

# 金钱鱼肾细胞系的建立及生长特性研究\*

张莹莹 梁雪梅 曾文刚 张俊彬

(上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**提要** 金钱鱼(*Scatophagus argus*)是一种重要的广盐性海水养殖鱼类,可直接在海水、淡水、咸淡水等不同环境中正常生长。为研究金钱鱼独特的渗透调节机制,本文研究了金钱鱼肾细胞的原代和传代条件及其生长特性,结果表明:原代肾细胞在含有 20%胎牛血清(FBS)的 L-15 培养基里贴壁和生长较好,添加 10ng/mL 的碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor)bFGF 能明显促进细胞增殖,传代细胞采用含有 10%胎牛血清的 L-15 培养基,细胞生长迅速,3—4d 即可传代。金钱鱼肾细胞为成纤维样细胞,命名为 SK 细胞,目前已传至 22 代。扩增第 11 代 SK 细胞的细胞色素氧化酶 I(COI)基因,比对结果证明此细胞系来源于金钱鱼。采用 CCK-8 法检测第 12 代细胞在低渗(95, 137, 200mmol/kg),等渗(330mmol/kg)和高渗(430, 550mmol/kg)中的增殖情况,结果发现肾细胞在 137—430mmol/kg 的渗透压范围内均可增殖,说明金钱鱼肾细胞对渗透压的耐受性较强。本试验首次建立了金钱鱼肾细胞系,并初步证明了肾细胞对盐度有较强的耐受性,为今后渗透压调节的深入研究奠定了基础。

**关键词** 金钱鱼;肾细胞系;原代培养;传代培养;渗透压调节

中图分类号 Q253

doi: 10.1111693/hyhz20130131001

金钱鱼(*Scatophagus argus*)又名金鼓鱼,栖息于沿海水域近岸沿礁、海藻丛生地带,常进入咸淡水或淡水河流中,在我国南海及东海南部均有分布。金钱鱼具有较强的抗逆性,可直接在不同的盐度水体中正常生长,是一种典型的广盐性鱼类(蔡泽平等, 2010; 宋郁等, 2012)。

从海水转入淡水或咸淡水过程中,鱼类个体经历剧烈的盐度变化,为了维持鱼体渗透压稳定,必须进行一定的渗透压调节。鱼类的渗透调节能力,反映了他们对水环境的盐度的适应,决定了鱼类的分布区域和活动范围(刘珊等, 2011)。渗透压调节对鱼类生存十分重要,但迄今为止,仍缺乏对其机理的深入研究。目前,关于渗透压调节的研究主要集中在观察鳃丝及鳃细胞变化, Na/K-ATPase 活性和激素变化等方面,实际上,这个过程是由生物体内复杂的信号传导网络控制(Fiol *et al.*, 2007)。哺乳动物渗透调节信号通

路的研究大多是以细胞系为模型,然而,在鱼类研究中,很少有此方面的报道(Chow *et al.*, 2011)。鱼类细胞系是鱼类生物学研究的重要工具,同时也是鱼类基因功能研究的重要材料(任国诚等, 2007)。作为体外研究模型,鱼类细胞系具有诸多的优点:(1)成本低,维护细胞系并不需要大规模的养殖设备;(2)实验条件可重复性,保证实验的精确性;(3)结果精确,避免了外在因素的干扰(张博等, 2010)。

自世界上第一个鱼类细胞系建立以来,鱼类细胞培养技术发展十分迅速,而我国鱼类细胞培养起步较晚,培养技术尚不成熟,尤其是海水鱼细胞培养依然存在很多难点(Qin *et al.*, 2006)。建立海水广盐性鱼类细胞系可为鱼类渗透压调节信号通路研究提供重要的研究模型。2009 年, Lee 等将虹鳟鱼鳃细胞系 RTG-W1 接种在跨膜室上,细胞直接接触淡水或海水,模拟体内环境进行渗透压调节研究。Chow 等(2011)

\*国家科技部“十二五”科技支撑计划, 2011BAD13B00 号;国家自然科学基金项目, 41176109 号。张莹莹, 硕士研究生, E-mail: zhang2yy@126.com

