞中期分裂相的染色体数目 $2n=100$ (图8), 与已报道的锦鲤体细胞染色体数目 $2n=100$ 相符^[16]。第40代锦鲤鳍条细胞的染色体数目分布在45~77之间, 染色体众数为52(图9), 染色体数目为52的细胞约占总细胞数的38.32%(图10), 表明第40代锦鲤鳍条细胞的染色体已发生很大变化。

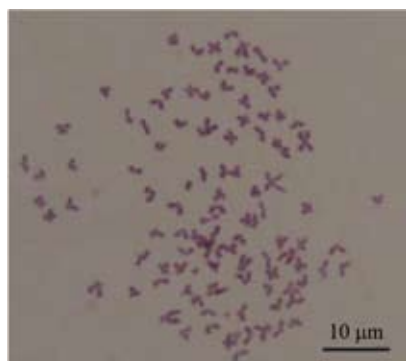


图8 第16代Koi-Fin细胞染色体

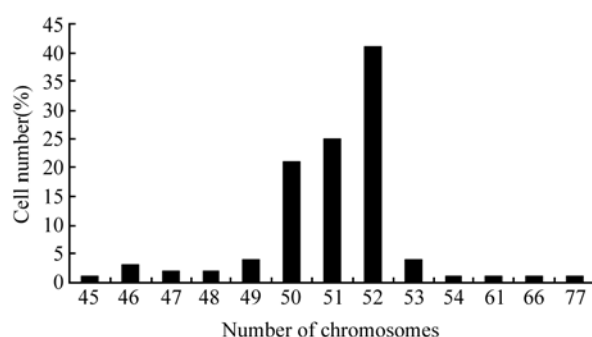
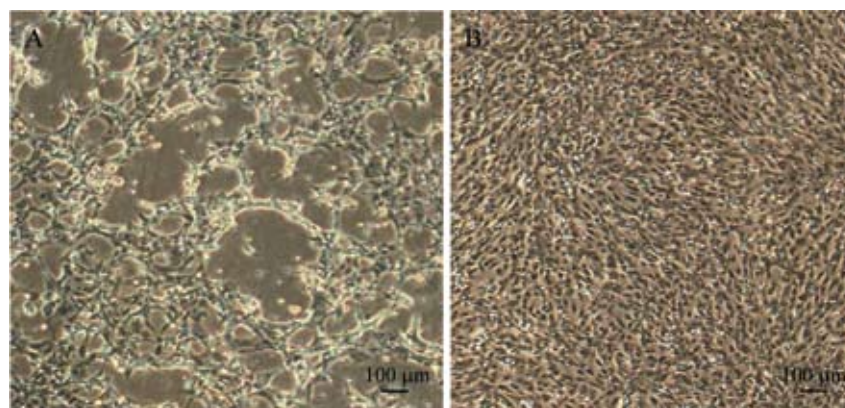
Fig.8 Koi-Fin cell chromosomes at 16th passage

图10 第40代Koi-Fin细胞染色体数目分布

Fig.10 Koi-Fin cell chromosomes at 40th passage

2.9 病毒敏感性试验

用锦鲤疱疹病毒KHV细胞毒材料感染锦鲤鳍条汇合单层细胞, 感染后第4 d, 细胞出现收缩变圆、折光度增加, 细胞单层收缩现象。感染后第8 d, 细胞碎片增多, 细胞脱落, 单层呈破渔网状, 出现典型细胞病变效应(CPE)(图11A), 而对照组正常(图11B)。



A: KHV感染Koi-Fin细胞产生的细胞病变效应; B: 正常细胞对照。

A: Koi-Fin cell infected with KHV; B: normal cell control.

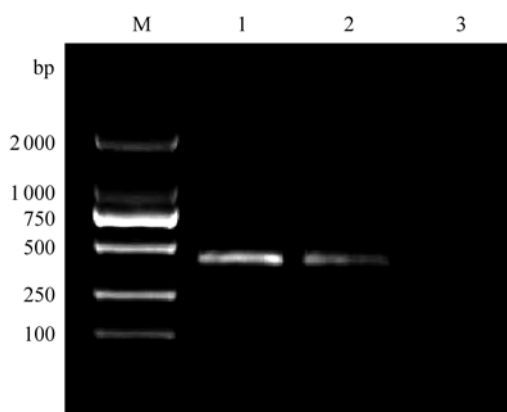
图11 KHV感染Koi-Fin细胞出现典型细胞病变效应

Fig.11 Cytopathic effect of Koi-Fin cells infected with KHV

采用微量培养板培养法测定病毒滴度(TCID₅₀/mL)为 $10^{7.86 \pm 0.51}$ 。

2.10 锦鲤疱疹病毒PCR检测

针对病毒胸苷激酶(thymidine Kinase, TK)基因设计引物并进行PCR检测的结果显示, PCR产物大小与预期的409 bp一致, 且条带单一、清晰(图12)。表明Koi-Fin细胞对KHV病毒敏感, KHV病毒能在Koi-Fin细胞上增殖。



M: DL 2 000分子量标准; 1,2: KHV病毒扩增产物; 3: 阴性对照。

M: DL 2 000 marker; 1,2: PCR amplified product of KHV virus; 3: negative control.

