

文章编号:1000 - 0615(2001)01 - 0011 - 05

牙鲆鳃细胞与中国对虾淋巴细胞 杂交细胞的体外培养

樊廷俊, 史振平

(青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用 PEG 介导的细胞融合方法, 将已成系的牙鲆鳃细胞与中国对虾淋巴细胞进行细胞杂交, 对所获得的杂交细胞用 MEM MPS (1:1) 混合培养液进行体外培养。培养 5 天后发现, 杂交细胞长成了单层, 传代培养后仍可继续生长和分裂。通过逐渐提高混合培养液中 MPS 的所占比例所筛选出的杂交细胞, 目前已传 12 代, 生长和分裂势头仍然十分旺盛。通过接种对虾杆状病毒发现, 10 天后杂交细胞出现了明显的病变特征(细胞收缩变圆、脱落、死亡), 至 14 天细胞便几乎完全脱壁死亡。取病变细胞的培养上清 0.3 mL 再加入一瓶已长成单层的杂交细胞中, 结果 5 天后杂交细胞也出现了明显的病变特征, 而未接种病毒的对照组杂交细胞生长正常。可初步认为我们所得到的杂交细胞确为对虾(杆状)病毒的靶细胞。

关键词: 牙鲆; 中国对虾; 杂交细胞; 体外培养

中图分类号: Q32; S917 **文献标识码:** A

In vitro culture of hybrid cells derived from flounder gill cells and shrimp lymphocytes

FAN Ting-jun, SHI Zhen-ping

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The hybrid cells produced by PEG-mediated cell fusion method with gill cells from flounder, *Paralichthys olivaceus*, and lymphocytes from shrimp, *Penaeus chinensis*, were cultured in mixed medium of MEM MPS (1:1). After 5 days culture and observation, it was found that the hybrid cells cultured in the mixed medium of MEM MPS (1:1) grew into monolayer and with good growing and proliferating appearance. As the concentration of MPS in the mixed medium was raised gradually, ideal hybrid cells had been screened out. By now, the obtained hybrid cells have been subcultured for 12 generations and still had very good growing and dividing appearance. Hybridoma cells acquired obvious disease appearance such as, the cell contracted to round, disattachment and death, after inoculation with white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp for 10 days, and died almost completely at the 14th day after inoculation. After 0.3 mL culture supernatants of the cells with obvious disease appearance added into a new monolayer of normal hybrid cells, the hybrid cells acquired obvious disease appearance 5 days later, while the control cells still with normal appearance. It can be concluded that the hybrid cells obtained in this study are probably the target cells of shrimp viruses.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Penaeus chinensis*; hybrid cell; in vitro culture

收稿日期:2000-04-19

资助项目:国家海洋 863 攻关项目(819-04-04)

第一作者:樊廷俊(1964-),男,山东单县人,副教授,博士,主要从事海洋经济动物细胞工程学研究。

对虾是最具有经济价值的海洋无脊椎动物之一,其养殖业也为人类带来了巨大的经济效益。但近年来,对虾爆发性流行病给养殖业造成了莫大的经济损失。自 1974 年 Couch 首次报道了对虾的病毒病以来^[1,2],已相继发现了近 20 多种对虾病毒病。对虾病毒病给养殖业造成了巨大的经济损失,因此,研究病毒病和检测对虾病毒病已成为当务之急,而细胞培养则是研究和检测对虾病毒病的重要手段。在对虾养殖历史长、对虾病毒病爆发早的台湾,陈秀男最先开始了对虾细胞培养的研究工作^[3,4]。到目前为止,学者们已对斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[3,4]、南美白对虾(*P. vannamei*)^[5,6]、长毛对虾(*P. penicillatus*)^[7]、短沟对虾(*P. semisulcatus*)^[7]、东方对虾(*P. orientalis*)^[8]、红额角对虾(*P. stylirostris*)^[6]和中国对虾(*P. chinensis*)^[9-11]等多种对虾的细胞培养进行了研究。

