

文章编号: 1000-0615(2018)10-1626-09

DOI: 10.11964/jfc.20170810942

## 鳊胚胎细胞系的建立与应用

陈晓武<sup>1,2,3</sup>, 申亚伟<sup>1</sup>, 赵金良<sup>1,2,3\*</sup>, 吴明林<sup>4</sup>

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验科教示范中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;

4. 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 为更好地开展鳊基因功能研究和药物筛选工作, 提高基因转染效率, 本研究以鳊囊胚期胚胎为材料, 采用含有20%胎牛血清的DMEM培养基进行培养, 建立了生长稳定的鳊胚胎细胞系MFE。在此基础上, 采用绿色荧光蛋白(GFP)作为标记物, 在HEK293T细胞中体外包装逆转录病毒, 再感染MFE细胞系。MTT法分析表明传代后细胞培养96 h内, 细胞生长率变化也经历增殖、降低到达稳定期。而且MFE细胞能稳定表达GFP基因, 感染效率为20%±5%, 而脂质体转染效率为3%±2%。可见包装病毒感染细胞不仅能获得稳转细胞系, 效率也远高于脂质体瞬时转染。荧光定量PCR分析表明, MFE细胞系能表达*Irf1*、*Irf3*和*Irf7*基因, *Irf1*基因表达量最高。MFE细胞系受到poly I:C刺激后, *Irf1*、*Irf3*和*Irf7*的表达量分别升高3.5、2.3和2.1倍。因此, MFE细胞通过病毒感染可以获得较高的转染效率, 该细胞可作为鳊免疫相关基因功能研究的工具。

**关键词:** 鳊; 细胞培养; 逆转录病毒; 干扰素调节因子

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

鳊(*Siniperca chuatsi*)主要分布在中国, 生长速率快、养殖范围广、价格高。国内对鳊的种质<sup>[1]</sup>、生长<sup>[2-3]</sup>、遗传<sup>[4]</sup>、营养<sup>[5]</sup>研究较多。随着鳊人工养殖规模的增加, 病毒性、细菌性和寄生虫病也越来越严重, 因此, 鳊病理学和免疫学基础研究需要深入开展。

细胞系是生物学基础研究的重要工具, 稳定的细胞系能用于药物筛选、转基因、基因功能、疾病发生机理、疫苗等研究<sup>[6]</sup>。鱼类细胞培养研究已有60年的历史<sup>[7]</sup>。迄今为止, 人们已经建立200多种鱼类细胞系, 而且发展速度越来越快<sup>[8]</sup>。然而, 鳊细胞系种类不多, 目前报道的鳊细胞仅有3种: 鳊稚鱼MFF-1细胞系易于被脾肾坏死性病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染; MFF-8C1细胞系被用于细胞

肿大病毒感染研究<sup>[9-10]</sup>; 利用L15培养基能成功培养出鳊脑细胞<sup>[11]</sup>。这些细胞主要用于病毒的研究。转基因是研究基因功能的有效方法, 在鱼类体内转基因可以通过显微注射方法<sup>[12]</sup>, 在细胞系中, 转基因可以通过化学、电转和病毒载体介导的方法进行。其中逆转录病毒被广泛应用, 它能随着细胞分裂整合到基因组中而表达外源基因<sup>[13]</sup>。

胚胎细胞生长旺盛、分裂快, 是细胞培养很好的材料, 和其他组织一样, 胚胎期细胞基因表达有一定的规律。斑马鱼(*Danio rerio*)早期受精卵基因组没有激活, 而外包期以后胚胎的基因表达谱和前期有较大差异, 说明受精卵基因组已经激活<sup>[14]</sup>。体外培养鱼类胚胎细胞基因表达谱有何变化尚需探讨。干扰素调节因子(in-

收稿日期: 2017-08-29 修回日期: 2017-09-30

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 安徽省农业科学院人才发展基金(16F0505); 安徽省自然科学基金(1808085QC81)

