

鱼类细胞的培养及其染色体标本的制备

吴政安

(中国科学院发育生物学研究所)

自桑福德 (Sanford) 等从哺乳类动物的长期培养细胞成功地获得细胞克隆 (Clone)^[1] 以来,随着技术的提高与合成培养基的确立,组织培养法在体细胞遗传学、发育生物学、免疫学、肿瘤学及细胞工程学等研究领域中都得到了越来越广泛的应用。当前,在包括人类在内的哺乳类动物细胞遗传学的研究中,尤其在染色体组型的分析中,组织培养法正在发挥它的重要作用。

近年来,已经可以借助于染色体上物质分布的不均一性,用显带技术使染色体上的特定的部位显出带谱,并以此来鉴别每一条染色体及其特定的部分。然而,这种染色体的显带技术,有赖于稳定而清晰的染色体标本的大量的供应。利用细胞培养法制备染色体标本,有助于达到此目的。因此,在染色体组型的分析中,细胞培养法已成为一项不可缺少的技术。

鱼类组织培养的研究开始于 1914 年。当时,奥朔斯吉 (Osouski) 曾将一种鳟鱼 (*Salmo trutta*) 的胚胎取出来放在由 Ringer 溶液和青蛙血清组成的培养液中培养,使其维持了大约 24 小时。随后,丹特罗 (Denderer) 于 1921 年培养了底鳉属鱼 (*Fundulus*) 的胚胎,连续观察了 10 天的心脏跳动。直至 1941 年,格兰德 (Grand) 等及施列姆堡 (Schlemberger) 分别培养了底鳉属鱼和金鱼的肿瘤组织。

鱼类细胞培养的研究开展得较晚,大约比哺乳类晚 10 年左右。众所周知,所谓合成培养基是 50 年代确立并得到推广应用的。在鱼类方面,沃尔夫 (Wolf) 等首先利用了合成培养基。随后不久,克莱姆 (Clem) 等建立了鱼类的第一个单层培养细胞系。在 1962 年, Wolf 和奎因伯 (Quimby) 用硬头鳟 (*Salmo gairdneri*)

的生殖腺培养出鱼类的第一个细胞株,取名 RTG-2 株而开始市售。早年的鱼类细胞培养技术,主要是迫于鱼病毒的研究而发展起来的。最近 10 年来,为了满足鱼类染色体研究的迫切需要,分别发展了血液培养 [小岛 (Ojima)、吴政安和杨慧一]^[1]、鳞片培养 (Ojima 等)、肾细胞培养 [山本 (Yamamoto) 和 Ojima; 吴政安和杨慧一]^[1]、鳞与鳍的混合培养林 [(Hayashi) 等]^[1],以及眼胚 (eyed embryo) 的培养 [Ojima 和上田 (Ueda) 等]^[1] 方法。

一般来说,鱼类细胞的染色体比哺乳类的小,染色体数目亦较多。因此,精确的染色体组型分析及染色体显带分析,均有赖于鱼类细胞的培养及其培养细胞的染色体标本制备技术的不断地改进与完善。

本文根据作者近年来的工作^[1],以及在国外短期工作中所获得的一些研究结果与文献^[2-7],对鱼类细胞的培养及其染色体标本的制备,做一简单的介绍。

一、鱼类细胞培养的一些准备工作

(一) 灭菌 众所周知,细胞培养必须在无菌条件下进行。通常可以在无菌培养室、无菌操作箱或超净工作台内操作。培养液和器具等的灭菌,可分别沿用一般微生物学研究所采用的一些灭菌法(例如干热灭菌、高压蒸气灭菌和过滤灭菌等)。最常用的灭菌法是高压蒸气灭菌,即通过在一个大气压、120℃ 的高压蒸气下保持 15—30 分钟来完成灭菌。吸管及培养

1) 克隆 (Clone)——亦称无性繁殖系,最早于 1903 年由韦布 (Webber) 命名。一般指由一共同的细胞或生物,经无性繁殖而产生的一群基因型完全相同的细胞或生物。

瓶等,使用时必须保持干燥的玻璃用具,可在高压蒸气灭菌之后,再置于烤箱内烘烤或采用干热灭菌(180℃,保持30—60分钟)方法。容易受高温影响而变质的培养液及其他溶液,必须采用微孔滤膜(Millipore)过滤器进行过滤灭菌。一般使用孔径为0.2—0.45微米的微孔滤膜。

