

匙吻鲟鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性

肖 艺^{1,2} 曾令兵^{1,2*} 李晓莉² 邹远超¹ 周 勇¹ 徐 进²

(¹华中农业大学水产学院, 武汉 430070; ²中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要 采用组织块移植培养技术, 对来源于匙吻鲟鳍条组织的细胞进行原代培养, 建立了匙吻鲟鳍条组织细胞系, 已稳定传代培养 80 多代, 定名为 PF-Fin。匙吻鲟鳍条组织细胞的形态为成纤维样细胞, 其最佳培养基为 M199, 最适血清浓度为 10%, 最适培养温度为 25℃。液氮冷冻保存 8 个月后的细胞经台盼兰染色检验, 约 87.68%±3.61% 仍保持活性, 细胞复苏后培养生长旺盛。匙吻鲟鳍条组织细胞的集落形成效率为 13.75%±2.28%; 细胞染色体分析结果表明, 第 10 代传代细胞的染色体数目为正常二倍体 2n=120, 第 59 代传代培养细胞的染色体众数为 90。病毒敏感性试验结果表明, PF-Fin 细胞对草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(CCRV)和鲤鱼春季病毒血症病毒(SVCV)敏感, 可产生典型细胞病变效应(CPE)。

关键词 匙吻鲟; 鳍条组织; 细胞系; 生物学特性; 病毒敏感性

匙吻鲟(*Polyodon spathula*, Paddlefish)隶属鲟形目、匙吻鲟科(白鲟科)、匙吻属, 原产于北美密苏里河与密西西比河流域, 是现存的两种白鲟科鱼类之一。我国于 1988 年首次从美国引种, 开始了匙吻鲟的驯化、养殖和人工繁殖技术研究^[1]。匙吻鲟主要以浮游动物为食, 具有适应性强、生长迅速、易于捕捞、经济价值高等优点, 现已在我国近 20 个省市进行养殖, 经济效益显著^[2]。但是, 随着匙吻鲟养殖规模的不断扩大, 集约化程度的不断提高, 养殖过程中病害问题也日趋严重, 养殖鲟鱼暴发性死亡事件时有发生, 造成重大经济损失^[3,4]。鱼类细胞是研究水生动物病毒病原分离鉴定、病原生物学、致病机理、免疫预防技术等的重要实验材料^[5]。Hedrick 等^[6]建立了来源于白鲟脾脏和脑组织的细胞系; Li 等^[7]建立了来源于大西洋鲟的心脏细胞系 SH; Wang 等^[8]建立了来源于高首鲟鳍条、吻端和肌肉组织的细胞系; 叶湘辉等^[9]建立了来源于中华鲟吻端和性腺组织的细胞系 CSSn 和 CSG; 孟彦等^[10]报道了施氏鲟不同组织来源细胞离体培养的初步研究结果; 但目前关于匙吻鲟鳍条组织细胞离体培养的研究尚属空白。国外利用已经建立的细胞系发现或报道了鲟科鱼类的多种病毒病原^[11-16], 国内在鲟鱼病毒病研究领域急需开展研究, 但鲟科鱼细胞系资源缺乏。本研究通过对来源于匙吻鲟鳍条组织细胞进行离体培养, 建立了可连续传代的匙吻鲟鳍条组织细胞系(PF-Fin), 并进行了细胞系生物学特性和病毒敏感性的测定, 为我国匙吻鲟和鲟科鱼类病毒性疾病的研究提供了重要实验材料。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 健康匙吻鲟鱼, 体长约 15 cm, 来源于中国水产科学研究院长江水产研究所太湖鲟鱼保护研究基地。实验前于实验室暂养 1 周。

1.1.2 细胞与病毒 草鱼肾脏组织细胞系(CIK)由本实验室建立并传代保存^[17]; 草鱼呼肠孤病毒 GCRV、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒 CCRV 由本实验室分离鉴定^[18,19]; 鲤鱼春季病毒血症病毒(SVCV)由美国夏威夷大学公共卫生与健康系 Yuanan Lu 教授惠赠。

1.1.3 试剂与耗材 MEME、M199、R1640、L-15 培养基、Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS)、两性霉素 B、青霉素/链霉素、胰蛋白酶-EDTA(Typsin-EDTA)、二甲亚砜(DMSO)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、秋水仙素、去离子水均购自 Sigma 公司; 精制胎牛血清(defined fetal bovine serum, DFBS)为 Hyclone 产品; 生长因子 EGF 和 FGF 为 Peprotech 产品。25 cm² 细胞培养瓶(Corning); 1 ml、2 ml、5 ml、10 ml 移液管(Greiner bio-one); 移液辅助器(HTL); 15 ml、50 ml 离心管(Greiner bio-one); 细胞冻存管(Costar)、程序降温盒、过滤器(Nalgene)。

收稿日期: 2010-02-03 接受日期: 2010-07-08

农业部公益性行业科研专项(No.200803013)和中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室课题(No.2010FEA03001)资助项目