通信作者: 赵金良, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

terferon regulatory factors, IRF)是一类转录因子, 能通过与干扰素(*Ifn*)基因启动子的结合, 刺激*Ifn*以及调节干扰素刺激基因的表达<sup>[15]</sup>。IRF除了主要参与抵抗病毒侵染和免疫应答反应外, 在干细胞发育和分化、细胞成长和细胞凋亡调控、细胞因子传导以及肿瘤发生调控中都发挥关键作用。IRF家族成员很多, 已经在哺乳动物当中发现并确认了IRF家族的9种成员, 包括IRF1、IRF2、IRF3、IRF4、IRF5、IRF6、IRF7、IRF8和IRF9<sup>[16-17]</sup>, 其中, 鱼类IRF3和哺乳动物功能类似, 能促进*Ifn*的表达<sup>[18]</sup>。研究表明, 多个*Irf*基因在斑马鱼胚胎期开始表达, 可能参与发育或免疫<sup>[14]</sup>。本研究旨在建立一种稳定的胚胎细胞系, 探讨细胞转基因的方法, 同时对体外胚胎细胞中*Irf*基因的表达规律进行初步分析, 为鳊胚胎细胞系的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鳊胚胎取自上海浦东新区孙农水产养殖场。细胞培养基DMEM(高糖)、MEM(Thermo Fisher, 美国)按常规方法配制, 7.5% NaHCO<sub>3</sub>调节pH至7.0~7.2, 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, 4 °C冷藏备用; 用PBS缓冲液配制0.25% Trypsin (Amerisco, 美国)作为组织消化液, 调节pH至7.0~7.2, 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, -20 °C冷冻备用。含pLegfp骨架质粒及包装质粒pAdvantage、pVSV-G和pGag-pol质粒菌种分别接种于液体LB培养基中, 37 °C、200 r/min培养过夜。按照产品说明书进行质粒的中提及纯化, 测定浓度后于-20 °C保存, 备用。pLegfp购自美国Clontech公司, pAdvantage、pVSV-G和pGag-pol质粒由湖北工业大学张雷博士馈赠。

### 1.2 胚胎细胞分离方法

鳊受精卵于23 °C流水中孵化, 解剖镜连续观察, 取囊胚期胚胎100个, 无菌水清洗, 70%酒精浸泡灭菌1 min, PBS缓冲液冲洗干净, 在无菌操作台中用小镊子剥去卵壳, 把胚胎集中到一起尽量少附带卵黄。小剪刀剪碎胚胎后, 用移液器轻轻冲散, 形成细胞块和单细胞。PBS缓冲液清洗后, 转移到培养皿中, 加DMEM培养液, 添加20 mmol HEPES缓冲液, pH 7.5, 双抗(penicillin, 100 U/mL streptomycin, 100 μg/mL)

(Thermo Fisher, 美国), 胎牛血清(20%) (Thermo Fisher, 美国), 成纤维生长因子(bFGF, 2 ng/mL) (Thermo Fisher, 美国), 26 °C培养箱培养, 根据培养密度, 观察生长情况, 5 d换1次培养基。细胞长至培养皿底部95%后, 采用0.25%胰酶消化, 一分为二进行传代。待传到第20代时, 收集生长稳定的细胞, 备做包装病毒转染实验。

采用四唑蓝比色(MTT)法测定第20代细胞的增殖能力, 将100 μL细胞悬液接种于96孔细胞培养板, 接种浓度为 $2 \times 10^5$  个/mL, 取10个平行孔, 每隔24 h换液100 μL, 加入50 μL  $1 \times$  MTT溶液, 继续培养4 h, 小心吸出上清液, 参照南京建成生物工程研究所MTT细胞增殖检测试剂盒说明书测定570 nm波长下吸光值。

### 1.3 逆转录病毒包装与MFE细胞感染

将HEK293T细胞铺于10 cm培养皿中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养。待细胞长满培养皿80%, 胰酶消化成单细胞悬液进行电转<sup>[19]</sup>。400 μL混合液包括 $10^7$ 细胞和15 μg混合质粒(1.7 μg pAdvantage、2.6 μg pVSV-G、4 μg pGag-pol、6.7 μg pLegfp), 110 V, 25 ms在Easyject electroporater(Bio-Rad, 美国)上完成。电转后的细胞于冰上孵育15 min, 2 000 r/min离心5 min, DMEM培养基悬浮后, 继续培养48 h, 收集细胞上清液, 上清液经0.45 μm滤膜过滤后, 20 000 r/min、4 °C离心150 min, 弃上清液, 用100 μL的DMEM培养基重悬逆转录病毒颗粒, 于-80 °C保存。逆转录病毒半数组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)测定方法: 在96孔板中接种293T细胞, 培养过夜, 用细胞培养基稀释逆转录病毒颗粒, 10倍稀释成7个浓度( $10^{-1}$ 至 $10^{-7}$ ), 除去原有的培养基, 每孔加100 μL病毒稀释液, 每孔3个重复, 同时做不加病毒的8个重复孔做阴性对照组。3 d后开始观察GFP荧光, 记录每个稀释样本中发出GFP荧光的样品孔数, Reed-Muench法计算病毒滴度。

感染MFE细胞时, 为避免过高滴度病毒对MFE细胞的影响, 经过预实验, 确定采用 $1.6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL的病毒感染MFE细胞。后续实验取病毒液到60 mm培养皿中。对照组添加6.7 μg pLegfp质粒, 采用脂质体包装后进行细胞转染, 每组各5个平行。脂质体转染组在48 h后对发光的细胞进行计数, 病毒转染组在第5天计数。每板细胞随机取5个视野, 在40倍物镜下利用尼康Ti-

