维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0439-8114(2006)02-0232-04

几个因素对菲律宾蛤仔组织培养的影响

李云玲[1],孙振兴[1],陈丽媛[1],李 田[1],徐晓波[1],张明青[2]
(1.烟台师范学院生命科学学院,山东 烟台 264025;2.青岛高利来食品有限公司,山东 青岛 266555)

摘要:研究了不同消毒剂和培养基对菲律宾蛤仔组织培养的影响。结果表明,在术必泰消毒剂醋酸氯己定($C_{26}H_{36}O_4N_{10}Cl_2$)的有效浓度为100~200 μg·mL^{-1}、或复方新洁尔灭中苯扎溴铵($C_{21}H_{38}BrN$)的有效浓度为300~600 μg·mL^{-1}时,既能有效杀灭粘附在组织块上的细菌,又能保持细胞活性而不影响细胞生长。在D-MEM、M199和RPMI-1640 3种培养基中,蛤仔的外套膜和鳃细胞均能正常生长,其中D-MEM、M199的培养效果优于RPMI-1640。

关键词:菲律宾蛤仔;组织培养;消毒剂;培养基
中图分类号:Q17;S969.3 **文献标识码**:A

水生无脊椎动物的组织培养不仅可以为分离与检测病毒提供宿主细胞,而且在细胞遗传学、免疫学、毒理学等方面也有很大的应用价值。因此,建立连续性细胞系,无论对基础理论研究还是实际应用都有着重要意义。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum* Adams et Reeve)广泛分布于我国南北方沿海,是一种重要的养殖经济贝类。为建立其细胞系,作者曾进行过菲律宾蛤仔鳃和外套膜的组织培养[1,2],证实了原代培养的可行性。但水生无脊椎动物的组织培养较之哺乳动物困难得多[3],除了两者的细胞生长特性不同之外,影响水生无脊椎动物组织培养的关键因素诸如组织的除菌净化、适宜的培养基等问题尚未得到根本解决。基于此原因,我们探讨了不同消毒剂和不同培养基对菲律宾蛤仔组织培养的影响,以期为蛤仔的传代培养及建立细胞系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用1~2龄菲律宾蛤仔购自烟台农贸市场,平均壳长2.5 cm,平均个体鲜重9.5 g。试验前将活贝放入有充气装置的水族箱内暂养数小时以吐净泥沙,暂养海水中添加适量双抗以抑制细菌。

1.2 培养基及其添加成分

RPMI-1640,Dulbecco's-MEM (D-MEM)和M199 3种基础培养基均为美国Gibco公司产品,小牛血清为浙江金华市清湖犊牛利用研究所产品。各种培养基均按说明书用三蒸水配制,3种培养基的添加成分相同,即每1 000 mL培养基中包括NaCl 3.5 g,小牛血清100 mL,水解乳蛋白5.0 g,L-谷氨酰胺0.3 g,植物血球凝集素(Phytohemagglutinin,PHA)5 mg[4],青霉素0.8×10^5 IU、链霉素1×10^5 IU,pH调至7.4,用Nalgene抽滤器经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后4℃保存备用。Hanks液等按常规方法配制灭菌,贴壁物质采用自制的鼠尾胶原[5]。

1.3 消毒剂的配制

术必泰液为北京朝阳北郊消毒用品厂产品,主要成分为0.5%(*W/V*)醋酸氯己定,用三蒸水分别稀释成10、20、25、33.3、50和100倍溶液供试验使用。复方新洁尔灭液为山东利尔康消毒科技有限公司产品,主要成分为3.0%(*W/V*)苯扎溴铵,用无菌过滤海水(煮沸10 min充分冷却数小时后使用,盐度为31.26)分别稀释成10、20、25、33.3、50和100倍溶液供试验使用。青-链霉素双抗液用无菌过滤海水配制,其中青霉素为4 000 IU·mL^{-1},链霉素为5 000 IU·mL^{-1}[6]。

1.4 方法

将蛤仔贝壳用70%的酒精棉球擦净后,用解剖器具取出蛤仔的外套膜和鳃组织,用无菌海水冲净组织表面的粘液,将冲洗好的外套膜和鳃置于不同

收稿日期:2005-11-16
基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2002D12)
作者简介:李云玲(1982-),女,山东烟台人,硕士研究生,现从事贝类细胞遗传学研究,(电话)13964503704 (电子信箱)sunzx@public.ytptt.sd.cn;通讯作者:孙振兴。

