

# 近江牡蛎鳃细胞的原代培养

王 彬, 张其中

(暨南大学 水生生物研究所, 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广东 广州 510632)

**摘要:** 采用改良的 DMEM(HG)培养基, 建立了近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)鳃细胞体外培养技术, 包括鳃组织块培养法和胰酶消化培养法。结果表明, 组织块培养法接种 6 h 后, 细胞开始从组织块中迁出, 细胞形态较小, 呈圆形、椭圆形或多边形, 直径 3~6 μm。培养至 3 d 时, 细胞在组织块周围形成生长晕。培养至 6 d 时可进行细胞传代, 本次实验细胞已传至第 6 代。胰酶消化法接种约 2 h 后, 细胞逐渐贴壁, 从形态上主要分为两类, 一类为小型细胞, 形态为圆形、椭圆形或多边形, 直径 3~6 μm, 数量多, 增殖速度较快; 另一类为大型细胞, 形态为圆形、椭圆形或多边形, 直径 10~20 μm, 部分细胞内部含有颗粒, 数量较少, 增殖速度较慢。培养至 2 d 时可进行细胞传代, 传代培养物中的优势细胞皆为小型细胞。本次实验细胞已传至第 6 代。

**关键词:** 近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*); 鳃细胞; 组织块培养; 胰酶消化

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)06-0001-05

近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)具有固着生活、过滤取食和对环境中污染物有较强富集能力等特点, 能指示其生活海区的水质状况, 且分布在近岸海域, 种群数量大而稳定, 能满足重复采样监测的需要, 是合适的海洋环境监测生物, 已被中国“南海贻贝观察体系”选为主要监测生物<sup>[1]</sup>。研究发现近江牡蛎鳃 HSC70 基因对低浓度污染的反应灵敏, 可作为海洋环境污染的潜在早期预警器官和分子<sup>[2,3]</sup>。为了进一步排除外界环境多种因素的影响, 在分子水平阐明近江牡蛎鳃对污染物的反应特点、规律和机制, 需要培养近江牡蛎鳃细胞(培养条件下的鳃细胞的环境条件稳定, 可排除外界干扰), 以其为材料开展系列研究。

自 20 世纪初 Harrison 和 Carrel 创立动物组织和细胞的体外培养方法以来, 脊椎动物的细胞培养已积累了大量研究成果<sup>[4]</sup>, 然而, 软体动物细胞培养却进展缓慢, 仅建立了一种淡水蜗牛胚胎 (*Biomphalaria glabrata* embryonic, BGE)细胞系<sup>[5]</sup>, 此外, 尚未建立起其他软体动物细胞系<sup>[6-8]</sup>。但是, 贝类原代细胞培养已有不少报道<sup>[9,10]</sup>, 其中, 尽管已有牡蛎鳃组织培养方法的论文发表<sup>[11,12]</sup>, 却未见近江牡蛎鳃细胞培养方法的报道, 而该牡蛎对盐度的需求显著低于其他牡蛎种类, 在培养条件和方法上会有明显不同, 因此, 需要建立适合近江牡蛎鳃细胞培养的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

鲜活近江牡蛎取自广东省阳江市程村镇红木山蚝场, 系人工吊养的二龄贝, 平均壳长(8.0±2.0)cm, 平均壳宽(3.0±1.0)cm, 平均体质量(150±25)g。实验前暂养于实验室 2~4 周, 并持续保持充气状态。

### 1.2 药品和试剂

海水晶(广州市海荔水族科技有限公司), 洗必泰液(暨南大学华侨医院), 胰蛋白酶(北京普博欣生物科技有限责任公司), 鼠尾胶原蛋白型(杭州生友生物技术有限公司), DMEM(GIBCO), FBS(杭州四季青)等。

### 1.3 试验仪器

CK40 倒置显微镜(OLYMPUS), KDC-40 低速离心机(中佳), 水套式 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(REVCO), SW-CJ-1F 单人双面超净工作台(BOXUN), 微量有机分析专用超纯水机(颐洋), 电子微量天平

收稿日期: 2009-09-12; 修回日期: 2010-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(40576056, 40976066)资助

作者简介: 王彬(1985-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为动物资源与生物技术, 电话: 15918749860, E-mail: jnwyb020@163.com; 张其中, 通信作者, E-mail: zhangqzdr@126.com

