



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114410569 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 19

(21) 申请号 202210002672.0

(22) 申请日 2022.01.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114410569 A

(43) 申请公布日 2022.04.29

(66) 本国优先权数据
202110264585.8 2021.03.11 CN

(73) 专利权人 青海大学
地址 810016 青海省西宁市城北区宁大路
251号
专利权人 青海湖裸鲤救护中心(青海省鱼
类原种良种场)

(72) 发明人 卫福磊 梁健 尹卫 许丁凡
岳苗 谢保胜 俞录贤 丰朝晖
张宏 田少峰 汪洋 田文根

(74) 专利代理机构 成都华风专利事务所(普通
合伙) 51223
专利代理师 杜朗宇

(51) Int.Cl.

G12N 5/071 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102106287 A, 2011.06.29

ID 201702054 A, 2017.03.10

CN 105331576 A, 2016.02.17

US 2018208901 A1, 2018.07.26

AU 2020102488 A4, 2020.11.19

CA 2988038 A1, 2019.06.07

CN 103937736 A, 2014.07.23

CN 104322413 A, 2015.02.04

CN 110283779 A, 2019.09.27

WO 0000512 A2, 2000.01.06

WO 2012104936 A1, 2012.08.09

CN 114317419 A, 2022.04.12

周佳楠等. 金钱鱼鳃细胞系的建立及其生长
特性的初步研究. 热带海洋学报. 2019, 第38卷
(第6期), 第90-97页. (续)

审查员 朱兵

权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法,包括原代培养、传代培养、细胞冻存与复苏,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、200~400IU/mL青霉素、200~400 μg/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺和1~5mmol/L mmol/L丙酮酸钠;所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μg/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺和1~5mmol/L mmol/L丙酮酸钠;所述细胞冻存的冻存液组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μg/mL链霉素、5~30% DMSO、1~5mmol/L谷氨酰胺和1~5mmol/L mmol/L丙酮

酸钠。本发明的制备方法简单,无需特殊设备,在一般的无菌培养室内均可操作,制备得到的细胞生长良好、稳定,可用于营养、免疫、环境毒性、基因功能分析等研究。



CN 114410569 B

[接上页]

(56) 对比文件

赵雪梅.不同浓度Cu²⁺对青海湖裸鲤鳃细胞培养的影响.青海环境.2011,第21卷(第2期),第94-98页.

Fulei Wei等.Establishment of a cell line derived from the gills of *Gymnocypris przewalskii*, an endemic Schizothoracine fish from Qinghai Lake of Tibet Plateau.J Fish Biol.2022,第101卷(第5期),第1150-1159页.

Mona C. Gjessing等.Development and

characterization of two cell lines from gills of Atlantic salmon.PLOS ONE.2018,第1-13页.

樊廷俊;耿晓芬;丛日山;姜国建;于秋涛;付永锋;王晶;于苗苗;杨秀霞;吴建东.大菱鲆鳃细胞系的建立.中国海洋大学学报(自然科学版).2007,(第05期),第77-84页.

樊廷俊;郭雪阳;姜国建;徐晓辉;孙爱;徐彬.圆斑星鲽连续性鳃细胞系的建立.中国海洋大学学报(自然科学版).2010,(第09期),第73-78页.

1. 一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法,包括原代培养、传代培养、细胞冻存与复苏,其特征在于,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600 μ g/mL链霉素;

所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素;

所述细胞冻存的冻存液组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、5~30%DMSO;

其中,所述原代培养、传代培养、细胞冻存的基础培养基为DMEM high glucose培养基;

所述牛血清为胎牛血清;

所述原代培养、传代培养、细胞冻存的培养液组分中均还包括1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L丙酮酸钠。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600 μ g/mL链霉素;

所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素;

所述细胞冻存的冻存液组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、10~20%DMSO。

3. 根据权利要求1或2所述的构建方法,其特征在于,所述DMEM high glucose培养基含有4500 mg/L D-葡萄糖。

4. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600 μ g/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L 丙酮酸钠;