维普资讯 http://www.cqvip.com

消毒液中，按照试验设计的时间浸泡消毒，再用 Hanks 液反复冲洗灭菌后的组织块，以去除多余的消毒液。将组织块剪成 1 mm^3 左右的小块,分散排布在涂有胶原的 25 cm^2 培养瓶内壁上,4~6 h 后翻瓶添加培养液,以后每隔 3 d 更换一次培养液,以组织块培养法进行封闭培养。培养温度 26℃,pH 7.4 左右,培养期间每天用倒置显微镜观察拍照。在不同消毒剂试验中，以无菌海水浸泡处理的组织块作为对照,各试验组均使用 D-MEM 培养基。在不同培养基试验中,组织块消毒均采用双抗液浸泡 20 min。

2 结果

2.1 不同消毒剂的除菌效果

不同稀释倍数的术必泰对菲律宾蛤仔外套膜的除菌效果如表 1 所示,当醋酸氯己定有效浓度≥100 μg·mL^{-1} 时,可有效抑制细菌,细胞迁出正常(图 1);但有效浓度≥250 μg·mL^{-1} 时,则组织块贴壁率明显下降,且影响细胞的迁出。

不同稀释倍数的新洁尔灭对菲律宾蛤仔外套膜的除菌效果如表 2 所示,当苯扎溴铵有效浓度为 300~1 500 μg·mL^{-1} 时,均可有效抑制细菌,细胞迁出正常(图 3),但随着有效浓度增加,细胞迁出时间延长;当有效浓度为 3 000 μg·mL^{-1} 时对组织块损伤严重,虽然仍可贴壁,但其边缘发黑变薄,已不能正常地迁出细胞,随着时间的延长,组织块逐渐从瓶壁脱落。

同时,还分别用上述 2 种消毒剂的不同稀释倍数处理菲律宾蛤仔鳃组织 30 s,在同样处理条件下,

表 1　不同浓度术必泰对菲律宾蛤仔外套膜的除菌效果

编号	稀释倍数	醋酸氯己定含量/μg·mL^{-1}	处理时间/s	贴壁率/%	细胞迁出时间/h	48h 后是否染菌
1	1:10	500	30	40.0	未迁出	-
2	1:20	250	30	33.3	9.0	-
3	1:25	200	30	66.7	7.5	-
4	1:33.3	150	30	77.8	6.5	-
5	1:50	100	30	85.7	5.0	-
6	1:100	50	30	80.0	-	+
16	CK	0	30	71.4	-	+

注:贴壁率=贴壁的组织块数/接种的组织块总数;"-"表示未污染,"+"表示细菌污染,下同。

表 2　不同浓度新洁尔灭对菲律宾蛤仔外套膜的除菌效果

编号	稀释倍数	苯扎溴铵含量/μg·mL^{-1}	处理时间/s	贴壁率/%	细胞迁出时间/h	48h 后是否染菌
10	1:10	3000	30	50.0	未迁出	-
11	1:20	1500	30	80.0	7.5	-
12	1:25	1200	30	75.0	6.0	-
13	1:33.3	900	30	66.7	5.5	-
14	1:50	600	30	60.0	4.0	-
15	1:100	300	30	83.3	3.0	-
16	CK	0	30	71.4	-	+

对鳃组织的除菌效果要比外套膜略差,这是由于鳃组织有大量的鳃丝,在滤食的同时鳃丝表面也粘附了很多细菌,所以除菌比外套膜困难。对鳃组织除菌效果较好的试验组有：醋酸氯己定有效浓度 100 μg·mL^{-1}、苯扎溴铵有效浓度 300 μg·mL^{-1},表明低浓度的消毒剂对组织块的损伤较小，细胞增殖快,迁出的细胞形状规则,数量也较多。

2.2 鳃和外套膜组织在不同培养基中的生长情况

组织块在不同培养基中的生长状况主要根据细胞开始迁出的时间、迁出数量以及迁出细胞的形态进行评价,此外,相同来源组织块在不同培养基中的贴壁率，也是衡量培养基适合与否的一个方面。