* 通讯作者。E-mail: zenglingbing@gmail.com

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

1.2 方法

1.2.1 细胞原代培养 健康匙吻鲟在 20 ppm 高锰酸钾溶液中药浴 30 min, 再用 70% 酒精擦拭鱼体表面, 然后将鱼放在洁净托盘里置于 II 级生物安全柜内。参考薛庆善^[20]和 Freshnery^[21]的原代细胞培养方法, 取其鳍条置于含青霉素(500 U/ml)、链霉素(500 μg/ml)、两性霉素 B(12.5 μg/ml)的 DPBS 缓冲液中洗涤 3~4 次, 用灭菌消毒过的眼科剪将鳍条剪成 1 mm³ 左右的小块, 均匀移植在 25 cm² 培养瓶里(Corning), 于 25℃ 静置 1 h 后添加 1 ml 含 30% DFBS、青霉素(200 U/ml)、链霉素(200 μg/ml)、两性霉素 B(5.0 μg/ml)以及适量细胞生长因子 EGF 和 FGF 的 MEME 培养液, 在 25℃ 恒温培养箱中进行原代培养。逐日观察组织块的贴壁以及细胞从组织块的迁出和生长状况, 照相记录观察结果。在培养的第 3 或 4 天, 吸弃培养基, 添加 3 ml 新鲜培养基继续培养。

1.2.2 细胞传代培养 当从组织块中迁出并且生长良好的细胞单层达到培养瓶 70% 左右的培养面积时即可进行细胞传代培养。传代前轻拍培养瓶使鳍条组织块脱落, 用移液管吸出组织块与培养基, 然后用 Trypsin-EDTA 溶液消化细胞, 在倒置显微镜下观察细胞的消化进程, 待细胞单层逐渐解离成单个细胞后, 迅速用含 10% DPBS 的培养基中和过量的消化液。反复吹打细胞, 收集细胞悬液于 15 ml 离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min。吸出离心管上层液体后用新鲜培养基重新悬浮细胞, 按适当比例转移至新的培养瓶内进行继续培养。

1.2.3 细胞最佳培养条件的确定 细胞最佳培养基的确定: 选择 MEME、M199、R-1640、L-15 四种不同的细胞培养基, 并添加 10% DPBS, 每种培养基接种 12 瓶细胞, 细胞量均一, 置于 25℃ 恒温培养箱中。每个实验组每 2 天取出 2 瓶细胞经 Trypsin-EDTA 消化后分别进行细胞计数, 连续计数 6 次, 共培养 12 d, 绘制细胞在不同培养基条件下的生长曲线, 确定细胞生长的最佳培养基。最适血清浓度确定: 分别配制含血清 0%、5%、10%、20% 的 M199 培养基, 实验组设置同前, 在 25℃ 恒温培养箱中培养, 同样每个实验组每 2 d 取出 2 瓶细胞经 Trypsin-EDTA 消化后分别进行细胞计数, 连续计数 6 次, 共培养 12 d, 绘制细胞

在不同血清浓度条件下的生长曲线, 确定细胞生长的最适血清浓度。最适培养温度的确定: 选择 15℃、20℃、25℃、30℃ 4 个不同的温度条件, 用含 10% DFBS 的 M199 培养基。实验组设置同前, 同样每个实验组每 2 d 取出 2 瓶细胞经 Trypsin-EDTA 消化后分别进行细胞计数, 连续计数 6 次, 共培养 12 d, 绘制细胞在不同温度条件下的生长曲线, 确定细胞生长的最适培养温度。

1.2.4 细胞冻存与复苏 参考 Freshnery^[21]的方法对生长旺盛、形态均一的细胞分批进行液氮冷冻保存。细胞冷冻保存液各组分的终浓度分别为 10% 二甲亚砜(DMSO)、20% 血清(DFBS)、70% M199 培养基。根据保存的细胞数量(冻存管数)确定冷冻保存液的体积。首先配制一半体积的细胞冻存液, 其中含 20% DMSO、40% DFBS, 其余用 M199 培养基补充, 置冰上预冷。然后消化收集细胞, 用 M199 培养基(与预先配制的细胞冻存液等体积)悬浮细胞, 在冰上缓慢加入预冷的冻存液, 混合均匀, 再以 1ml/管分装到预冷的细胞冻存管里。最后把细胞冻存管移入 4℃ 预冷的程序降温盒内, 置 -80℃ 冰箱过夜后转移到液氮罐里保存。冻存细胞复苏时, 从液氮里取出冻存细胞, 迅速放入 37℃ 水浴里解冻, 用移液管将细胞移入培养瓶, 添加 4~5 ml 含 10% DFBS 的培养基, 25℃ 恒温培养 12 h 后吸出培养基和未贴壁细胞, 再添加含 10% DFBS 的新鲜培养基继续培养, 观察细胞的生长状况。冻存细胞的活细胞计数采用台盼蓝染色法。从液氮中取出的冻存细胞在 37℃ 水浴后, 用移液枪取少许细胞与等体积台盼蓝染色均匀混合, 显微镜下观察并计数统计不着色的活细胞数量。