图12 KHV病毒PCR检测结果

Fig.12 The PCR amplified results of KHV virus

3 讨论

鱼类细胞原代培养方法主要有组织块移植法、酶消化法、机械分散法、络合剂分散法等^[17], 其中组织块移植法具有操作方便、快速、效率高等特点, 是最为常用的细胞原代培养方法之一。组织块的存在, 为迁出细胞提供了良好的生长基质和环境, 对适应培养环境和促进细胞生长有重要作用, 从组织块中迁移出的细胞贴壁稳定、生长迅速, 可生长成稳定的单层细胞。采用组织块移植法进行细胞原代培养的过程中, 随着细胞从组织块中迁出, 需要适时添加或更换新鲜培养基, 及时清除脱落的组织块或未贴壁的细胞。肖艺等^[17]采用组织块培养法对匙吻鲟鳍条来源的细胞进行原代培养, 发现在组织块接种后的2~3 d内有细胞迁出, 大约7 d出现细胞生长晕, 在第10 d形成单层。本实验中, 原代培养的锦鲤鳍条细胞在1~2 d内有细胞从鳍条组织块纤维结缔组织中迁出, 4 d左右即可形成生长晕, 大约8~10 d迁

出的细胞在组织块的周围形成单层, 表明锦鲤鳍条组织细胞具有良好的环境适应特性和生长特性。用胰酶-EDTA对原代培养细胞单层进行消化, 在显微镜下观察消化进程, 待单层细胞解离成单个细胞时, 迅速用含血清的培养基中和过量胰酶, 再用移液管轻轻吹打, 均匀分散。原代培养细胞的第一次传代培养因细胞量较少, 不宜进行分瓶扩大培养。传代10 h后离心培养基去除未贴壁细胞和使用HEPES/HEPES-Na溶液调节培养基的pH, 使细胞生长在适宜的范围内。早期的传代培养细胞仍使用与原代培养完全一致的培养基, 如血清浓度仍为30%, 并添加抗生素等。

细胞的冷冻保藏与复苏培养是能否成功建立一个细胞系的关键问题之一。为了提高细胞复苏时的存活率, 在本实验中, 使用亲水性低温保护剂DMSO作为细胞保护剂, 并预先制备细胞冷冻保存液并放在冰上预冷、预先将程序降温盒放在4℃冰箱预冷, 较好地解决了细胞保存过程中需要逐步降温的问题。特别是使用程序降温盒, 由于其中盛有异丙醇, 可以确保细胞在-80℃冰箱中每分钟降温1℃左右, 有效地避免了细胞在降温过程中冰晶的形成所造成的伤害^[11-12]。利用该方法保存的Koi-Fin细胞复苏后贴壁快速, 生长形态、状况与没有冻存的细胞基本相似, 未出现明显差别。复苏细胞用台盼蓝染色, 经细胞计数表明, 约80%的细胞不着色, 具有细胞活性。

鱼类细胞培养常常使用化学合成培养基, 主要包括MEME、M199、L-15、R-1640、DMEM等。Kathleen等^[8]培养鲤鱼脑组织细胞CCB、锦鲤鳍条细胞KF-1时使用的是DMEM培养基, 薛淑群等^[10]在培养鲤鱼尾鳍细胞时使用的是M199培养基。本文通过比较锦鲤鳍条细胞在MEME、M199、R-1640、L-15四种培养基里细胞生长状态、单层稳定性、细胞增殖速度等, 确定MEME培养基是锦鲤鳍条细胞生长的最佳培养基。

鱼类细胞培养基常常需要添加一些天然成分, 如血清、生长因子等, 它们具有促进体外培养细胞贴壁、增殖的作用。血清中含有丰富的营养物质, 可以促进细胞贴壁和生长, 保护细胞免受重金属离子、蛋白酶等物质的损害^[11]。生长因子主要通过酪氨酸激酶性受体结合, 刺激细胞增殖^[19]。在鱼类细胞培养中, Freshney^[12]、Wang等^[20]先后使用了

