

不同浓度亚油酸对日本对虾肝胰腺传代细胞磷含量的影响*

王宏伟¹ 王安利² 王维娜¹ 刘瑞兰³ 候雅宾¹¹ 河北大学生命科学学院 保定 071002)² 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)³ 西南师范大学生命科学学院 重庆 400715)

摘要 在199培养基中加入促进细胞生长的亚油酸,对日本对虾(*Penaeus japonicus*)肝胰腺细胞进行传代培养,测定传代细胞的总磷、无机磷含量。当亚油酸的加入量为 16×10^{-5} ml/L时,细胞的总磷、有机磷含量均为最高。表明培养基中加入适量亚油酸,可促进日本对虾肝胰腺传代细胞的生长。

关键词 日本对虾(*Penaeus japonicus*), 肝胰腺传代细胞, 磷含量, 亚油酸

中图分类号 S 917.6, Q 954.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0078-03

日本对虾(*Penaeus japonicus*)是一种经济价值很高的甲壳动物。具有生命力旺盛,抗病力强,可短时间离水,利于运输和鲜活上市等优点。近年来,病毒性虾病造成对虾养殖大面积减产,而组织培养技术是研究病毒学的基础^[1]。建立细胞株(系)以供病毒的分离、纯化,并进行各种特性的分析,为进一步研究单克隆抗体奠定基础。培养对虾的细胞是研究对虾免疫机能和筛选免疫增强药物的手段,从而为解决虾病防治问题开辟一条有效途径^[2]。亚油酸是生命活动所必需的不饱和脂肪酸,在培养基中加入适量亚油酸,可促进细胞生长^[3]。以往的研究是测定虾体肌肉、肝胰腺和壳中的总磷、无机磷含量。本实验以培养的日本对虾肝胰腺细胞作为研究对象,以培养细胞中磷含量来评定亚油酸促进细胞生长的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

日本对虾购自河北保定府河市场,体长8.5~10.5 cm,体质量6.13~10.34 g,用配有双抗(1 000 U/mL青霉素,1 000 μg/mL链霉素)的人工海水(盐度35)暂养3 h。

本实验采用199培养基,在其基础上加入NaCl, MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃,葡萄糖,青霉素,链霉素和20%灭活的胎牛血清(传代细胞培养基中为10%的胎牛血清)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞原代培养 取清洁、形态良好的对虾放入75%乙醇中,浸泡体表除菌10 min以上。取出后用剪刀剪取适量肝胰腺(注意不要碰破胃、肠组织),用双抗溶液(1 000 U/mL青霉素,1 000 μg/mL链霉素)浸泡10~15 min,用Hanks平衡盐溶液冲洗3~4遍,加入适量培养基,剪成小于1 mm³的组织块,用取样器接种至培养板上,每孔1滴。静置10 min,待其贴壁后,每孔加入1 mL培养基。将培养板放入CO₂培养箱中,在26℃,供以5%的CO₂培养,每天用倒置显微镜观察并照相,镜检时应用封口膜将培养板封严。自冰海水起,以上操作均在无菌间的超净台上进行,所有物品均需严格灭菌,培养基需用0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌。

1.2.2 肝胰腺传代细胞的培养 培养1周后的原代细胞用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,计数后接

* 河北省重大科技攻关计划项目8593-29号。

第一作者:王宏伟,出生于1970年,讲师,硕士,主要从事水生生物学研究。电话:0312-7940567, E-mail:hw200090@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-06-18;修回日期:2003-05-20

种子新的培养板中,每孔加入 1 mL 培养液。

1.2.3 磷的测定 参照王重庆等用定磷法测定核酸含量的方法^[4]。

1.2.4 亚油酸的添加 在细胞培养技术中,亚油酸是促进细胞生长的物质。本实验培养基中加入以无水乙醇溶解的亚油酸,浓度梯度为 $0, 4 \times 10^{-5}, 8 \times 10^{-5}, 12 \times 10^{-5}, 16 \times 10^{-5}, 20 \times 10^{-5}$ mol/L。分别等量加入进行原代培养日本对虾肝胰腺细胞,再以相同浓度梯度进行细胞传代培养,测定传代细胞中总磷和无机磷含量,并计算有机磷含量。