1.2.5 细胞集落形成效率 将传代培养至第 51 代的 PF-Fin 细胞经 Trypsin-EDTA 消化后, 以 200 cells/瓶、500 cells/瓶、1 000 cells/瓶三种不同的接种浓度分别接种于 25 cm² 培养瓶, 于 25℃ 培养, 培养基为 M199, 添加 10% 血清, 设置重复试验组。培养 12 d 后, 吸弃培养液, 用 DPBS 缓冲液清洗细胞单层。添加 5 ml 新鲜无水乙醇固定细胞, 20 min 后吸弃固定液, 然后用 5 ml Giemsa 染色液染色 10 min, 最后用蒸馏水冲洗培养瓶多次, 自然晾干。倒置显微镜下观察细胞集落生长情况并计数。按如下公式计算细胞的集落形成效率: $PE = (\text{细胞集落数} / \text{接种细胞总数}) \times 100\%$ 。

1.2.6 染色体分析 分别对第 10 代和第 59 代的匙吻鲟鳍条细胞进行染色体分析。细胞传代培养 24 h

后, 更换新鲜培养基, 添加终质量浓度分数为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的秋水仙素继续培养 13~16 h。吸出培养液, 用 Trypsin-EDTA 消化细胞, 待细胞解离成单个细胞后用含 10% 血清的 M199 培养基中和过量消化液, 移液管反复吹打后离心收集细胞。参照 Wang 等^[8]的方法进行染色体制片, 高倍显微镜下观察和计数 PF-Fin 细胞的染色体数目。

1.2.7 病毒敏感性试验 PF-Fin 细胞于 25 cm^2 培养瓶中进行传代培养, 待细胞长成汇合单层后(18~24 h), 吸出培养基, 每瓶加入本实验室制备和保存的 GCRV, CCRV 和 SVCV 细胞病毒材料 0.5 ml, 再加入终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ polybrene(Sigma), 25°C 吸附 1 h, 期间每隔 15~20 min 轻微晃动培养瓶一次以便均匀吸附。待吸附结束后, 吸弃多余的病毒液, 分别添加血清浓度为 2% 的 M199 维持液, 25°C 培养。向正常对照组细胞添加 0.5 ml 无血清的 M199 培养基模拟感染, 其它操作同感染试验组。感染试验组设置重复试验。光学显微镜下逐日观察细胞病变效应(Cytopathic Effect, CPE), 照相记录结果。

2 结果

2.1 原代培养

在 25°C 培养条件下, 匙吻鲟鳍条组织接种后 2~3 d 内有成纤维样的细胞从组织块中迁出, 呈放射状生长(图 1), 大约 7 d 迁出的细胞在组织块周围形成单层, 呈典型成纤维样细胞(图 2)。随着培养时间的增加, 细胞单层面积不断扩大, 经过约 10 d 的培养, 从组织块里迁出的细胞铺满 70% 左右的瓶底。

2.2 传代培养

用胰酶-EDTA 对原代培养细胞进行传代培养, 传代细胞在 4~8 h 内即可贴壁生长, 在 3~5 d 内生长

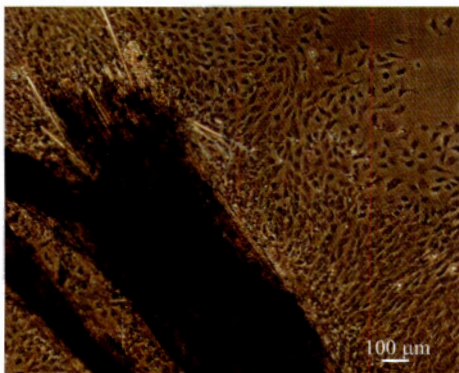


Fig.1 Primary culture of PF-Fin cell, d3

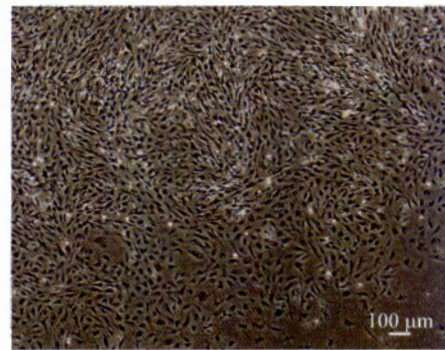


Fig.2 Primary culture of PF-Fin cell, d7



Fig.3 Subculture of PF-Fin cell at 75th passage (d2, bar=100 μm)