所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L 丙酮酸钠;

所述细胞冻存的冻存液组分包括:基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、10~20%DMSO、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L 丙酮酸钠。

5. 根据权利要求4所述的构建方法,其特征在于,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、15%牛血清、500IU/mL青霉素、500 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L 丙酮酸钠;

所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L 丙酮酸钠;

所述细胞冻存的冻存液组分包括:基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、10%DMSO、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L 丙酮酸钠。

6. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述原代培养的步骤包括:用无菌PBS冲洗鳃组织后接种在培养瓶中倒置培养,培养瓶中添加1ml原代培养基用以保持培养瓶中湿度,防止鳃组织干燥细胞死亡,次日加入细胞培养液3ml,培养至长成细胞单层;

所述原代培养的条件为:22~26 $^{\circ}$ C培养箱中倒置24小时。

7. 根据权利要求6所述的构建方法,其特征在于,所述原代培养的条件为:

23 $^{\circ}$ C培养箱中倒置过夜。

8. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述传代培养的步骤包括:原代鳃细胞铺满瓶底60%,吸出原代培养液,悬起细胞,加入细胞培养液后进行传代培养。

9. 根据权利要求8所述的构建方法,其特征在于,所述悬起细胞的方法为胰酶消化法;所述传代培养的方式为:首次传代按1:1传,此后按1:2进行传代,每8~12天传代一次;所述传代培养的温度为22~26℃。

10. 根据权利要求9所述的构建方法,所述胰酶消化法使用的试剂包括0.2~0.4%胰蛋白酶-EDTA;

所述传代培养的方式为:首次传代按1:1传,此后按1:2进行传代,每10天传代一次;所述传代培养的温度为25℃。

11. 根据权利要求10所述的构建方法,所述胰酶消化法使用的试剂包括0.25%胰蛋白酶-EDTA。

12. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述细胞冻存的步骤包括:取对数生长期细胞经胰酶消化后,离心,将得到的沉淀与冻存液混合、重悬,液氮保存;

所述重悬后的细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。

13. 根据权利要求12所述的构建方法,其特征在于,所述重悬后的细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

14. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述复苏的步骤包括:将冻存液于37℃水浴中快速融化、离心,得到沉淀后用传代细胞培养液重悬,22~26℃培养至长成细胞单层。

一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养技术领域,具体涉及一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法。

背景技术

[0002] 青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*),俗称湟鱼,属鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),裂腹鱼亚科,裸鲤属,主要分布于中国青海湖及其湖周支流,为高原低温盐碱性水域经济鱼类,是青海湖中唯一的经济鱼类,也是我国重要的经济鱼类之一。其喜栖息于滩边、大石堆间流水缓慢处、深潭或岩缝中,适应性强,在半咸水(青海湖水含盐量12~13‰)或淡水中均可生活。在自然条件下,青海湖裸鲤的生长极为缓慢,生长到300~500g平均需要7~10年的时间。有关资料表明,青海湖现有裸鲤资源量约为7500吨,不足开发初期的1/10,而目前,鸟岛栖息的鸟类每年要吞食近千吨的裸鲤,加上近年来由于裸鲤的生存环境受到污染、破坏和过度捕捞等原因,造成青海湖裸鲤资源量严重下降,渔业资源破坏严重,同时,伴随着青海湖盐度的逐年升高,青海湖裸鲤资源保护面临着重要的挑战。

[0003] 为保护青海湖裸鲤资源,青海湖裸鲤人工增殖放流技术在过去的二十余年里已经逐渐成熟,该技术需要自然条件下成熟的青海湖裸鲤亲本作为性细胞来源,用于人工授精和仔鱼孵化养殖,该技术需要在特定时间段进行。养殖青海湖裸鲤的人工繁育技术还未建立,目前还未见有全人工繁育青海湖裸鲤群体的相关报道,因此,在对青海湖裸鲤进行自然适应、进化、疾病等研究时,通常需要大量的青海湖裸鲤个体,获取青海湖裸鲤个体的来源只能依靠捕获野生个体进行,这与保护该珍稀鱼类种质资源形成了亟待解决的矛盾。

