

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211021001

http://www.yykxjz.cn/

罗晓雯, 曾令兵, 江南, 艾桃山, 范玉顶, 李波, 谢德兵, 孟彦, 周勇. 鳊脑组织细胞系的建立及其病毒敏感性研究. 渔业科学进展, 2022, 43(5): 179-188

LUO X W, ZENG L B, JIANG N, AI T S, FAN Y D, LI B, XIE D B, MENG Y, ZHOU Y. Establishment of a cell line derived from the brain tissue of madanrin fish *Siniperca chuatsi* and its susceptibility to infection by fish viruses. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(5): 179-188

鳊脑组织细胞系的建立及其病毒敏感性研究*

罗晓雯¹ 曾令兵¹ 江南¹ 艾桃山² 范玉顶¹
李波² 谢德兵² 孟彦¹ 周勇^{1①}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所 湖北 武汉 430223;

2. 武汉市农业科学院 湖北 武汉 430065)

摘要 鱼类细胞是开展鱼类病毒分离鉴定、功能基因分析以及生物制品制备等研究的重要物质基础。鳊(*Siniperca chuatsi*)是深受养殖者和消费者欢迎的养殖品种。随着鳊鱼养殖产量的逐年增加,其病害问题尤其是病毒病问题也日趋严重,但是,可用于鳊鱼病毒分离和基因功能分析的鳊细胞系缺乏。本研究采用组织块消化法,对来源鳊脑组织的细胞进行原代培养,建立了鳊脑组织细胞系,命名为 MFB。MFB 细胞在 28℃ 含 10% 胎牛血清的 L-15 中已稳定传代超过 70 次,第 25 代鳊脑组织细胞的染色体众数为 56。采用免疫荧光细胞化学技术(β -tubulin 和 Neu-N)鉴定 MFB 细胞的神经元纯度,结果显示,培养的 MFB 细胞为神经元类细胞。病毒敏感性实验结果显示,鳊蛙虹彩病毒(MFRaIV)、大口黑鲈蛙虹彩病毒(LMBRaIV)和大鲵虹彩病毒(GSIV)均可在 MFB 细胞中产生典型细胞病变效应,病毒滴度分别为 $10^{8.68\pm 0.12}$ 、 $10^{8.36\pm 0.15}$ 、 $10^{10.15\pm 1.85}$ TCID₅₀/mL。使用脂质体 Lipofectamine[®]2000 将 pEGFP-N1 转入 MFB 细胞,转染效率可达 20%。本研究建立的鳊脑组织细胞系不仅对多种蛙虹彩病毒敏感,而且转染质粒效率较高,为鳊病毒性病原的分离及基因功能研究奠定了前期基础。

关键词 鳊; 脑组织; 细胞系; 生物学特性; 病毒敏感性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)05-0179-10

鳊(*Siniperca chuatsi*)亦称桂花鱼,属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、鳊属(*Siniperca*)。鳊鱼肉质鲜美,经济价值高,在水产品市场被誉为“淡水石斑”,是具有出口创汇能力的名贵经济鱼类(吴斌等, 2015)。自鳊的亲鱼培育、苗种繁育以及配套的饲

养技术获得成功之后,鳊鱼养殖在我国多个省市得以迅速发展(付小哲, 2017; 董浚键等, 2018)。随着鳊养殖规模的逐年扩大和养殖密度的不断提高,鳊的疾病也日益增多。感染鳊的常见病原有:寄生虫类,孢子虫、指环虫、车轮虫、斜管虫、中华蚤、锚头蚤、小

* 国家重点研发计划(2019YFD0900105)、湖北省技术创新专项(2018ABA101)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD44)和国家淡水水产种质资源库(FGRC18537)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program (2019YFD0900105), Technical Innovation Special Project of Hubei Province (2018ABA101), Basic Scientific Research Funds of Central Public Welfare Research Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD44), and National Freshwater Aquatic Germplasm Resource Center (FGRC18537)].

