

DOI: 10.11964/jfc.20221213828

SCC-37 37 °C 驯化的稳定性及其在常见病毒培养中的应用



巩金鹏¹, 赵颖², 陈雪兰³, 蔺凌云¹, 姚嘉赞¹, 穆雪姣¹,
周可欣³, 王丛旭¹, 沈锦玉^{1,3}, 潘晓艺^{1*}

1. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江湖州 313001; 2. 湖州市南浔区农业技术推广服务中心, 浙江湖州 313009; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要:

【目的】建立能快速增殖且对鳊源常见病毒敏感的鳊鱼细胞系。

【方法】利用已建立的鳊脊髓组织细胞系 SCC, 采用梯度血清逐步驯化的方式, 建立一个连续细胞系 SCC-37, 分析该连续细胞系的来源、支原体污染、生长特性和冻存后细胞活力, 评估其对传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)、鳊虹彩病毒 (SCRaV) 和鳊弹状病毒 (SCRV) 的敏感性。

【结果】该细胞系 SCC-37 已连续培养 30 代, 稳定的生长条件为 L-15+10%NBGS、37 °C 培养; 通过鳊 28S rRNA 基因分析其来源于鳊, 支原体检测证实 SCC-37 无支原体污染; 病毒敏感性结果显示, ISKNV、SCRaV 和 SCRIV 可在 SCC-37 中稳定增殖和传代, 培养的病毒滴度为 $10^{3.4} \sim 10^{9.6}$ TCID₅₀/mL, 电镜观察可见大量病毒颗粒。

【结论】新驯化的 SCC-37 为分离、鉴定和增殖病毒以及疫苗制备提供了重要工具。

关键词:鳊; 鳊脊髓组织细胞系; 37 °C 驯化; 生长特性; 敏感性

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国特有的淡水鱼类, 属于鲈形目 (Perciformes) 暖鲈科 (Percichthyidae) 鳊亚科 (Siniperconae), 营养价值高、肉质鲜美, 在我国广泛分布, 深受消费者喜爱^[1-2]。其全国养殖总产量在 2021 年、2022 年分别达 37.4 万和 40.1 万 t, 产值超过 200 亿元^[3]。但各种环境应激因素, 包括高温、缺氧和病害, 经常损害鱼类健康, 给鳊水产养殖业造成严重的经济损失^[4]。鳊养殖主要病害有细菌性疾病、寄生虫病和病毒性疾病, 以病毒性疾病危害最为严重, 主要有传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV), 鳊蛙虹彩病毒 (*Siniperca chuatsi ranavirus*, SCRaV/ mandarin fish ranavirus, MRV), 鳊弹状病毒 (*Siniperca chuatsi rhabdovirus*, SCRIV)^[5]。ISKNV 是导致鲈形目鱼类高死亡率的病毒之一, 造成鳊、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 和墨瑞鳊 (*Maccullochella peelii*) 等严重的经济损失^[6], 受 ISKNV 感染的鱼主要症状为体色发黑、腹部肿胀、鳃苍白、脾脏肿大^[7-8]。同时也存在亚临床病毒感染, 造成疾病不易确诊, 使

第一作者: 巩金鹏, 从事水产养殖生态环境与疾病防控研究, E-mail: 2542756880@qq.com;



赵颖, 从事水产养殖技术推广, E-mail: 46687312@qq.com

通信作者: 潘晓艺, 从事水产动物病原生物学与免疫预防研究, E-mail: panxiaoyi@163.com

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900103); 浙江省自然科学基金 (ZCLTGN24C1901); 浙江省“三农九方”科技协作计划 (2024SNJF053)

收稿日期: 2022-12-05

修回日期: 2023-04-23

文章编号:

1000-0615(2025)03-039417-10

中图分类号: S 943

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



该病不能及时得到防控^[6]。SCRaV 是鳃养殖业新发现的病原, 流行普遍, 引起较高发病率, 最早报道的 MRV-GD1301 分离株是在 2013 年从杂交鳃中分离出来的一种类似于大口黑鲈虹彩病毒 (LMBV) 特征的新型致死性病毒^[9], 感染 SCRaV 的鱼表现为嗜睡、厌食和腹部肿胀, 部分伴有腹水; 在自然条件下, SCRaV 的持续隐性感染是防控的难点^[10-11]。SCRV 有很强的致病性, 感染的鱼表现为体表、鳍和部分内脏器官出血, 致死率高达 80%~100%^[12]。有相关报道表明, 正常生长的成年鳃也可以携带 SCR, 这些携带病毒无明显临床症状的成鱼, 成为病毒传染源, 给该病的防控带来了巨大的挑战^[13]。因此, 这些病毒性疾病的防治已成为当今鳃养殖业急需解决的重要问题。

连续稳定的细胞系是病毒研究、疫苗开发的关键工具, 可用于病毒分离、鉴定、发病机制研究以及基于细胞培养的病毒疫苗研发^[14]。同源细胞系, 尤其是来自同一物种, 被视为应对未知病毒暴发的宝贵工具^[15]。自 1962 年, Wolf 等^[16]建立第一个鱼类细胞系: 虹鳟性腺细胞系 RTG-2, 至今已有 918 个鱼类细胞系 (https://www.cellosaurus.org/browse_by_group, Fish cell lines) 被建立。此前, 鳃鱼苗细胞系 (MFF-1)、鳃全脑细胞系 (CPB/MFB)、鳃胚胎细胞系 (MFE) 和鳃脊髓组织细胞系 (SCC) 已被建立, 主要在 24~28 °C 培养, 生长速率慢, 均使用胎牛血清, 成本高^[17-21]。在该研究中, 利用已有的细胞系 SCC, 通过优化细胞培养工艺 (培养温度和血清浓度), 驯化建立 SCC-37, 并分析了该细胞系的特性, 评估其对几种鳃常见病毒的敏感性。该细胞系的建立为大规模生产相关病毒提供了重要工具, 为研发高效和价廉的疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