成汇合单层, 细胞呈典型的成纤维样。经过数十次连续传代以后, 传代细胞约 1~2 d 即可汇合成细胞单层, 且细胞单层稳定(图 3)。

2.3 最佳培养条件

2.3.1 最佳培养基 使用 M199、MEME、R1640 和 L-15 四种不同的培养基, 添加 10% 血清, 于 25°C 恒温培养 PF-Fin 细胞。细胞在四种培养基中均能稳定生长与增殖, 4~8 d 间细胞成近对数增长。细胞统计计数结果显示, PF-Fin 细胞在 M199 培养基中增殖速度最快, 其次是 MEME、R1640 培养基, 培养 8 d 后, 形成致密细胞单层, 每瓶细胞数目超过 6×10^6 个; 在 L-15 培养基里, PF-Fin 细胞生长增殖最慢, 细胞数目最高约为 4.8×10^6 个/瓶(图 4)。

2.3.2 最适血清浓度 使用 M199 培养基, 分别添加 0%、5%、10%、20% 的血清, 于 25°C 恒温培养 PF-Fin 细胞。细胞统计计数结果显示, 在含 0% FBS 的培养基里, PF-Fin 细胞贴壁数少, 不能生长和形成细胞单层; 在含 5% FBS 的培养基里, PF-Fin 细胞可以正常生长, 但细胞的增殖速度比较缓慢, 培养 4 d 后才能形成细胞单层; PF-Fin 细胞在含 10% 和 20% FBS 的 M199 培养基里, 生长增殖旺盛, 在 2~6 d 间成

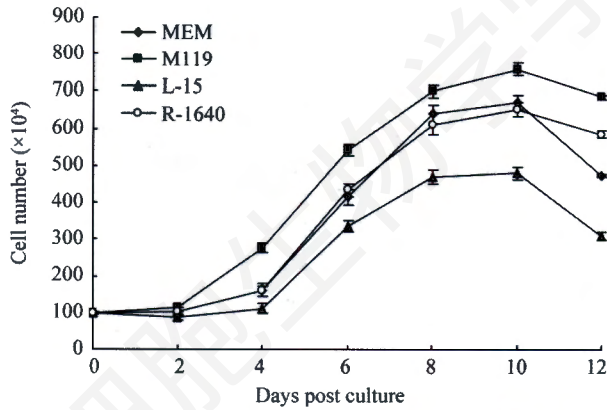


Fig.4 Comparative growth of PF-Fin cells cultured in different media

近对数增长, 培养至第 8 d 细胞数量超过 6×10^6 个/瓶, 形成致密细胞单层。在细胞单层的稳定性和维持时间方面, 含 20% 血清的培养基要差于含 10% 血清的 M199 培养基, 在培养后期(8~12 d 间), 细胞脱落较为明显(图 5)。

2.3.3 最适培养温度 使用含 10% FBS 的 M199 培养基, 分别在 15℃、20℃、25℃、30℃ 四个温度恒温培养 PF-Fin 细胞。细胞统计计数结果显示, 在 30℃ 温度条件下, PF-Fin 细胞在第 6 d 生长数目增至最高 4.1×10^6 个/瓶, 随后出现较多死亡细胞, 致密细胞单层出现空洞, 生长细胞从瓶壁脱落, 细胞数下降明显; PF-Fin 细胞在 20℃ 和 25℃ 条件下都能稳定的生长和增殖, 但 25℃ 条件下细胞生长速度更为迅速; 25℃ 条件下培养 4 d, 细胞即可形成稳定的细胞单层, 培养 6 d 后细胞数达到 6×10^6 个/瓶。在 15℃ 的培养温度条件下, PF-Fin 细胞可以正常贴壁, 但生长

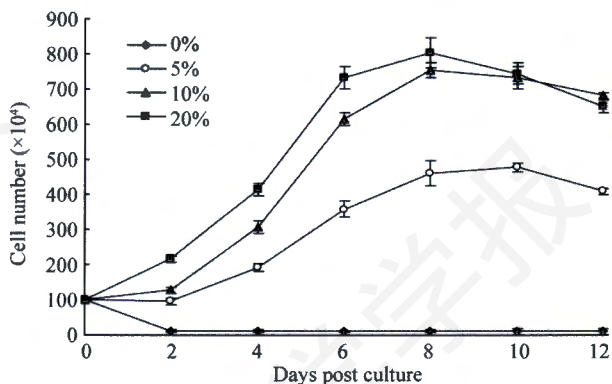


Fig.5 Comparative growth of PF-Fin cells cultured under different concentrations of fetal bovine serum

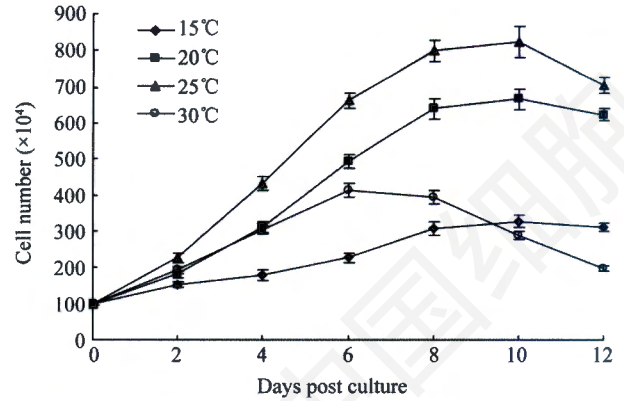


Fig.6 Comparative growth of PF-Fin cells cultured at selected incubation temperatures

