

研究简报

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、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。