SCC 由浙江省淡水水产研究所鱼病室建立并保存^[20], 该研究中使用第 60 代细胞。ISKNV、SCRaV 和 SCR 由浙江省淡水水产研究所分离鉴定并保存。

1.2 试剂与仪器

L-15 培养液、M-199 培养液、青霉素/链霉

素混合液、磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%Trypsin-EDTA)、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司, 新生牛血清 (NBCS) 购自内蒙古金源康生物工程股份有限公司, 核酸提取试剂盒 (磁珠法) 购自洛阳爱森生物科技有限公司, 细胞冻存液购自日本 ZENOAQ 公司, 秋水仙素、吉姆萨染液购自北京索莱宝科技有限公司, 2×Flash Hot Start MasterMix(Dye) 购自北京康为世纪生物科技股份有限公司, TransDetect® PCR Mycoplasma Detection Kit 购自北京全式金生物技术有限公司。细胞基因组提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

实验所用完全培养基: 1 号完全培养基 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、20% 胎牛血清的 L-15 培养液), 2 号完全培养基 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 L-15 培养液), 3 号完全培养基 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、20% 新生牛血清的 L-15 培养液), 4 号完全培养基 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、10% 新生牛血清的 L-15 培养液), 5 号完全培养基 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、5% 新生牛血清的 L-15 培养液), 维持液 (含有 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、2% 新生牛血清的 L-15 培养液)。

磁珠法全自动核酸提取纯化仪购自洛阳爱森生物科技有限公司, 细胞计数器购自美国 Merck 公司。

1.3 SCC 传代培养

选择第 60 代次 SCC 进行驯化培养。按照 Gong 等^[20]的方法从液氮选择第 60 代次 SCC 复苏。简而言之, 将从液氮取出的 SCC 细胞, 迅速置于 37 °C 水中摇晃, 融化后, 1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬于 1 号完全培养基, 转入 T25 细胞培养瓶, 置于 28 °C 恒温培养箱。细胞汇合度达 90% 以上时进行连续传代培养。具体步骤: 吸出原有培养基, 用 PBS 进行冲洗, 加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 消化液室温消化, 1~2 min 后, 去除胰蛋白酶-EDTA, 添加 4 mL 1 号完全培养基终止消化并吹打细胞, 收集细胞悬液; 体积比 1 : 2 进行分瓶, 置于 28 °C 恒温培养箱。逐代观察细胞, 细胞生长稳定, 可进行驯化培养。

1.4 SCC 培养条件驯化

不同比例血清的完全培养基初筛 L-15 培养液和 M-199 培养液搭配不同比例血清配制完全培养基, 观察传代后的 SCC 活力。选择 L-15 培养液和 M-199 培养液分别搭配 20% FBS、10% FBS、5% FBS、1% FBS、20% NBCS、10% NBCS、5% NBCS 和 1% NBCS 配制完全培养基。取 SCC 分别用每一种完全培养基传代, 置于 37 °C 恒温培养箱, 逐日观察, 选择细胞活力较好的几种完全培养基 (L-15+10% FBS、L-15+20% NBCS、L-15+10% NBCS、L-15+5% NBCS), 继续传代, 逐代观察。

驯化培养 根据初筛结果, 进行 SCC 驯化培养。首先选择生长稳定的 SCC, 用 2 号完全培养基进行传代培养, 置于 37 °C 恒温培养箱, 每 2 天进行换液, 细胞汇合度达 90% 以上时继续传代培养, 逐代观察。细胞生长稳定且可连续传代培养时, 选择 3 号完全培养基进行传代培养, 置于 37 °C 恒温培养箱, 每 2 天进行换液, 细胞汇合度达 90% 以上时继续传代培养, 逐代观察。细胞生长稳定且可连续传代培养时, 选择 4 号完全培养基进行传代培养, 置于 37 °C 恒温培养箱, 每 2 天进行换液, 细胞汇合度达 90% 以上时继续传代培养, 逐代观察。

1.5 28S rRNA 基因序列分析与比对

SCC-37 在 37 °C 可以稳定生长, 且能连续传代, 为了防止细胞间污染, 对后续研究造成误导。取第 30 代 SCC-37, 根据细胞基因组提取试剂盒的操作说明, 提取细胞的总基因组 DNA。引物参照罗晓雯等^[21] 28S rRNA 基因引物 MF-28S(表 1)。以提取的 SCC-37 总基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应的总体积为 25 μL, 其中包含 2×Flash Hot Start MasterMix(Dye) 12.5 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、模板 DNA 1.5 μL、ddH₂O 9 μL。PCR 产物通过琼脂糖凝胶分析并送往生工生物工程上海股份有限公司测序。测序结果采用 NCBI 的 BLAST 工具进行比较与分析。

1.6 SCC-37 支原体检验

取第 30 代 SCC-37 根据 TransDetect[®] PCR Mycoplasma Detection Kit 的操作说明检测支原体污染。简而言之, 细胞汇合度达 90% 以上时,

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers in this study

| 引物 primers | 序列(5'-3') sequences (5'-3') | 片段长度/bp fragment length |
|------------|---|-------------------------|
| MF-28S | TAGCGAAACCACAGCCAAGG CCAACGCTTGGTGAATTCTG | 528 |
| ISKNV | CCTTAATTGCCATTCCCTCTTC AGTAGTCTACTCCCATCTGGTGGAG | 550 |
| SCRaV | CATTATCCCGTGGGTGGTTTAC GGACCCTAGCTCCTGCTTGAC | 400 |
| SCRV | CTGACATCCTTTGGAATCGAG TTCACCAGCTCTGCAGATGTTC | 780 |