鳃组织的生长情况，培养 5 h 后观察，在 D-MEM 和 M199 培养基中已有增生细胞迁出，但在 RPMI-1640 培养基中无迁出细胞;20 h 后观察(图2),D-MEM 和 M199 培养基中的迁出细胞数量较多,而 RPMI-1640 培养基中迁出细胞较少;培养 48 h 后迁出细胞数量逐渐增多,3 种培养基差别不明显。鳃组织块在培养 7 h、24 h 和 48 h 时的贴壁率如图 5 所示，对鳃组织而言,D-MEM 和 M199 的效果优于 RPMI-1640,但前 2 者差异不大。

外套膜组织的生长情况，培养 10 h 后观察,在 D-MEM 和 M199 培养基中已有增生细胞迁出,但在

维普资讯 http://www.cqvip.com

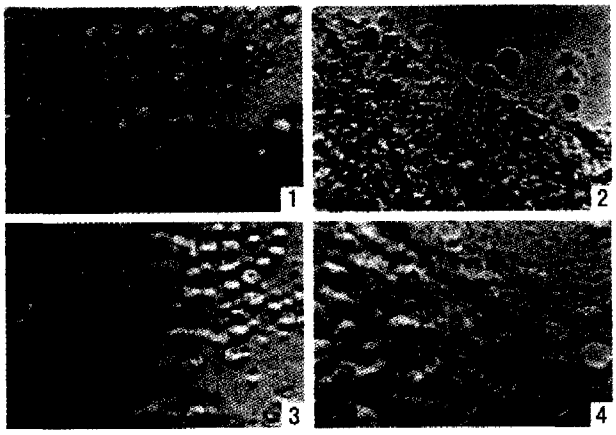

图 1–4 不同消毒剂处理后的外套膜和鳃细胞生长状况

(1) 醋酸氯己定有效浓度 100 μg·mL^{-1} 处理 30s 后的外套膜组织，示细胞迁出正常 (D–MEM 培养 20 h,400×);(2) 双抗处理 20 min 后的鳃组织,示增生细胞(M199 培养 20 h,400×);(3)苯扎溴铵有效浓度 300 μg·mL^{-1} 处理 30s 后的外套膜组织，示细胞迁出正常(D–MEM 培养 20 h,400×);(4)双抗处理 20 min 后的外套膜组织,示细胞生长正常(RPMI–1640 培养 20 h,400×)。

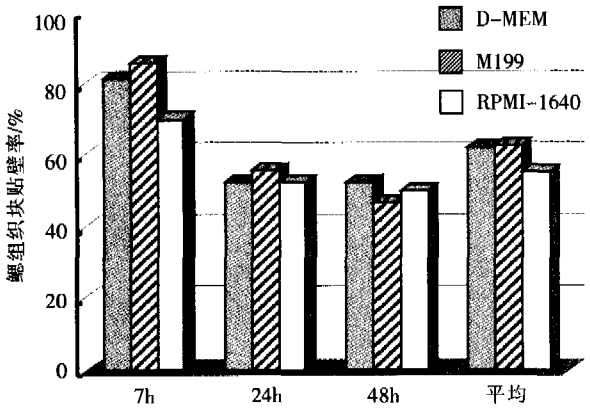

图 5 不同培养基中鳃组织块的贴壁率比较

RPMI–1640 培养基中细胞迁出极少;20 h 后观察，细胞迁出数量依次为 D–MEM>M199>RPMI–1640，迁出细胞多为圆形或椭圆形的透明细胞，胞质均匀、透亮(图 4)。培养 48 h 后迁出细胞数量增多,在前 2 种培养基中的迁出细胞数量稍多于 RPMI–1640 培养基。外套膜组织块在培养 5 h、24 h 和 48 h 时的贴壁率如图 6 所示,从总体上看,D–MEM 的效果优于 M199 和 RPMI–1640 培养基,培养的细胞最长可成活 14 d。

3 讨论

3.1 消毒剂的选择及其对菲律宾蛤仔组织培养的影响

哺乳动物的脏器不直接与外界接触,而海洋贝类的大多数器官组织都直接与外界海水接触,加之埋栖型贝类生活在泥沙底质中,因而其组织表面有大量的细菌、真菌等,如果除菌不彻底,在组织培养