(SARTORIUS), 3150 超声波清洗器(BRANSON), 96901 精密型酸度计(BECKMAN), DX7590 数码照相机(KODAK)等。

## 1.4 溶液配制

**暂养海水:** 以海水晶配成 1.8%(W/V)的人工海水, 并提前充气 24 h 以上。

**无菌海水:** 海水晶 18.0 g, 青霉素  $2 \times 10^5$  UI, 链霉素  $2 \times 10^5$  UI, 卡那霉素 0.1 g, 庆大霉素  $10^5$  UI, 三蒸水定容至 1 000 mL, 经滤纸过滤, 再经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**洗必泰消毒液:** 洗必泰液(浓)4.0 mL, 三蒸水定容至 100 mL, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**抗生素消毒液:** 三蒸水和海水晶配成 1.8%(W/V)的人工海水, 滤纸过滤后, 添加抗生素浓度如下: 青霉素  $4 \times 10^5$  UI, 链霉素  $4 \times 10^5$  UI, 庆大霉素  $2 \times 10^5$  UI, 卡那霉素 0.1 g, 两性霉素 0.004 g, 三蒸水定容至 100 mL, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**D-Hanks 冲洗液:** NaCl14.0 g, KCl0.4 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.134 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.03 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.35 g, 卡那霉素 0.1 g, 青霉素  $2 \times 10^5$  UI, 链霉素  $2 \times 10^5$  UI, 庆大霉素  $10^5$  UI, 三蒸水定容至 1 000 mL, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**胰酶消化液:** 胰蛋白酶 1.25 g, EDTA0.2 g, D-Hanks 定容至 1 000 mL, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**鼠尾胶原溶液:** 以三蒸水和冰醋酸配制, 乙酸终质量浓度为 0.36 g/L, 定容至 100 mL, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后, 加入 0.5 mL 鼠尾胶原原液,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**DMEM(HG)不完全培养基:** DMEM(HG) 13.5 g, Hepes5.98 g,  $\text{NaHCO}_3$ 3.5 g, L-谷氨酰胺 0.3 g, NaCl 4.0 g, 卡那霉素 0.05 g, 两性霉素 0.002 g, 青霉素  $10^5$  UI, 链霉素  $10^5$  UI, 庆大霉素  $5 \times 10^4$  UI, 三蒸水定容至 1 000 mL, 搅拌 2 h 完全溶解后, 经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,  $4^\circ\text{C}$  保存。

**DMEM(HG)完全培养基:** FBS(杭州四季青) 20 mL, DMEM(HG)不完全培养基补加至总体积 100 mL,  $4^\circ\text{C}$  保存。

## 1.5 实验方法

### 1.5.1 取材及消毒

取健康牡蛎清洗后, 置于超净作台中, 去壳, 无菌海水冲洗软体部分数次, 同时以无菌脱脂棉擦去

污物和黏液, 然后剪取鳃部组织, 置于培养皿中, 无菌海水冲洗约 10 次, 投入洗必泰消毒液中, 处理 1 min, 再投入抗生素消毒液中, 处理 15 min, D-Hanks 冲洗约 10 次, 以去除多余的消毒液。

### 1.5.2 接种培养

本实验采用组织块培养<sup>[13,14]</sup>和胰酶消化<sup>[15,16]</sup>两种方法。

**组织块培养:** 将组织块剪成  $1 \text{ mm}^3$  左右的小块后, 选取 25 块组织小块均匀分散排在预先经鼠尾胶原处理的  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶内壁上, 加入 1~2 mL 培养基, 培养基加入量以一薄层液体平铺于瓶底, 同时又不会让组织块移动为宜, 于  $27^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中贴壁培养 18~24 h 后, 加入 5 mL 培养液, 恒温静置培养。

**胰酶消化法:** 将组织块剪成  $1 \text{ mm}^3$  左右的小块后, 选取 25 块组织小块移入清洁的灭菌离心管中, 加入 3 mL 胰酶消化液, 于  $27^\circ\text{C}$  下静置消化 90 min, 加入 3 mL 完全培养基终止消化, 缓慢吹打混匀液体后, 200 目滤网过滤, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 加入不完全培养基重悬, 再次以 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 加入完全培养基重悬, 移入预先经鼠尾胶原<sup>[17]</sup>处理的  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中, 于  $27^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中恒温静置培养。