速度较为缓慢, 细胞数量最高至 2.4×10^6 个/瓶(图 6)。

2.4 细胞冻存与复苏

对生长状态良好的细胞用冻存液制成细胞悬液, 通过程序降温盒预冷后再转移至液氮保存。将在液氮中保存 8 个月的 PF-Fin 细胞取出, 迅速置于 37℃ 水浴锅里解冻, 然后添加含 10% DFBS 的 M199 培养基进行细胞复苏培养。为了去除 DMSO 对细胞的毒害, 在 25℃ 恒温培养 12~24 h 后, 更换新鲜的培养基。复苏的 PF-Fin 细胞贴壁快速, 形态均一, 可在 2~3 d 左右生长成汇合单层, 细胞单层稳定。冷冻保存的 PF-Fin 细胞于 37℃ 水浴快速融化后用台盼蓝染色, 显微镜观察计数统计活细胞数, 结果表明, 约 $87.68\% \pm 3.61\%$ 的细胞不着色, 为具有活性的细胞(数据未列出)。

2.5 细胞集落形成效率

图 7 为单个 PF-Fin 细胞生长成细胞集落后的形态。按照 $PE = (\text{细胞集落数} / \text{接种细胞总数}) \times 100\%$ 计算, PF-Fin 细胞的集落形成效率为 $13.75\% \pm 2.28\%$ (表 1)。

2.6 染色体分析

分别在倒置显微镜下观察 30 个第 10 代 PF-Fin 细胞的中期分裂相和 80 个第 59 代 PF-Fin 细胞的中期分裂相的染色体图片, 统计细胞的染色体数目。结

Table 1 Plating efficiency of PF-Fin cells

Cell number/flask	Number of cell colonies	
	Test 1	Test 2
200	26	20
500	58	76
1 000	148	179
Plating efficiency	$13.75\% \pm 2.28\%$	