(二) 培养液 从目前的情况看来,对于淡水鱼类,一般直接沿用哺乳类细胞培养所使用的一些培养液。如, Eagle 氏基础培养液(简称 MEM)、TC-199 或 RPMI-1640 等。有时,将其盐浓度调整至淡水鱼生理盐水(表1)的水平再使用。Ojima 等(1971)曾指出,对于原代培养,使用以淡水鱼生理盐水溶解的氨基酸和维生素含量增强至4倍的 Eagle 氏基础培养液效果较好。

表1 各种培养液中的盐浓度的比较

	鱼类生理盐水		Eagle MEM	TC-199
	淡水鱼	海水鱼		
NaCl	7.5g/l	13.5g/l	6.8g/l	6.8g/l
KCl	0.2	0.6	0.4	0.4
CaCl ₂	0.2	0.25	0.2	0.2
NaHCO ₃	0.2	0.2	1.2	1.0
NaH ₂ PO ₄	—	—	0.115	—
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	—	—	0.125
MgCl ₂	—	0.35	—	—
MgSO ₄	—	—	0.0935	0.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—	0.0001

在盐浓度上,哺乳动物的培养液与淡水鱼的生理盐水很相似,但海水鱼则不然。因其盐浓度较高,必须相应地把盐浓度提高之。一般可以将 NaCl 的浓度提高 0.06M,即在哺乳动物的盐溶液中加入 3.51 克/升的 NaCl。曾经有人使用在海水鱼的生理盐水中溶解了维生素和氨基酸含量增强至4倍的 Eagle 氏基础培养液,成功的从鳍的培养获得了硫球光鳃鱼(*Chromis isharae*)的细胞系。

通常,在培养液中加入 10—20% 的胎牛血清或小牛血清,以利于细胞的增殖。另外,也

加入适量青霉素(100 国际单位/毫升)、链霉素(100 微克/毫升)、卡那霉素(60 微克/毫升)或两性霉素 B(2.5 微克/毫升),以防止细菌和霉菌的感染。在一些培养液中,还加有制霉菌素(50 国际单位/毫升)。

(三) 培养温度 鱼类是变温脊椎动物,它广泛地生活在热带至寒带、浅海至深海的各种不同的水域中。因此,细胞培养的温度,亦颇难一概而论。应该说,鱼类细胞的培养温度是一个复杂而微妙的问题,必须具体分析种类,主要参考其生活环境的温度而定。尽管细胞能够增殖的温度范围较大,但总是存在最适温度。譬如,鲫鱼和泥鳅等的来自鳍的细胞培养系,可以在 5—25℃ 增殖,但其最适温度为 25—32℃。超过此范围时,细胞增殖率下降。硬头鳉的培养细胞系,也可以在 5—35℃ 增殖,但细胞在 20℃ 左右增殖最佳。金鱼的细胞可在 15—35℃ 培养,甚至在 40℃ 亦可生存,但目前所获得的细胞系,分别是在 31℃ 和 37℃ 下增殖的两种细胞系。

(四) pH 值 一般认为,最适 pH 值为 7.2—7.4,有些鱼类细胞可在 pH 7.0—7.8 的范围内增殖。通常,pH 值低于 7.2 或高于 7.8,细胞增殖率显著下降。但是,根据作者的经验,使用 RPMI-1640 培养液培养淋巴细胞,其 pH 值保持 6.9—7.2 为宜。在含 CO₂ 的气相条件下培养时,可用 NaHCO₃ 调整 pH 值。密封培养时,若使用 HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 缓冲剂) [10—25 毫克分子 (mM)] 或磷酸缓冲液,培养液的 pH 值可以保持稳定。