通讯作者: 张俊彬, 教授, 博士生导师, E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

收稿日期: 2013-02-02, 收修改稿日期: 2013-4-23

以日本鳗鳃的原代细胞为实验材料,研究了鳃细胞在不同的渗透压调节下渗透胁迫转录因子(Ostf)的作用机制,为渗透压调节机制的研究开拓了新的思路。然而在国内,尚未有关于此方面的相关报道。本实验首次建立了金钱鱼的肾细胞系,并研究肾细胞的生长特性,为金钱鱼的研究奠定理论和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验鱼** 体重 40g 左右的金钱鱼来自广东省阳江市养殖基地。实验室暂养一个月以上,每天喂食两次。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清(FBS), 0.25%胰酶, L-15 培养基, 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(均购于 GBICO 公司), 青霉素和链霉素(上海微科生物有限公司), DMSO(二甲基亚砷)购于 Sigma, CCK-8 细胞增殖试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 金钱鱼血清渗透压** 取 6 条个体均匀的金钱鱼体重  $(40.71 \pm 2.99)$ g, 体长  $(9.3 \pm 0.2)$ cm, 体高  $(5.5 \pm 0.5)$ cm 用于实验, 尾静脉取血,  $4^{\circ}\text{C}$  静置过夜, 3000rpm 离心 10min。上层黄色透明液体即为金钱鱼血清, 使用 VAPRO-5520 渗透压仪测得金钱鱼血清渗透压, 每个样品重复 3 次。

**1.2.2 配制细胞培养液** 根据测得的血清渗透压使用渗透压仪配制等渗培养基, 其成分如下: 干粉 L-15 培养基定容至 1L, pH 调节至 7.4。原代培养基添加 20%胎牛血清(FBS), 400U/mL 青霉素和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素, 此外, 为了比较碱性生长因子 bFGF 对细胞的作用, 配制两种原代培养基(A:含有 10ng/mL bFGF 和 B:不含 bFGF)。传代培养基添加 10%FBS 和 100U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素。

**1.2.3 原代培养** 取 40g 左右金钱鱼, 用 75%酒精擦拭鱼体, 移至超净工作台内无菌取肾, 放于无菌培养皿内, 用含有 400U/mL 青霉素和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 PBS 液冲洗数次, 洗掉血丝和表面细菌, 用剪刀将肾组织剪成  $1\text{mm}^3$  大小。转移至 15mL 离心管内, 加入 10 倍体积的 0.25%胰酶,  $28^{\circ}\text{C}$  水浴锅消化 20—30min, 期间不断震荡加速细胞分离。消化完成后, 加入含有 20% FBS 的培养基终止胰酶消化, 用 200 目滤网过滤, 将得到的细胞悬液转移至 15mL 离心管中, 1000 r/min 离心 10min, 弃上清液, 分别用 A 和 B 培养基悬浮细胞沉淀, 然后接种于培养瓶,  $28^{\circ}\text{C}$

静置培养, 每日观察细胞增殖情况, 接种后第 2 天更换 1—2mL 新鲜培养基, 以去除血细胞和未贴壁细胞。

**1.2.4 传代培养** 原代细胞长满单层后开始传代培养: 用移液管吸出培养基, 每瓶加入 0.5mL 胰酶-EDTA 消化细胞, 在  $28^{\circ}\text{C}$  培养箱内放置 1min, 显微镜下观察细胞开始变圆时立即加入培养基终止胰酶消化, 初次传代按 1:1 比例传代, 此后按 1:2 或 1:3 比例传代。

**1.2.5 冻存与复苏** 取对数期生长的肾细胞, 胰酶消化, 1000r/min 离心 10min, 弃掉上清, 向沉淀中加入细胞冻存液(含 20% FBS 和 10% DMSO 的 L-15 培养液), 用吸管轻轻吹打使之充分悬浮, 将细胞悬液转移到细胞冻存管中, 使用梯度降温冻存盒, 在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜后转至液氮中长久保存。细胞复苏时, 取出液氮中冻存 1 年的金钱鱼肾细胞(SK), 迅速置于  $40^{\circ}\text{C}$  水浴中加速冻存液融化。待冻存液即将完全融化时, 将细胞转移至 15mL 离心管中, 添加 10 倍体积的 L-15 培养基稀释, 1000 r/min 离心 10min, 用含有 20% FBS 的 L-15 培养基充分悬浮细胞, 按上述培养条件进行培养, 取少许细胞用台盼蓝染色检测细胞存活率。

