

研究简报

皱纹盘鲍的组织培养

THE TISSUE CULTURE OF *HALIOTIS DISCUS HANNAI*

李 霞 刘淑范

LI Xia, LIU Shu-Fan

(大连水产学院养殖系, 116023) (Department of Aquaculture, Dalian Fisheries College, 116023)

关键词 皱纹盘鲍, 组织培养

KEYWORDS *Haliotis discus hannai*, Tissue culture

组织培养技术在哺乳类和鱼类已得到广泛的应用,在软体动物方面,国内外学者也进行了初步尝试,但都仅限于细胞原代培养[Hetrick 1981, Fyhn 1975, 石安静 1983, Chen 1988]。作者自 1991 年起,对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)几种组织和细胞进行体外培养,将外套膜和鳃继代培养 10 和 11 代,这无疑对今后贝类病毒的分离和纯化,珍珠形成机制以及一些细胞生物学研究具有指导意义。

1 材料与方法

材料取自大连碧龙海珍品有限公司海上及育苗室的成鲍和幼鲍。供体外培养的鲍组织为外套膜、鳃、足部肌肉、肝胰腺和鳃下腺。

用消毒海水反复冲洗鲍壳和软体部,在无菌室中用 70%酒精擦洗体表,后用消毒剪刀取下要培养的组织放置消毒液中,再用不含小牛血清的 Eagle's MEM 冲洗 10 余遍,仔细将组织剪成 1 mm² 大小,将其置于细胞培养瓶中,采用组织块培养法[陈瑞铭 1991], 12 h 后加入培养基,培养温度为 26~27℃, pH 值为 7.0~7.2, 封闭培养。所用器械均采用高压蒸汽(15 磅, 30℃)或干烤(150℃, 2 h)灭菌,培养基用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤除菌。

2 结果与讨论

2.1 几种消毒剂的选择

鲍的各器官均与外界相通,表面带菌或原生动,培养前需进行灭菌处理,除菌彻底与否是培养成功的关键之一。实验单独或混合使用 0.5%二氯化汞, 70%酒精、青霉素、链霉素和 1%洗必泰(双氯苯双胍己烷)处理所供培养的组织,以外套膜为例,不同消毒剂效果见表 1。

结果表明将所取组织器官放置 1%洗必泰和双抗 1:1 混合液中浸泡 30 min,再用维持液反复冲掉多余消毒剂,这样处理既能杀死细菌,又能保持细胞活性。

2.2 培养基的筛选

选择市售的人工合成培养基,加入 20% 小牛血清,视其对鲍原代细胞生长的影响,从中选出最适宜的配方。通过比较本实验采用培养基的配方为:

Eagle MEM	9.5 g	L-谷氨酰胺	0.3 g
氯化钠	3.51 g	碳酸氢钠	2.2 g
胰岛素	2.5 g	庆大霉素	1 支
三蒸水	1 000 mL		

表 1 几种消毒剂效果比较

Table 1 Comparison of effects of some kinds of disinfectants

实验号	消毒剂	处理时间	长满单层时间(d)
1	70%酒精	10 s	—
2	1%洗必泰	30 min	—
3	1%洗必泰+双抗(1:1)	30 min	10
4	0.5%二氯化汞	10 min	—
5	0.5%二氯化汞	20 min	20
6	双抗	30 min	—

注:—表示细菌污染;双抗浓度:青霉素 4 000 IU/mL,链霉素 5 000 IU/mL

Chen[1988]在培养文蛤鳃细胞时,选用 2 倍 L-15 合成培养基加入 5% 文蛤血淋巴及 10% 胎牛血清,石安静[1983]用 1640 培养基 50 mL 加入 0.3% 水解乳蛋白 30 mL 和小牛血清 20 mL 培养河蚌外套膜。在鲍培养中,作者选用效果较好的 Eagle's MEM 合成培养基并补充氯化钠和胰岛素。一定浓度的氯化钠是为满足海产动物渗透压的需要[Thomas 1984],胰岛素在哺乳动物细胞培养中得到应用[陈瑞铭 1991],在贝类细胞中作为生长因子仍有促进细胞分裂的作用。