取 40 μL 细胞培养基置于 95 °C 热处理 10 min。按照 PCR 体系和条件进行反应, 设置阴性对照 (MycoFree Water) 和阳性对照 (Myco Positive Control Template), 凝胶电泳检测 PCR 结果。通过与阳性对照和阴性对照比对结果, 确认细胞支原体污染情况。

1.7 SCC-37 生长特性

取第 30 代 SCC-37, 经过胰蛋白酶-EDTA 消化后悬浮在 4 号完全培养基, 以细胞浓度为 4.865×10^4 个/mL 的浓度接种 1 mL 到 24 孔细胞培养板, 置于 37 °C 恒温培养箱。每隔 1 天取 3 孔, 用 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 消化, 使用细胞计数器计算细胞浓度。同时, 以培养时间为横坐标, 细胞浓度为纵坐标, 绘制 SCC-37 的生长曲线。根据 $T=t \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$ ^[21] 计算 SCC-37 的群体倍增时间, 式中, N_t 为 t 时间的细胞数, N_0 为初始接种细胞数。

1.8 SCC-37 冻存与复苏

细胞生长过程中对不同代次的细胞进行冻存是必要的^[22]。取第 25、30 代 SCC-37, 经过胰蛋白酶-EDTA 消化后悬浮在 1 mL 4 号完全培养基, 1 200 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀重悬于 1 mL 的细胞冻存液, 转移至 1.8 mL 的冻存管。将冻存管放入程序降温盒, 然后放入超低温冰箱 (-80 °C) 过夜, 次日取出冻存管转入液氮 (-196 °C) 中长期保存。

需要对冻存细胞进行复苏时, 取出存放在液氮中的冻存管, 迅速在 37 °C 的水浴锅中不断摇晃, 以达到快速解冻细胞的目的。解冻后 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重悬于 4 号

完全培养基, 转入 T25 细胞培养瓶, 置于 37 °C 恒温培养箱, 逐日观察。

1.9 SCC-37 对 ISKNV、SCRaV、SCRV 的敏感性

细胞 CPE 观察 SCC-37 对 ISKNV、SCRaV、SCRV 敏感性的检测。SCC-37 接种 800 μL ISKNV, 对照组中加入等量的维持液。24 °C 孵育 50 min, 去掉孵育液, 添加 5 mL 的维持液, 置于 24 °C 恒温培养箱。逐日观察。CPE 达到 80% 以上, 冻融 2~3 次, 分装储存在 -80 °C 或液氮。SCRaV、SCRV 同上。

采用磁珠法全自动核酸提取纯化仪搭配核酸提取试剂盒 (磁珠法) 提取病毒的总 DNA 和 RNA。利用 ISKNV、SCRaV 和 SCRIV 的特异性引物, 通过 PCR 确定病毒种类, 引物^[5]见表 1。

病毒传代稳定性 验证病毒能否在细胞中增殖并传代, 采用 SCC-37 在 24 °C 对病毒进行传代培养, 传代 7 次, 保留每一代次的病毒培养液, 进行 PCR 扩增鉴定, 引物^[5]见表 1。

TCID₅₀ 检测 SCC-37 经胰蛋白酶-EDTA 消化, 添加 10 mL 的 4 号完全培养基吹打混匀。96 孔细胞培养板每孔加入 100 μL 的细胞悬液 (5×10⁴ 个/mL), 培养至单层铺满, 弃去原有培养液。病毒用 L-15 培养液作连续 10 倍梯度稀释, 96 孔细胞培养板每孔 100 μL, 每个梯度 8 个平行。同时设立空白维持液作为对照组。置于 24 °C 恒温培养箱, 孵育 1 h 后, 更换成维持液, 每孔 100 μL, 置于 24 °C 恒温培养箱。逐日观察并记录 CPE, 依据 Reed-Muench 法^[23], 计算 50 % 细胞感染剂量 (TCID₅₀)。

电镜观察 通过透射电子显微镜观察 ISKNV、SCRaV 和 SCRIV。SCC-37 接种 800 μL 病毒液, 约有 40% 的细胞病变时, 胰蛋白

酶-EDTA 消化细胞, 离心收集。用 PBS 浸洗 2 遍细胞沉淀, 2% 戊二醛 (pH 7.2, 0.1 mol/L PBS 配制) 预固定。1% 四氧化锇再固定, 经脱水包埋后进行超薄切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 透射电镜观察。

2 结果

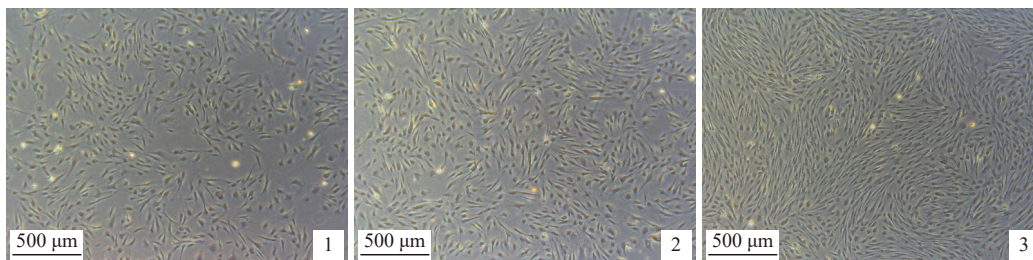
2.1 SCC-37 的驯化培养

不同比例血清的完全培养基初筛结果 SCC-37 搭配不同比例血清的完全培养基传代, 观察发现, 4 种完全培养基 (2 号完全培养基、3 号完全培养基、4 号完全培养基和 5 号完全培养基) 的细胞活力较好, 其他完全培养基的细胞状态不佳, 无法进行传代。利用 4 种完全培养基继续传代发现, 只有 2 号完全培养基可以进行连续传代, 其他完全培养基无法传代培养。因此, 最终决定以 2 号完全培养基→3 号完全培养基→4 号完全培养基→5 号完全培养基的方式逐步驯化。