对虾细胞培养与其它海洋无脊椎动物细胞培养一样,都面临着细胞传代难和不能转化等问题。Tapay 等^[12]曾利用 SV40 的肿瘤(T)抗原基因对红额角对虾类淋巴组织的细胞进行了转化实验,成功地获得了对虾的传代细胞,且对虾细胞具有典型的转化特征,但没有细胞建系的有关报道。如能成功地建立起对虾的永久性细胞系,不仅在对虾病毒和对虾病毒病的理论研究上具有重要的科学价值,而且在对虾病毒病的诊断和治疗上也具有重大的应用价值,特别是对虾病毒单克隆抗体,在对虾病毒病的诊断甚至治疗中都具有极大的应用潜力。一旦攻克对虾病毒病,将会使对虾养殖业起死回生,为社会创造出巨大的经济效益。但到目前为止,仍没能建立起一株对虾连续性细胞系。因此,使利用细胞繁殖病毒遇到了很大障碍。本研究旨在通过利用已成系的牙鲆鳃细胞系与中国对虾淋巴细胞进行细胞杂交,来探索建立对虾连续性细胞系的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

已传 173 代的牙鲆鳃细胞系(FG)细胞,由张士瑾教授提供。

海捕的活中国对虾购自青岛市即墨温泉镇。

对虾杆状病毒,由汪岷博士提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的制备

将海捕的中国对虾于消毒海水(青霉素 1 000 IU·mL⁻¹,链霉素 1 000 g·mL⁻¹)中饲养 6h 左右,在 70%酒精中浸泡数分钟后,无菌取出其淋巴组织,于无血清 MPS 培养液中剪碎,静置 3 min 后用吸管轻轻取出组织碎块上方的细胞悬液,800 r·min⁻¹离心 5min,弃上清后重新悬浮于无血清 MPS 培养液中,同样条件下再离心清洗 3 次,计数后备用。

用吸管吹下处于对数生长期的牙鲆鳃细胞系的细胞,收集细胞悬液,离心(800r·min⁻¹,5min)收集细胞,同样条件下再用无血清 MEM 培养液离心清洗 3 次,计数后备用。

1.2.2 细胞融合

取固体聚乙二醇(PEG)(分子量 4 000 D)于 10mL 玻璃离心管中,高压灭菌后用无血清 MEM MPS (1:1)混合培养液将其配制成 50%的 PEG 溶液,置于 30℃水浴中预热备用;将 FG 细胞和对虾淋巴细胞按照 1:(6~8)的比例混合,离心去除上清液后,轻弹离心管底部使细胞团疏松,预热至 30℃备用;将 1mL 的 PEG(50%)溶液在 45sec 内匀速加入到含有混合细胞的离心管中,然后再将 8mL MEM MPS (1:1)混合培养液在 1min 内加速加入到离心管中,室温放置 5min 后,离心去除 PEG,将杂交细胞分别用含有 20%血清的 MPS 培养液、MEM 培养液和 MEM MPS (1:1)混合培养液于 20℃进行培养;每天进行观察,待细胞长成单层后进行传代培养。

1.2.3 杂交细胞的病毒侵染实验

取 0.3mL 抽滤除菌的对虾杆状病毒(WSSV)液加入到长成单层的杂交细胞的培养液(10%FCS)中,

每天进行观察。待细胞出现病变后,再取 0.3mL 培养液接种到正常的杂交细胞中,以观察细胞的生长与分裂情况。

2 结果

2.1 杂交细胞的筛选

利用 50% PEG 介导 FG 细胞和对虾淋巴细胞融合后,获得了大量的杂交细胞,融合率高达 70%。通过利用不同培养液进行培养,对杂交细胞进行了筛选,结果如下:

培养在 MPS 培养液中的杂交细胞混合物,3 d 后有较多的细胞存活,部分细胞还便能进行分裂,7 d 后可长成单层,但无法进行传代培养。

培养在 MEM 培养液中的杂交细胞混合物,3 d 后也有部分细胞存活,但随着培养时间的延长,细胞便逐渐分裂而长成单层,传代培养后仍能生长和分裂,经鉴定为 FG 细胞。