2.3 不同器官组织的培养情况

本实验体外培养了鲍的外套膜、鳃、肌肉、肝胰腺和鳃下腺。外套膜和鳃在原代基础上又传代培养,肌肉组织仅原代培养,肝胰腺和鳃下腺没有成功(表 2)。

表 2 5 种鲍组织培养的结果

Table 2 The results of five kinds of tissues from abalone

组织	培养批次	培养所得细胞系		细胞贴壁与否	细胞形态
		原代细胞	传代细胞		
外套膜	14	20	14	+	上皮样细胞
鳃	14	19	19	—	圆形细胞
肌肉	10	4	0	+	纤维样细胞
肝胰腺	4	0	0	—	圆形细胞
鳃下腺	4	0	0	+	上皮样细胞

2.3.1 外套膜

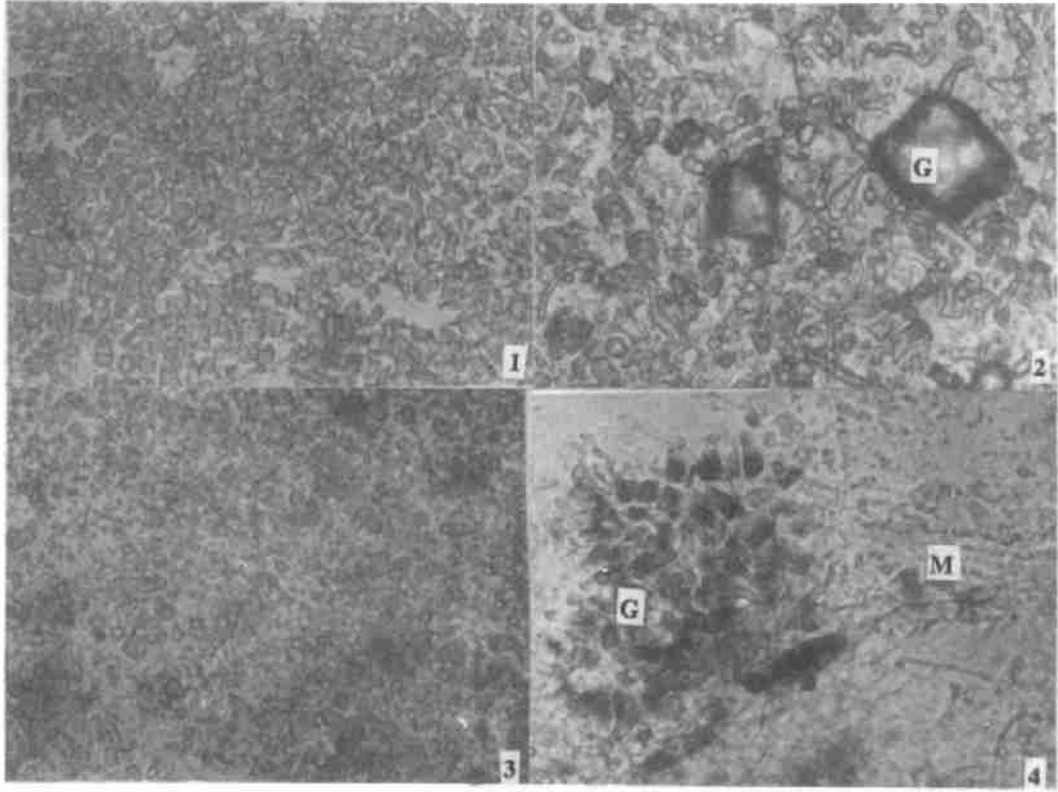
细胞从组织块迁移出来后,大多数为上皮样,贴壁,个别为圆形,可以看到为数不多的有丝分裂现象。李霞[1993a,1993b]曾观察鲍外套膜的显微和超微结构,发现其表皮为单层柱状上皮,而结缔组织细胞是圆形,体外培养的细胞系中,基本上由这两类细胞组成(图版-1)。在 4~8 月,细胞长成原代的时间为 10 d,传代间隔时间为 15~20 d。传代后,细胞呈半悬浮状态,轻轻晃动就可浮起。传代培养至 10 代,细胞分裂速度减慢,不再生长。在原代和传代培养过程中,都可见到多角形的茶褐色的结晶物(图版-2),马氏珠母贝[町井昭等 1986]和河蚌[石安静 1983]与之情形相似,说明外套膜细胞在该环境中仍有旺盛的分泌功能。