驯化培养 SCC-37 用 2 号完全培养基传代, 2~3 d 进行换液, 初期培养需 8~10 d, 再次传代, 连续传代 5 代 (F₁~F₅), 细胞逐渐稳定。更换为 3 号完全培养基, 3 d 进行换液, 初期培养需 7 d, 再次传代, 连续传代 8 代 (F₆~F₁₃), 细胞逐渐稳定。更换为 4 号完全培养基, 3 d 进行换液, 初期培养需 5 d, 连续传代, 细胞逐渐稳定 (F₁₄~F₂₀), 传代至 F₂₅, 细胞传代 2~3 d 可单层铺满 (图版 I)。SCC-37 在连续传代中, 已适应 37 °C 和低浓度血清培养, 并且随着连续传代, 细胞生长周期在缩短。

2.2 28S rRNA 基因序列分析与比对

以 SCC-37 总基因组 DNA 为模板, PCR 扩



图版 I SCC-37 生长形态

Plate I Morphology of SCC-37

1. 24 h, 2. 36 h, 3. 48 h.

增, 获得片段大小为 528 bp (图 1), 与目的条带一致。序列分析比对, 与已知的鳊 28S *rRNA* 基因 (EF120974) 同源率为 100%, 结果表明 SCC-37 来源于翘嘴鳊 (*Siniperca chuatsi*)。

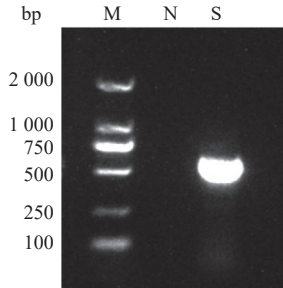


图 1 28S *rRNA* PCR 扩增产物

M. 2 000 bp DNA marker, N. 阴性对照, S. 模板。

Fig. 1 PCR amplified products of 28S *rRNA* gene

M. 2 000 bp DNA marker, N. negative control, S. sample.

2.3 SCC-37 支原体检测

SCC-37 第 30 代次的 7 瓶细胞支原体检测结果表明, 无支原体污染 (图 2)。

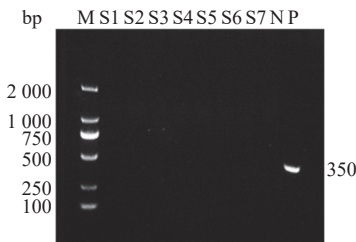


图 2 支原体检测

M. DNA marker DL2 000, S1-S7. 模板, N. 阴性对照, P. 阳性对照。

Fig. 2 Mycoplasma detection

M. DNA marker DL2 000, S1-S7. sample, N. negative control, P. positive control.

2.4 SCC-37 生长特性

SCC-37 初始浓度 4.865×10^4 个/mL, 37 °C 培养。第 30 代 SCC-37 在 0~1 d 细胞贴壁、生长迟缓, 处于延迟期, 1~7 d 处于指数生长阶段 (对数期), 7~8 d 细胞生长趋于静止, 处于平台期 (静止期)。第 7 d 时, SCC-37 的浓度为 1.214×10^5 个/mL (图 3)。通过公式计算, 第 0 天至第 7 天, 细胞系 SCC-37 的群体倍增时间是 127.3 h。结果显示, SCC-37 在 37 °C 生长正常, 可稳定传代。

2.5 SCC-37 冻存与复苏

第 25、30 代 SCC-37, 各冻存 1 次。为了评

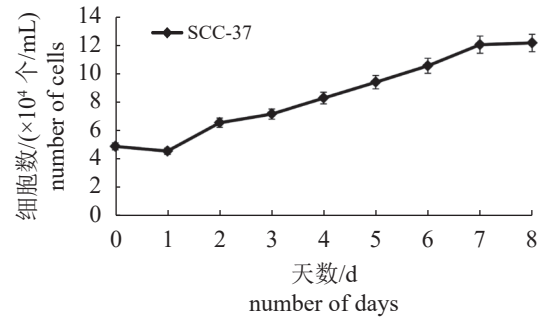


图 3 SCC-37 生长曲线

Fig. 3 Growth curve of SCC-37 cells

估低温保存后的细胞活力, 分别储存 1 个月、3 个月后复苏。观察发现, 在最佳培养条件下, 细胞显示 85%~90% 的活力, 生长正常稳定, 细胞形态没有明显变化。表明冻存和复苏对细胞没有影响。

2.6 SCC-37 对 ISKNV、SCRaV、SCRV 的敏感性

CPE 观察 SCC-37 接种 ISKNV、SCRaV 和 SCRIV, 24 °C 培养。发现接种 ISKNV、SCRaV 和 SCRIV 的细胞均出现 CPE。细胞感染 ISKNV 后, 第 2 天出现 CPE, 第 5 天细胞聚合、变圆, 部分分离, 第 8 天约 80% 的细胞分离 (图版 II)。细胞感染 SCRaV 后, 第 7 小时出现显著 CPE, 约 90% 的细胞变圆分离 (图版 III)。感染 SCRIV 的细胞很快出现 CPE, 4 h 后细胞变圆分离, 80% 细胞在 12 h 聚合分离 (图版 IV)。