[0004] 建立青海湖裸鲤鱼类细胞系作为细胞模型,是解决以上问题的重要方法。鱼类细胞培养起于20世纪60年代,发展至今已建立了280余株细胞系,中国的鱼类细胞培养历经30多年,只建立了50余株细胞系,建立细胞系的物种不足中国鱼类总数的1.5%(中国鱼类超过3500种),由此可见,细胞系的构建速度是非常缓慢的,本身存在一定的困难。且相较于其他鱼类细胞培养,由于自然条件下的青海湖裸鲤个体通常为患病个体,携带多种寄生虫,在细胞培养中更易发生污染,细胞致死率较高,导致失败率上升。因此,目前亟需建立一种细胞致死率低、能获得大量的鳃细胞,用于探究青海湖裸鲤生长的基础研究的细胞系构建方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法,能够获得大量的鳃细胞,用于探究鱼类生长的基础研究。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种青海湖裸鲤鳃细胞系构建方法,包括原代培养、传代培养、细胞冻存与复苏,所述原代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600μg/mL链霉素;

[0008] 所述传代培养的细胞培养液的组分包括:基础培养基、10~30%牛血清、50~

250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素；

[0009] 所述细胞冻存的冻存液组分包括：基础培养基、10~30%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、5~30%DMSO。

[0010] 进一步地，所述原代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600 μ g/mL链霉素；

[0011] 所述传代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素；

[0012] 所述细胞冻存的冻存液组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、10~20%DMSO；

[0013] 更进一步地，所述原代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、15%牛血清、500IU/mL青霉素、500 μ g/mL链霉素；

[0014] 所述传代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素；

[0015] 所述细胞冻存的冻存液组分包括：基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、10%DMSO。

[0016] 本发明所述“%”为体积百分比浓度；培养基中各成分按照浓度加入，各成分后为浓度单位。

[0017] 进一步地，所述原代培养、传代培养中的基础培养基选自DMEM(high glucose)、DMEM(low glucose)、L-15、RPMI 1640培养基中的一种，在本发明的具体实施方式中，所述原代培养、传代培养中的基础培养基为DMEM(high glucose)培养基；

[0018] 所述冻存液中的基础培养基为DMEM(high glucose)培养基；

[0019] 所述牛血清选自胎牛血清、小牛血清中的一种，优选胎牛血清。

[0020] 基本培养基购自Gibco公司DMEM高糖培养基，货号为11960044，DMEM高糖培养基含有4500mg/L D-葡萄糖，不含L-谷氨酰胺，不含丙酮酸钠。

[0021] 进一步地，所述原代培养、传代培养、细胞冻存的培养液组分中均还包括1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L丙酮酸钠。

[0022] 进一步地，所述原代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、300~600IU/mL青霉素、300~600 μ g/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L丙酮酸钠；

[0023] 所述传代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L丙酮酸钠；

[0024] 所述细胞冻存的冻存液组分包括：基础培养基、10~20%牛血清、50~250IU/mL青霉素、50~250 μ g/mL链霉素、10~20%DMSO、1~5mmol/L谷氨酰胺、1~5mmol/L丙酮酸钠；

[0025] 更进一步地，所述原代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、15%牛血清、500IU/mL青霉素、500 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L丙酮酸钠；

[0026] 所述传代培养的细胞培养液的组分包括：基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L丙酮酸钠；

[0027] 所述细胞冻存的冻存液组分包括：基础培养基、10%牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、10%DMSO、2.5mmol/L谷氨酰胺、2.5mmol/L丙酮酸钠。