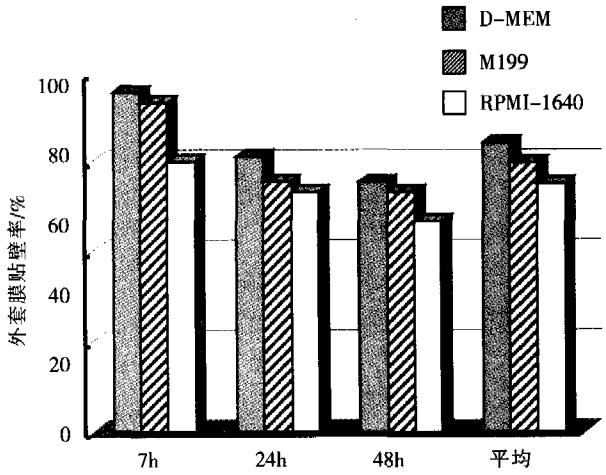

图 6 不同培养基中外套膜组织块的贴壁率比较

时极易造成污染。组织块的除菌消毒效果,在很大程度上决定了组织培养能否成功。因此,选择适宜的消毒剂并确定其杀菌浓度,是极为重要的。

术必泰是一种由多种抗菌剂、表面活性剂及增效剂合成的复合型速效消毒剂,其主要杀菌成分为醋酸氯己定($C_{26}H_{36}O_4N_{10}Cl_2$)、异噻唑啉酮等,具有高效、广谱、迅速及持久的杀菌作用,不仅对细菌有效,而且对真菌等也有效,此外,还具有性能稳定、无毒、无着色,pH 值为中性等特点,主要用于医院手术前的皮肤消毒等。

复方新洁尔灭属于季铵盐类化合物中的阳离子表面活性剂，其主要成分为苯扎溴铵($C_{21}H_{38}BrN$),还含有咪唑磷等。苯扎溴铵可改变细菌质膜的通透性,使菌体内的物质外渗,阻碍细菌的代谢而使其死亡。咪唑磷是两性离子表面活性剂,在水中可解离出阳离子、阴离子及两性离子,可增强对带电荷细菌的穿透性,从而增强杀菌力。复方新洁尔灭的特点是易溶于水、无色、无刺激性、无腐蚀性、无毒性,性能稳定,对革兰氏阳性菌作用较强;但其杀菌谱较窄,对革兰氏阴性菌的作用差,对一些杆菌和芽胞无效,是一种低效消毒剂[7]。

在使用以上 2 种消毒剂时,考虑到渗透压对组织培养的影响,本试验采用无菌过滤海水稀释消毒剂,但由于术必泰易与海水中的某些离子作用形成絮状沉淀,所以改用三蒸水稀释术必泰。高浓度的消毒剂虽然能彻底杀菌，但对细胞的损伤也很大,影响组织块的成活及细胞的生长,这是由于贝类外套膜、鳃的组织学特点与哺乳动物皮肤不同的缘故,加上取样部位的组织很薄,即使短暂的数十秒浸泡也会导致贝类组织完全死亡。试验结果表明,在术必泰中醋酸氯己定的有效浓度为 100~200 μg·mL^{-1}、或复方新洁尔灭中苯扎溴铵的有效浓度为300~600 μg·mL^{-1},处理时间 30 s 的情况下,即能

维普资讯 http://www.cqvip.com

有效杀菌，又能保持细胞活性而不影响细胞增生。高于上述浓度,即使组织块贴壁成活,但细胞迁出时间延迟,这可能是由于消毒剂对细胞的副作用所致。

使用青霉素和链霉素可有效地抑制细菌、降低污染率,这在细胞与组织培养中已被广泛证实。但由于青、链霉素对许多海洋弧菌不起作用,加上一些细菌的耐药性,仅仅使用双抗往往难以达到满意的除菌效果,因此采用消毒剂除菌是必要的。

