

菲律宾蛤仔外套膜组织原代培养的初步研究

孙振兴,张 晾,刘 雪,许昌磊

(烟台师范学院生命科学学院,山东 烟台 264025)

摘要 用 E-MEM 培养基对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum* Adams et Reeve)的外套膜组织进行了原代培养。实验结果表明,在 E-MEM 培养基中添加 L-谷氨酰胺、小牛血清、水解乳蛋白等成分,温度为 26~27℃,pH 为 7.4 的条件下,适合外套膜细胞的生长,培养 3 d 时外套膜组织块周围出现迁出的细胞,培养至第 8 天时形成单层增殖细胞。

关键词 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) ;外套膜 ;组织培养 ;原代培养

中图分类号 Q17.S969.3 **文献标识码** A **文章编号** :1000-3096(2004)03-0079-03

作为生物学领域中的一重要技术,动物组织和细胞培养已广泛应用于哺乳动物和鱼类的研究中,并取得了丰硕成果。但由于水生无脊椎动物的细胞培养较困难,难以进行传代,因此至今未得到水生无脊椎动物的连续性细胞系^[1]。在海洋贝类方面,国内外学者在鲍^[2,3]、扇贝^[4]、珍珠贝^[5,6]等的组织培养方面进行了一些探索,但尚未见有关菲律宾蛤仔组织培养的研究报道。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum* Adams et Reeve)广泛分布于我国南北沿海,是一种重要的养殖经济贝类,作为细胞生物学的基础环节,作者对菲律宾蛤仔外套膜组织的原代培养进行了初步研究,以期建立蛤仔的组织细胞培养技术提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用 1~2 龄菲律宾蛤仔购自烟台水产品市场,实验前将活贝放在室内具充气装置的水族箱内暂养 24 h,暂养海水中添加抗菌素,以抑制细菌。Eagle's-MEM(E-MEM)培养基为美国 GIBCO 公司产品,L-谷氨酰胺为北京化学试剂公司进口分装,小牛血清为浙江金华市清湖犊牛利用研究所产品。培养基等按常规方法配制并灭菌^[8]。

1.2 方 法

用解剖器具取出菲律宾蛤仔的外套膜组织,用 70% 酒精棉球快速擦洗,再用含有双抗液(0.1 g/L 青霉素和 0.1 g/L 链霉素)的培养液漂洗 10 次,将组织块剪成 1 mm³ 左右的小块,分散分布在细胞培养瓶内壁上,以组织块培养法进行封闭培养。12 h 后翻瓶添加培养液,以后每隔 2~3 d 更换培养液一次。培养温度为 26~27℃,pH 值为 7.4 左右。根据实验要求分

别向培养基中添加 L-谷氨酰胺、小牛血清等。

2 结果与讨论

2.1 培养基成分的筛选

培养基中不同添加物对菲律宾蛤仔外套膜组织的生存和细胞增生,有很大影响。本实验中,单纯用商售的 E-MEM 培养基进行培养,外套膜组织可以贴壁生长,但持续时间较短,一般存活不超过 6 d。用 E-MEM 培养基作为主要成分,并添加其它物质,可明显地改善培养条件。经多次比较实验,对菲律宾蛤仔外套膜原代细胞生长最为适宜的配方如下: E-MEM 培养基 9.4 g, L-谷氨酰胺 0.3 g, 水解乳蛋白 5.0 g, 小牛血清 100 mL, NaCl 3.5 g, 青霉素 100 mg, 链霉素 100 mg, 加三蒸水至 1 000 mL。使用前用 7.4% NaHCO₃ 将 pH 值调整到 7.4 左右。

对动物细胞来说,商售的合成培养基只能维持细胞的生存,要想使细胞更好地生长和增殖,必须补充天然培养基。李霞等^[2]在培养鲍外套膜时,在 E-MEM 培养基中添加 0.3% L-谷氨酰胺和 2.5% 胰岛素,郎刚华等^[4]在培养扇贝外套膜时,在 199 培养基中添加 20% 小牛血清。本实验中添加了 L-谷氨酰胺、小牛血清、水解乳蛋白等补充成分,都说明了天然培养基对组织培养是不可缺少的。L-谷氨酰胺不

收稿日期 :2003-08-04,修回日期 :2003-12-10

基金项目 :山东省自然科学基金项目(Y2002D12)

