



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102492650 A

(43) 申请公布日 2012.06.13

(21) 申请号 201110377593.X

(22) 申请日 2011.11.24

(71) 申请人 大连海洋大学

地址 116000 辽宁省大连市沙河口区黑石礁街 52 号

(72) 发明人 李霞 郭莹 秦艳杰 姜志强

(74) 专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220

代理人 曲宝威

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

大泷六线鱼细胞系的构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种大泷六线鱼细胞系的构建方法,包括如下步骤:(1)选择 D M E M /F12 培养基,并加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素制备细胞培养液,在 4℃ 的环境下存放;(2)在超净工作台上取大泷六线鱼的组织进行双抗和漂洗处理,在培养瓶中进行原代培养;(3)待细胞长成单层后制成细胞悬液并加入培养液进行传代培养。本发明的方法,步骤简单,易操作;构建的大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏组织细胞系形态为纤维样,可以连续传代并直接应用于病原特性研究、疫苗研制及功能基因研究,满足了对大泷六线鱼理论研究及病毒疫苗研制等应用研究的需要;该构建方法也适用于其他鱼类构建鱼鳍、吻端和肾脏的细胞系。

1. 一种大泷六线鱼细胞系的构建方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1)、制备细胞培养液

选择 DMEM/F12 培养基,向培养基内分别加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清占总体积的 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 5ng/ml, I 型胰岛素样生长因子的浓度为 40ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 20ug/ml ;

在 4℃ 的环境下存放;

(2)、原代培养

在超净工作台上取大泷六线鱼的组织,用青霉素和链霉素的混合液进行浸泡处理,青霉素的浓度为 100IU/ml,链霉素的浓度为 100ug/ml,处理时间为 30 分钟;再用 PBS 漂洗后,剪成 0.8 ~ 1.2mm³ 的块状,经上述处理的组织块均匀接种于 25cm² 细胞培养瓶中,加入培养液 3 ml,在 25℃ CO₂ 培养箱中启动原代培养;

(3)、传代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1ml,消化 1min,细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,将之前吸出的旧培养液加回,用吸管吹打培养瓶底,制成细胞悬液;向细胞悬液内补入新的培养液,细胞悬液与培养液的体积比为 1:2,然后接种于两个培养瓶内;在 25℃ CO₂ 培养箱中培养;

待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

2. 根据权利要求 1 所述的大泷六线鱼细胞系的构建方法,其特征在于:所述的原代培养步骤还需对块状组织用 0.5% 透明质酸酶和 0.2%II 型胶原酶联合消化 30min。

大泷六线鱼细胞系的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞系的构建方法,特别是一种大泷六线鱼细胞系的构建方法。

背景技术

[0002] 大泷六线鱼 *Hexagrammos otakii* 又称欧式六线鱼,俗名黄鱼,属近海冷温性底层鱼类,在我国黄、渤海以及日本、朝鲜和俄罗斯远东诸海都有分布,其肉味鲜美,肉质细嫩,有“北方石斑”之称。大泷六线鱼适应能力强,耐低温,又有性成熟早和世代交替快的生物学特征,栖息于近海岩礁和岛屿附近,洄游活动范围小,因此是礁湾养殖的理想鱼种。近年来,对大泷六线鱼的市场需求日益增大,野生大泷六线鱼种群数量远远不能满足供应,其海水养殖业有待发展。大泷六线鱼细胞系的建立能满足大泷六线鱼病毒学、病理学、毒理学、免疫学、遗传育种和种质保存等理论研究以及病毒疫苗研制等应用研究的需要。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种步骤简单、易操作的大泷六线鱼细胞系的构建方法,以满足对大泷六线鱼理论研究以及病毒疫苗研制等应用研究的需要。

[0004] 本发明的大泷六线鱼细胞系的构建方法,包括如下步骤:

(1)、制备细胞培养液

选择 DMEM/F12 培养基,向培养基内分别加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清占总体积的 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 5ng/ml, I 型胰岛素样生长因子的浓度为 40ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 20ug/ml;

在 4℃ 的环境下存放;

(2)、原代培养

在超净工作台上取大泷六线鱼的组织,用青霉素和链霉素的混合液进行浸泡处理,青霉素的浓度为 100IU/ml,链霉素的浓度为 100ug/ml,处理时间为 30 分钟;再用 PBS 漂洗后,于少量 5%FBS-DMEM/F12 (Ph7.2) 中剪成 0.8 ~ 1.2mm³ 的块状,经上述处理的组织块均匀接种于 25cm² 细胞培养瓶中,加入培养液 3 ml,在 25℃ CO₂ 培养箱中启动原代培养;

(3)、传代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1ml,消化 1min,细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,将之前吸出的旧培养液加回,用吸管吹打培养瓶底,制成细胞悬液;向细胞悬液内补入新的培养液,细胞悬液与培养液的体积比为 1:2,然后接种于两个培养瓶内;在 25℃ CO₂ 培养箱中培养。待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

[0005] 本发明的大泷六线鱼细胞系的构建方法,其中所述的原代培养步骤还需对块状组织用 0.5% 透明质酸酶和 0.2%II 型胶原酶联合消化 30min。

[0006] 本发明的大泷六线鱼细胞系的构建方法,工艺步骤简单,操作容易;所构建的大泷

六线鱼鳍、吻端和肾脏组织细胞系 (HOF、HOL、HOK) 形态均为纤维样,可以连续传代并直接应用于病原特性研究、疫苗研制及功能基因研究,满足了对大泷六线鱼理论研究以及病毒疫苗研制等应用研究的需要;该构建方法也适用于其他鱼类构建鱼鳍、吻端和肾脏的细胞系。