罗晓雯, E-mail: ml8790069727@163.com

① 通信作者: 周勇, 副研究员, E-mail: zhoyou@yfi.ac.cn

收稿日期: 2021-10-21, 收修改稿日期: 2021-10-29

瓜虫等(杨承泰等, 2008); 细菌类, 柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鲺鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*); 真菌类, 水霉(*Saprolegnia*) (杨承泰等, 2008); 病毒类, 传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)(何建国等, 1998)、大口黑鲈蛙虹彩病毒(largemouth bass Ranavirus, LMBRaIV)、鳊弹状病毒(*Siniperca chuatsi rhabdovirus*, SCRv)等(梁红茹等, 2021)。其中, 病毒病造成的危害最大, 几种病毒的发病率普遍在 60%以上, 发病严重的鱼塘死亡率达 100% (付小哲等, 2013)。由于病毒必须在活细胞内才能增殖, 因此, 建立对病毒敏感的鳊鱼来源细胞系, 是进行鳊病毒性病原分离与鉴定、感染与致病机理研究、疫苗制备的重要基础。本研究通过对鳊脑组织细胞的离体培养, 建立可连续传代的鳊脑组织细胞系(mandarin fish brain, MFB), 并进行了几种常见水生病毒的敏感性实验和外源基因转染实验, 旨在为今后开展鳊鱼病毒性疾病的研究奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼与病毒株 健康鳊, 体长约为(20±4) cm, 体重约为(200±20) g, 来源于湖北省武汉市农业科学院养殖基地。鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)、鳊蛙虹彩病毒(MFRaIV)、大口黑鲈蛙虹彩病毒(LMBRaIV)、大鲢虹彩病毒(GSIV)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV-I)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤浮肿病毒(CEV)和鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)均由本实验室分离保存。

1.1.2 试剂与耗材 L-15、RPMI1640、M199、MEM、DMEM 培养基、二甲基亚砷(DMSO)、秋水仙素、胎牛血清(FBS)、Antibiotic-Antimycotic (100×) 购自 Gibco 公司; I 型胶原酶购自上海源叶生物科技有限公司; 生长因子 bFGF 和 IGF 购自 Peprotech 公司; 含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶溶液购自杭州吉诺生物医药技术公司; Lipofectamine®2000 购自 Invitrogen 公司; HPV 碘购自北京渔经生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 原代培养和传代培养 20 mg/L 的 HPV 碘浸泡鳊 30 min, 然后用 75%酒精擦拭鳊鱼体表, 在生物安全柜内取鳊鱼脑组织, 置于含有 2×Antibiotic-Antimycotic 的 PBS 缓冲液中洗涤 4~5 次后, 在无菌培养皿中, 用灭菌的眼科剪刀将组织剪成约 3 mm³ 大小的组织块, 移至 50 mL 离心管中, 加入适量含

0.25% EDTA 的胰蛋白酶和胶原酶的消化液, 37℃ 消化 0.5~1 h 后, 用含 10% FBS 的 L-15 培养基终止消化, 过滤后, 1000 r/min 离心 5 min, 加 5 mL L-15 培养基重悬后移入 25 cm² 的细胞培养瓶中, 培养基中含 30%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、10 ng/mL 的 bFGF 和 40 ng/mL IGF, 置于 28℃ 培养箱进行原代培养, 逐日观察细胞贴壁状况, 4 d 或 5 d 后换液, 之后每 3 d 更换 1/2 培养液。当细胞单层达培养瓶底面积的 80%时, 参照曾令兵等(2009)的方法对细胞进行传代培养。当传代至第 5 代后将培养基中 FBS 的浓度降低至 15%; 当细胞传代至第 10 代后, 培养基中 FBS 的浓度降低至 10%, 并且不再添加生长因子等添加物。

1.2.2 细胞最佳培养条件的确定 MFB 细胞最佳培养基的确定: 选择 5 种不同的培养基 L-15、RPMI1640、M199、MEM 和 DMEM, 分别配制血清体积分数为 10%的完全培养基。将细胞密度调整至 5×10⁴ 个/mL, 接种到 24 孔板, 每孔 1 mL, 置于 28℃ 培养箱, 每天取 3 孔计数, 连续取 7 d, 绘制其在不同培养基条件下的生长曲线, 确定 MFB 细胞的最佳培养基。