[0028] 进一步地,所述原代培养的步骤包括:用无菌PBS冲洗鳃组织后接种在培养瓶中倒置培养,培养瓶中添加1ml原代培养基用以保持培养瓶中湿度,防止鳃组织干燥细胞死亡,次日加入细胞培养液3ml,培养至长成细胞单层;

[0029] 所述原代培养的条件为:22~26℃培养箱中倒置24小时,优选为23℃培养箱中倒置过夜。

[0030] 所述鳃细胞的获取步骤包括:将3个月大的仔鱼用无菌水漂洗后,再用75%酒精浸泡40~100s,晾干后取鳃组织。

[0031] 进一步地,所述传代培养的步骤包括:原代鳃细胞铺满瓶底60%,吸出原代培养液,悬起细胞,加入细胞培养液后进行传代培养。

[0032] 进一步地,所述悬起细胞的方法为胰酶消化法;进一步地,所述胰酶消化法使用的试剂包括0.2~0.4%胰蛋白酶-EDTA,优选为0.25%胰蛋白酶-EDTA;

[0033] 所述传代培养的方式为:首次传代按1:1传,此后按1:2进行传代,每8~12天传代一次,优选为每10天传代一次;

[0034] 所述传代培养的温度为22~26℃,优选为25℃。

[0035] 进一步地,所述细胞冻存的步骤包括:取对数生长期细胞经胰酶消化后,离心,将得到的沉淀与冻存液混合、重悬,液氮保存;

[0036] 所述重悬后的细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL,优选为 1×10^6 个/mL。

[0037] 进一步地,所述复苏的步骤包括:将冻存液于37℃水浴中快速融化、离心,得到沉淀后用传代细胞培养液重悬,22~26℃培养至长成细胞单层。

[0038] 本发明的有益效果是:

[0039] (1)本发明方法传代培养到第20代后得到的鳃细胞致死率低,可获得大量的鳃细胞,方便用于裸鲤营养、免疫、环境毒性、基因功能分析等研究。

[0040] (2)本发明方法简单易行,无需特殊设备,在一般的无菌培养室内均可操作。

附图说明

[0041] 图1为原代培养图;

[0042] 图2为第20代传代培养图。

具体实施方式

[0043] 下面对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 本发明DMEM高糖培养基购自Gibco公司,产品货号为11960044;胎牛血清购自上海生工生物工程有限公司,货号E510008。若无其他特殊说明,本发明中使用的试剂均可市购获得。

[0045] 实施例1

[0046] (1)青海湖裸鲤鳃的获取

[0047] 选择在池塘养殖3个月的青海湖裸鲤仔鱼个体,使用无菌水浸泡漂洗3次,每次10~20分钟,再以75%酒精浸泡鱼体1分钟后晾干,取其皮下鳃组织,放置于无菌PBS中,备用。

[0048] (2) 原代培养

[0049] 先分别采用DMEM(高糖)、Leibovitz's L-15和RPMI 1640三种基础培养基对 12个外植体进行实验,选出最佳的基础培养基。

[0050] 结果表明,在DMEM(高糖)和Leibovitz's L-15培养基中,细胞可从鳃组织中迁移,呈现成纤维细胞或上皮样形态。在DMEM(高糖)添加胎牛血清和青霉素链霉素溶液中培养25天后,外植体移出的单层细胞可达到传代要求进行传代培养。相比之下,在L-15培养基中,单层细胞在组织块周围的迁移速度太慢。因此,在后续的传代过程中,使用DMEM(高糖)作为基础培养基。

[0051] 为了在传代培养20代后还能得到大量的鳃细胞,本发明首先配制如下原代细胞培养液:DMEM(high glucose)培养基、15%胎牛血清、500IU/mL青霉素、500 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺和1.5mmol/L丙酮酸钠。