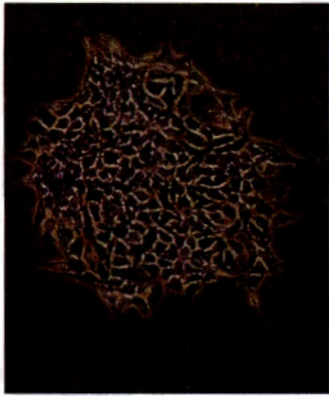


Fig.7 Single colony of PF-Fin cell

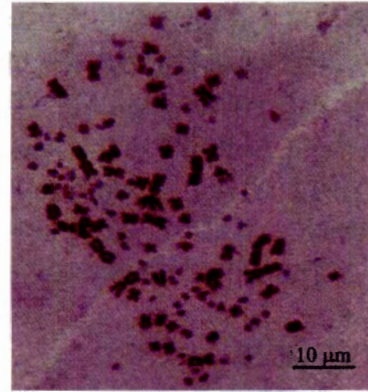


Fig.8 PF-Fin cell chromosomes at 10th passage

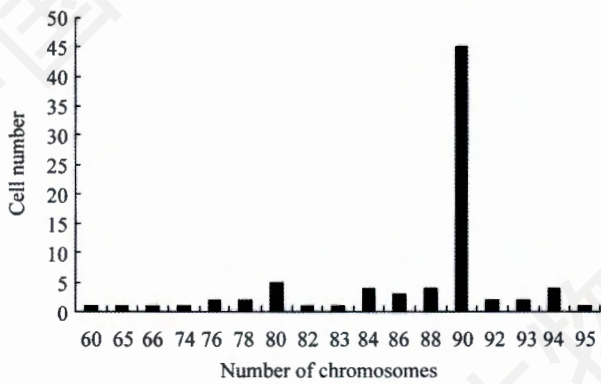


Fig.9 PF-Fin cell chromosomes at 59th passage

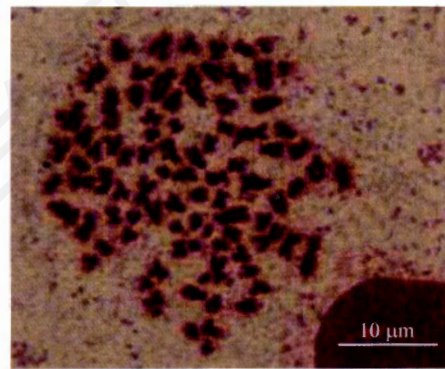


Fig.10 PF-Fin cell chromosomes at 59th passage

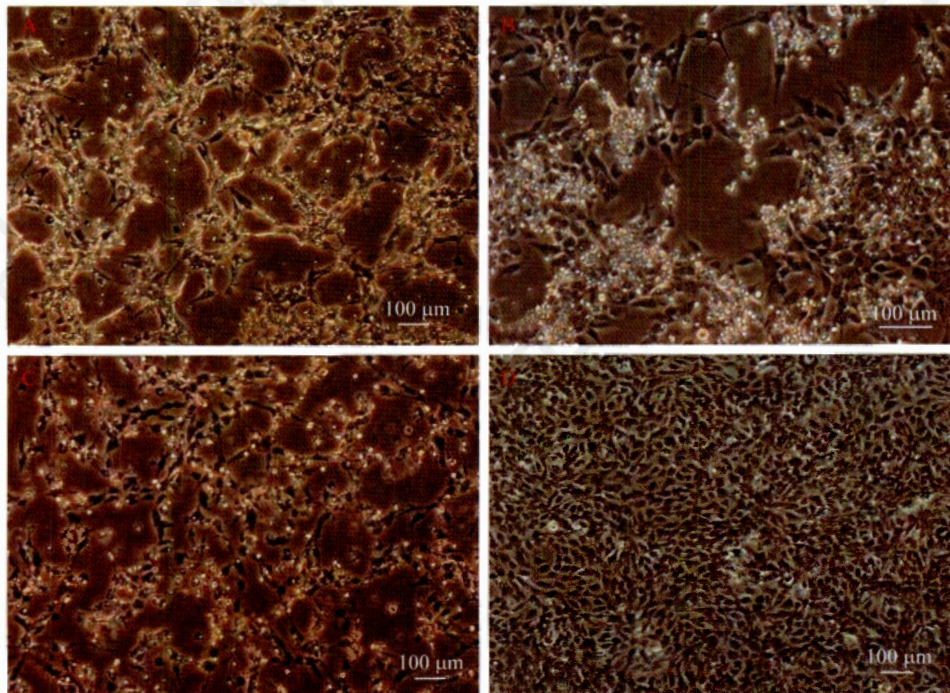


Fig. 11 Cytopathic effect of PF-Fin cells infected with GCRV, CCRV and SVCV

A: PF-Fin infected with GCRV; B: PF-Fin infected with CCRV; C: PF-Fin infected with SVCV; D: normal cell control.

果显示,第10代PF-Fin细胞的染色体数 $2n=120$ (图8),为二倍体,与报道的匙吻鲟染色体数目相符^[22],从染色体图上可以看出,PF-Fin早期细胞的染色体有大量微小染色体存在。第59代PF-Fin细胞的染色体数目分布在60~95之间,染色体众数为 $2n=90$ (图9),表明第59代PF-Fin细胞的染色体已经出现了变化,从染色体图片上可以看出,细胞的微小染色体出现丢失(图10)。

2.7 病毒敏感性试验

用草鱼呼肠孤病毒GCRV、斑点叉尾鲟呼肠孤病毒CCRV和鲤春病毒血症病毒SVCV感染PF-Fin汇合单层细胞,在病毒感染36 h后,细胞逐渐变圆、折光度增加,细胞单层逐渐收缩,感染48~72 h后,细胞开始出现大面积脱落,细胞碎片增多,单层破裂,出现典型CPE,用培养基模拟感染的对照组正常细胞未出现病变(图11)。收获细胞培养的病毒材料进行传代感染,PF-Fin均能稳定地出现CPE。

3 讨论

组织块移植法是常用的细胞体外培养方法,其具有快速、操作简单、效率高等优点,适合原代细胞培养。组织块的存在对适应培养环境有重要作用,它为细胞提供了良好的生长基质和环境,从组织块里迁出的细胞容易贴壁和生长。Wang等^[8]用组织块培养法对高首鲟的鳍条等组织来源细胞进行培养,发现在组织块接种后的第2 d有细胞从组织块里迁出,第3~4 d出现细胞生长晕,在第5~6 d形成细胞单层。本实验原代培养的PF-Fin细胞在2~3 d内有细胞从组织块中迁出,第5 d迁出的细胞在组织块的周围形成单层,与高首鲟的鳍条组织原代培养相似。当从组织块中迁出的细胞铺满瓶底约70%时,即可进行传代培养。传代过程中的关键之一即胰蛋白酶-EDTA对细胞的消化程度。消化时间过短,则不能将贴壁细胞完全消化,传代细胞数量减少;消化时间过长,则对细胞造成不同程度的损伤,降低传代细胞的贴壁效率^[20]。用胰酶-EDTA消化单层细胞,在显微镜下观察消化进程,待单层细胞解离成单个细胞,用手轻拍培养瓶,迅速用含10%血清的培养基中和剩余胰酶,再用移液管轻轻吹打,均匀分散细胞,在胰酶消化和吹打分散细胞过程中,应注意损失细胞。细胞传代10 h后,观察细胞的贴壁情况和培养基的pH,需要及时清洗去除未贴壁细胞和使用HEPES/HEPES-Na溶液调节培养基的酸碱度,控制pH在细胞生长的适宜

