



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102766595 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201210288477. 5

(22) 申请日 2012. 08. 07

(71) 申请人 中国科学院昆明动物研究所

地址 650223 云南省昆明市五华区教场东路
32 号

(72) 发明人 潘晓赋 王晓爱 杨君兴 陈小勇

(74) 专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限公司 53115

代理人 杨宏珍

(51) Int. Cl.

C12N 5/077(2010. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法

(57) 摘要

本发明涉及一种鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法,属于淡水生物细胞培养技术领域。该方法以鳊浪白鱼心脏组织为材料,清洗剪碎后,采用透明质酸酶和 II 型胶原酶联合消化获得游离心脏细胞和疏松组织块,接种于 25cm²培养瓶中,加入含有胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子和硫酸软骨素的 L-15 培养液,置于 28℃ 培养箱培养。每隔 3 天半更换培养液,待细胞长成单层后,采用胰蛋白酶消化法进行传代。本发明的有益效果在于: 1、操作简便;2、构建的鳊浪白鱼心脏细胞系的细胞生长状态良好,形态为成纤维样细胞,能连续传代 40 代以上,直接用于环境毒理学研究环境污染物的模型,进行污染检测和安全性评价;3、该方法也适用于其他鱼类构建心脏细胞系。

1. 一种鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法,其特征在于该构建方法的具体步骤如下:

a. 制备细胞培养液

选择 L-15 培养基,向培养基中加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子和硫酸软骨素,使胎牛血清的终浓度为 20%,人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 3 ng/ml,硫酸软骨素的浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。pH 值为 7.0-7.4,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用;

b. 原代培养

先用 8 mg/L 高锰酸钾浸泡鲜活鳊浪白鱼 10 min,对鱼进行整体消毒,以 75% 酒精再次消毒,置于超净工作台中,用无菌解剖器械取其心脏,置于 12 孔板中,加入 PBS+200 IU/ml 青霉素+200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的溶液浸泡心脏组织,浸泡 20 min 后,将心脏组织用 PBS+200 IU/ml 青霉素+200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的溶液清洗三次,剪成组织小块,用 0.5% 透明质酸酶和 0.2%II 型胶原酶联合消化 30 min,收集心脏组织块,并将其均匀接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,正置干贴过夜,次日加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素+100 IU/ml 青霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的细胞培养液 5ml,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中启动原代培养,每隔 3 天半量更换培养液,第 8 天细胞开始迁出,第 45 天细胞长成单层;

c. 继代培养

待细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养液,用不含抗生素的 PBS 溶液清洗两遍,加入 0.125% 的胰蛋白酶 1.5 ml,消化 2 min,细胞变圆后,加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素+100 IU/ml 青霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的细胞培养液 8.5 ml,用吸管吹打,制成细胞悬液;然后接种于两个新培养瓶内,原贴有心脏组织块的培养瓶亦加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素+100 IU/ml 青霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的细胞培养液 5 ml,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养;以后 7 天传代一次,传至第 2 代时,培养液中的抗生素浓度减半,传至第 3 代时,将培养瓶中的培养液替换成 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素的细胞培养液 5ml,传至第 8 代时,将培养液中血清含量降至 10%,此时,细胞系建立成功。

一种鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法,属于淡水生物细胞培养技术。

背景技术

[0002] 鳊浪白鱼 *Anabarilius grahami* 隶属于鲤形目 Cypriniforms、鲤科 Cyprinidae、白鱼属 *Anabarilius*, 俗称白鱼, 是仅产于云南抚仙湖的珍稀鱼种, 是云南四大名鱼之一。此鱼肉细嫩鲜美, 软刺薄鳞, 清香可口。该鱼曾是抚仙湖的主产鱼种, 多年来, 由于外来鱼种入侵, 以及水质恶化, 捕捞过度, 已处于濒危边缘。虽然 1999 年以来, 中科院昆明动物研究所人工繁殖成功, 保护并挽救了这一珍稀鱼种, 使其近年产量保持平稳。但野生种群仍在锐减, 且并未给出基于鳊浪白鱼自身的种群衰减原因。而细胞系的建立可望作为环境毒理学研究环境污染物的模型, 对淡水水体中存在的各种环境污染物, 包括基因毒物、致癌物和环境激素等, 进行污染检测和安全性评价; 还可应用于鱼类病毒的分离、繁殖、病毒疫苗研制, 在分子细胞水平寻找种群衰减的原因。