培养在“1/2MEM + 1/2MPS”培养液中的杂交细胞,3 d 后仍有大量细胞存活,培养至第 5 天,细胞便长成单层(图版 - 1),传代培养后逐渐提高混合培养液中 MPS 的比例,直至完全的 MPS 培养液,发现部分杂交细胞仍可继续生长和分裂。到目前为止,筛选出的该杂交细胞已传 12 代,生长和分裂势头仍然十分旺盛(图版 - 2)。

2.2 杂交细胞的形态特征

对已传 12 代的杂交细胞经固定、包埋、切片后,进行了电镜观察。发现杂交细胞具有部分瘤细胞的特征,如核较大、胞浆丰富、糙面内质网不甚发达、胞浆中游离核糖体较多且多成簇存在、线粒体数目较多等(图版 - 3)。

2.3 对虾杆状病毒的接种

在接种对虾杆状病毒(WSSV) 10 d 后,所筛选出的杂交细胞便出现明显的病变特征(细胞收缩、变圆、脱落、死亡),至 14 d 细胞几乎完全脱壁死亡(图版 - 4);而接种到 FG 细胞培养物中,未发现任何病变特征(图版 - 5)。取病变细胞的培养上清 0.3mL 再加入到一瓶已长成单层的杂交细胞中,结果 5 d 后杂交细胞也出现了明显的病变特征(图版 - 6),而未接种病毒的对照组杂交细胞生长正常。

3 讨论

自童裳亮^[10]首次成功地进行了中国对虾淋巴细胞的原代培养以来,中国对虾的细胞培养和建系研究越来越受到学者们的广泛关注。中国对虾的细胞培养与其它对虾一样,都面临着细胞传代难和不易转化等问题。各国学者也从各种角度探索了对虾细胞的建系方法,但至今仍未见成功的报道。为了探索对虾连续性细胞系的建系途径,本研究利用已成系的牙鲆鳃细胞与中国对虾淋巴细胞进行杂交,可能获得存活的杂交细胞。

将 FG 细胞同中国对虾的淋巴细胞杂交后,所得细胞混合物中有 5 种细胞类型:FG 细胞与淋巴细胞的杂交细胞、FG 细胞的自我融合细胞、淋巴细胞的自我融合细胞以及未融合的 FG 细胞和淋巴细胞,其中仅 FG 细胞与淋巴细胞的杂交细胞是本实验所需要的。为了分离出该类细胞,本文使用了三种细胞培养液:MEM、MPS 和“1/2MEM + 1/2MPS”。由于在体外培养中 FG 细胞与淋巴细胞的渗透压差别显著,故在 MEM 培养液中,未融合的淋巴细胞及淋巴细胞的自我融合细胞无法存活;在 MPS 培养液中,未融合的 FG 细胞及 FG 细胞的自我融合细胞无法存活,未融合的淋巴细胞及淋巴细胞的自我融合细胞虽能存活,但无法传代培养。而在“1/2MEM + 1/2MPS”培养液中,尽管各种细胞类型均可能存活,但未融合的淋巴细胞及淋巴细胞的自我融合细胞因无法传代而在传代时被遗弃;未融合的 FG 细胞及 FG 细胞的自我融合细胞虽能存活,但随着 MPS 所占比例的逐渐提高而死亡,剩下的只有 FG 细胞与淋巴细胞的杂交