作者简介 :孙振兴(1956-),男,山东省烟台人,教授,博士,研究方向为贝类遗传育种 E-mail :sunxz@public.ytptt.sd.cn

仅能为组织和细胞提供必要的碳源和氮源,而且可以促进组织和细胞吸收培养基中的其他氨基酸,从而利于细胞的生长和分裂。水解乳蛋白是用乳蛋白经胰酶消化而制成的一种蛋白冻,含有充分的必须氨基酸,作为培养基的补充成分,能供给组织细胞更多的营养物质。小牛血清含有多种细胞生长因子,在哺乳动物细胞培养中得到广泛应用,但由于软体动物的体液成分与哺乳动物相去甚远,如果添加贝类自身的血淋巴液作为补充成分,可能获得更好的培养效果。Chen^①在 L-15 合成培养基中添加 10% 胎牛血清和 5% 文蛤血淋巴,成功地培养了文蛤鳃组织,就说明了这一点。

2.2 外套膜细胞的生长和增殖

在上述适宜培养基中,菲律宾蛤仔外套膜组织块的贴壁状况良好,培养 3 d 时,在组织块周围出现增生的游离细胞,这些细胞多为圆形或椭圆形的透明细胞,其间夹杂少量上皮样细胞;在倒置显微镜下观

察,细胞从组织块迁出后沿着组织块周围的粘液运动,并逐渐形成生长晕,靠近组织块周围的细胞密集,远离组织块处逐渐稀疏(图 1),还可看到一些游离细胞出现分裂现象,培养至第 8 d 时,形成致密的单层增殖细胞(图 2)。

组织培养过程中,细胞的生长和增殖不仅取决于培养基的营养成分,还取决于培养环境的渗透压、温度、pH 值等因素。本实验中曾用含 2.472% NaCl 的人工海水和含 0.8% NaCl 的 Hank 液作为平衡盐溶液,但皆因渗透压过高,引起细胞失水皱缩,而造成脱落。改用 0.35% NaCl 作为平衡盐溶液,细胞与培养液的渗透压处于等渗环境下,组织块贴壁状态良好,细胞可正常生长和增殖。

适宜的温度是保证细胞在体外生存和正常生长的重要条件。从理论上讲,细胞或组织培养的适宜温度应是培养对象机体正常生理活动的温度,如人和

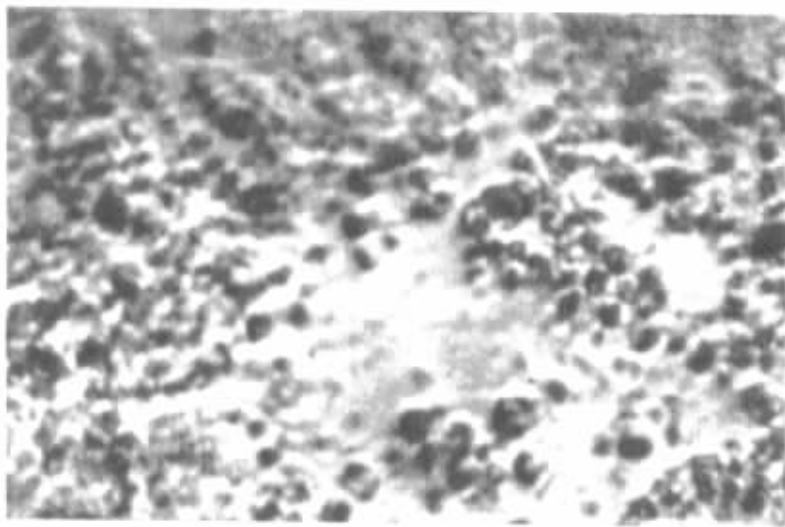


图 1 培养 3 d 的菲律宾蛤仔外套膜细胞(×400)

Fig. 1 The mantle cells of *Ruditapes philippinarum* cultured for 3 days

哺乳动物细胞培养的最适温度为 36~37℃^[7]。对水生变温无脊椎动物来说,其组织细胞培养温度也随培养对象不同而异。虾类细胞培养温度一般以 25~28℃为宜^[8],贝类组织培养的最适温度范围为 26~27℃^[9]。菲律宾蛤仔是广温性贝类,其生长水温为 5~35℃,最适生长水温为 18~30℃^[10]。但作者等在进行菲律宾蛤仔鳃组织培养过程中发现,培养温度 24℃时,细胞生长缓慢;27℃时细胞生长正常;30℃时细胞仍能贴壁生长,高于 33℃时细胞脱落。由此可见,菲律宾蛤仔组织培养的适宜温度较之其生长适温范围狭窄得多。