**1.2.6 细胞来源鉴定** 酚-氯仿法提取第 11 代 SK 细胞全基因组 DNA。具体方法如下: 0.25 胰酶-EDTA 消化 1 瓶第 11 代 SK 细胞, 1000r/m 离心 5min, 吸掉上清, 加入 1mL 预冷的 PBS(pH7.4)漂洗两遍, 得到的细胞沉淀加入 300 $\mu\text{L}$  细胞裂解液 [10 mmol/L Tris-HCl 和 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 8.0],  $56^{\circ}\text{C}$  孵育 1h。细胞消化液经过饱和酚/氯仿-异戊醇抽提, 无水酒精沉淀, 最后溶解于双蒸水中。紫外分光光度计测定 DNA 浓度。所得 DNA 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

PCR 扩增金钱鱼 SK 细胞线粒体 COI 基因的 DNA 片段(Zhang, 2011)。50 $\mu\text{L}$  反应体系中, 包括 5.0 $\mu\text{L}$  10XPCR buffer, 2.0 $\mu\text{L}$  dNTP (10mmol/L), 33.4 $\mu\text{L}$  去离子水, 引物(表 1)各 0.25 $\mu\text{L}$  (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 2.0 $\mu\text{L}$  模板 DNA 和 0.3 $\mu\text{L}$  1.25U Ex Taq DNA 聚合酶(Takara)。反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $52^{\circ}\text{C}$  30s,  $72^{\circ}\text{C}$  40s, 30 个循环, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物在 1%琼脂糖胶上检测扩增条带, 对目的条带进行回收纯化, 送至上海美吉生物有限公司测序。使用 BLAST 对测序结果进行比对分析。

**1.2.7 肾细胞增殖实验** 通过加 NaCl 和水调整培养基渗透压, 分别配制浓度为 95、137、200、330、430、550 mmol/kg 的培养基(10% FBS, 不含抗生素)。

表 1 扩增 COI 基因引物  
Tab.1 The COI primers

引物名称	序列(5'—3')
上游引物 A-1	CGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
上游引物 A-2	AACCAACCACAAAGACATTGGCAC
下游引物 B-1	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
下游引物 B-2	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA

消化第 12 代肾细胞, 用等渗培养基充分悬浮细胞, 使用血球计数板计数后调整细胞浓度, 按每孔 100 $\mu$ L, 5000 个细胞的密度接种到 96 孔板, 分为 6 组, 每组 3 个平行, 一个空白对照。接种 6h 后更换上述培养基。分别孵育 24h、48h、96h, 每孔加入 10 $\mu$ L cck-8 液, 3h 后用酶标仪检测 450nm 波长的吸光值。

**1.2.8 肾细胞最适培养条件的确定** 比较不同培养基及血清浓度对细胞增殖速率影响的方法同上述肾细胞增殖实验。其中, 最适血清浓度更换的培养基分别为含有 5%、10%、15%、20%FBS 的 L-15, 培养温度为 28 $^{\circ}$ C。最适培养基更换的培养基分别为 MEM、L-15 和 1640, 血清浓度为 10%, 培养温度为 28 $^{\circ}$ C。

## 2 结果

### 2.1 金钱鱼血清渗透压

采用 VAPRO-5520 渗透压仪测得金钱鱼血清渗透压为 321.1 $\pm$ 3.54 mmol/kg。根据金钱鱼渗透压配制等渗培养基, 按照上述配方配制培养基, 使用渗透压仪测得培养基渗透压为(323 $\pm$ 3.23) mmol/kg。

### 2.2 原代培养

实验比较了 bFGF 对原代细胞增殖的影响, 见表 2。加入 10ng/mL bFGF 的原代肾细胞, 第 4 天开始有细胞迁出, 第 7 天细胞铺满瓶底 80%, 原代培养周期

为 7 天, 图 1 是加入生长因子(bFGF)组肾细胞向外迁出。不加 bFGF 的肾细胞生长较缓慢, 第 11 天有细胞迁出, 14 天铺满瓶底 80%, 原代培养时间长达 14d。结果表明: 添加 10ng/mL 的 bFGF 能明显促进肾细胞的增殖, 明显缩短原代细胞培养的时间。

表 2 bFGF 对肾细胞贴壁和增殖的影响  
Tab.2 bFGF effects on the adherence and proliferation of SK cells