E系统软件统计荧光细胞和总细胞数比值。病毒包装和细胞转染流程见图1。

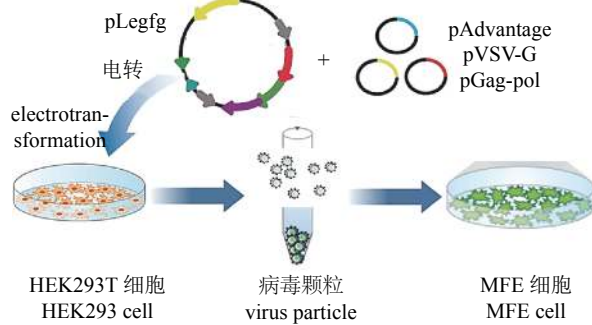


图1 病毒包装和转染流程

Fig. 1 Schematic for retroviral packaging and cell transfection

#### 1.4 荧光定量PCR (qRT-PCR)检测

qRT-PCR设置2个组, 每组3个培养皿的细胞。实验组使用poly I:C (终浓度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理细胞, 对照组添加等量PBS缓冲液。处理24 h后采用Trizol法提取总RNA。Nanodrop 2000测定总RNA浓度, 同时电泳检测RNA完整性。cDNA反转录使用TaKaRa公司缓冲液反转试剂盒(编号: DRR047A)。IRF3引物序列如下, IRF3qs: CCC-TCCGAGCCAAAGGTTTC; IRF3qa: AGCCTGCG-GTGTCCTCTGTT。IRF1和IRF7引物参考文献<sup>[20]</sup>(IRF1qs: GACATTATCCAGATTTGCCAGC和IRF1qa: GTCTGTGGGAATTGTGAGGTC; 7qs: GTAGTGAAGGTGGTCCCTCTGAT和IRF7qs: AGAGGCTGTTGTGTGAGATCTGT)。 $\beta$ -actin作为内参基因, 引物为actin-qs: ATCGTGGGGCGC-

CCCAGGCACC, actin-qa: CTCCTTAATGT-CACGCACGATTTTC。20  $\mu\text{L}$  PCR反应液其中包括2  $\mu\text{L}$  cDNA模板, 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Roche SYBR Master Mix, 正反向混合引物共0.8  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )和7.2  $\mu\text{L}$  双蒸水。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  34 s, 40个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算出每一个样本基因的相对表达量。

## 2 结果

### 2.1 鳃细胞原代培养

鳃囊胚期胚胎动物极细胞团呈半球形, 大小随胚胎发育时间有差异, 后期会变矮, 开始覆盖在卵黄顶端(图2-a)。分散胚胎细胞团后, 接种培养, 细胞呈圆形、透明, 并含有少量细胞块, 培养基中还有卵黄颗粒。培养3 d后, 少量细胞贴壁生长, 细胞呈现多种形态。继续培养, 可观察到细胞形态多样, 呈梭形、多边形, 细胞培养5 d后换液去除未贴壁细胞和卵黄颗粒, 培养至第6天, 细胞开始生长, 逐渐汇合, 开始生长成片, 细胞形状多样, 以纤维型为主(图2-b)。到原代细胞铺满培养皿底部80%开始传代, 首次按照1:1比例传代。待细胞生长稳定后按照1:2或1:3比例传代。第15代后, 4~5 d即可传代, 形成比较稳定的细胞系, 命名为MFE细胞系。

### 2.2 MFE细胞增殖率测定

MTT法测定不同培养时间MFE细胞增殖率的变化结果显示, 570 nm处吸光度总体上呈现先

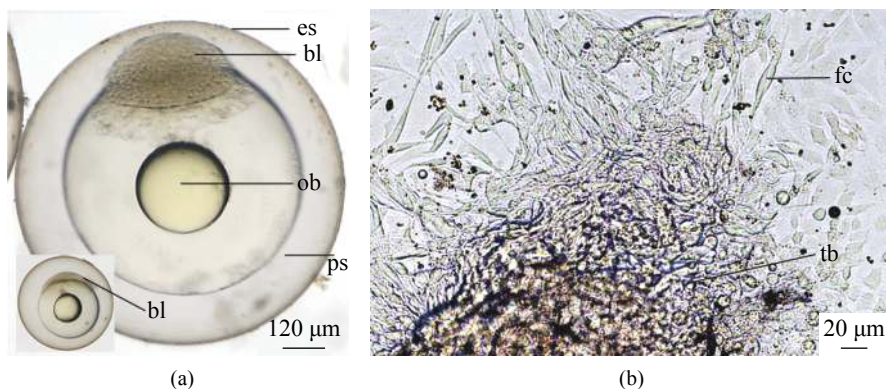


图2 鳃囊胚期胚胎和细胞原代培养

(a) 鳃囊胚期胚胎, (b) 胚胎细胞块和游离的细胞; bl. 囊胚, es. 卵壳, ob. 油球, ps. 卵周隙, fc. 游离细胞, tb. 细胞块

Fig. 2 Blastula stage embryo and embryo cell separation of *S. chuatsi*

(a) blastula stage embryo, (b) embryo cell mass and free cell; bl. blastula embryo, es. egg shell, ob. oil ball, ps. perivitelline space, fc. free cells, tb. tissue mass