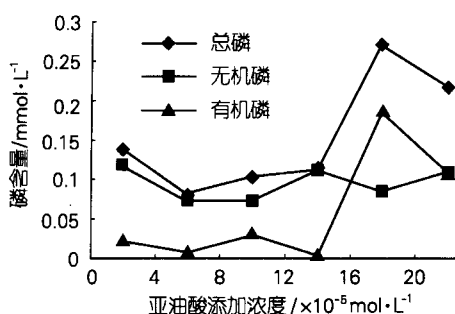


图1 不同亚油酸浓度下日本对虾肝胰腺传代细胞磷含量

Fig.1 The contents of phosphate in subcultured hepatopancreatic cells of *Penaeus japonicus* at different concentrations of linoleic acid

2 结果

在原代和传代培养日本对虾肝胰腺细胞的培养基中加入亚油酸,当加入浓度为 16×10^{-5} mol/L时,传代培养细胞的总磷、有机磷含量均为最高(见图1),与对照组相比差异显著($P = 0.01786 < 0.05$, $P = 0.00013 < 0.05$)。当加入浓度为 20×10^{-5} mol/L时,培养细胞的总磷、有机磷含量也比较高,与对照组相比差异也显著($P = 0.04891 < 0.05$, $P = 0.00139 < 0.05$)。

3 讨论

机体磷的大部分与钙的需求相关联而形成外

壳。磷是磷脂、核酸、磷蛋白、高能化合物许多代谢中间物不可缺少的成分,构成磷脂调节脂肪代谢;构成肌酸、三磷酸腺苷等参与能量代谢、物质合成和信息传递;构成DNA和RNA参与遗传变异;作为酶的辅助因子调节酶的活性^[5]。而在生命活动中发挥重要作用的磷多数为有机磷。

亚油酸是生物体中最重要的必需不饱和脂肪酸,是细胞的组成成分,特别对参与前列腺素、线粒体及细胞膜磷脂的合成有重要作用。其在细胞内氧化分解可产生大量的ATP和乙酰辅酶A,前者是重要的高能磷酸化合物,为生物合成与代谢提供能量与磷酸基团,如为磷脂合成提供有机磷;后者是三羧酸循环的基础,参与各种生命物质的合成与代谢。此外,亚油酸在膜磷脂中的含量可以影响细胞受体的结合,部分酶的活性和膜渗透性^[6],从而影响包括磷在内的各种物质的吸收。

本实验在培养基中加入亚油酸,对日本对虾肝胰腺细胞进行原代和传代培养。结果表明,当亚油酸加入量为 16×10^{-5} mol/L和 20×10^{-5} mol/L时,传代细胞的总磷、有机磷含量均比对照组升高。当亚油酸加入量为 16×10^{-5} mol/L时,传代细胞的总磷、有机磷含量均为最高,说明适量加入亚油酸可以促进细胞体内有机磷的形成,从而促进细胞的生长。

参考文献

- 1 张晓华,宋晓玲,王立平. 中国对虾肌肉组织原代细胞培养初探. 海洋科学,1997(1):13-14
- 2 童裳亮. 海洋动物的细胞培养与应用. 生物工程进展,1994,14(6):47-48
- 3 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京:北京出版社,1995. 40-76
- 4 王重庆,李云兰编. 高等生物化学实验教程. 北京:北京大学出版社,1994. 113-115
- 5 沈同,王镜岩主编. 生物化学(下册). 北京:高等教育出版社,1999. 156-158
- 6 Watkins H. Essential fatty acids in poultry nutrition: Their importance, Metabolic and Physiological significance and feeding considerations. Nutrition Research,1990(10): 325-334

EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF LINOLEIC ACID ON CONTENTS OF PHOSPHATE OF SUBCULTURED HEPATOPANCREATIC CELLS OF *Penaeus japonicus*

WANG Hong-Wei¹ WANG An-Li² WANG Wei-Na¹ LIU Ri-Lan³ HOU Ya-Bin¹

(¹ College of Life Science, Hebei University, Baoding, 071002)

(² College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, 510631)

(³ College of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing, 400715)

Received: Jun., 18, 2002

Key Words: *Penaeus japonicus*, Subcultured hepatopancreatic cells, Contents of phosphate, Linoleic acid

Abstract

Contents of general phosphate and inorganic phosphate of subcultured hepatopancreatic cells of *Penaeus japonicus* were tested after subculturing 72 h by adding linoleic acid which was favorable to the growth of cells into Medium 199. Contents of general phosphate and organic phosphate of subcultured cells reached the maximum at the concentration of linoleic acid, 16×10^{-5} mg/L. The result showed that, the appropriate addition of linoleic acid can improve the growth of hepatopancreatic cells of *Penaeus japonicus*.

(本文编辑:刘珊珊)