培养基	细胞贴壁时间(d)	细胞迁出时间(d)	铺满瓶底时间(d)
不含生长因子	1	11	14
含生长因子	1	4	7

### 2.3 传代培养

原代细胞铺满平底 80%开始传代, 首次传代细胞按 1:1 的比例传代, 即原瓶传代, 此后按 1:2 或 1:3 比例传代。传代细胞 3—4h 贴壁, 为成纤维样细胞(图 1)。传代细胞(图 2)生长迅速, 3—4d 即可传代。前 5 代细胞血清浓度仍为 20%, 5—10 代降至 15%, 10 代后为 10%。目前, 金钱鱼的肾细胞已传至 22 代。

### 2.4 冻存和复苏

复苏液氮冻存一年的第 7 代 SK 细胞, 台盼蓝染色测得细胞存活率为 70%, 细胞接种后 6h 内贴壁, 形态未发生变化, 6 天铺满单层。

### 2.5 COI 基因序列测定和比对分析

扩增 SK 细胞线粒体 COI 基因以证明此细胞系来源。提取第 11 代 SK 细胞全基因组 DNA, PCR 扩增获得 756bp 的条带(图 3)。测序图谱中未出现叠峰, 表明所扩展对象来源单一。在 NCBI 上对测序结果进行 BLAST 比对分析, 结果显示, PCR 扩增出的片段与 GenBank 中公布的金钱鱼 COI 片段(EF607516.1)序列相似性为 100%, 表明 SK 细胞来源于金钱鱼。

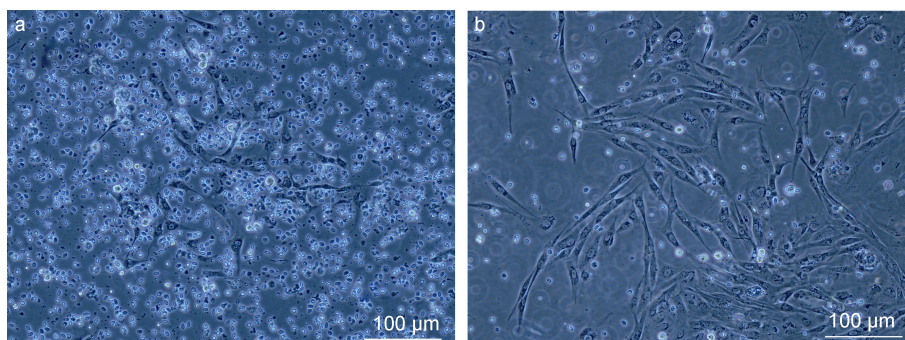


图 1 金钱鱼原代培养细胞

Fig.1 Primary culture of SK cells

A: 加入 bFGF 第 4 天金钱鱼肾细胞 B: 加入 bFGF 第 6 天金钱鱼肾细胞

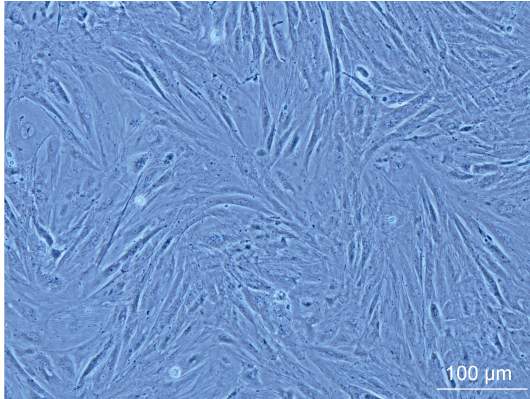


图 2 金钱鱼 12 代肾细胞  
Fig.2 SK cells at 12<sup>th</sup> generation

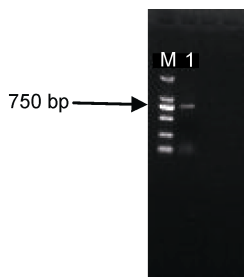


图 3 SK 细胞线粒体 COI 基因 PCR 扩增产物  
Fig.3 COI amplification product for SK cells  
M: 100bp marker; 1: COI 扩增产物

### 2.6 肾细胞增殖实验

肾细胞在不同的渗透压条件下(137—430mmol/kg)都可快速增殖(图 4)。3 天后,培养基渗透压为 95、137、200、330、430、550mmol/kg 的细胞的增殖倍数分别为 0.87、2.29、4.42、3.76、3.09、1.39 (增殖倍数=第 3 天 OD 值/第 0 天 OD 值)。其中在 200mmol/kg 的培养基中增殖速率最高,在 430mmol/kg 的高渗环境中细胞也增殖了两倍,表明金钱鱼肾细胞可以在较广的渗透压范围条件下生长。