[0003] 经文献检索, 未见与本发明的相同报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种简便易行的鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法, 以弥补现有技术不足, 满足对鳊浪白鱼理论研究以及在环境毒理学中的应用。

[0005] 本发明的鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法, 其具体步骤如下:

[0006] a. 制备细胞培养液

[0007] 选择 L-15 培养基, 向培养基中加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子和硫酸软骨素, 使胎牛血清的终浓度为 20%, 人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 3 ng/ml, 硫酸软骨素的浓度为 0.5 μg/ml。pH 值为 7.0-7.4, 置于 4℃ 冰箱中保存, 备用;

[0008] b. 原代培养

[0009] 先用 8 mg/L 高锰酸钾浸泡鲜活鳊浪白鱼 10 min, 对鱼进行整体消毒, 以 75% 酒精再次消毒, 置于超净工作台中, 用无菌解剖器械取其心脏, 置于 12 孔板中, 加入含有抗生素的 PBS 溶液浸泡心脏组织, 其中: 青霉素的浓度为 200 IU/ml, 链霉素的浓度为 200 μg/ml, 庆大霉素的浓度为 100 μg/ml, 浸泡 20 min 后, 将心脏组织用 PBS+200 IU/ml 青霉素 +200 μg/ml 链霉素 +100 μg/ml 庆大霉素的溶液清洗三次, 剪成组织小块, 用 0.5% 透明质酸酶和 0.2% II 型胶原酶联合消化 30 min, 收集心脏组织块, 并将其均匀接种于 25 cm² 细胞培养瓶中, 28℃ 培养箱中, 正置干贴过夜, 次日加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 μg/ml 硫酸软骨素+100 IU/ml 青霉素+100 μg/ml 链霉素的培养液 5 ml, 在 28℃ 培养箱中启动原代培养, 每隔 3 天半量更换培养液, 第 8 天细胞开始迁出, 第 45 天细胞长成单层;

[0010] c. 继代培养

[0011] 待细胞长成单层后, 吸出培养瓶中的培养液, 用不含抗生素的 PBS 溶液清洗两遍, 加入 0.125% 的胰蛋白酶 1.5 ml, 消化 2 min, 细胞变圆后, 加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml

bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的细胞培养液 8.5 ml, 用吸管吹打, 制成细胞悬液; 然后接种于两个新培养瓶内, 原贴有心脏组织块的培养瓶亦加入 5 ml L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素细胞培养液, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养; 以后 7 天传代一次, 传至第 2 代时, 培养液中的抗生素浓度减半, 传至第 3 代时, 将培养瓶中的培养液替换成 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素细胞培养液 5 ml, 传至第 8 代时, 将培养液中血清含量降至 10%, 此时, 细胞系建立成功。

[0012] 本发明的各步骤中所用的百分比为体积百分比。

[0013] 本发明的有益效果在于:

[0014] 1、操作简便易行;

[0015] 2、构建的鳊浪白鱼心脏细胞系 (AGH) 细胞生长状态良好, 形态为成纤维样细胞, 能连续传代 40 代以上, 直接用于环境毒理学研究环境污染物的模型, 进行污染检测和安全性评价; 还能应用于鱼类病毒的分离、繁殖、病毒疫苗研制。