[0052] 将获得的鳃组织1g剪成小块,每小块为1mm²,使用无菌PBS冲洗3遍,每次5分钟,将其接种于25cm²细胞培养瓶中,加入原代培养基1ml,在23℃培养箱中倒置过夜,于次日加入原代培养液3ml,每三天更换以此培养液,10天以后细胞开始从组织块中迁移(图1),30~40天即可长成细胞单层,可覆盖40-60%培养瓶底部。此种处理方法可以控制污染低于20%。

[0053] (3) 传代培养

[0054] 按照如下配方配制传代细胞培养液:DMEM(high glucose)培养基(Gibco)、10%胎牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、2.5mmol/L谷氨酰胺和 1.5mmol/L丙酮酸钠。

[0055] 待原代培养中的鳃细胞铺满培养瓶瓶底60%后开始进行传代培养,步骤如下:先吸出培养瓶中的原代培养液,使用0.25%胰蛋白酶-EDTA的胰酶消化法传代悬起细胞,加入传代培养液3mL中和胰酶反应,首次传代按1:1传,此后按 1:2进行传代,于25℃培养箱中继续培养,平均每10天传代一次,所得到的细胞状态良好、稳定。

[0056] (4) 细胞冻存

[0057] 按照如下配方配制细胞冻存液:DMEM(high glucose)培养基、10%胎牛血清、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、10%DMSO、2.5mmol/L谷氨酰胺和 1.5mmol/L丙酮酸钠。

[0058] 传代培养20代后,鳃细胞系建立成功(图2),取对数生长期细胞,经胰酶消化后,细胞悬液1200rpm离心5分钟,弃掉上清,向细胞沉淀中加入配制的细胞冻存液,重悬,控制细胞浓度为1 \times 10⁶~1 \times 10⁷个/mL,将1mL细胞悬液转移至1.8mL冻存管中,将冻存管置于程序降温盒中,-80℃放置24小时后放入液氮中长期保存。

[0059] (5) 细胞复苏

[0060] 将冻细胞从液氮中取出,放入37℃水浴锅中快速摇晃至融化,细胞悬液 1200rpm离心5分钟除上清液;用传代细胞培养液1ml重悬细胞,并转移至细胞培养瓶中,25℃培养箱中培养,8~10天细胞即长成单层。