3.2　培养基成分对菲律宾蛤仔组织培养的影响

离体组织培养过程中为了使细胞能正常生长和繁殖,必须创造适宜的条件,尽量接近细胞原来生长的环境,包括培养基、培养温度、pH 值、渗透压和氧气等,其中,培养基是关键因素。用于动物细胞和组织培养的人工合成培养基有 MEM,D-MEM,L-15,RPMI-1640,M199 等，为了促进细胞的生长,人们通常在合成培养基的基础上添加一些成分,例如在疣鲍(*Haliotis tuberculata*)血细胞培养时添加了表皮生长因子[8];在皱纹盘鲍外套膜组织培养时添加了胰岛素[6];在马氏珠母贝外套膜组织培养时添加了鸡组织提取物[9]等,都取得了较好的效果。PHA 是从豆科植物中提取的一种糖蛋白,其主要成分为 D-甘露糖、氨基葡萄糖酸衍生物所构成的低聚糖辅基与蛋白质的复合物,是脊椎动物细胞培养中常用的一种有丝分裂原,具有促进细胞分裂的功能。但 PHA 浓度超过 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时可能会抑制细胞 DNA 合成,使细胞增殖发生障碍[10]。本试验在培养基中添加了 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ PHA，对促进菲律宾蛤仔细胞增殖起到了一定的作用,由于其浓度低,所以不会对细胞产生副作用。

在本试验所用的 3 种培养基中,菲律宾蛤仔的外套膜和鳃细胞均能正常生长,其中 D-MEM、M199 的培养效果总体上优于 RPMI-1640。但应当指出,贝类的组织细胞培养至今仍沿用着经典的陆地哺乳动物的细胞培养基,由于贝类等水生无脊椎动物与哺乳动物的代谢途径有很大差异,对各种营养因子的需求也不同,因此对贝类适宜的培养基和添加成分，有必要从贝类细胞基础代谢的角度深入研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 张卓然.培养细胞学与细胞培养技术[M].上海:上海科学技术出版社,2004.29-37.

[5] 程宝鸾.动物细胞培养技术[M].广州:华南理工大学出版社,2000.30-54.

[6] 李　霞,刘淑范.皱纹盘鲍的组织培养[J].水产学报,1997,21(2):197-200.

[7] 张　玮,朱玉玲,孙燕晓,等.复方新洁尔灭消毒剂杀菌效果及毒性试验观察[J].医学动物防制,2004,20(12):720-724.

[8] LEBEL, J.M.,GIARD W.,FAVERI P.,et al.Effects of Different Vertebrate Growth Factors on Primary Cultures of Hemocytes from the Gastropod Mollusc, *Haliotis tuberculata* [J].Bio. Cell, 1996,86:67-72.

[9] 刘　汀,沈亦平,郑俊英,等.马氏珠母贝外套膜组织培养基的设计[J].武汉大学学报(自然科学版),1998,44(2):221-224.

[10] 范　红,李曼军,黄　敏,等.PHA 对日本血吸虫成虫细胞鸟氨酸脱羧酶活性作用的研究[J]. 湖北预防医学杂志,2001,12(12):1-2.

Several Factors in Tissue Culture for *Ruditapes philippinarum*

LI Yun-ling[1],SUN Zhen-xing[1],CHEN Li-yuan[1],LI Tian[1],XU Xiao-bo[1],ZHANG Ming-qing[2]

(1. Life Science College,Yantai Normal University,Yantai 264025,Shandong,China;
2. Gaolilai Foodstuff Limited Corporation,Qingdao 266555,Shandong,China)

Abstract:The influences of different disinfectant and culture medium were studied to the tissue culture of *Ruditapes philippinarum*. The results showed: When the effective concentration of $C_{26}H_{36}O_4N_{10}C_{l2}$ was 100~200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ on the Shubitai disinfectant, or effective concentration of $C_{21}H_{38}BrN$ was 300~600 $\mu g \cdot mL^{-1}$ on the Compound bromo geramine, they could effective kill the bacterium adhered to tissue blocks as well as could keep the activation of cells, not influence made the growth of cells. In the three kind media of the D-MEM, M199 and RPMI-1640, the cells of mantle and gill of clam all could grow normally, effect of D-MEM and M199 were both excelled RPMI-1640.

Key words:*Ruditapes philippinarum*;tissue culture;disinfectant;culture medium

(责任编辑　万景辉)