二、可供培养的组织

眼胚、稚鱼、幼鱼和成鱼等均可供培养,但一般来说,使用胚胎或年幼个体更容易培养成功。

(一) 外部组织 在鱼的体表上,往往附着有细菌、霉菌和原生动等。因此,外部组织的培养易受感染。通常可利用各种消毒液和抗菌素来减少污染。

使用 70% 的酒精灭菌, 杀菌效力固然很强, 但过度的处理, 又往往造成细胞的死亡而使培养失败。因此, 鳍和鳞片的灭菌, 可使用 1% 次氯酸钠溶液。其具体做法如下: 在灭菌的培养皿中放入鱼类的生理盐水, 将鳍浸泡于其中, 以镊子夹住鳍的一端, 在溶液中摆动冲洗, 此时可见外表的细胞层发白并脱落。鉴于这些脱落的细胞即使贴附于培养器底部, 其增殖亦颇迟缓或者只经过几代即脱落, 故尽可能在灭菌过程中冲洗掉。鳍经 1% 次氯酸钠溶液浸泡处理大约一分钟后, 使用无菌生理盐水冲洗, 然后再用 TC-199 或其他培养液洗二次。也有些人将 70% 酒精灭菌与 1% 次氯酸钠灭菌二者结合起来的。即, 先用 70% 酒精轻微而迅速地冲洗一下, 接着再用 1% 次氯酸钠灭菌。鳃是很适于培养的组织, 但由于它的结构复杂, 不容易灭菌。Wolf 等曾经把鳃放在含有 500 单位多粘菌素 B、500 微克新霉素和 40 单位 Vantracin 的生理盐水中浸泡数小时, 获得无菌的鳃。

(二) 内部组织 凡健康鱼的内部器官, 除消化道之外, 一般都处于无菌状态。因此, 在剖腹取材时, 只要注意防止体表及消化道的污染即可。

在取内部组织时, 可麻醉鱼, 先后用 70% 酒精和 1% 次氯酸钠溶液浸泡, 再用灭菌的脱脂棉擦干体表。小型的鱼, 可在消毒液中去鳞, 这一方面可使剖腹容易进行, 另一方面又可以减少污染。在操作中, 必须注意勿损伤消化道, 并不要过分压迫消化道而使粪便被挤压出来。所摘除出来的脏器, 可在培养液中冲洗, 除去附在上面的血液、脂肪及其他不必要的组织。迄今的经验表明, 生殖腺、心脏、肾脏、肝脏及鱼鳔等适于培养。

(三) 胚胎组织 鱼卵内部通常是无菌的, 因此只须对卵表面进行充分的灭菌即可。然而, 有些鱼卵具有十分复杂的表面结构, 对此可采用在抗生素溶液中浸泡数小时的办法解决。对于卵胎生鱼类, 可以依前述内部组织的取材方法进行操作。一般的鱼卵, 可用吸管吸取, 移至灭菌的试管内, 注入 1% 次氯酸钠, 再用吸管吹

打卵, 静置片刻, 待卵下沉之后, 弃上清液, 再重新加入 1% 次氯酸钠溶液, 如此反复 2—3 次之后, 最后以生理盐水或培养液洗涤。这样的吸管吹打操作, 必须温和地进行, 以免卵子破裂而使胚体上浮, 不利于后面的整个操作。

三、培养方法

下面介绍几种旨在进行染色体组型分析鱼类细胞培养方法。

(一) 血液培养 全血培养: 鱼类淋巴细胞的培养, 始于 Ojima 和 Heckman 等 (1970)。作者等 (1980) 确立了一种简便的半微量血液培养法, 分别在鲤鱼、鲫鱼、金鱼、草鱼、团头鲂及罗非鱼上获得成功 (图 1—10 见封 3)¹⁾。兹介绍如下: 经体表局部碘酒与 70% 酒精消毒之后, 自尾静脉采取约 0.2 毫升全血, 放在 2 毫升含青霉素和链霉素的培养液中, 于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内培养。培养液的组成是: RPMT-1640 (或 TC-199) 8 毫升, 小牛血清 2 毫升, PHA-M (Difco 或中国科学院上海生物化学研究所产品) 0.3 毫升。

白细胞培养: 在采血量较大时, 可以分离白细胞进行培养, 以便获得清晰、干净的染色体标本。可将肝素抗凝血置于 3—5 毫米内径的玻璃管中, 在 4°C 冰箱中静置 1—2 小时。然后, 将整个玻璃管放在离心管中, 以 300—350rpm 离心 10 分钟。取上清液中的白细胞, 用培养液将细胞浓度调整至 $1—2 \times 10^6$ 个细胞/毫升, 置于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养。

无论是全血培养还是白细胞培养, 培养液的初始 pH 值应调整至 6.9—7.2。培养 72 小时之后, 在收集细胞制作染色体标本之前 4—6 小时, 以最终浓度为 1 微克/毫升的秋水仙素 (或者 0.1 微克/毫升的秋水仙胺) 处理细胞。