升高后降低并趋于稳定的趋势, 24~72 h吸光度持续显著增加( $P<0.05$ ), 在72 h达到峰值后显著下降( $P<0.05$ ), 96 h后吸光度趋于稳定 (图3)。结果说明细胞生长率变化也经历增殖、降低到达稳定期。

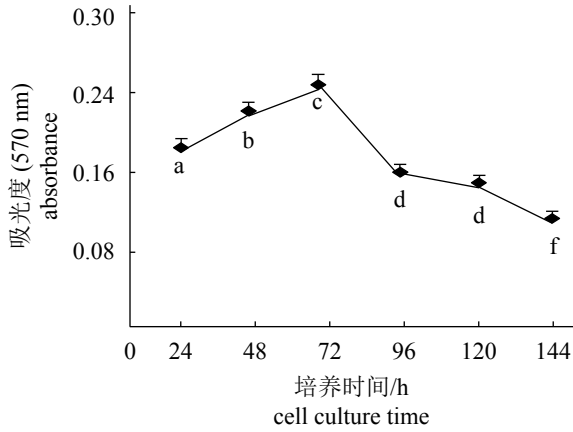


图3 MTT法测定细胞生长速率

每组实验设3个重复, 显示标准差; 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 3 Growth curves of MFE cell line

The mean of three duplicates and the standard deviations are shown; values with different letters superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ )

### 2.3 MFE细胞病毒感染和脂质体转染比较

MFE细胞传到20代时, 采用GFP基因作为标记进行转基因, 病毒载体表达GFP在第5天观察效果最好, 绿色细胞阳性率为 $20\% \pm 5\%$ (图4-a, c)。脂质体转染属于瞬时转染, 表达载体在细胞质中进行转录和翻译, 随分裂细胞内的浓度越来越低, 所以GFP的表达很快变弱, 不能形成稳定的细胞系, 转染后48 h进行计数, GFP阳性率为 $3\% \pm 2\%$ (图4-b, d)。

### 2.4 Irf基因的表达

qRT-PCR检测*Irf1*、*Irf3*和*Irf7*的表达, 结果表明*Irf1*表达量最高, 分别为*Irf3*和*Irf7*的18倍和2.5倍。Poly I:C处理MFE细胞后, *Irf1*、*Irf3*和*Irf7*的表达量分别升高3.5、2.3和2.1倍(图5)。

## 3 讨论

鱼类细胞培养的研究始于20世纪60年代, Wolf等<sup>[7]</sup>建立了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系RTG-2。此后, 鱼类细胞系的建立及其相关研究进展迅速。迄今为止, 已报道有200多株来自不同鱼类组织的细胞系, 鱼类细胞培养已成

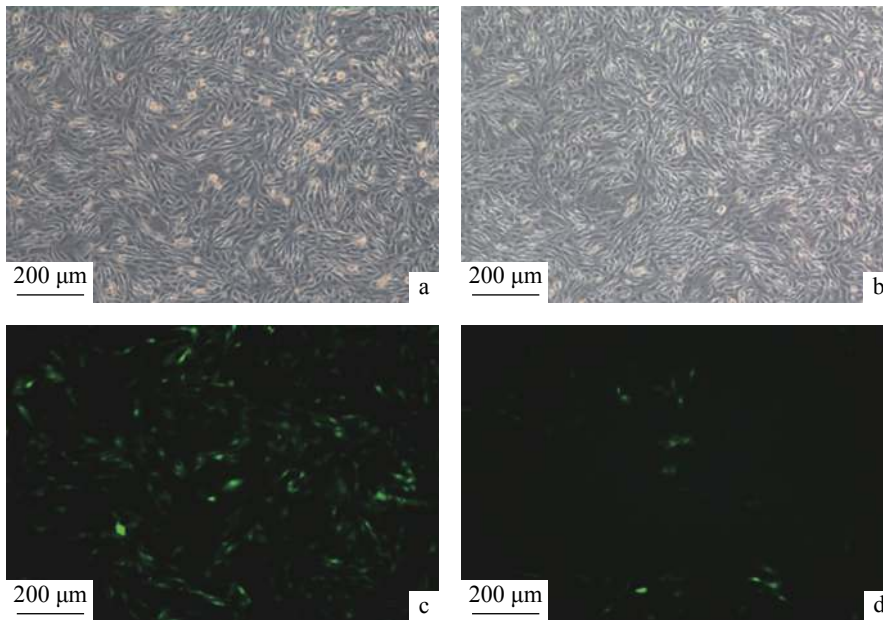


图4 MFE细胞系和GFP基因转染

(a) (c)明场和荧光显微镜下携带GFP基因的包装病毒感染MFE细胞; (b) (d)明场和荧光显微镜下携带GFP基因的脂质体转染MFE细胞

Fig. 4 MFE cells and GFP gene transfection

(a) (c) GFP gene infection by retroviral packaging under bright-field and fluorescence microscope; (b) (d) GFP gene transfection by liposome under bright-field and fluorescence microscope