### 2.7 肾细胞最适培养条件的确定

肾细胞在不同血清浓度培养基中增殖速率不同,其中在 15%和 20%FBS 的培养基中增殖速度最快,在 5%FBS 培养基中增殖缓慢(图 5)。

肾细胞在不同培养基中增殖速率不同,其中在 L-15 培养基中增殖速度最快,在 M199 和 1640 中增殖较慢,说明 SK 细胞的最适培养基为 L-15(图 6)。

## 3 讨论

细胞系为鱼类研究提供了强有力的工具。近年来,我国海水养殖业日益壮大,海水鱼细胞系的重要性

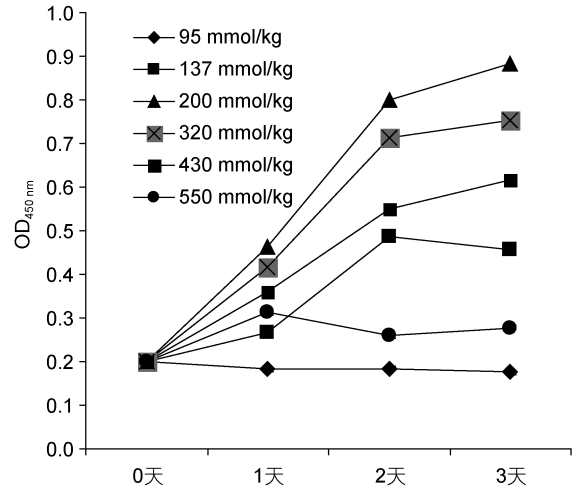


图 4 SK 细胞在不同渗透压条件下的增殖情况  
Fig.4 The proliferation rate of SK cells in different osmotic media

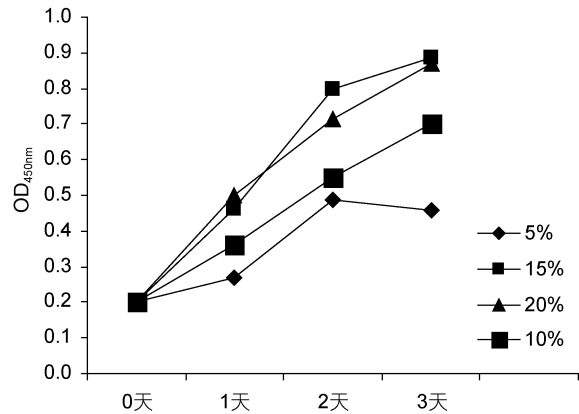


图 5 SK 细胞在不同血清浓度培养基中的增殖情况  
Fig.5 The proliferation rate of SK cells under different concentrations of fetal bovine serum

了受到了广泛的关注,然而,我国已建立的海水鱼类细胞系还很少(Chen *et al*, 2005; 张博等, 2010)。本研究首次建立了金钱鱼肾细胞系,为金钱鱼免疫学,基因功能学等方面的研究奠定了基础,同时丰富了我国海水鱼类系资源。

本实验采用胰酶消化法成功启动了金钱鱼肾细胞的原代培养,SK 细胞在含有 10%FBS 的 L-15 培养基中稳定传代。SK 细胞为成纤维细胞,混杂少量的上皮样细胞。组织块法和胰酶消化法是原代培养常用的培养方法。相对胰酶消化法,组织块法周期较长。Wazir 等(2010)采用组织块法建立的 CCF(鲤鱼鳍细胞)和 CCH(鲤鱼心脏细胞)细胞系,原代培养周期为 21 天。采用此方法的异源四倍体鲫肾细胞原代培养长达一个月(邓云等, 2006)。本实验采用 0.25%胰酶消化法,