届时, 用吸管充分地吹散细胞, 以 800rpm 离心 7 分钟, 收集细胞。用鱼类生理盐水洗涤 1—2 次, 再用 0.046M KCl (或 0.075M KCl) 溶液, 在 34°C 下低渗处理 20—30 分钟, 经甲醇:

1) 本文引用的图片, 是作者与杨慧一同志合作研究中所得到的, 谨表谢意。

冰醋酸(3:1)固定3—4次后,以常规的空气干燥法制备染色体标本。

(二) **肾细胞培养** Yamamoto 和 Ojima (1973) 首先确立了鱼类肾细胞的培养法。该法的特征是,通过 PHA 刺激,促使肾脏内的某些细胞进行细胞分裂,从而获得中期分裂相。作者等(1980)利用改进的方法,先后在中华鲟、草鱼、团头鲂、鲤鱼、鲫鱼、金鱼及罗非鱼上获得成功。

在无菌条件下取出肾脏,用生理盐水洗净血块,以锐利的剪刀细切组织。注入适量培养液(TC-199 或 Eagle 氏基础培养液),并将整个悬浮组织移至离心管、用吸管温和地吹散细胞之后,在室温下静置几分钟,取上部悬浮细胞进行培养。把细胞(不包括红细胞)浓度调整至 2×10^6 个细胞/毫升,置于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 72 小时。在培养液中必须含有 10 微升/毫升的 PHA-M (Difco)。在收集细胞前约 4 小时,以 1 微克/毫升浓度的秋水仙素处理细胞。

(三) **鳞片的培养** 取鳞片若干浸入含青霉素(100 国际单位/毫升)、链霉素(100 微克/毫升)和卡那霉素(60 微克/毫升)的磷酸缓冲液中洗三次,每次涮洗 10 分钟。把洗过的鳞片置于直径 6 厘米的培养皿底,以有孔的玻璃纸覆盖在上面,使鳞片贴附在底部。在 $28-30^\circ\text{C}$ 下在湿润的 CO_2 培养箱培养 24 小时。培养液由含青霉素(100 国际单位/毫升)、链霉素(100 微克/毫升)、卡那霉素(60 微克/毫升)、制霉菌素(50 国际单位/毫升)和 HEPES (15mM) 而不含 NaHCO_3 的 TC-199 85 毫升,加小牛血清 15 毫升组成。培养液的初始 pH 值用 NaOH 调整至 pH 7.4。在收集细胞之前 2—3 小时,加入最终浓度为 1 微克/毫升的秋水仙素。结束培养时,将玻璃纸和鳞片取出,以不含钙和镁离子的磷酸缓冲液洗涤上皮细胞,再于 37°C 下以 0.1% 胰蛋白酶消化 10 分钟,收集细胞。

(四) **鳞片和鳍的混合培养** 用 1% 的次氯酸钠溶液洗涮鱼体数秒钟,接着以 70% 酒精洗涤数秒钟。取鳞片与鳍放在试管中,用生理盐水洗三次。将组织移至含有 5 毫升胰蛋白酶溶

液(0.15% 胰蛋白酶, 0.3mM EDTA · 2Na) 的三角瓶中,在 4°C 下以磁力搅拌器温和地搅拌 4 小时,制备细胞悬液。届时,以 1000rpm 离心 3—5 分钟收集游离出来的细胞,加入培养液,在 32°C 下培养。培养液的组成为: 用鱼类生理盐水稀释的含 4 倍量氨基酸和维生素的 Eagle 氏基础培养液(内含 20mM HEPES、卡那霉素 60 微克/毫升、青霉素 100 国际单位/毫升) 80 毫升,加上小牛血清 20 毫升。为了获得单层培养细胞,必须每隔 3—4 天更换半量的培养液。首次传代时,在 4°C 下以胰蛋白酶和 EDTA · 2Na 的混合消化液剥离细胞。第二次传代时,可根据细胞的状态再决定使用混合消化液还是单纯以吸管吹散操作剥离细胞。