### 1.5.3 传代培养

原代细胞生长达到培养瓶面积的 70%左右时开始传代。轻轻吹打瓶底, 使贴壁细胞悬浮, 然后将培养液移入离心管中, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 加入完全培养基重悬, 将均匀分散的细胞按 1:2 进行分瓶传代。继续传代采用相同方法进行。

### 1.5.4 形态学观察

接种后, 每天于倒置相差显微镜下观察牡蛎细胞形态, 用数码照相机拍摄照片, 显微测微尺测量细胞直径。

## 2 结果

### 2.1 组织块培养法

接种的组织块半透明, 倒置显微镜下可观察其边缘细胞轮廓。组织块主体细胞形态较小, 有时也可观察到一些大型椭圆细胞(图 1-1 和 图 1-2)。组织块需附着 24 h 以上方可比较牢固地贴壁, 但仍有一部分组织块轻摇即脱壁。

细胞自接种 6 h 后开始从组织块中迁出, 细胞常黏附在一起, 迁出后即贴壁并向四周扩展。培养至

3 d时, 迁出细胞围绕组织块形成生长晕(图 1-1), 即迁出细胞在组织块周围形成的细胞层。组织块周围的细胞较为密集, 向四周分散增殖并逐渐稀疏, 细胞形态较小, 呈圆形、椭圆形或多边形, 直径 3~6 μm, 平均直径为(4.5±1.03) μm(图 1-1 和图 1-2)。随着培养天数的增加, 生长晕日趋明显, 范围也逐渐增大。培养过程中有部分细胞脱落, 但这对其生长影响不大。

培养至 6 d 时在培养瓶局部肉眼可见薄纱状细胞层, 于倒置显微镜下可见大量细胞紧密相连(图 1-3 和图 1-4), 但贴壁不牢, 轻摇培养瓶则可见部分细胞晃动。此时即可进行细胞传代, 传代细胞贴壁不很牢, 要尽量避免过大的震动。3 d 后可再次传代, 但细胞传至第 4 代后生长速度变慢, 需 5 d 以上才可再传代, 本实验细胞已传至第 6 代。

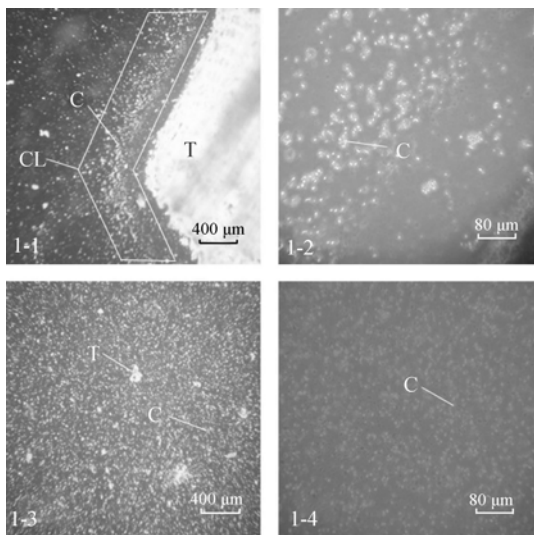


图 1 组织块培养法获得的近江牡蛎鳃细胞

Fig. 1 Oyster (*Crassostrea hongkongensis*) gill cells obtained by tissue culture

1-1 和 1-2. 培养 3 d 的鳃组织(T), 迁出细胞(C)和生长晕(CL); 1-3 和 1-4. 培养 6 d 的鳃组织(T)和鳃细胞(C)

1-1 and 1-2. Gill tissue (T), migrated cells (C) and cell layers (CL) cultured for 3 days; 1-3 and 1-4. Gill cells (C) cultured for 6 days

## 2.2 胰酶消化法

初始接种后, 培养瓶细胞呈悬浮状态, 约 2 h 后, 细胞逐渐贴壁。从形态上区分, 原代培养细胞主要有两类, 一类为小型细胞, 形态为圆形或椭圆形, 直径 3~6 μm, 平均直径为(4.7±0.97) μm(图 2-1); 另一类为大型细胞, 形态为圆形或椭圆形, 直径 10~20 μm, 部分细胞内部含有颗粒, 平均直径为(15.3±3.43) μm(图 2-1)。小型细胞数量多, 增殖速度较快, 在原代培养中后期易聚集为细胞集落; 大型细胞数量较