MFB 细胞最适培养温度的确定: 用血清体积分数为 10%的 L-15 培养基将消化好的细胞密度调至为 5×10⁴ 个/mL, 接种至 24 孔板, 分别置于 15℃、22℃、28℃ 和 34℃ 培养箱中, 每天取 3 孔计数, 连续取 7 d, 绘制其在不同温度下的生长曲线, 确定 MFB 细胞最适培养温度。

MFB 细胞最适血清浓度的确定: 配制血清体积分数分别为 5%、10%、15%和 20%的 L-15 培养基, 将消化好的细胞密度调至为 5×10⁴ 个/mL, 接种至 24 孔板, 每天取 3 孔计数, 连续取样 7 d, 绘制其在不同血清浓度条件下的生长曲线, 确定 MFB 细胞最适血清浓度(曾令兵等, 2009; 赵建青等, 2019)。

1.2.3 鳊脑细胞的生长特性测定 按照 1.2.2 的细胞密度和方法将 MFB 细胞接种至 24 孔板中, 每孔 1 mL, 置于 28℃ 恒温培养箱培养, 培养基为 L-15。每隔 12 h 取出 3 孔细胞消化后分别计数, 连续取 7 d 并绘制生长曲线; 根据 $T=t \times \lg 2 / \lg(N_t/N_0)$ 计算 MFB 细胞的群体倍增时间, 式中, N_t 为 t 时间的细胞数, N_0 为接种细胞数。

1.2.4 细胞染色体分析 取 25 代鳊脑组织细胞, 培养 24 h 后更换新鲜培养基, 添加终质量浓度为 1 μg/mL 的秋水仙素, 继续培养 13~16 h, 用 Trypsin-EDTA 消化细胞单层并离心收集细胞悬液。参照 Wang 等(2004)和 Lu 等(2000)的方法进行染色体制片, 100 倍油镜下观察和统计 MFB 染色体数目。

1.2.5 28S rRNA 基因序列分析与比对 设计鳃 28S rRNA 基因的特异性引物(MF-18SF: 5'-TAGCGA AACCACAGCCAAGG-3'; MF-18SR: 5'-CCAACGCT TGGTGAATTCTG-3'), 以 MFB 细胞总基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增片段经测序后, 于 NCBI GenBank 数据库中进行 Blast 比对与分析。

1.2.6 神经元类细胞的免疫荧光鉴定 将 MFB 细胞传至共聚焦皿中, 待细胞长至 80%, 吸净皿中原有培养基, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)浸洗 3 次, 每次 5 min; 4%多聚甲醛室温固定 30 min; 使用 0.2% TritonX-100 室温孵育 10~15 min, 去除 TritonX-100 后, 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min; 在细胞孔板里滴加按一定比例稀释的一抗: β -tubulin (1 : 250)、Neu-N (1 : 200), 平放于湿盒内 4℃孵育过夜。一抗孵育结束后用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min, 去除 PBS 后, 滴加与一抗相应种属的二抗(Cy3 稀释比例为 1 : 2000) 稀释液覆盖细胞, 室温避光孵育 50~120 min; 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min, 去除 PBS 后在皿中滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min; 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min, 在共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.7 MFB 对常见水生病毒的敏感性 取 39 代 MFB 细胞传至 T₂₅ 细胞培养瓶中, 待细胞长至 80% 时, 分别接种 ISKNV、MFRaIV、LMBRaIV、GSIV、GCRV-I、KHV、CEV 和 CyHV-2 等 8 种病毒, 每个 T₂₅ 细胞瓶接种 0.5 mL 病毒液, 用无血清培养基补足 1 mL, 28℃培养箱中孵育 1 h 后, 加 4 mL 含 2% FBS 的 L-15 培养基, 在显微镜下观察细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 发生情况。能连续产生 CPE 的病毒传 5 代后, 采用微孔板培养法(李莉娟等, 2013) 测病毒滴度。将胰酶消化分散后的 MFB 细胞接种到 96 孔板中(Corning, 美国), 每孔接种 0.1 mL, 每孔细胞数约为 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个/mL。在离心管中用 L-15 培