EGF和bFGF,发现这些生长因子具有促进鱼类细胞增殖的作用。本文在锦鲤鳍条组织细胞的原代培养与早期传代培养时,在培养液中添加了适量的bFGF和EGF,可有效地促进鳍条细胞的贴壁、生长与分裂。本文在锦鲤鳍条组织细胞传代培养过程中,分别使用了含胎牛血清0%、5%、10%、20%四种浓度的培养基,比较了锦鲤鳍条细胞的增殖速度,并考虑到细胞单层的稳定性以及培养过程中的成本消耗,确认添加10%血清浓度比较适宜培养锦鲤鳍条细胞。

在鱼类细胞培养过程中,培养温度的选择十分重要,鱼类细胞培养的最适温度一般与鱼类本身的最适生长温度一致。对温水性鱼类,培养的适温范围是15~37℃,最适温度是25~35℃。本文选择了15℃、20℃、25℃、30℃四个不同温度,通过比较细胞生长状态、单层稳定性、细胞增殖速度等,确定了25℃是锦鲤鳍条细胞生长的最适温度,与锦鲤最适生长温度(21℃~27℃)基本一致。

第23代鳍条细胞系的生长特性鉴定结果显示,细胞的群体倍增时间为43.5 h,表明其增殖旺盛。通过对第16代与第40代锦鲤鳍条细胞染色体分析,发现传代培养的锦鲤鳍条细胞染色体数目发生了很大的变化,第16代锦鲤鳍条细胞染色体数目 $2n=100$,但第40代锦鲤鳍条细胞的染色体数目分布在45~77之间,染色体众数为52。染色体出现缺失、畸变、断裂或重组是造成体外培养细胞染色体发生变化的主要原因,其机理有待于对不同传代次数的细胞进行更系统的研究。

Kathleen等^[8]认为利用常用的鱼类细胞系较难分离到KHV,刘荭等^[2]也证实KHV不能在CO、CK和EPC等鱼类细胞内复制。用KHV感染本研究建立的锦鲤鳍条组织细胞后,可导致细胞出现典型细胞病变效应(CPE),所培养的KHV经连续传代感染,均能产生典型CPE,病毒滴度(TCID₅₀/mL)达到 $10^{7.86\pm0.51}$ 。细胞培养KHV的PCR检测结果表明,本研究建立的锦鲤鳍条细胞对KHV敏感,可应用于研究KHV的致病机理、检测方法与防控技术研究。

参考文献 (References)

- 1 李 梅,刘文利,黄树涛,张风群,申大鹏,陈 昶,等.锦鲤嗜水气单胞菌的分离鉴定及生物学特性研究.中国预防兽医学报(Li Mei, Liu Wenli, Huang Shutao, Zhang Fengqun, Shen Dapeng, Chen Chang, *et al.* Isolation and the biological characterization of *Aeromonas hydrophila* isolates from ornamental carp, *Cyprinus carpio* L. *Chi J Prev Vet Med*) 2010; 32(8): 591-4.
- 2 刘 荭,史秀杰,高隆英,江育林.进口锦鲤暴发病病原的nested-PCR鉴定.华中农业大学学报(Liu Hong, Shi Xiujie, Gao Longying, Jiang Yulin. Studies on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay. *J Huazhong Agri Univ*) 2002; 21(5): 414-8.
- 3 Gilad O, Yun S, Andree K, Adkison MA, Zlontkin A, Bercovier H, *et al.* Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis Aquat Org* 2002; 48(1): 101-8.
- 4 Bondad-Reantaso MG, Sunarto A, Subasinghe RP. Managing the koi herpesvirus disease outbreak in Indonesia and the lessons learned. *Dev Biol (Basel)* 2007; 129: 21-8.
- 5 Grimmer SG, Warg JV, Getchell RG, Johnson DJ, Bowser PR. An unusual koi herpesvirus associated with a mortality event of common carp *Cyprinus carpio* in New York State, USA. *J Wild Dis* 2006; 42(3): 658-62.
- 6 Iida T, Sano M. Koi herpesvirus disease. *Uirusu* 2005; 55(1): 145-51.
- 7 徐 达,涂 坚,郑穹翔,陈微玫.锦鲤疱疹病毒传播媒介之探讨.台湾兽医学杂志(Xu Da, Tu Jian, Zheng Qiongxiang, Chen Weimei. The research of the transmission vectors of koi herpesvirus (KHV). *J Taiwan Vet*) 2007; 33(2): 89-95.
- 8 Eide KE, Miller-Morgan T, Heidel JR, Kent ML, Bildfell RJ, Lapatra S, *et al.* Investigation of koi herpesvirus latency in koi. *J Virol* 2011; 85(10): 4954-62.
- 9 江海明,潘厚军,王 庆,石存斌,吴淑勤.锦鲤鳍条细胞适宜消化方法和培养条件的初步探讨.中国水产学会学术年会论文摘要集(Jiang Haiming, Pan Houjun, Wang Qing, Shi Cunbin, Wu Shuqin. Primary studies of the proper conditions for the koi fin cell culture. Abstract collections, the annual symposium of Chinese Fisheries Association, 2010).
- 10 薛淑群,尹洪滨.鲤鱼尾鳍细胞的体外培养及其生长状态的研究.水产学杂志(Xue Shuqun, Yin Hongbin. Culture of cell from caudal fin of carp. *Chi J Fish*) 2003; 16(2): 40-3.
- 11 薛庆善.体外培养的原理与技术.北京:科学出版社(Xue Qing-shan. The theories and techniques of cultures *in vitro*. Beijing: Science Press), 2001, 87-101.
- 12 Freshney RI. Culture of animal cells—a manual of basic technique, 4th ed, New York: Wiley-Liss, Inc., 2000, 149-75; 297-308.
- 13 曾令兵,李晓莉,张 林,徐 进,张 燕.斑点叉尾鮰肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性.中国水产科学(Zeng Ling-bing, Li Xiaoli, Zhang Lin, Xu Jin, Zhang Yan. Establishment and characterization of a cell line derived from kidney of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Fish Sci Chi*) 2009; 16(1): 75-81.
- 14 Wang G, LaPatra S, Zeng L, Zhao Z, Lu Y. Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three celllines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Methods Cell Sci* 2003; 25(3/4): 211-20.
- 15 戴华生.新实验病毒学.北京:中国学术出版社(Dai Huasheng. New Experimental Virology, Beijing: Zhongguo Xueshu Chubanshe), 1983, 30-7.
- 16 余先觉,周 瞰,李渝成,李 康,周 密.中国淡水鱼类染色体.北京:科学出版社(Yue Xianjue, Zhou Tun, Li Yucheng, Li Kang, Zhou Mi. Chromosomes of Chinese freshwater fishes. Beijing: Science Press), 1989, 77.