(五) **鳍的培养** 将背鳍或尾鳍浸泡于 0.2—0.3% 的次氯酸钠溶液中数十秒钟,再浸入 70% 酒精中几秒钟杀死细菌。接着,用鱼类生理盐水洗三次。以锐利的剪刀将组织细切成小片,并散放在塑料培养皿底部,组织片上面压上灭菌过的小玻片。加培养液之后,在 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 下,置于 CO_2 培养箱中培养。每隔 3—4 天更换半量的培养液。经 3 周培养之后,在组织片周围长出许多细胞,届时可以取走压在组织片上的玻璃片。次日,在 4°C 下以胰蛋白酶和 EDTA · 2Na 剥离生长在培养皿底部的细胞,接种于新的培养皿,进行再培养。在收集细胞之前 2—3 小时,加入最终浓度为 0.2 微克/毫升的秋水仙素,再以常规方法制备染色体标本。

(六) **胚胎的培养** 卵胎生鱼的胚胎的培养: 用 70% 酒精擦洗怀有胚胎的雌鱼的体表,在无菌条件下取出若干胚胎,并用 0.15% 胰蛋白酶和 0.3mM EDTA · 2Na 溶液(pH 7.2) 洗涤。用锐利的剪刀细切,并置于 2 毫升胰蛋白酶和 EDTA · 2Na 溶液中,在室温下浸泡 5—10 分钟。届时,将组织片转移至试管中,加入 2 毫升培养液停止消化液的作用。以吸管吹散组织片,制成细胞悬液。经培养液洗涤之后,将细胞接种于塑料培养皿中,于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养。

卵生鱼的胚胎的培养: 将鱼卵置于 0.1% 次氯酸钠溶液中浸泡几秒钟,再用 70% 酒精消

毒卵表面数秒钟。其他操作同于卵胎生鱼胚胎的培养。如果卵的数量较少,细胞浓度不够,也可以不用消化液,只通过细切及吸管吹散之后,将细胞悬液及组织片一起供培养。附着于培养皿底部的组织片,可以生长出细胞,并建成细胞株。

结 束 语

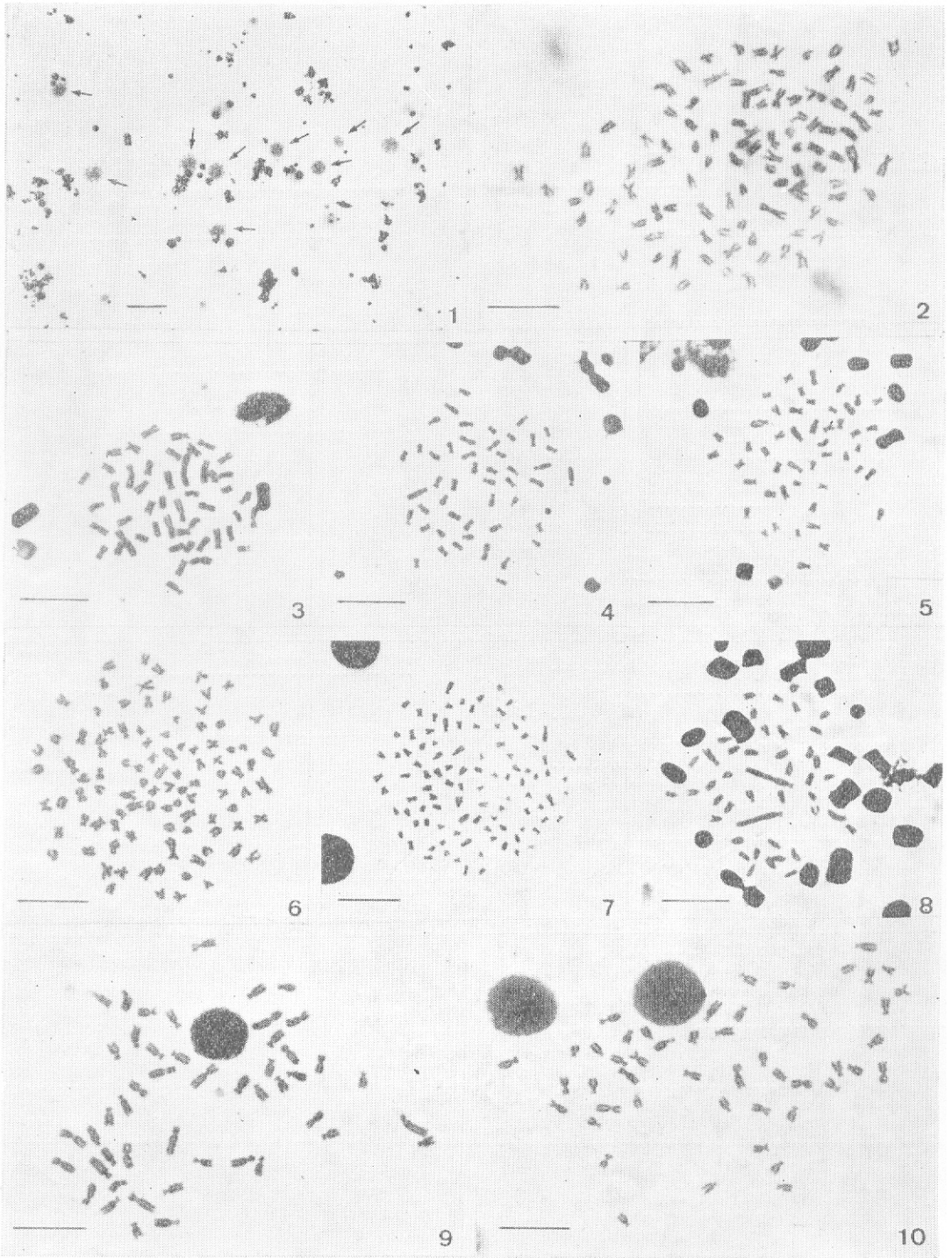
以上只简单地介绍了鱼类细胞培养的一些基本手法。如何应用于具体的种类,还需要研究者根据所选用的材料与研究的目的做适当的改良。除了已经成为细胞株的培养细胞可以获得较多分裂相之外,血液培养和肾细胞培养可以在短期内获得较多的分裂相。前者的优点是可以不杀死动物,其缺点就是过小的鱼不易采血;后者适合于小型(5厘米以下)的鱼类,其成功率较大。鳍与鳞片的培养,需要10天至3周,才能做染色体标本,但此类细胞适于长期的培养,比较容易由此获得细胞株。