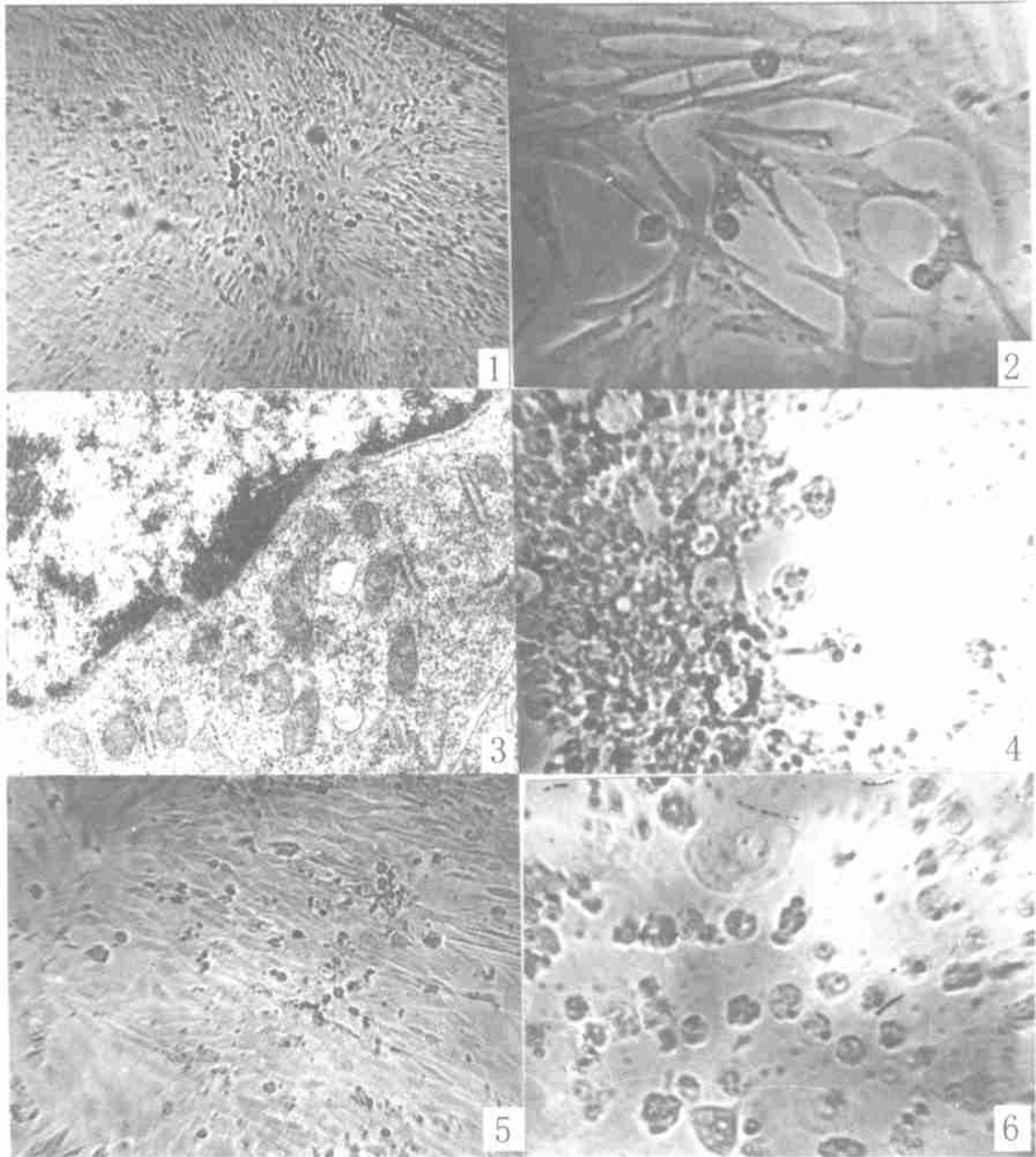
细胞。由此可见,培养在“1/2MEM + 1/2MPS”培养液中的杂交细胞混合物,经逐渐提高混合培养液中 MPS 的比例所剩下的存活杂交细胞,即为 FG 细胞与淋巴细胞的杂交细胞。到目前为止,所筛出的杂交细胞已传至 12 代。