[0016] 3、该构建方法也适用于其他鱼类构建心脏的细胞系

具体实施方式

[0017] 本发明的鳊浪白鱼心脏细胞系的构建方法, 该构建方法的具体步骤如下:

[0018] a. 制备细胞培养液

[0019] 选择 L-15 培养基, 向培养基中加入胎牛血清、人碱性成纤维细胞生长因子和硫酸软骨素, 使胎牛血清的体积占总体积的终浓度为 20%, 人碱性成纤维细胞生长因子的浓度为 3 ng/ml, 硫酸软骨素的浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。pH 值为 7.0-7.4, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 备用;

[0020] b. 原代培养

[0021] 先用 8 mg/L 高锰酸钾浸泡鲜活鳊浪白鱼 10 min, 对鱼进行整体消毒, 以 75% 酒精再次消毒, 置于超净工作台中, 用无菌解剖器械取其心脏, 置于 12 孔板中, 加入含有抗生素的 PBS 溶液浸泡心脏组织, 其中: 青霉素的浓度为 200 IU/ml, 链霉素的浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 庆大霉素的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 浸泡 20 min 后, 将心脏组织用 PBS+200 IU/ml 青霉素 +200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的溶液清洗三次, 剪成组织小块, 用 0.5% 透明质酸酶和 0.2% II 型胶原酶联合消化 30 min, 收集心脏组织块, 并将其均匀接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 正置干贴过夜, 次日加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素细胞培养液 5 ml, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中启动原代培养, 每隔 3 天半量更换培养液, 第 8 天细胞开始迁出, 第 45 天细胞长成单层;

[0022] c. 继代培养

[0023] 待细胞长成单层后, 吸出培养瓶中的培养液, 用不含抗生素的 PBS 溶液清洗两遍, 加入 0.125% 的胰蛋白酶 1.5 ml, 消化 2 min, 细胞变圆后, 加入 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素细胞培养液 8.5 ml, 用吸管吹打, 制成细胞悬液; 然后接种于两个新培养瓶内, 原贴有心脏组织块的培养瓶亦加入 5 ml L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的培养液, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养; 以后 7 天传代一次, 传至第 2 代时, 培养液中的抗生素浓度减半, 传至第 3 代时, 培养瓶中的培养液替换成 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5

$\mu\text{g/ml}$ 硫酸软骨素的细胞培养液 5 ml, 传至第 8 代时, 将培养液中血清含量降至 10%, 此时, 细胞系建立成功。

[0024] d. 细胞冻存与复苏

[0025] 对上述构建的心脏细胞进行冻存, 配置细胞冻存液, 分别取胎牛血清、L-15 和 DMSO, 按 5:3.5:1.5 的体积比混合, 现用现配。

[0026] 细胞冻存: 取处于对数生长期的细胞, 经上述胰酶消化后获得细胞悬液, 1000 rpm 离心 10 min, 弃掉上清液。向细胞沉淀中加入适量配置好的细胞冻存液, 重悬, 使细胞浓度至 3×10^6 个 /ml, 将 1 ml 细胞悬液转移至 1.8 ml 无菌冻存管中。按一定程序降温, 4℃ 冰箱 60 min, -20℃ 冰箱 45 min, -80℃ 冰箱过夜, 最后放入液氮中长期保存。

[0027] 对上述冻存的细胞进行复苏, 将冻存管从液氮罐中取出, 放入 37℃ 水浴锅中快速摇晃至融化。然后在无菌条件下将解冻细胞转移至 10 ml 离心管中, 1000 rpm 离心 10 min, 去除上清, 收集细胞。用 10 ml L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸软骨素 +100 IU/ml 青霉素 +100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素细胞培养液重悬细胞, 并转移至两个细胞培养瓶中, 28℃ 培养箱中培养。待细胞长成单层后, 按上述方法(步骤 c)传代, 此时换成 L-15+20%FBS+3 ng/ml bFGF+0.5 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸软骨素培养液, 每瓶 5 ml。