范围内。

超低温保存是储存种子细胞的重要方法,DMSO是目前最常用的细胞冻存保护剂。细胞冻存过程中采用使用程序降温盒,由于降温盒内盛有异丙醇,可以保障细胞在 -80°C 冰箱中缓慢降温(降温速率约为每分钟 1°C),有效的保护了细胞免受冰晶所造成的破坏^[11]。冻存细胞复苏时,从液氮罐里取出冻存管,迅速放入 37°C 水浴中解冻,于最适温度培养12 h后,吸出培养基以去除DMSO,添加新鲜培养基继续培养细胞,可消除残留DMSO对细胞造成的伤害。本实验中通过液氮低温保存8个月后复苏,台盼蓝检查时绝大部分细胞仍保持活性,复苏培养的细胞第3 d即可生长成细胞单层,表明细胞冻存效果良好,可达到长期保存的目的。

通过观察细胞形态、细胞单层稳定性以及统计细胞数增殖速度等,确定了匙吻鲟鳍条细胞的最适培养条件为:M199细胞培养基,添加10%血清,温度在 25°C 。PF-Fin细胞的最佳培养基M199与高首鲟鳍条组织细胞系WSF的最佳培养基M199相同^[8]。培养PF-Fin细胞时添加10%血清比较合适,主要是考虑细胞生长时对营养的需求、细胞单层的稳定性、细胞生长速度以及培养过程中成本的消耗以及操作者精力的付出等。PF-Fin细胞培养的最佳温度与匙吻鲟生长的最适生长温度范围($20\sim 32^{\circ}\text{C}$)基本上一致。

匙吻鲟鳍条组织细胞PF-Fin的集落形成效率为 $13.75\% \pm 2.28\%$,与Wang等^[8]研究结果相似。匙吻鲟鳍条组织细胞PF-Fin的细胞集落形成效率显著低于曾令兵等^[23]研究的斑点叉尾鲟肾脏组织细胞的集落形成效率($74.16\% \pm 3.54\%$),说明在培养过程中匙吻鲟鳍条组织细胞的接种量对于细胞生长成单层的速度与细胞单层的稳定性等影响显著。通过对第10代和第59代PF-Fin细胞的染色体分析,第10代PF-Fin细胞的染色体数目 $2n=120$,与已报道的匙吻鲟染色体数相符^[22],第59代PF-Fin细胞的染色体数目分布在60~95之间,其众数为90。匙吻鲟鳍条组织细胞PF-Fin在传代培养过程中染色体数目发生了很大的变化,这说明细胞随着培养时间的延长/传代次数的增加以及生长环境的改变等出现了染色体的畸变、重组、断裂、丢失等,尤其是微小染色体的丢失。体外培养细胞的染色体数目发生改变后,细胞对体外环境的适应能力增强,分裂生长能力增强,更容易传代,有利于细胞的永久保存与应用^[20]。

用草鱼呼肠孤病毒GCRV、斑点叉尾鲟呼肠孤

病毒CCRV和鲤春病毒血症病毒SVCV分别感染匙吻鲟鳍条组织细胞, 可导致单层细胞出现典型的细胞病变效应(CPE), 并且连续的传代感染也能出现细胞病变效应, 这表明, PF-Fin 细胞系对上述病毒的感染敏感。匙吻鲟不是上述病毒的原始宿主, 其 PF-Fin 细胞对这些病毒的感染出现敏感性, 可能是由于细胞经过数十代的连续传代培养后, 细胞表面受体已经发生变化, 因而对多种不同来源的病毒具有了敏感性, 但其机理还有待深入研究。病毒对非原始感染宿主来源的细胞具有感染性, 这对于研究相应疾病的细胞疫苗及其免疫机理有较为重要的意义, 因为这可以避免使用病毒原始宿主来源细胞制备细胞疫苗而导致潜在的免疫病理反应。由于鲟鱼病毒材料的缺乏, 本文暂未研究鲟鱼病毒病原对PF-Fin细胞的感染性, 而有关使用PF-Fin细胞系进行鲟鱼病毒病原的分离工作仍在进行之中。

参考文献(References)