已传 12 代的杂交细胞的超微结构具有部分瘤细胞的特征,如核较大、胞浆丰富、糙面内质网不甚发达、胞浆中游离核糖体较多且多成簇存在、线粒体数目较多等,表明所得杂交细胞具备了快速增殖的结构特点。为了确定所筛出的杂交细胞是否为对虾病毒的靶细胞,本文还对长成单层的杂交细胞接种了对虾杆状病毒(WSSV),发现 10d 后杂交细胞出现了收缩变圆、脱落、死亡等明显的病变特征,至 14d 细胞便几乎完全脱壁死亡。取病变细胞的培养上清 0.3mL 再加入到另一瓶长成单层的杂交细胞中,结果 5d 后杂交细胞也出现了明显的病变特征。而将 WSSV 接种到 FG 细胞培养物中,却未发现任何病变特征,因此可初步认为本文所得杂交细胞确为对虾(杆状)病毒的靶细胞。

目前,该杂交细胞还在进一步的培养、传代与观察中,能否通过细胞杂交的方法建立对虾连续性细胞系,还有待于进一步的观察和探索。但无论如何,本研究的实验结果将为对虾连续性细胞系的建立提供一条新的研究思路。如能对对虾等海洋无脊椎动物的细胞培养有所裨益,便是作者们的最大愿望。

参考文献:

- [1] Couch J A. 1974. Free and occluded virus, similar to Baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp[J]. Nature, 247:229 - 231.
- [2] Couch J A. 1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence and enhancement[J]. J Invertebrate Pathol, 24:311 - 331.
- [3] Chen S N, Chi S C, Kou G H, et al. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*[J]. Fish Pathol, 1986, 21(3):161 - 166.
- [4] Chen S N, Kou G H. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodortype baculovirus (MBV) [J]. J Fish Dis, 1989, 12:73 - 76.
- [5] Ellender R D, Middlebrooks B L, McGuire A. Evaluation of various growth enhancement factors, media formulations, and support matrices for development of primary and established cell lines from *Penaeus hepatopancreas* [A]. U. S. marine farming program final report [C]. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C. 1988, 1:167.
- [6] Luedeman R A, Lightner D V. Development of an *in vitro* primary cell culture system from the Penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* [J]. Aquac, 1992, 101:205 - 211.
- [7] Rosenthal J, Diamant A. *In vitro* primary cell cultures from *Penaeus semisulcatus* [A]. Perkins F O, Cheng T C, eds: Pathology in Marine Science [M]. New York: Academic Press Inc, 1990. 7 - 13.
- [8] Hu K. Studies on a cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus shrimp*, *Penaeus orientalis* Kishinouye [J]. Asian Fisheries Science, 1990, 2:299 - 307.
- [9] 胡珂, 王立平, 段爱梅. 中国对虾的组织培养[J]. 水产学报, 1991, 15(4):328 - 331.
- [10] 童裳亮. 海洋动物的细胞培养与应用[J]. 生物工程进展, 1994, 14(6):47 - 48.
- [11] Tong S L, Miao H Z. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues [J]. Aquac, 1996, 147:151 - 157.
- [12] Tapay L M, Lu Y A, Brock J A, et al. Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (oka) organ with Simian virus-40 (T) antigen (43880) [J]. The Society for Experimental Biology and Medicine. 1995, 209:73 - 78.



图版 Plate

1. 培养 5 天后, 杂交细胞近长成单层, $\times 100$; 2. 传至第 12 代的杂交细胞, $\times 400$; 3. 杂交细胞的超微结构, $\times 40\ 000$, 核较大、胞浆丰富、糙面内质网不甚发达、胞浆中游离核糖体较多且多成簇存在、线粒体数目较多; 4. 接种 WSSV 后的杂交细胞, $\times 400$, 培养 10d 后便出现明显的病变特征; 5. 接种对虾杆状病毒的 FG 细胞, $\times 400$, 培养 10d 后细胞形态仍然正常; 6. 接种病变细胞培养上清后的杂交细胞, $\times 400$, 培养 5d 后也出现明显的病变特征。