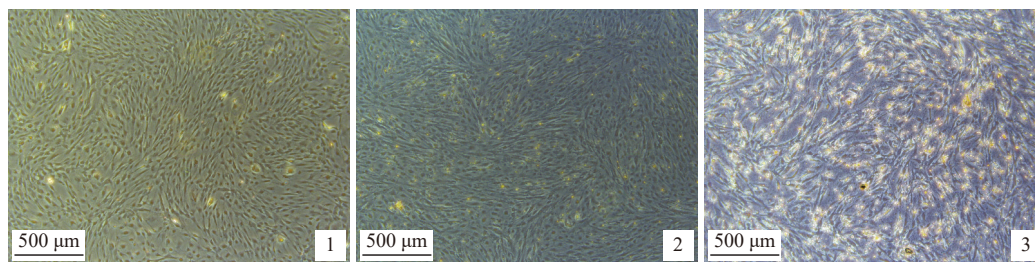
病毒传代稳定性 不同代次病毒提取核酸, PCR 扩增结果表明, 收集的 ISKNV、SCRaV 和 SCRIV 每一代 (1~7) 中都有目的条带 (图 4), 病毒可以在 SCC-37 细胞中增殖和稳定传代。

TCID₅₀ 检测 测定每种病毒的 TCID₅₀, 病毒梯度稀释并接种到在 96 孔板中培养的 SCC-37 细胞中, 连续观察。ISKNV、SCRaV 和 SCRIV 病毒的 TCID₅₀ 分别为 $10^{3.4}$ 、 $10^{9.6}$ 和 $10^{8.7}$ TCID₅₀/mL。

电镜观察 通过透射电镜观察 SCC-37, 发现 ISKNV 为二十面体, 平均直径约为 150 nm, SCRaV 为二十面体对称, 直径为 120~150 nm, SCRIV 为子弹形状, 直径约为 50 nm (图版 V)。

3 讨论

细胞系的建立与应用在病毒学、免疫学和

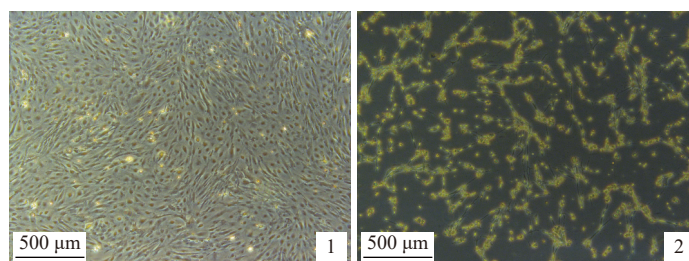


图版 II SCC-37 接种 ISKNV 的观察结果

1. 对照, 2. 2 d, 3. 5 d.

Plate II Observation of SCC-37 infection with ISKNV

1. control, 2. 2 days, 3. 5 days.

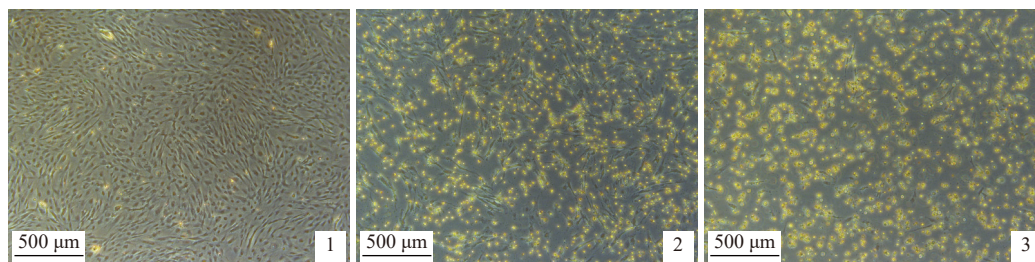


图版 III SCC-37 接种 SCRaV 的观察结果

(1) 对照, (2) 7 h.

Plate III Observation of SCC-37 infection with SCRaV

(1) control, (2) 7 h.



图版 IV SCC-37 接种 SCRv 的观察结果

1. 对照, 2. 4 h, 3. 12 h.

Plate IV Observation of SCC-37 infection with SCRv

1. control, 2. 4 h, 3. 12 h.

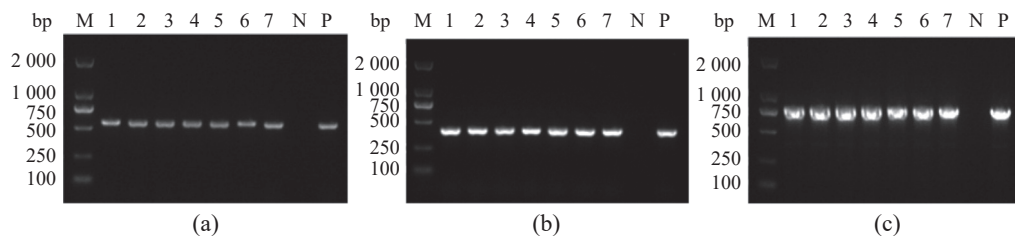
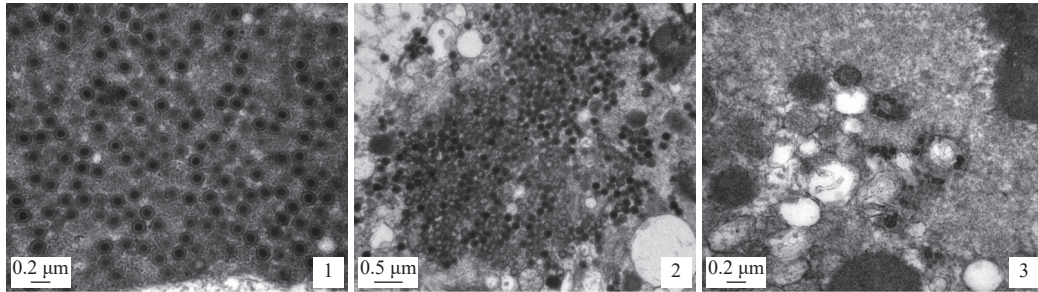


图 4 病毒传代稳定性

(a) ISKNV, (b) SCRaV, (c) SCRv; 1~7. 病毒 1~7 代, N. 阴性对照, P. 阳性对照, M. 2 000 bp DNA marker.