养基对病毒液进行连续 10 倍的稀释。将稀释好的病毒液按梯度分别接种到 96 孔培养板中, 每个稀释度接 8 孔, 每孔接种 100 μ L。同时设正常细胞对照, 逐日观察并记录结果, 观察 7 d。按 Reed-Muench 两氏法计算结果(李莉娟等, 2013)。

1.2.8 MFB 的瞬时转染效率 转染前 1 d, 将细胞传代 1 次, 使转染当天 T₂₅ 细胞培养瓶中细胞密度达到 85%~90% 的融合。参照 Lipofectamine[®]2000 Reagent 说明书操作, 配制 DNA-脂质体转染复合物, 将配置 DNA-脂质体转染复合物逐滴加入培养瓶中并混匀; 28℃培养 4~6 h 后换成含 10%胎牛血清的 L-15 培养基, 28℃培养 48 h, 在倒置荧光显微镜下观察转染水平, 随机选取 5 个视野(100 \times), 计算阳性转染细胞数和总细胞数, 取其均值作为转染效率(阳性转染细胞), 计算公式如下,

$$\text{转染效率}/\% = \text{阳性细胞数}/\text{视野细胞总数} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 原代和传代培养

采用胰酶消化法培养技术, 对来源于鳃脑组织的细胞进行原代培养, 消化后第 2 天约有 30% 的细胞贴壁, 7 d 左右形成单层, 约占瓶底面积的 80% (图 1A)。细胞传代后约 5 d 可形成单层, 传代至第 5 代后细胞生长速度加快, 约 3~5 d 即可传代。鳃脑组织细胞传代后贴壁良好, 待传代至第 10 代时, 更换为含 10% FBS 的 L-15 培养基。目前, 鳃脑组织细胞系已经传至 70 多代, 细胞生长稳定, 命名为 MFB 细胞系(图 1B)。

2.2 最佳培养基

MFB 细胞在 L-15、RPMI1640、M199、MEM、DMEM 5 种不同培养基中均能稳定生长增殖, 细胞计

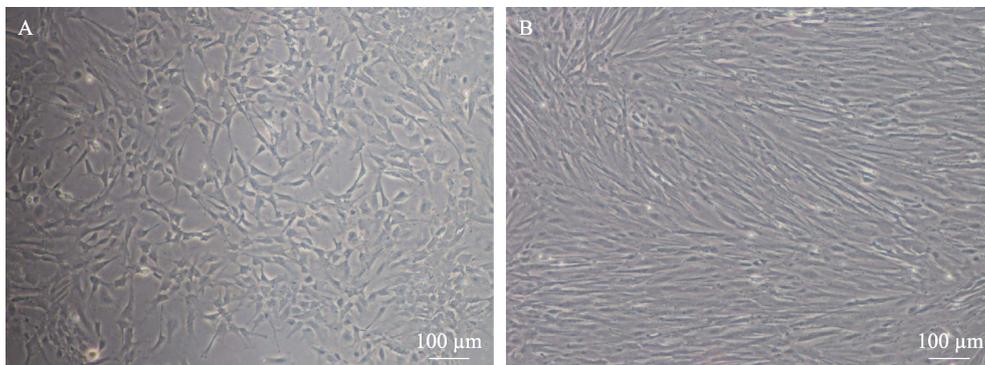


图 1 原代培养第 7 天和第 35 代的 MFB 细胞

Fig.1 Primary culture and the 35th passage of MFB cells

A: 原代培养第 7 天; B: 第 35 代的 MFB 细胞

A: Primary culture of MFB cells at day 7; B: The 35th passage of MFB cells

数结果显示: MFB 细胞在 L-15、M199 培养基中增殖速度最快, 培养第 5 天形成致密细胞单层, 但从细胞状态以及单层维持时间方面看, L-15 培养基要优于 M199 培养基, 细胞数目超过 2.5×10^5 个/mL。在 RPMI1640 和 MEM 培养基中, MFB 细胞能正常生长, 不过增殖速度比较缓慢。在 DMEM 培养基中, MFB 细胞不能正常增殖, 细胞慢慢开始死亡(图 2)。