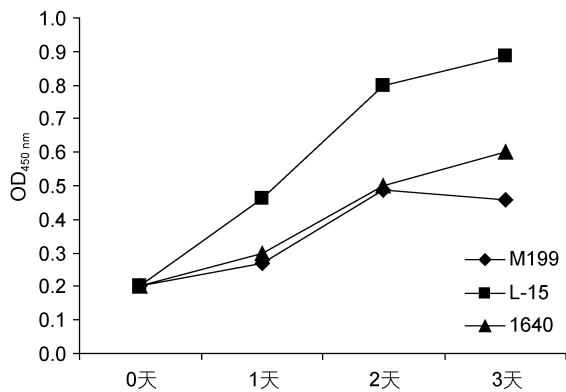


图 6 SK 细胞在不同培养基中的增殖情况

Fig.6 The proliferation rate of SK cells in different media

原代细胞长满单层的时间仅为 7 天, 明显缩短了培养周期。

鱼类常用的培养基包括 MEM、L-15 和 M199。其中 L-15 培养基配方中不含碳酸氢钠缓冲系统, 不需要 CO<sub>2</sub> 平衡环境, 广泛地应用于鱼类细胞培养。该培养基平衡环境不需要 CO<sub>2</sub>, 降低了细胞对培养环境的要求, 同时也降低了污染的几率。鉴于 L-15 培养基的诸多优点, 超过 80% 的鱼类细胞系选择该种培养 (Zhao *et al*, 2003; Qin *et al*, 2006; Lakra *et al*, 2011)。在原代细胞培养时, 比较了 DMEM、DMEM-f12 及 L-153 种培养基的培养效果 (数据未列出), 其中 DMEM 和 DMEM-f12 由于需要 5% 平衡环境, 培养基的 pH 变化明显, 实验效果不理想。L-15 培养基只需要大气环境, 因此实验采用封闭式培养, 培养基的 pH 波动很小, 实验效果理想。

细胞培养液在合成培养基的基础上通常需要添加一些天然成分, 如血清、生长因子等 (樊廷俊等, 2007)。血清是培养液中最常见的添加物, 一般选用品质较好的胎牛血清 (曾令兵等, 2009)。在一般鱼类细胞培养中添加量为 10%—20%, 在此范围内, 高浓度的血清可以明显促进细胞贴壁和增殖 (魏云波等, 2011)。本实验原代培养采用 20% FBS, 传代培养至 5 代后降至 10%。细胞贴壁较好, 增殖迅速, 3—4d 即可传代。选用重组人 bFGF 作为刺激因子, 在 10ng/mL 的浓度下, bFGF 可明显促进细胞增殖, 在第 4 天细胞开始迁出, 第 7 天长满单层, 显著缩短了原代细胞培养的时间。鱼类细胞加入 bFGF 可以显著提高细胞的增殖速率。

鉴定细胞系来源是确保实验准确性的必要步骤 (Wazir *et al*, 2010)。本研究扩增 SK 细胞线粒体 COI

基因以证明此细胞系来源。PCR 扩增出的片段与 GenBank 中公布的金钱鱼 COI 片段 (EF607516.1) 序列相似性为 100%, 证明 SK 细胞来源于金钱鱼。COI 基因序列被认为是一种物种鉴定的有效标记, 广泛应用于物种的分类和系统发育研究 (Hebert *et al*, 2003; Hebert *et al*, 2004; Xiao *et al*, 2004)。Cooper (2007) 使用 COI 基因鉴定了 67 种细胞系的来源。Wazir 等 (2010) 的研究结果也证明了 COI 基因作为细胞系来源鉴定的有效性。本次研究表明 SK 细胞 COI 基因与金钱鱼相似度为 100%, 再次证明了 COI 基因是细胞系来源鉴定的重要工具。