具体实施方式

[0007] 实施例 1:

(1)、制备细胞培养液

选择 Hyclone 公司的 DMEM/F12 培养基,向培养基内分别加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清占总体积的 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 5ng/ml, I 型胰岛素样生长因子的浓度为 40ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 20ug/ml;

在 4℃ 的环境下存放;

(2)、原代培养

在超净工作台上取大泷六线鱼的鱼鳍组织,用青霉素和链霉素的混合液进行浸泡处理,青霉素的浓度为 100IU/ml,链霉素的浓度为 100ug/ml,处理时间为 30 分钟;再用 PBS 漂洗后,于少量 5%FBS-DMEM/F12 (Ph7.2) 中剪成 0.8 ~ 1.2mm³ 的块状,再用 0.5% 透明质酸酶和 0.2%II 型胶原酶对块状鱼鳍组织联合消化 30min;

经上述处理的组织块均匀接种于 25cm² 细胞培养瓶中,加入培养液 3 ml,在 25℃ CO₂ 培养箱中启动原代培养;

(3)、传代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1ml,消化 1min,细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,将之前吸出的旧培养液加回,用吸管吹打培养瓶底,制成细胞悬液;向细胞悬液内补入新的培养液,细胞悬液与培养液的体积比为 1:2,然后接种于两个培养瓶内;在 25℃ CO₂ 培养箱中培养。待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

[0008] 实施例 2:

(1)、制备细胞培养液

选择 Hyclone 公司的 DMEM/F12 培养基,向培养基内分别加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清占总体积的 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 5ng/ml, I 型胰岛素样生长因子的浓度为 405ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 20ug/ml;

在 4℃ 的环境下存放;

(2)、原代培养

在超净工作台上取大泷六线鱼的吻端组织,用青霉素和链霉素的混合液进行浸泡处理,青霉素的浓度为 100IU/ml,链霉素的浓度为 100ug/ml,处理时间为 30 分钟;再用 PBS 漂洗后,于少量 5%FBS-DMEM/F12 (Ph7.2) 中剪成 0.8 ~ 1.2mm³ 的块状,再用 0.5% 透明质酸酶和 0.2%II 型胶原酶对块状鱼鳍组织联合消化 30min;

经上述处理的组织块均匀接种于 25cm² 细胞培养瓶中,加入培养液 3 ml,在 25℃ CO₂ 培

养箱中启动原代培养；

(3)、传代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1ml,消化 1min,细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,将之前吸出的旧培养液加回,用吸管吹打培养瓶底,制成细胞悬液;向细胞悬液内补入新的培养液,细胞悬液与培养液的体积比为 1:2,然后接种于两个培养瓶内;在 25℃ CO₂ 培养箱中培养。待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

[0009] 实施例 3:

(1)、制备细胞培养液

选择 Hyclone 公司的 DMEM /F12 培养基,向培养基内分别加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子、I 型胰岛素样生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清占总体积的 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 5ng/ml, I 型胰岛素样生长因子的浓度为 405ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 20ug/ml;

在 4℃ 的环境下存放;

(2)、原代培养

在超净工作台上取大泷六线鱼的肾脏组织,用 5%FBS-DMEM/F12 (Ph7.2) 漂洗一次后剪成 0.8 ~ 1.2mm³ 的块状;(内脏组织可不用双抗和联合消化处理)。

[0010] 经上述处理的组织块均匀接种于 25cm² 细胞培养瓶中,加入培养液 3 ml,在 25℃ CO₂ 培养箱中启动原代培养;

(3)、传代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1ml,消化 1min,细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,将之前吸出的旧培养液加回,用吸管吹打培养瓶底,制成细胞悬液;向细胞悬液内补入新的培养液,细胞悬液与培养液的体积比为 1:2,然后接种于两个培养瓶内;在 25℃ CO₂ 培养箱中培养。待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

[0011] 对上述构建的细胞冻存与复苏:

配置 1ml 细胞冻存保护液:分别取 0.2mlFBS,0.6ml DMEM/F12 和 0.2mlDMSO,混匀置于 4℃ 冰箱内备用。

[0012] 细胞冻存:取同一代数的处于对数生长期的细胞,经上述胰酶消化后收获细胞,1000rpm 离心 10min,弃掉上清液。向细胞沉淀中加入已配置好的 1ml 冻存保护液,重悬,调整细胞浓度至 1×10⁶ 个 /ml,将细胞悬液转移到无菌冻存管中,并按一下程序降温:4℃ 冰箱中放置 30min、-20℃ 冰箱放置 1h、-80℃ 冰箱过夜,最后放入液氮(-196℃) 中长期保存。

[0013] 细胞复苏:将水浴锅温度分别调至 40℃ 和 25℃,迅速把细胞冻存管从液氮罐中取出,放入 40℃ 水浴中,待细胞冻存液融化后转入 25℃ 水浴中。然后无菌条件下将细胞冻存管中细胞悬液转移至 10ml 离心管中,并加入等量 DMEM/F12 培养液,1000rpm 离心 10min,去上清,收集细胞。用培养液重悬细胞,并转移到细胞培养瓶中,25℃ CO₂ 培养箱中培养,12h 后全量换培养液,继续进行培养,4-5 天后细胞即可长成单层。