- 1 吴业彪, 林建国. 美国匙吻鲟及其养殖技术. 淡水渔业 1999; 29(1): 38-9.
- 2 李继勋. 大水面增殖名优品种匙吻鲟的养殖技术. 北京水产 2006; 2: 45-7.
- 3 曹海鹏, 杨先乐, 高鹏, 李怡, 张书俊, 邓璐. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究. 淡水渔业 2007; 37(2): 53-6.
- 4 孟彦, 肖汉兵, 张林, 李罗新, 曾令兵. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报 2007; 27(6): 822-6.
- 5 Villena AJ. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. Rev Fish Biol Fish 2003; 13: 111-40.
- 6 Hedrick RP, McDowell T, Rosemark R, Aronstein D, Lannan CN. Two cell lines from white sturgeon. Trans Am Fish Soc 1991; 120: 528-34.
- 7 Li MF, Marrayatt V, Annand C. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and gropy (*Poecilia reticulata*). Can J Zool 1995; 63: 2867-74.
- 8 Wang G, Lapatra S, Zeng L, Zhao Z, Lu Y. Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Methods Cell Sci 2004; 25: 211-20.
- 9 叶湘辉, 刘汉勤, 俞小牧, 张义兵. 中华鲟组织培养的初步研究. 水生生物学报 1999; 23(6): 566-71.
- 10 孟彦, 张燕, 张林, 肖汉兵, 李罗新, 杨焱清, 等. 施氏鲟不同组织来源细胞离体培养的初步研究. 细胞生物杂志 2007; 29: 718-22.
- 11 Hedrick RP, McDowell TS, Groff JM. Isolation and some properties of an iridovirus-like agent from white Sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Dis Aquat Org 1992; 12: 75-82.
- 12 Shchelkunov IS, Shchelkunova TI, Shchelkunov AI, Kolbassova YP, Didenko LV, Bykovsky AP. First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia. Dis Aquat Org 2009; 86: 193-203.
- 13 Hedrick RP, McDowell TS. Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon. Dis Aquat Org 1991; 11: 49-56.
- 14 Wartson LR, Yun SC, Groff JM. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Dis Aquat Org 1995; 22: 199-10.
- 15 Drennan JD, Ireland S, LaPatra SE, Grabowski L, Carrohers TK, Cain KD. High-density rearing of white sturgeon *Acipenser Transmontanus*(Richardson) induces white sturgeon iridovirus disease among asymptomatic carriers. Aquat Res 2006; 36: 824-7.
- 16 Waston LR, Groff JM, Hedrick RP. Replication and pathogenesis of white sturgeon iridovirus (WSIV) in experimentally infected white sturgeon *Acipenser transmontanus* juveniles and sturgeon cell lines. Dis Aquat Ora 1998; 32: 173-84.
- 17 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 杜森英, 杨先乐. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性. 水产学报 1986; 10(1): 11-17.
- 18 曾令兵, 贺路, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 株的理化、生物学特性及基因组结构. 水产学报 1998; 22(3): 279-82.
- 19 曾令兵, 徐进, 李艳秋, 王瑶, 肖艺, 范玉顶. 斑点叉尾鲟出血病病原呼肠孤病毒的分离与鉴定. 病毒学报 2009; 25(6): 474-80.
- 20 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 科学出版社 2001.
- 21 Freshney RI. Culture of animal cells-a manual of basic technique, 4th ed. Wiley-Liss, Inc, 2000.
- 22 Howell WH, Dingerkus G. Karyotypis analysis and evidence of tetraploidy in the North American Paddlefish, *Polydon spathula*. Science 1976; 194: 842-4.
- 23 曾令兵, 李晓莉, 张林, 徐进, 张燕. 斑点叉尾鲟肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国水产科学 2009; 16(1): 73-81.

Establishment and Characterization of a Cell Line Derived From Fin of Paddlefish, *Polyodon spathula* Walbaum

Yi Xiao^{1,2}, Ling-Bing Zeng^{1,2*}, Xiao-Li Li², Yuan-Chao Zou¹, Yong Zhou¹, Jin Xu²

(¹College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract A cell line, designated PF-Fin, had been established from the fin of paddlefish, *Polyodon spathula* Walbaum and subcultured over 80 passages. Characterization of the cell line included determination of cell morphology, optimal growth kinetics, plating efficiency, karyotyping, *etc.* The primary culture of this cell was generated by the tissue explant technique using the M199 medium supplemented with 30% fetal bovine serum, epidermal/fibroblast growth factors and penicillin/streptomycin/-amphotericin B solution. Subculture of the cell was conducted in M199 medium with 10% fetal bovine serum. The cell grew between 20~30 °C and the optimal growth temperature was 25 °C. The cell monolayer consisted of fibroblast-like cells and the plating efficiency of the cells was about 13.75%±2.28%. Following cryopreservation in liquid nitrogen, thawed cells exhibited a viability of 87.68%±3.61% after 8 months storage period. Chromosome typing of this cell line revealed the diploid chromosome number was 2n=120 at its 10th passage, and at its 59th passage the chromosome modal number was 2n=90. The results of virus challenge tests indicated that PF-Fin cell line is susceptible to the infection of Grass carp Reovirus (GCRV), Channel catfish Reovirus (CCRV) and Spring Viremia carp Virus (SVCV), and a characteristic viral-induced cytopathic effect (CPE) was observed.

Key words paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum); fin; cell line; characterization; viral susceptibility

Received: February 3, 2010 Accepted: July 8, 2010

This study was supported by the Special Fund of Commonweal Industry of the Ministry of Agriculture(No.200803013) and the Opening Grant of the Key Laboratory of Freshwater Ecology & Healthy Aquaculture, Chinese Academy of Fishery Sciences(No.2010FEA03001)

*Corresponding author. E-mail: zenglingbing@gmail.com