少, 增殖速度较慢, 只在原代培养前期可观察到少量的细胞密集区。

培养至 2 d 时, 于倒置显微镜下可见大量细胞紧密相连, 但贴壁不牢, 轻摇培养瓶则可见部分细胞晃动(图 2-2)。此时即可进行细胞传代, 传代培养物中的优势细胞皆为小型细胞, 这类细胞最终可形成较密集的细胞集落, 原代培养中的大型细胞, 在传代培养物中仅观察到零星分布, 未再见细胞密集区(图 2-3 和图 2-4)。传代细胞贴壁不很牢, 要尽量避免过大震动。3 d 后可再次传代, 但传至第 4 代后细胞生长速度变慢, 需 5 d 以上可再传代, 本实验细胞已传至第 6 代。

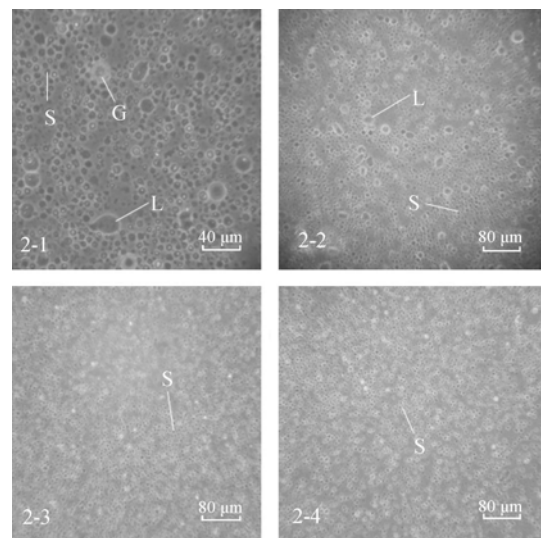


图 2 胰酶消化法培养获得的近江牡蛎鳃细胞

Fig. 2 Oyster (*Crassostrea hongkongensis*) gill cells cultured by trypsinization

2-1. 培养 2 h 的小型鳃细胞(S)、大型鳃细胞(L)和颗粒细胞(G); 2-2. 培养 2 d 的小型鳃细胞(S)和大型鳃细胞(L); 2-3. 培养 5 d 的小型鳃细胞(S); 2-4. 培养 8 d 的小型鳃细胞(S)

2-1. Small gill cells (S), large gill cells (L) and granular cells (G) cultured for 2 hours; 2-2. Small gill cells (S) and large gill cells (L) cultured for 2 days; 2-3. Small gill cells (S) cultured for 5 days; 2-4. Small gill cells (S) cultured for 8 days

## 3 讨论

### 3.1 牡蛎活性对鳃细胞培养成功的影响

实验初期使用的近江牡蛎活性不好, 鳃细胞培养屡次失败。本次实验表明良好的牡蛎活性是原代细胞培养成功的重要前提。暂养过程中, 需要每天检查牡蛎生活状态, 如果贝壳适度张开, 遇刺激很快合上, 则表明牡蛎活性好, 如果遇刺激后缓慢合上, 甚至不能合上, 则表明牡蛎活性差或已死, 捞出弃

之。去壳后,观察牡蛎心脏搏动,选择搏动有力且节奏均匀的牡蛎个体。

### 3.2 消毒方法

暂养过程中,在海水中添加适量抗生素,并隔天换水,可有效去除牡蛎体内的污物和泥沙,为开壳之后的消毒处理奠定良好基础。

牡蛎的鳃与海水直接接触,其组织表面粘有许多细菌和原生动物,因此在培养前必须将其擦净并进行严格的除菌处理,这是决定培养成败的关键因素。贝类消毒方法有多种,李霞等<sup>[18]</sup>在皱纹盘鲍的组织培养中采用 0.1%洗必泰和 1:1 双抗混合液浸泡 20 min,取得良好的杀菌效果;李云玲等<sup>[17]</sup>在菲律宾蛤仔的组织培养中尝试了洗必泰和新洁尔灭的消毒方法,证明在细菌耐药性不断增强和存在海洋弧菌的环境下,采用消毒剂除菌的必要性;朗刚华等<sup>[19]</sup>在对栉孔扇贝外套膜组织的原代培养中采用青霉素、链霉素和复方洗必泰混合溶液除菌,对组织损伤小,除菌彻底。本实验参考了以上多种方法并在实践中不断改进形成了适合近江牡蛎鳃消毒的方法:尽可能地去黏液,采用洗必泰和抗生素联合消毒,并使用含抗生素的无菌海水大量冲洗,可达到去污除菌同时最大限度保持细胞活力的目的。