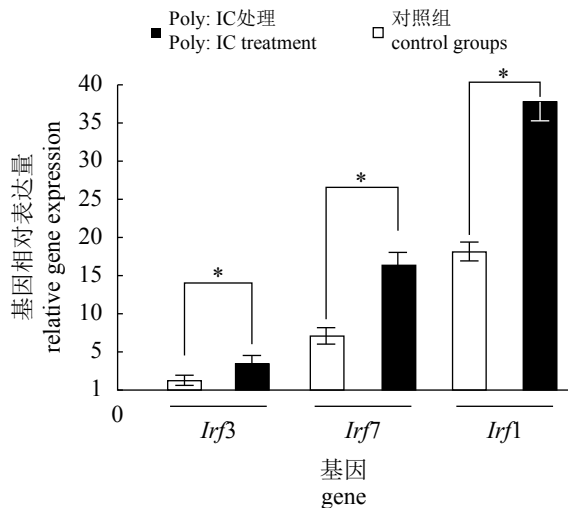


图5 Poly I:C刺激MFE细胞后Irf基因表达变化

Irf基因表达量计算以 $\beta$ -actin作为内标, 每组3个平行, 每组计算mean $\pm$ SE; \*表示 $P < 0.05$

Fig. 5 Transcriptional level variation of Irf after poly I:C stimulation

The expression of Irf is calculated relatively to the gene  $\beta$ -actin, values are the mean $\pm$ SE, the quantitative PCR value was averaged from three duplicates, each of which contained 3 groups; \* $P < 0.05$

为一项重要的技术, 在病毒学、免疫学、鱼类资源保护与遗传育种、病理学、环境毒理学、鱼类生理学、内分泌学和转基因等方面的理论及应用研究中发挥作用<sup>[8]</sup>。

国内很早也开始鱼类细胞培养的研究, 如1986年培养成功的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肾组织细胞系CIK对草鱼出血病病毒FRV具有敏感性, 能用于免疫学研究<sup>[21]</sup>。在暗色沙塘鳢(*Odontobutis obscura*)<sup>[22]</sup>、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[23]</sup>、大鳞鲃(*Barbus capito*)<sup>[24]</sup>、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[25]</sup>和斑马鱼<sup>[26]</sup>中, 不同类型的组织细胞培养也获得成功。鱼的胚胎细胞也作为重要的细胞来源进行体外培养。比如南方鲇(*Silurus meridionalis*)受精后30 h左右进行培养, 建立了胚胎细胞系SM<sup>[27]</sup>, 罗非鱼(*Oreochromis* sp.)体节分化期胚胎和斑马鱼胚胎能获得数量较多的胚胎细胞, 体外培养效果很好<sup>[28]</sup>。还有来自草鱼囊胚期胚胎的细胞GCB<sup>[29]</sup>。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、漠斑牙鲆(*P. lethostigma*)的原肠期胚胎进行培养后, 建立了3个海水鱼类胚胎细胞系FEC、TEC、SPEC<sup>[30]</sup>。胚胎细胞易获取, 分裂能力强, 是获得稳定细胞系的重要来源。

鳊具有很高的经济价值, 随着高密度养殖的发展, 鳊疾病越来越多, 包括各种寄生虫、细菌和病毒性疾病暴发给产业带来巨大的损失<sup>[31-32]</sup>。目前, 鳊细胞培养报道比较少, 有研究者发现L15为脑细胞(CPB)的最优培养基, 培养效果最佳。利用CPB细胞感染ISKNV后, 在不同条件下使用不同灭活剂对ISKNV灭活, 确定ISKNV疫苗的制备方法, 为制备鳊ISKNV灭活疫苗奠定了基础<sup>[33]</sup>。由鳊仔鱼组织构建的MFF-1细胞呈上皮样, 在含10%小牛血清的DMEM培养基中能够连续传代。MFF-1细胞易于被ISKNV感染, 可以用于病毒研究。MFF-1经过单细胞克隆得到MFF-8C1细胞系, 可以被细胞肿大病毒感染<sup>[9-10]</sup>。可见, 已有的鳊细胞系主要应用在病毒致病机理和疫苗生产中。高效的细胞转染方法是鳊免疫、抗病和基因功能研究的重要平台。本研究培育了稳定的鳊胚胎细胞系, 建立了一种稳定的转基因方法, 为鳊胚胎细胞的分离培养及应用提供了参考。

