



鱼类细胞克隆培养的研究

邓初夏 杨兴棋 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所)

STUDIES OF CLONING TECHNIQUES IN FISH CELLS

Deng Chuxia, Yang Xingqi and Chen Hongxi

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

在哺乳类细胞中,细胞克隆培养已获得了广泛的应用,而在鱼类细胞中,尚未见到有关克隆化培养的报道。建立适合鱼类细胞的克隆培养技术,对于鱼类的细胞生物学、生物化学、病毒学、体细胞遗传学和细胞工程的研究,具有广泛的实用价值。我们成功地进行了鱼类细胞克隆的培养。现将主要试验结果作一简要报道。

1. 克隆的培养与分离 分别取鲫鱼异倍体细胞系(CAB-80)、团头鲂尾鳍细胞系(BCC)、草鱼尾鳍二倍体和四倍体细胞系[GCC 和 GCC(4)]、草鱼肾细胞系(GCK-84)和草鱼囊胚细胞系(GCE)(除后两种细胞为作者培养外,其他细胞均由本研究室提供)进行传代培养,48 小时后,选生长良好的细胞,按有限稀释法或单细胞显微操作法,分别接种于 96 孔微量培养板内进行克隆培养。培养液均采用加有“三抗”和 20% 小牛血清的 TC-199。结果获得 GCC 的 6 个克隆, GCC(4) 的 2 个克隆, GCK-84 的 4 个克隆, GCE 的 4 个克隆, CAB-80 的 7 个克隆, 并从 GCC 的两个克隆中获得 4 个亚克隆, 共得克隆和亚克隆 27 个。

2. 影响克隆率的几种因素 本文研究了几种培养液、血清、谷氨酰胺、维生素 B₆、细胞饲养层等对细胞克隆形成率的影响。结果表明 TC-199 培养液较好, 克隆率最高可达 15%; 在 TC-199 培养液中加入谷氨酰胺或维生素 B₆ 后, 克隆率可提高到 20%; 加入条件培养液或用小鼠脾细胞作饲

养层后, 克隆率则高达 30% 左右。作者发现, 采用罗非鱼细胞作饲养层, 一般可使克隆率提高到 50% 以上, 最高可达 92%。此法与复制培养(replica plating)技术相结合, 可在短期内有效地获得大量克隆。

3. 复制培养法在鱼类病毒研究中的初步应用 当 96 孔板中的大部分克隆长至大半孔时, 用胰酶-EDTA 消化 3—5 分钟, 而后将诸克隆传入另外 3 块板的对应孔中。5 次复制培养试验的统计结果, 表明克隆成活率均在 98% 以上。作者利用该法对草鱼呼肠孤病毒(GCRV)进行了初步研究: 取 30 代的 GCK-84 细胞, 作克隆复制培养, 获得克隆 44 个。待复制品基本长为致密单层时, 将 GCRV 接种于各克隆之上, 均有细胞病变效应(CPE), 但呈现 CPE 的时间有所不同, 快的 2—3 天, 慢的 3—4 天, 最慢的则为 7 天。这表明诸克隆对 GCRV 的敏感性有较大差异。为了进一步定量分析比较, 从复制板的对应孔中将所需的克隆传出扩增, 进行 TCID₅₀ 值测定和噬斑分析。

复制培养法既可在较短时期内获得较多克隆, 又能在培养早期对大量克隆进行分析比较, 选择性地保留少数克隆, 这对于在细胞水平上进行遗传分析和筛选突变体具有重要意义。

1985年1月21日收到。