### 3.3 接种方法

在组织块培养中,崔龙波<sup>[11]</sup>,邓瑞鹏等<sup>[12]</sup>都采用了组织块倒置培养,后补加培养基的常规贴壁法,本实验对该法进行了优化,采用连续微量培养基强行细胞贴壁培养法<sup>[13,14]</sup>,保证培养全程中组织块处于较稳定的渗透压下,最大程度减少对组织块的损伤,为之后的细胞迁出和增殖创造最佳条件。另外,组织培养中需要注意的两个关键操作:(1)切碎组织块及接种时操作都应轻柔细致,尽量减少细胞损伤,并在切碎后低速离心或静置,以减少培养瓶中接种产生的组织碎片,否则细胞生长差,甚至导致正常细胞死亡。(2)组织块应置于 1.5 mL EP 管或青霉素小瓶中切碎,这样可以尽量切得细小,使其有更多的面积与培养瓶接触,从而有利于组织块贴壁和新生细胞迁出。

组织块培养法培养至第 6 天时可传代,以后约 3~5 d 可再次传代。胰酶消化法培养至第 2 天即可传代,以后约 3~5 d 可再次传代。这说明组织块培养法和胰酶消化法都可以获得具有增殖能力的细胞,

但胰酶消化法可以在较短时间内获得大量原代细胞,其细胞增殖速度也高于组织块培养法,这些优点对于毒理实验尤为关键<sup>[12]</sup>。然而胰蛋白酶易损伤细胞,降低其活性,因此合适的胰酶浓度和酶解时间尤为重要,参考史毓杰<sup>[15]</sup>,杨小静等<sup>[16]</sup>的实验结果,结合多次预实验,发现采用 0.125%的胰酶和 0.02%的 EDTA 于 27℃下联合作用 90 min,可达到获取大量原代细胞且保持较高细胞活性的目的。

### 3.4 培养条件

培养过程中为了使细胞能正常生长和增殖,必须创造适宜的条件,尽可能模仿细胞原来生长的环境,包括渗透压、培养温度和培养基等。

渗透压是细胞培养成功的关键,不同动物或同种动物不同组织器官,其合适的渗透压不尽相同。石安静<sup>[20]</sup>在河蚌的组织培养中设计了适合相应动物渗透压的平衡盐溶液和培养基,培养才获得成功。崔龙波等<sup>[11]</sup>在大连湾牡蛎的组织培养中,向 MEM 培养基中分别加入 1.0%、1.5%和 2.0%的 NaCl 饱和溶液,结果表明含 2.0%NaCl 饱和溶液的培养基渗透压较适合大连湾牡蛎血细胞的生长,而鳃和外套膜细胞则在含 1.5%NaCl 饱和溶液的培养基中生长良好,可见同一种动物不同组织的渗透压也略有不同。近江牡蛎适于生活在低渗环境中,本研究参考崔龙波<sup>[11]</sup>,朗刚华等<sup>[19]</sup>的实验结果,在预实验中设置了系列渗透压梯度,结果发现于 1 000 mL DMEM 培养基中添加 4.0 g NaCl,可达到有利于细胞生长和增殖的渗透压。

近江牡蛎是广温性种类,如生活在珠江口及其附近潮间带的近江牡蛎全年要经受水温 10~39℃之间的变化<sup>[21]</sup>。姜德勋等<sup>[22]</sup>对生长温度为 8~38℃的福寿螺采用 37℃的培养温度,明显加快了培养细胞的生长繁殖速度。理论上讲,细胞培养的适宜温度应是培养对象机体正常生理活动的温度,从本实验结果看,在适温范围选用较高温度可使细胞快速分裂增殖。在以后的实验中,可进一步改进培养条件,尝试更高的培养温度。

如今,大部分软体动物细胞培养仍沿用经典的哺乳动物细胞培养基,但由于软体动物与哺乳动物的代谢方式差异颇大,对各种营养因子的需求也很不相同,因此,软体动物细胞培养技术仍不成熟,需要作诸多改进逐步完善培养技术。本实验参考并改进了李云玲<sup>[17]</sup>,孙振兴等<sup>[23,24]</sup>的方法,在 1 000 mL