逆转录病毒载体在生物学研究中起着越来越重要的作用, 它在转基因、药物筛选和免疫学研究等方面已成为十分常用的工具<sup>[34-35]</sup>。除了病毒介导法(包括逆转录病毒和腺病毒介导)以外, 常见的转基因方法还有DEAE-葡聚糖法、磷酸钙法、脂质体法、阳离子聚合物、显微注射法和电穿孔法等。逆转录病毒介导的基因转移是通过病毒中膜糖蛋白和宿主细胞表面的受体相互作用而进入宿主细胞, 之后合成cDNA并随机整合到宿主基因组中, 实现稳定表达外源基因。目前还有一些问题如病毒滴度不高, 对分裂慢的细胞系效果不理想等需解决<sup>[36]</sup>。本研究利用电转法进行病毒包装, 获得高滴度的病毒。表明逆转录病毒包装后比脂质体瞬时转染在效率和稳定性上有明显的优势。如果调整细胞培养温度和对细胞进行初步处理, 转染效率还有可能继续提高。

原代胚胎细胞经过体外培养和传代后, 细胞生活的环境、形态和基因表达谱都可能发生变化。基因表达谱是细胞系特性的重要指标。斑马鱼不同胚胎期基因表达谱不同, 在1细胞期受精卵有10 096个转录本, 从1细胞期到512细胞期基因表达量比较稳定, 但是从512细胞期到50%外包期, 细胞表达的基因数量变化较大, 说明细胞基因组转录开始启动, 包括干扰素调节

因子(IRF)家族一些成员开始表达<sup>[14]</sup>。1998年研究人员在人和鼠的I型IFN的病毒诱导表达时发现IRF, 其结构相对保守, 通过与IFN上的启动子特殊结构的结合, 刺激IFN和调节干扰素刺激基因(ISG)的表达<sup>[15]</sup>。IRF还在造血干细胞发育和分化、细胞成长和细胞凋亡调控、细胞因子传导以及肿瘤发生调控中都发挥作用<sup>[16]</sup>。在已发现的干扰素调节因子当中, 涉及到抗病毒免疫应答的干扰素信号通路的至少含有IRF1、IRF3、IRF5和IRF7等<sup>[37]</sup>。最早被鉴定出来的IRF家族成员是IRF1<sup>[38]</sup>。在虹鳟<sup>[39]</sup>、石斑鱼<sup>[40]</sup>、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[41]</sup>、匙吻鲟(*Polyodon spathula*)<sup>[42]</sup>和草鱼<sup>[43]</sup>中受到病毒或病毒模拟物poly I:C刺激后, *Irf1*的表达水平会有明显上升。目前, 在草鱼<sup>[44]</sup>和青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)<sup>[44]</sup>等鱼类当中已经完成*Irf3*的克隆和表达分析。草鱼经poly I:C刺激后, 肝脏和脾脏中*Irf3*迅速上升。同时实验发现草鱼*Irf3*与其*Ifn*启动子区结合介导了*Ifn*的转录<sup>[43]</sup>。以往研究表明, 尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)和花鲈(*Lateolabrax maculatus*)IRF3在体内和体外都能启动*Ifn*的表达<sup>[18, 45]</sup>。本研究在鳊胚胎细胞系中发现*Irf1*、*Irf7*和*Irf3*的表达, 它们受到poly I:C的刺激后表达量增加。MFE细胞受到刺激后是否能表达*Ifn*基因, 将在下一步的工作中继续分析。MFE细胞受到poly I:C刺激后能产生反应, 说明MFE细胞系可作为免疫相关基因功能和表达调控研究的工具。

#### 参考文献:

- [1] Zhao J L, Wang W W, Li S F, *et al.* Structure of the mitochondrial DNA control region of the siniperine fishes and their phylogenetic relationship[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 793-799.
- [2] 李传阳, 许淼洋, Thammaratsuntorn J, 等. 3种鳊鱼生长与摄食量、胃蛋白酶活性和胃蛋白酶原基因表达相关分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(1): 1-7.
- Li C Y, Xu M Y, Thammaratsuntorn J, *et al.* Comparison of growth, food intake, pepsin activity and pepsinogen genes expression among *Siniperca* species[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(1): 1-7(in Chinese).
- [3] 许淼洋, 赵金良, 李传阳, 等. 三种鳊鱼骨骼肌生长及相关调控基因表达比较[J]. *生物技术通报*, 2014, 30(12): 184-189.
- Xu M Y, Zhao J L, Li C Y, *et al.* Comparison on muscle growth and expression of muscle growth-related genes among three mandarin fishes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 30(12): 184-189(in Chinese).
- [4] 王伟伟, 赵金良, 李思发, 等. 斑鳊不同地理群体遗传变异的AFLP分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(2): 304-309.
- Wang W W, Zhao J L, Li S F, *et al.* Genetic variation of *Siniperca scherzeri* steindachner from different geographical populations by AFLP analysis[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2): 304-309(in Chinese).
- [5] 邓燕飞, 薛洋, 赵金良, 等. 斑鳊(*Siniperca scherzeri*)胃蛋白酶原A、胃质子泵基因的克隆与组织表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 618-625.
- Deng Y F, Xue Y, Zhao J L, *et al.* Cloning and tissue expression analysis of the pepsinogen a and gastric proton pump genes from *Siniperca scherzeri*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 618-625(in Chinese).
- [6] Wise J S, Winn R N, Renfro J L. Generating new marine cell lines and transgenic species-conference summary[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 292(3): 217-220.
- [7] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. *Science*, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [8] Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(1): 1-20.
- [9] Dong C F, Weng S P, Shi X J, *et al.* Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. *Virus Research*, 2008, 135(2): 273-281.
- [10] Dong C F, Shuang F, Weng S P, *et al.* Cloning of a new fibroblast cell line from an early primary culture from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) fry for efficient proliferation of megalocytiviruses[J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(6): 883-890.
- [11] 赖迎迢. 鳊脑细胞系培养条件及传染性脾肾坏死病毒灭活工艺的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- Lai Y T. The study of optimal culture conditions and the methods of inactivating infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016(in Chinese).