2.3.2 鳃

鳃细胞从组织块迁出时即成悬浮状态,圆形,直径为 4~5 μm ,细胞增殖速度很快,常常粘附在一起(图版-3),传到 11 代,细胞生长速度减慢,直至停止。在已有报道贝类细胞培养成功的例子中,采用鳃组织培养较多[Derikot 和 Blinova 1982,Chen 1988],从鲍的情形看,鳃组织也极易增殖,但因为鳃丝结构复杂,彻底除菌较难,往往不易培养成功。

2.3.3 足部肌肉

肌纤维贴壁生长,明暗带清晰可见。足腺细胞呈多角形,一端有大量的色素沉积,肌细胞长成原代时间约为3~4个月,用胰酶—EDTA消化传代后即脱落死亡(图版-4)。



图版 Plate

1. 外套膜上皮样细胞, $\times 400$; 2. 外套膜细胞分泌的结晶体(G), $\times 400$;
3. 传代培养的鳃细胞, $\times 400$; 4. 肌纤维(M)和足腺细胞(G), $\times 400$

2.4 细胞生长速度

在5月选择1~4龄鲍,用外套膜实验发现个体越小,细胞生长越快,1龄鲍长满单层仅需10 d,2~3龄鲍需20 d,4龄鲍则需25 d以上。另外,季节对鲍细胞生长也有影响,春季较易培养成功,秋季较难,1龄鲍需70~80 d才能长成单层,而冬季细胞几乎是不生长,这与河蚌[石安静 1983]培养中得到的结论相似,也与自然海水中鲍的生长情况相吻合,这可能与激素调节有关,其机理尚待进一步研究。

3 结论

用1%洗必泰和双抗(4 000 IU青霉素,5 000 IU链霉素)1:1混合浸泡供培养组织30 min后,用维持液反复冲洗,消毒效果较好。

用Eagle's并补充一定量的氯化钠做为海产贝类细胞培养基的基本成分。

外套膜细胞传代培养较鳃细胞稳定,并有旺盛的分泌功能,鳃细胞生长较快。

个体越小,细胞生长越快,且细胞在春季比秋季生长快,冬季几乎不生长。

本研究为农业部青年基金资助课题,编号:渔85-91-青-05。

参 考 文 献

- 石安静.1983.河蚌外套膜的组织培养.水产学报,7(2):153~157.
- 李霞.1993a.皱纹盘鲍外套膜的组织学研究.大连水产学院学报,7(4):43~48.
- 李霞.1993b.皱纹盘鲍外套膜的超微结构观察.大连水产学院学报,8(1):15~20.
- 陈瑞铭主编.1991.动物组织培养技术及其应用.北京:科学出版社.83~84.
- 町井昭等.1986.组织培养研究.(5):119~121.
- Chen S.1988. Establishment, characterization and application of cell culture from marine fish, crustacean and molluscs. First International Symposium on Marine Molecular Biology. Baltimore, Maryland.
- Derikot I V, Blinova M I.1982. In vitro culture of somatic cells of marine molluscs and echinoderms (methodology). Biol Morya,(1):59~61.
- Fyhn U E.1975. Tissue culture of cirripeds. Bio Bull,149:316~330.
- Hetrick F M.1981. Attempts to develop a marine molluscan cell line. College Park. MD UNIV SEA GRANT PROGRAM, 88.
- Thomas C C.1984. Comparison of the efficacy of two maintenance media for gonads of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: gastropoda). Trans Am. Microsc Soc,103(3):249~262.