细胞增殖实验结果显示, SK 细胞可以耐受 137—430mmol/kg 的渗透压范围, 具有较强的渗透压耐受性, 对盐度的适应性广, 符合金钱鱼抗逆性强的特性。Sandbichler 和 Pelster (2005) 指出, 体外培养的细胞例如 RTgill-W1 (虹鳟鳃细胞系), 当渗透压发生显著的变化时, 细胞内表达一些参与渗透调节相关蛋白, 以保护细胞免受外界的伤害。Lee 等 (2009) 证明 RTgill-W1 对渗透压的耐受力很强, 可以在 175—550mmol/kg 的渗透压范围内生存。本实验的金钱鱼肾细胞可以在 137—430mmol/kg 的渗透压范围生存, 对渗透压有较大的耐受性, 这一点类似于 RTgill-W1 细胞。然而, SK 细胞对低渗环境的耐受性更强, 而高渗环境对细胞的伤害较大。其中, SK 细胞在 200mmol/kg 的低渗环境中增殖最快, 这可能是由于 SK 细胞在低渗环境中启动了某种刺激细胞的增殖, 有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 邓 云, 刘少军, 张轩杰等, 2006. 异源四倍体鲫鲤鱼肾细胞培养的初步研究. 湖南师范大学自然科学学报, 29(1): 74—77
- 任国诚, 陈松林, 沙珍霞, 2007. 漠斑牙鲆胚胎细胞系的建立与鉴定, 14(4): 579—583
- 刘 珊, 李 冰, 张成峰等, 2011. 硬骨鱼类渗透调控的研究进展. 安徽农业科学, 39(20): 12239—12242
- 宋 郁, 苏冒亮, 张俊彬等, 2012. 金钱鱼幼鱼低温耐受能力和饵料营养需求的研究. 上海海洋大学学报, 21(5): 715—719
- 张 博, 陈松林, 2010. 近 10 年鱼类细胞培养研究进展及应用展望. 海洋科学学报, 35(7): 113—121
- 曾令兵, 李晓莉, 张 林等, 2009. 斑点叉尾鲷肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国水产科学, 16(1): 76—81
- 蔡泽平, 王 毅, 张俊彬等, 2010. 金钱鱼繁殖生物学及诱导



- 产卵试验. 热带海洋学报, 29(5): 180—185
- 樊廷俊, 耿晓芬, 丛日山等, 2007. 大菱鲆细胞系的建立. 中国海洋大学学报, 37(5): 759—766
- Chen S L, Ren G C, Sha Z X *et al*, 2005. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 249: 63—68
- Chow S C, Wong C K, 2011. Regulatory function of hyperosmotic stress-induced signaling cascades in the expression of transcription factors and osmolyte transporters in freshwater Japanese eel primary gill cell culture. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 1264—1270
- Cooper J K, Sykes G, King S, 2007. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 43: 344—351
- Fiol D F, Kültz D, 2007. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS Journal*, 274: 5790—5798
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L *et al*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 313—321
- Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S *et al*, 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PloS Biology*, 2(10): 1657—1663
- Lakra W S, Goswami M, Rajaswaminathan T *et al*, 2010. Development and characterization of two new cell lines from common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). *Biological Research*, 43: 385—392
- Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P, 2011. Development, characterisation, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 1—20
- Lee L E, Dayeh V R, Schirmer K *et al*, 2009. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45: 127—134
- Qin Q W, Wu T H, Jia T L *et al*, 2006. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *Journal of Virological Methods*, 131(1): 58—64
- Sandbichler A M, Pelster B, 2005. Osmolarity-induced changes in trout gill epithelial cells on permeable supports. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(3): 197—198
- Xiao J H, Xiao H, Huang D W, 2004. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 50(5): 852—855
- Zhang J B, 2011. Species identification of marine fishes in China with DNA Barcoding. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi: 1155/2011/978253
- Zhao Z, Mont gomery Brock D, Lee C S, 2003. Establishment characterization and viral susceptibility of 3 new cell lines from snakehead *Channa striatus* (Blooch). *Methods in Cell Science*, 25: 155—166

## ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A NEW EURYHALINE FISH KIDNEY CELL LINE OF SPOTTED SCAT *SCATOPHAGUS ARGUS*

ZHANG Ying-Ying, LIANG Xue-Mei, ZENG Wen-Gang, ZHANG Jun-Bin  
(College of Fisheries & Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** Spotted scat *Scatophagus argus* is a euryhaline fish and they could live in seawater, freshwater, or brackish water. We established and characterized a new kidney cell line (SK) of the fish, and successfully subcultured SK to the 22th generations at present. The results showed that the primary cells grew well in L-15 medium with 20% fetal bovine serum (FBS), and adding 10ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) could increase significantly the growth rate. Subcultured cells were maintained in L-15 medium with 10% FBS and could be passaged in 3—4 days. SK cells were observed fibroblastic. PCR amplification of 1 cytochrome oxidase subunit I (COI) for the cells of 11th generation confirmed the origin of this cell line. The CCK-8 method was used to detect the proliferation rate for the twelfth SK cells in hypotonic (95, 137, 200 mmol/kg), isotonic (330 mmol/kg), and hypertonic (430, 550 mmol/kg) conditions. Therefore, the SK cells were able to proliferate in the wide range from 137 to 430mm/kg osmotic pressure.

**Key words** *Scatophagus argus*; kidney cell line; primary culture; subculture; osmoregulation