- [12] Zhang X, Guan G J, Chen J B, *et al.* Parameters and efficiency of direct gene disruption by zinc finger nucleases in medaka embryos[J]. Marine Biotechnology (NY), 2014, 16(2): 125-134.
- [13] Zheng H X, Tian H, Jin Y, *et al.* Development of a hamster kidney cell line expressing stably T7 RNA polymerase using retroviral gene transfer technology for efficient rescue of infectious foot-and-mouth disease virus[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 156(1-2): 129-137.
- [14] Vesterlund L, Jiao H, Unneberg P, *et al.* The zebrafish transcriptome during early development[J]. BMC Developmental Biology, 2011, 11(1): 30.
- [15] Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, *et al.* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- $\beta$  gene regulatory elements[J]. Cell, 1988, 54(6): 903-913.
- [16] Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation[J]. Gene, 1999, 237(1): 1-14.
- [17] Nguyen H, Hiscott J, Pitha P M. The growing family of interferon regulatory factors[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 1997, 8(4): 293-312.
- [18] Gu Y F, Wei Q, Tang S J, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of IRF3 in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 55: 130-137.
- [19] Liu Q Z, Wang Y Z, Lin F, *et al.* Gene transfer and genome-wide insertional mutagenesis by retroviral transduction in fish stem cells[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0127961.
- [20] Sun B J, Chang M X, Song Y, *et al.* Gene structure and transcription of IRF-1 and IRF-7 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 116(1-2): 26-36.
- [21] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系CIK的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 11-17.
- Zuo W G, Qian H X, Xu Y F, *et al.* A cell line derived from the kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of fisheries of China, 1986, 10(1): 11-17(in Chinese).
- [22] 张君. 河川沙塘鳢细胞培养及胚胎发育研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- Zhang J. The study of the embryonic development and cell culture of *Odontobutis potamophila*[D]. Suzhou: Soochow University, 2010(in Chinese).
- [23] Zheng Y, Wang N, Xie M S, *et al.* Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(6): 1635-1643.
- [24] 耿龙武, 鲁翠云, 姜海峰, 等. 一种大鳞鲃鱼肾细胞体内培养制备染色体的方法: 中国, 103091144 A[P]. 2013-05-08.
- Geng L W, Lu C Y, Jiang H F, *et al.* Method for preparing chromosomes through large-scale barbel fish nephrocyte *in vivo* culture: CN, 103091144A[P]. 2013-05-08 (in Chinese).
- [25] 骆源, 张春晓, 王玲, 等. 斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立[J]. 水产学报, 2016, 40(4): 558-565.
- Luo Y, Zhang C X, Wang L, *et al.* Study on the isolation and primary culture of hepatocytes from liver of grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(4): 558-565(in Chinese).
- [26] 董丹丹, 孙燕侠, 郭华荣. 斑马鱼性腺组织的原代细胞培养技术的建立[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 130-134.
- Dong D D, Sun Y X, Guo H R. Development of primary cell culture from the gonad tissues of zebrafish[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(15): 130-134(in Chinese).
- [27] 洪锡钧. 南方鲇胚胎细胞培养及其细胞周期特性检测[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 240-245.
- Hong X J. Subculture and observation of cell cycle characteristics of embryonic cell from *Siluroidei meridionalis meridionalis*[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(3): 240-245(in Chinese).
- [28] 胡洋. 尼罗罗非鱼及斑马鱼胚胎细胞分离培养的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
- Hu Y. Study on isolation and culture of Nile tilapia and zebrafish embryonic cells[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010(in Chinese).
- [29] 叶湘辉, 刘汉勤, 王铁辉. 草鱼囊胚细胞系的生物学特性[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(4): 362-365.
- Ye X H, Liu H Q, Wang T H. The biological characteristics of grass carp blastula cell line[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2000, 9(4): 362-365(in Chinese).