Fig. 4 The stability of virus passages

(a) ISKNV, (b) SCRaV, (c) SCRv; 1-7, virus passage 1-7 generations, N. negative control, P. positive control, M. 2 000 bp DNA marker.



图版 V 感染 ISKNV (1)、SCRaV (2) 和 SCRv (3) 的 SCC-37 电镜图

Plate V Transmission electron microscopy of SCC-37 infected with ISKNV (1), SCRaV (2), and SCRv (3)

基因学研究中发挥着重要作用。鱼类细胞系也已成为鱼类病毒分离和鉴定、鱼病诊断、基因编辑表达和疫苗研究等方面的必要工具^[24]。该实验成功驯化了一种在 37 °C 培养的鳊脊髓组织细胞系, 并详细研究了该细胞系的来源、特性和病毒敏感性, 结果显示, 该细胞系对几种病毒具有敏感性, 为病毒学和疫苗研究提供了重要工具。

联合国政府间气候变化专门委员会 (IPCC) 指出, 2011—2020 年, 全球平均温度比 1850—1900 年提高 1.09 °C, 到 2100 年, 预计比 1986—2005 年提高 0.3~4.5 °C, 全球气温持续变暖, 将对水产养殖产生影响^[25-26]。因此, 建立一株能在高温条件下连续稳定传代的细胞系, 以应对高温环境下疾病病原的研究具有重要意义。本研究建立的高温适应细胞系 SCC-37 可用于未知病毒分离、检测和鉴定和转基因等方面研究, 并且由于其生长速度快和培养成本降低, 也可用于病毒相关疫苗的大规模制备。已有文献报道, 来自鳊不同组织建立的 5 种细胞系, 最适生长温度在 26~28 °C, 也有学者进行了高温培养条件的测试, MFB 在 34 °C 培养结果显示, 第 6 天开始细胞逐渐死亡并脱落^[21]。本研究通过逐步驯化的方式, 获得可在 37 °C 连续稳定传代培养的细胞系 SCC-37, 并维持约 20 d 细胞仍存活。在驯化过程中, 逐步降低完全培养基中的血清浓度, 从 20% FBS 逐步过渡到 10% NBSCS。经过驯化, SCC-37 细胞能够适应不同浓度的血清, 为后续的血清培养基驯化提供了基础。此外, 本实验的驯化方法也为其他鱼类细胞的驯化提供了参考。

确认细胞系来源主要是通过 PCR 扩增细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome C oxidase I)、细胞色素 b (cytochrome b)、12S *rRNA* 和 16S *rRNA*

基因, 进行测序验证^[27-28], 也可通过 18S *rRNA* 和物种自身的特异性基因来确认细胞系来源^[18,21]。本研究采用鳊 28S *rRNA* 基因的特异性引物^[21], PCR 扩增测序, 分析比对, 表明 SCC-37 来源于翘嘴鳊, 说明驯化传代过程中, 没有产生细胞间的相互污染。细胞培养过程中, 支原体污染被认为是主要污染之一^[29], 不仅影响病毒的增殖传代, 而且还会改变细胞膜抗原性, 导致细胞死亡, 且支原体污染无法通过显微镜和培养基浑浊度的观察进行判定^[15]。因此, 无支原体污染在细胞的培养与保存过程中极其重要^[30]。SCC-37 的支原体检测阴性结果, 确保了细胞系 SCC-37 的安全。

细胞培养的生长周期, 是明确细胞培养接种密度、传代间隔、培养持续时间和建立传代程序的主要依据。在相同的条件下, 选择相同的接种浓度, 相同培养时间会有产生相近浓度的细胞量, 细胞传代时, 可选择相同的传代间隔时间^[22]。本研究通过绘制细胞生长曲线发现, SCC-37 生长周期的延迟时间为 1 d, 细胞群体倍增时间为 127.3 h, 在第 7 天到达平台期, 为 1.214×10^5 个/mL。冻存细胞是细胞长期保存的方法之一, 可以挽回细胞污染的损失, 避免连续传代引起的遗传变化和细胞老化^[30-32]。本研究对细胞进行冻存后复苏, 结果表明冻存 1 个月、3 个月的细胞回收率在 85%~90%, 复苏后的细胞在细胞培养瓶中可以稳定生长, 形态正常。将该细胞传代后置于 20、24 和 28 °C 培养, 可以稳定生长。将处于对数生长期的细胞置于 17 °C 可以存放较长时间。

细胞系作为病毒研究的重要工具, 本研究通过 CPE、TEM 观察和 TCID₅₀ 检测, 测试 SCC-37 对 ISKNV、SCRaV 和 SCRv 的敏感性。接种 ISKNV 的 SCC-37 在第 2 天部分细胞病变,