2.3 最佳血清浓度的确定

使用 L-15 培养基, 分别添加 5%、10%、15% 和 20% 血清, 在 28℃ 培养 MFB 细胞。细胞计数结果显示: 在含 5% 和 20% 血清的培养基里, MFB 细胞均可以正常的贴壁、生长, 但细胞的增殖速度缓慢。在含 10% 血清的 L-15 培养基里, 细胞生长增殖迅速, 1—5 d 间呈近指数生长, 培养至第 5 天细胞数目超过 2.5×10^5 个/mL; 但在细胞单层的稳定性及保持时间方面, 含 10% 血清的培养基优于含其他浓度血清的 L-15 培养基(图 3)。

2.4 最适培养温度的确定

使用 L-15 培养基并添加 10% 胎牛血清, 分别在

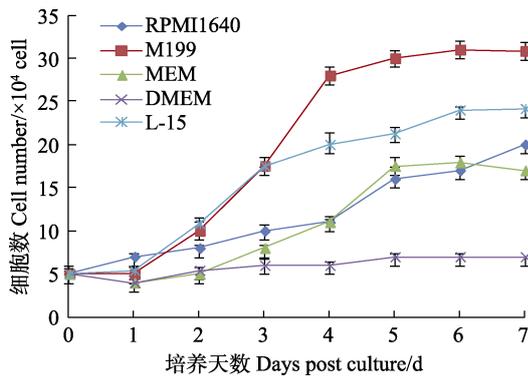


图 2 MFB 细胞在不同培养基中的生长比较
Fig.2 Comparison of the growth of MFB cells cultured in different medium

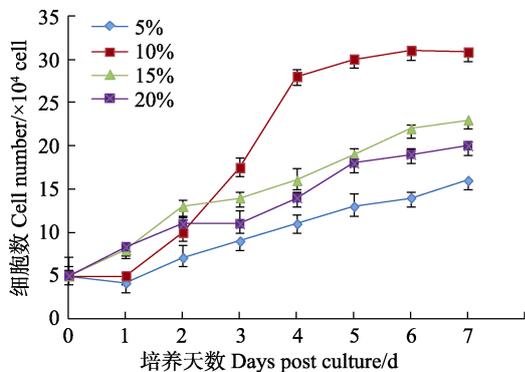


图 3 MFB 细胞在不同血清浓度下的生长曲线比较
Fig.3 Comparison of the growth of MFB cells cultured with fetal bovine serum of different concentrations

15℃、20℃、28℃、34℃ 4 个不同温度条件下培养鳃脑组织细胞的统计计数结果显示: 在 15℃ 条件下培养, 细胞能正常贴壁, 细胞数目最高至 8.75×10^4 个/mL, 但生长速度缓慢; 在 28℃ 条件下培养, 细胞生长增殖迅速, MFB 细胞到第 5 天能形成稳定的细胞单层, 细胞数目最高至 3.0×10^5 个/mL; 在 20℃ 和 34℃ 培养条件下, 细胞生长至第 6 天生长数目超过 1×10^5 个, 随后培养板中出现较多死亡细胞, 致密细胞单层开始出现空洞(图 4)。

2.5 生长特性测定

从第 30 代鳃脑组织细胞的生长曲线(图 5)可以看出, 细胞贴壁、生长、增殖前 1.5 d 为迟缓期, 1.5—3.5 d 处于对数期, 4.5—6.5 d 为基本平台期。通过公式计算, 第 30 代脑细胞的群体倍增时间为 46.6 h, 表明继代培养的鳃脑组织仍表现出旺盛的生长增殖状态。