[0061] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

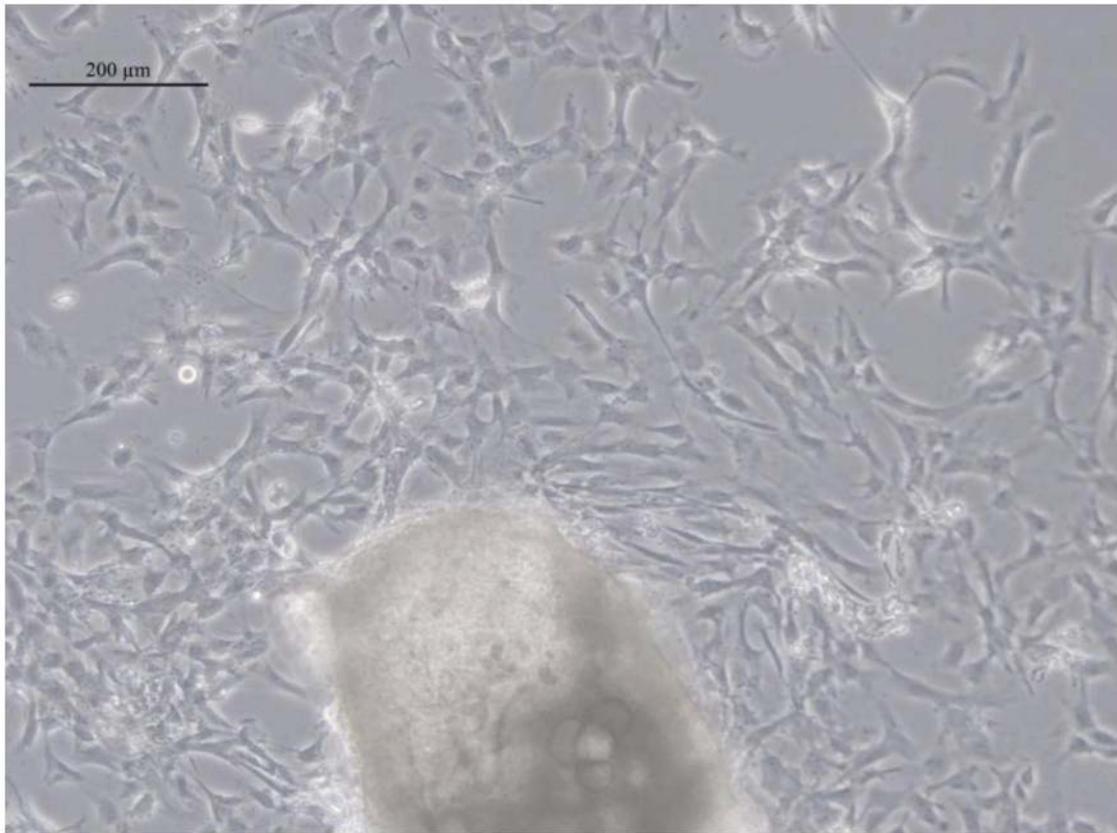


图1

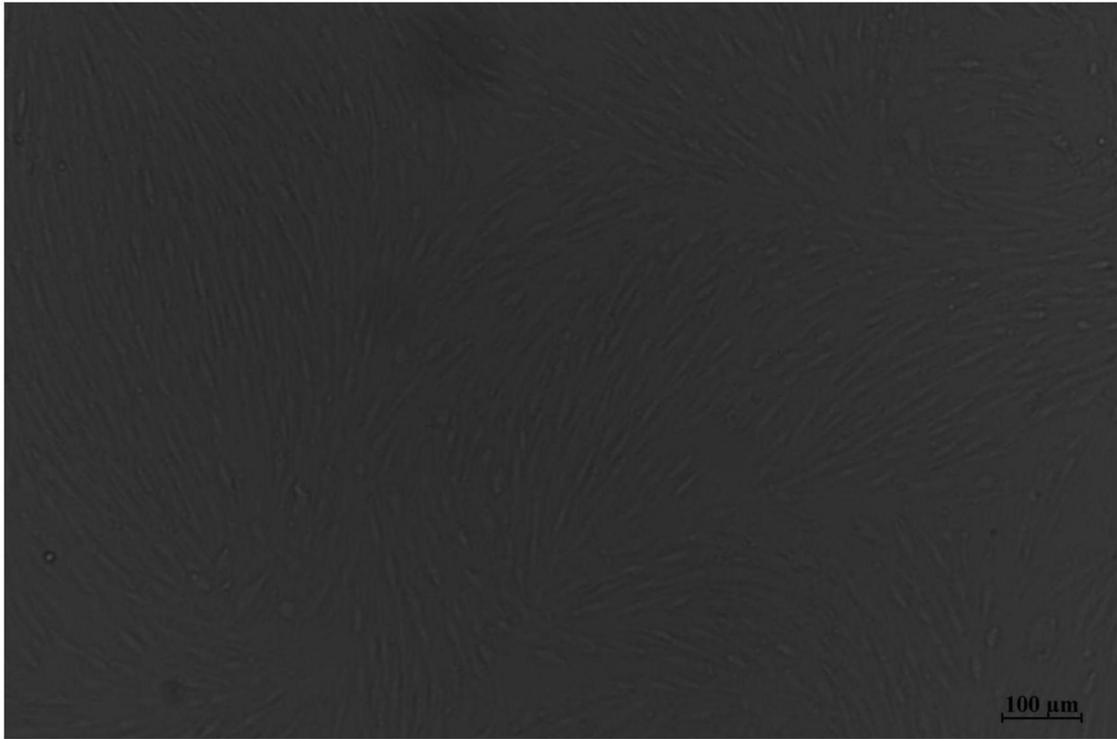


图2