- [30] 任国诚, 陈松林, 沙珍霞. 漠斑牙鲈胚胎细胞系的建立与鉴定[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 579-583.  
Ren G C, Chen S L, Sha Z X. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(4): 579-583(in Chinese).
- [31] 王亚军, 吴淑勤, 林文辉, 等. 鳊塘浮游生物DNA序列多样性、水质和疾病的关系[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 163-168.  
Wang Y J, Wu S Q, Lin W H, et al. Relationships among planktons DNA sequence diversity, water quality and fish diseases in *Siniperca chuatsi* ponds[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(1): 163-168.
- [32] Dong C F, Xiong X P, Luo Y W, et al. Efficacy of a formalin-killed cell vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and immunoproteomic analysis of its major immunogenic proteins[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2-4): 419-428.
- [33] 赖迎迢. 鳊脑细胞系培养条件及传染性脾肾坏死病毒灭活工艺的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
Lai Y T. The study of optimal culture conditions and the methods of inactivating infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [34] Hoffmann D, Schott J W, Geis F K, et al. Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells[J]. Gene Therapy, 2017, 24(5): 298-307.
- [35] Rawson J M O, Mansky L M. Retroviral vectors for analysis of viral mutagenesis and recombination[J]. Viruses, 2014, 6(9): 3612-3642.
- [36] Kamimura K, Suda T, Zhang G S, et al. Advances in gene delivery systems[J]. Pharmaceutical Medicine, 2011, 25(5): 293-306.
- [37] Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(9): 644-658.
- [38] Maruyama M, Fujita T, Taniguchi T. Sequence of a cDNA coding for human IRF-1[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(8): 3292.
- [39] Collet B, Hovens G C J, Mazzoni D, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2(IRF-1 and IRF-2)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(2): 111-126.
- [40] Shi Y, Zhu X P, Yin J K, et al. Identification and characterization of interferon regulatory factor-1 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(3): 1483-1493.
- [41] Yao C L, Kong P, Huang X N, et al. Molecular cloning and expression of IRF1 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(4): 654-660.
- [42] Gan X N, Chen Z, Wang X Z, et al. Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 1(IRF-1), IRF-2 and IRF-5 in the chondrosteian paddlefish *Polyodon spathula* and their phylogenetic importance in the Osteichthyes[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 36(1): 74-84.
- [43] Lai Q N, Lin G, Ma M S, et al. IRF-1 acts as a positive regulator in the transcription of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) IFN gene[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1432-1438.
- [44] 屈宜笑. 青鱼IRF3及IRF7基因的克隆及功能初探[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2016.  
Qu Y X. Molecular cloning of IRF3 and IRF7 gene of black carp and preliminary studying on their functions[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2016(in Chinese).
- [45] Chen X W, Wei Q, Wang Z P, et al. Identification and functional analysis of interferon regulatory factor 3 in *Lateolabrax maculatus*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 63: 1-9.



## Culture and application of *Siniperca chuatsi* embryo cell line

CHEN Xiaowu<sup>1,2,3</sup>, SHEN Yawei<sup>1</sup>, ZHAO Jinliang<sup>1,2,3\*</sup>, WU Minglin<sup>4</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract:** There are only a few cell lines of *Siniperca chuatsi* (mandarin fish) that could be widely used in scientific research. For mandarin fish, cell culture technique is an important aspect of the quality control program for the National Wild Fish Health Survey. Healthy, sensitive and mycoplasma-free cells are essential for detection of fish viruses in free-ranging fish populations. *S. chuatsi* is native to China and an important commercial species. In addition, the transfection efficiency is quite low in most fish cell lines. That is an obstacle in the basic research on fishes. In this study, a continuous cell (MFE) culture derived from the mandarin fish embryo was developed and has been subcultured over 20 passages in DMEM cell culture medium. MFE consists predominantly of epithelial-like cells and grows well in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum. Cell proliferation was assessed by MTT assay. The absorbance of the sample was read directly in the wells at an optimal wavelength of 570 nm. The results showed that MFE cell experienced proliferation, decrease and stable phases during 96 h. Meanwhile, we used GFP-expressing retrovirus produced by HEK293T cells to test the transfection efficiency in MFE cell line. The result showed that the transfection efficiency reached 20%±5% without affecting the growth of these cells. Subsequently, the expression of three genes of *Irf1*, *Irf2* and *Irf7* was examined in MFE cell line by qRT-PCR. The results indicated that *Irf1* is the highest one, and all increased to 3.5, 2.3 and 2.1 folds after poly I:C stimulation. The results of this study showed that MFE is the first cell line originated from embryo of mandarin fish. It could be used as a tool for gene function research and genetic modification.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; cell culture; retrovirus; interferon regulator factor

**Corresponding author:** ZHAO Jinliang. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-46); Talent Development Special Fund of Anhui Academy of Agricultural Sciences (16F0505); Anhui Provincial Natural Science Foundation (1808085QC81)