本实验采用封闭培养,随着细胞的生长和代谢活动的增强,细胞不断释放 CO₂,而使培养液的 pH 值降低,在培养液中添加 NaHCO₃ 以及定期更换培养液等措施,可维持 pH 值的相对稳定,但对细胞生长也有一

① Chen S. Establishment, characterization and application of cell culture from marine fish, crustacean and molluscs. Baltimore: First International Symposium on Marine Molecular Biology, 1988.

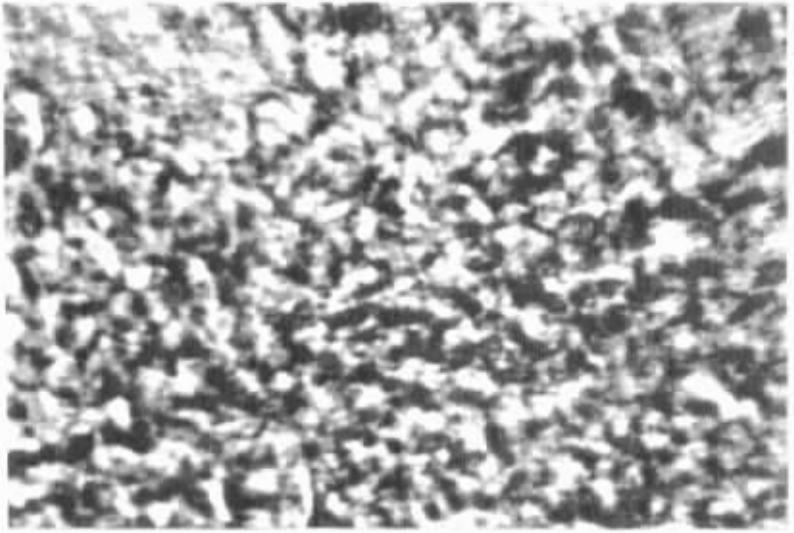


图2 培养8 d的菲律宾蛤仔外套膜细胞(×400)

Fig.2 The mantle cells of *Ruditapes philippinarum* cultured for 8 days

定程度的影响。

参考文献：

- [1] 于森,管华诗,郭华荣,等.鱼类细胞培养及其应用[J].海洋科学,2003,27(3):4-8.
- [2] 李霞,刘淑范.皱纹盘鲍的组织培养[J].水产学报,1997,21(2):197-198.
- [3] 崔龙波,魏峰,陆瑶华.皱纹盘鲍鳃组织培养适宜条件的研究[J].海洋科学,2000,24(7):17-18.
- [4] 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.
- [5] Awaji M, Suzuki T. The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster[J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(5): 747-751.
- [6] Machii A. In vitro studies of pearl formation[J]. *Applied Cell Biol*, 1998, 15(1): 1-10.
- [7] 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.
- [8] 王宏伟,王安利,王维娜,等.对虾细胞培养研究概述[J].生物学通报,2003,38(5):5-7.
- [9] 朗刚华,王勇,刘万顺,等.贝类组织培养及其应用研究[J].海洋科学,2000,24(4):15-18.
- [10] 孙振兴.海水贝类养殖[M].北京:中国农业出版社,1995.147-152.

Primary culture of mantle of *Ruditapes philippinarum*

SUN Zhen-xing, ZHANG Liang, LIU Xue, XU Chang-lei
(Life Science College, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Received: Aug., 4, 2003

Key words: *Ruditapes philippinarum*; mantle tissue culture; primary culture

Abstract: The mantle tissues of clam *Ruditapes philippinarum* were primary cultured in vitro with Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM). The result of experiment showed that L-Glutamine, calf serum and lactalbumin hydrolysate etc. appended to the E-MEM, at temperature 26~27 °C and pH 7.4 were appropriate condition for growth of mantle cells. On the 3rd day of the cultivation, the migrating cells appeared on the sarroundings of the mantle tissue blocks. On the cultured 8th day, a layer of proliferation cells was formed.

(本文编辑 张培新)