- 17 于 淼, 管华诗, 郭华荣, 张士瑾. 鱼类细胞培养及其应用. 海洋科学(Yue Miao, Guan Huashi, Guo Huarong, Zhang shicui. Cell culture of fish and its application. J Marine Sci) 2003; 27(3): 1-8.
- 18 肖 艺, 曾令兵, 李晓莉, 邹远超, 周 勇, 徐 进. 匙吻鲟鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国细胞生物学学报(Xiao Yi, Zeng Lingbing, Li Xiaoli, Zou Yuanchao, Zhou Yong, Xu Jin. Establishment and characterization of a cell line derived from fin of paddlefish, *Polyodon spathula* Walbaum. J Chi J Cell Biol) 2010; 34(4): 533-40.
- 19 Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. Cell Biol Int 1995; 19(5): 413-30.
- 20 Wang XL, Wang N, Sha ZX, Chen SL. Establishment, characterization of a new cell line from heart of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Fish Physiol Biochem 2010; 36(4): 1181-9.

Establishment and Characterization of a Cell Line Derived from Fin of *Cryprinus carpiod*

Xiao Yi, Zeng Lingbing*, Xu Jin, Zhou Yong

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract A cell line, designated Koi-Fin, has been established from the fin of *Cryprinus carpiod* by using tissue explant techniques. Koi-Fin cell line has been continuously subcultured over 60 times and fully characterized in the aspects of morphological observation, cryopreservation, optimal growth kinetics, population doubling time and karyotyping, etc. Koi-Fin cell monolayer consists of fibroblast-like cells and its optimal growth condition is: MEM medium, 10% FBS and 25 °C. Under such optimized condition the doubling time of Koi-Fin cell numbers is about 46.5 h. After 12 months cryopreservation in liquid nitrogen, Koi-Fin cells exhibit a viability of about (80.21±5.84)% with trypan blue staining. Chromosome typing of this cell line revealed that at its 16th passage the diploid chromosome number was 2n=100, and at the 40th passage the modal number is 52. The results of virus sensitivity test indicated that Koi-Fin cell line is susceptible to the infection of Koi Herpesvirus (KHV), a characteristic viral-induced cytopathic effect (CPE) was observed and the viral titer (TCID₅₀/mL) reached about 10^{7.86±0.51}. Moreover, PCR detection demonstrated that the targeted gene can be amplified by using specific primers designed targeting the viral thymidine kinase gene.

Key words *Cryprinus carpiod*; fin; cell line; characterization; viral susceptibility

Received: April 4, 2012 Accepted: May 2, 2012

This work was supported by the Chinese Agriculture Research System (No.CARS-46-11)

*Corresponding author. Tel: 86-27-87180158, E-mail: zenglingbing@gmail.com