第 5 天细胞变圆聚集并脱落; 接种 SCRaV 的 SCC-37 在第 7 天约 90% 的细胞聚集、脱落并显示空斑; 接种 SCRv 的 SCC-37 在第 4 小时出现 CPE, 第 12 小时约 80% 的细胞变圆脱落。其他鳊细胞 CPB 和 MFF-1 接种 ISKNV 后, 也出现变圆脱落^[17-18], 但也有建立的鳊脑组织细胞系对于 ISKNV 不敏感的情况^[21]。这表明, 源自同一组织建立的不同细胞系, 其主要细胞类型存在差异, 导致在面对相同病毒时的敏感性不同。在本研究中, 细胞在驯化过程中呈现出不同形态, 其中一类形态的细胞对病毒的敏感性随传代而降低, 然而, 这类形态在传代过程中并不稳定, 最终稳定传代的主要仍以成纤维状为主。实验对 SCC-37 传代的不同代次病毒进行 PCR 扩增, 表明 3 种病毒 ISKNV、SCRaV 和 SCRv 可稳定传代超过 7 代。后续将采用单细胞克隆的方式, 筛选出对病毒更为敏感的细胞, 并对其进行传代培养。

TCID₅₀ 是测量病毒在细胞中复制效率的主要工具。将 ISKNV、SCRaV 和 SCRv 的稀释液接种在 96 孔细胞培养板中, 观察 8 d。基于 Reed-Muench 方法的计算表明, ISKNV、SCRaV 和 SCRv 的滴度分别为 10^{3.4}、10^{9.6} 和 10^{8.7} TCID₅₀/mL。SCC-37 对 ISKNV 的敏感性不如细胞 CPB (10^{7.58-7.62} TCID₅₀/mL) 和 MFF-1 (10^{7.6-8.4} TCID₅₀/mL)^[17-18]。而 SCRaV 和 SCRv 在 SCC-37 表现出较高的复制效率, 表明该细胞系可用于以上病毒的分离、增殖和疫苗制备。在固定的病变细胞中也观察到大量病毒颗粒, ISKNV 是平均直径约为 150 nm 的二十面体结构, SCRaV 是直径为 120~150 nm 的二十面体结构, SCRv 是直径约为 50 nm 的子弹状。

综上, 本实验所驯化的 SCC-37 细胞系是一种用于分离、鉴定和增殖鳊相关病毒有效的工具。此外, 它还可以用于高温季节中鱼类未知新发病毒的研究。该细胞系具有生长迅速、培养成本低等优点, 对于鳊鱼病毒类疫苗的开发具有重要意义。

参考文献 (References):

[1] 国家特色淡水鱼产业技术体系. 中国鳊鱼产业发展报告 [J]. 中国水产, 2021(4): 23-32.
National characteristic freshwater fish industry technology system. Report on the development of Chinese mandarin fish

industry[J]. China Fisheries, 2021(4): 23-32 (in Chinese).
[2] Ouyang H F, Deng N N, Xu J C, et al. Effects of hyperosmotic stress on the intestinal microbiota, transcriptome, and immune function of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738901.
[3] 李松林, 韩志豪, 王小源, 等. 鳊养殖概况及摄食调控机制研究进展 [J]. *水产学报*, 2021, 45(10): 1787-1795.
Li S L, Han Z H, Wang X Y, et al. Research progress on aquaculture and feeding regulation mechanism of mandarin fish [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(10): 1787-1795 (in Chinese).
[4] Wang P F, Zeng S, Xu P, et al. Two HSP90 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Identification, characterization and their specific expression profiles during embryogenesis and under stresses [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(4): 1123-1136.
[5] 梁红茹, 马赛亚, 付小哲, 等. 传染性脾肾坏死病毒、鳊鱼蛙病毒和鳊弹状病毒三重 PCR 检测方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2021, 49(11): 17-24.
Liang H R, Ma S Y, Fu X Z, et al. Establishment of multiple PCR assay for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus, *Siniperca chuatsi* ranarivirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(11): 17-24 (in Chinese).
[6] Vaniksampanna A, Manajit O, Senapin S, et al. Generation of monoclonal antibodies against heterologously expressed major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738895.
[7] Dong H T, Jitrakorn S, Kayansamruaj P, et al. Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKNV) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 65-73.
[8] Lin Q, Fu X Z, Liu L H, et al. Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 98-105.
[9] Dong C F, Wang Z M, Weng S P, et al. Occurrence of a lethal ranavirus in hybrid mandarin (*Siniperca scherzeri* × *Siniperca chuatsi*) in Guangdong, South China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 203: 28-33.
[10] Zhang W F, Duan C, Zhang H T, et al. Widespread outbreaks of the emerging mandarin fish ranavirus (MRV) both in natural and ISKNV-FKC vaccinated mandarin fish *Siniperca chuatsi* in Guangdong, South China, 2017 [J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734989.
[11] Fu X Z, Lin Q, Liu L H, et al. The pathogenicity and biological