在系统发育的研究中,鱼类是十分重要的研究对象。鉴于目前已经知道在包括人类在内的脊椎动物的进化过程中,基因的重复及染色

体的重复或易位起着相当重要的作用,因此,通过培养细胞进行鱼类染色体的精确分析,将为解决系统发育学中的一些问题,提供重要的线索。同时,也将为鱼类的杂交育种工作,提供合理的依据。

参 考 文 献

- [1] 吴政安,杨慧一,1980 鱼类细胞遗传学的研究,II. 鱼类淋巴细胞的培养及其染色体组型分析,遗传学报,7(4):370—375。
- [2] 江藤久美,1978 鱼类的细胞培养,遗传,32(7):64—71。
- [3] Hayashi, M., Y. Ojima and N. Asano, 1976 A cell line from Teleost fish: Establishment and cytogenetical characterization of the cells, *Jap. Jour. Genet.*, 51(1): 65—68.
- [4] Ojima, Y., S. Hitotsumachi and M. Hayashi, 1970 A blood culture method for fish chromosomes, *Jap. Jour. Genet.*, 45(2): 161—162.
- [5] Suyama, I. and H. Etoh, 1979 A cell line derived from the fin of the goldfish, *Carassius auratus*, *Zoological Magazine*, 88: 321—324.
- [6] Wolf, K. and C. Quimby, 1969 Fish cell and tissue culture, In *Fish physiology*, vol. III, p253—305 (W. S. Hoar and D. J. Randall, eds) Academic Press, N. Y.
- [7] Yamamoto, K. and Y. Ojima, 1973 A PHA-culture method for cells from the Renal tissue of Teleosts, *Jap. Jour. Genet.*, 48(3): 235—238.



《鱼类细胞的培养及其染色体标本的制备》一文的附图（正文见 50 页）

图 1—8 自血液培养获得的中期分裂相，图 9—10 自肾细胞培养获得的中期分裂相。1, 2: 鲫鱼 (*Carassius auratus*), $2n = 100$; 3: 团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*), $2n = 48$; 4—5: 草鱼 (*Clenopharyngodon idellus*), $2n = 48$; 6: 由鲤鱼细胞核与鲫鱼细胞质构成的核质杂种细胞的中期分裂相, $2n = 100$; 7: 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*), $2n = 100$; 8: 罗非鱼 (*Tilapia mossambica*), $2n = 44$; 9—10: 中华鲮鱼 (*Rhodens sinensis*), $2n = 48$ 。图 1 的标尺为 30 微米，箭头示中期分裂相，图 2—10 的标尺为 10 微米。