DMEM(HG)培养基中添加 5.98 g Hepes、0.3 g L-谷氨酰胺、200 mL FBS、0.05 g 卡那霉素、0.002 g 两性霉素、 $10^5$  UI 青霉素、 $10^5$  UI 链霉素和  $5 \times 10^4$  UI 庆大霉素, 结果显示鳃细胞在此改进的培养基中可以较好地生长和增殖。

参考文献:

- [1] 贾晓平, 林钦, 李纯厚, 等. 南海贻贝观察: 广东沿海牡蛎体中 Zn 含量水平及其变化趋势[J]. 海洋环境科学, 2000, **19**(4): 31-36.
- [2] 李春勇. 敌百虫诱导近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)HSC70 基因表达的定量研究[D]. 广州: 暨南大学, 2007. 21-58.
- [3] 张其中, 吴信忠, 高劲松, 等. 近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因 cDNA 片段的克隆及 Southern 杂交和 RT-PCR 分析[J]. 动物学报, 2003, **49**(5): 708-712.
- [4] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及应用[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 77-85.
- [5] Bayne J C, Jowett C, Salvatore P. Low-temperature preservation of the *Biomphalaria glabrata* cell line [J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1997, **29**(3): 332-337.
- [6] Rinkevich B. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements [J]. **Journal of Biotechnology**, 1999, 70: 133-153.
- [7] Rinkevich B. Marine invertebrate cell culture: new millennium trends [J]. **Marine Biotechnology**, 2005, 7: 429-439.
- [8] 刘万磊. 水生无脊椎动物细胞培养[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28: 173-178.
- [9] Lebel J, Giard W, Favrel P, *et al.* Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata* [J]. **Biology of the Cell**, 1996, 86: 67-72.
- [10] Chen S N, Wen C M. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding [J]. **Methods in Cell Science**, 1999, 21: 183-192.
- [11] 崔龙波, 李睿坤. 大连湾牡蛎的组织培养[J]. 海洋通报, 2001, **20**(2):30-34.
- [12] 邓瑞鹏, 韩雅莉, 敖丽梅, 等. 牡蛎鳃组织的培养及 TBTCI 对细胞活力的影响[J]. 海洋环境科学, 2004, **23**(2): 5-7.
- [13] 马世兴, 王峰. 连续微量培养液强行细胞贴壁培养法[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1998, **14**(4): 308-309.
- [14] 刘国红, 柴玉荣, 朱晓燕. 连续微量培养液胃癌组织块贴壁培养法[J]. 肿瘤防治研究, 2008, **35**(2): 147-148.
- [15] 史毓杰, 曾抗, 杨健, 等. 人角质形成细胞的体外改良培养及生物学特征[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, **16**(5): 296-298.
- [16] 杨小静, 李红文, 郑乃刚, 等. 不同质量浓度胰蛋白酶和 EDTA 细胞消化分离液对人表皮细胞生长的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, **43**(1): 81-83.
- [17] 李云玲, 孙振兴, 陈丽媛, 等. 几个因素对菲律宾蛤仔组织培养的影响[J]. 湖北农业科学, 2006, **45**(2): 233-235.
- [18] 李霞, 刘淑范. 皱纹盘鲍的组织培养[J]. 水产学报, 1997, **21**(2): 197-198.
- [19] 朗刚华, 王勇, 刘万顺, 等. 栉孔扇贝外套膜组织原代培养的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, **30** (1) : 123-126.
- [20] 石安静. 河蚌外套膜的组织培养[J]. 水产学报, 1983, **7**(2): 153-156.
- [21] 劳赞. 近江牡蛎养殖技术[J]. 水产科技, 2005, 1: 15-16.
- [22] 姜德勋, 许璞, 沈爱国, 等. 福寿螺足组织和外套膜组织细胞培养的初步研究[J]. 淡水渔业, 2008, **38**(2): 54-59.
- [23] 孙振兴, 张晾, 郝丽红, 等. 菲律宾蛤仔鳃组织的原代培养[J]. 水产科学, 2004, **23**(2): 12-14.
- [24] 孙振兴, 张晾, 刘雪, 等. 菲律宾蛤仔外套膜组织原代培养的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, **28**(3): 79-81.

(下转 21 页)