- features of Santee-Cooper Ranaviruses isolated from Chinese perch and snakehead fish[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 112: 269-273.
- [12] Huang Y, Wang R X, Gao T H, *et al.* Transcriptome analysis of immune response against *Siniperca chuatsi* rhabdovirus infection in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 44(6): 675-687.
- [13] Liu X Y, Zhang X D, Xu Z D, *et al.* Isolation, genomic and biological characterizations of a Rhabdovirus from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738894.
- [14] Fu Y T, Li Y, Liu X G, *et al.* Development of two cell lines from yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* fin and brain suitable for propagating SDDV but not for ISKNV, MRV and GIV[J]. *Aquaculture*, 2022, 560: 738478.
- [15] Yadav M K, Rastogi A, Criollo Joaquin M P, *et al.* Establishment and characterization of a continuous cell line from heart of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to tilapia lake virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 287: 113989.
- [16] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. *Science*, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [17] 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.
- [18] Fu X, Li N, Lai Y, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32-45.
- [19] 陈晓武, 申亚伟, 赵金良, 等. 鳊胚胎细胞系的建立与应用 [J]. *水产学报*, 2018, 42(10): 1626-1634.
- Chen X W, Shen Y W, Zhao J L, *et al.* Culture and application of *Siniperca chuatsi* embryo cell line[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1626-1634 (in Chinese).
- [20] Gong J P, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Establishment and characterization of a spinal cord tissue cell line from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* and its susceptibility to several viruses[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(10): 1419-1427.
- [21] 罗晓雯, 曾令兵, 江南, 等. 鳊脑组织细胞系的建立及其病毒敏感性研究 [J]. *渔业科学进展*, 2022, 43(5): 179-188.
- Luo X Y, Zeng L B, Jiang N, *et al.* Establishment of a cell line derived from the brain tissue of mandarin fish *Siniperca chuatsi* and its susceptibility to infection by fish viruses[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(5): 179-188 (in Chinese).
- [22] Freshney R I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications[M]. 6th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010, 317-334.
- [23] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493-497.
- [24] Wu H J, Liu F, Du H Y, *et al.* Establishment and susceptibility to cyprinid herpesvirus 2 of *Carassius carassius* gill cell line[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 27: 101382.
- [25] 谭显胜, 段仁燕, 邹乐, 等. 全球气候变暖对极小种群植物扣树生境适宜性的影响 [J]. *生命科学研究*, 2023, 27(1): 56-62.
- Tan X S, Duan R Y, Zou L, *et al.* Effects of global warming on habitat suitability of *Ilex kaushue*, a plant with an extremely small population[J]. *Life Science Research*, 2023, 27(1): 56-62 (in Chinese).
- [26] 王淳一, 赵明月, 赵运成, 等. 气候变化对农业生态系统服务的影响及适应对策 [J]. *生态学杂志*, 2023, 42(5): 1214-1224.
- Wang C Y, Zhao M Y, Zhao Y C, *et al.* A review of the impacts of climate change on agro-ecosystem services and adaptation measures[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2023, 42(5): 1214-1224 (in Chinese).
- [27] Ishaq Ahmed V P, Sarath Babu V, Chandra V, *et al.* A new fibroblastic-like cell line from heart muscle of the Indian major carp (*Catla catla*): development and characterization[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 180-186.
- [28] Jin Y L, Chen L M, Le Y, *et al.* Establishment of a cell line with high transfection efficiency from zebrafish *Danio rerio* embryos and its susceptibility to fish viruses[J]. *Journal of Fish Biology*, 2017, 91(4): 1018-1031.
- [29] Uphoff C C, Drexler H G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2014, 106: 28.4. 1-28.4. 14, doi: 10.1002/0471142727.mb2804s106.
- [30] Jean A, Tardy F, Allatif O, *et al.* Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172358.
- [31] Swaminathan T R, Basheer V S, Gopalakrishnan A, *et al.* A new epithelial cell line, HBF from caudal fin of endangered yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* (Gunther, 1864)[J]. *Cyotechnology*, 2016, 68(3): 515-523.
- [32] Ma Y M, Gao L, Tian Y Q, *et al.* Advanced biomaterials in cell preservation: hypothermic preservation and cryopreservation [J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 131: 97-116.

Study on the stability of SCC-37 acclimated at 37 °C and its application in common virus culture

GONG Jinpeng¹, ZHAO Ying², CHEN Xuelan³, LIN Lingyun¹, YAO Jiayun¹, MU Xuejiao¹,
ZHOU Kexin³, WANG Congxu¹, SHEN Jinyu^{1,3}, PAN Xiaoyi^{1*}

1. Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

2. Huzhou Nanxun Centre for Agricultural Technology Extension and Service, Huzhou 313009, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The SCC-37 cell line was established via acclimation, and the impact of this process on cell characteristics was analyzed. Additionally, the sensitivity of these cells to viruses was assessed, thereby reducing culture costs and laying the groundwork for large-scale vaccine production. In this study, a continuous cell line was derived from the spinal cord tissue of mandarin fish, *Siniperca chuatsi*, using a gradual acclimation process with a serum gradient. The origin of the cell line, mycoplasma contamination status, growth characteristics, and viability after cryopreservation were evaluated. Furthermore, the sensitivity to infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), *S. chuatsi ranavirus* (SCRaV), and *S. chuatsi rhabdovirus* (SCRV) was examined. The cell line, designated SCC-37, has been successfully cultured for up to 30 passages in complete medium (L-15+10%NBCS) at 37 °C. The *S. chuatsi* origin of SCC-37 was confirmed through the *S. chuatsi* 28S rRNA gene. Mycoplasma testing verified that SCC-37 is free of contamination. Sensitivity experiments demonstrated that ISKNV, SCRaV, and SCRv can proliferate and be passaged stably in SCC-37, with virus titers ranging from $10^{3.4}$ to $10^{9.6}$ TCID₅₀/mL. Electron microscopy revealed a high abundance of virus particles in SCC-37 cells. In summary, the newly acclimated SCC-37 cell line provided a crucial tool for virus isolation, identification, and amplification, as well as for vaccine preparation. Its diverse applications merited further investigation.

Key words: *Siniperca chuatsi*; SCC cell line; acclimation at 37 °C; characteristic of growth; sensitivity

Corresponding author: PAN Xiaoyi. E-mail: panxiaoyi@163.com

Funding projects: National Key R & D Program of China (2019YFD0900103); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (ZCLTGN24C1901); Zhejiang "Three Rural Nine" Science and Technology Cooperation Project (2024SNJF053)