2.6 染色体分析

染色体统计计数结果显示, 第 25 代鳃脑组织细胞的染色体数目分布在 20~60 之间, 其中拥有 52 条

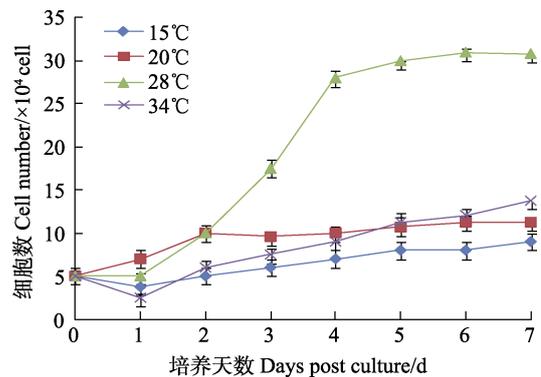


图 4 MFB 细胞在不同培养温度下的生长曲线比较
Fig.4 Comparison of the growth of MFB cells cultured at different incubation temperature

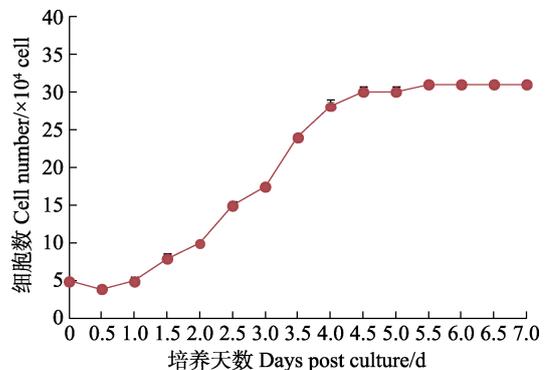


图 5 第 30 代 MFB 细胞的生长曲线
Fig.5 Growth curve of MFB cells at the 30th passage

染色体的细胞占总细胞数的 19%，染色体众数 56 出现率为 20% (图 6)，表明第 25 代 MFB 细胞的染色体出现了很大的变化，从染色体图片上可以看出，细胞的染色体出现了丢失(图 7)。

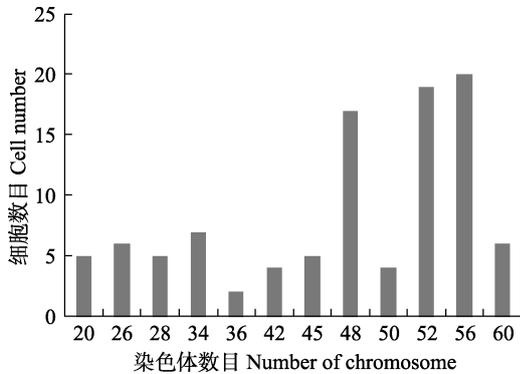


图 6 第 25 代 MFB 细胞染色体分布

Fig.6 Distribution of MFB cell chromosome at 25th passage



图 7 第 25 代 MFB 细胞染色体

Fig.7 MFB cell chromosomes at 25th passage chromosome

2.7 28S rRNA 基因序列分析与比对

以 MFB 细胞总基因组 DNA 为模板，设计鳃 28S rRNA 基因的特异性引物，PCR 扩增获得大小为 528 bp 的部分基因片段，与预期大小相符(图 8)。PCR 扩增片段经测序后，于 GenBank 数据库中进行 Blast 比对与分析。结果显示，PCR 扩增 MFB 细胞 28S rRNA 基因 528 bp 的序列与 GenBank 中发布的来源于鳃 28S rRNA 基因(EF120974)的序列同源率为 100%，证明此细胞系来源于鳃。

2.8 MFB 细胞的鉴定

对传代 50 代后的细胞进行免疫荧光染色鉴定，共聚焦显微镜下观察神经元标志蛋白 β -tubulin 和神经元特异性蛋白 Neu-N 表达均为红色，呈阳性。在 DAPI 染色后，细胞核呈蓝色，整个视野下全部细胞

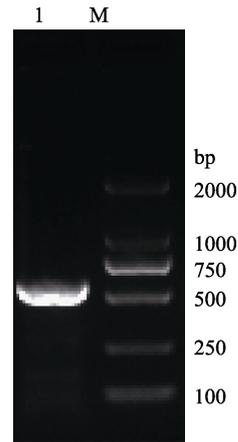


图 8 MFB 细胞 28S rRNA 基因 PCR 扩增产物
Fig.8 PCR amplified products of 28S rRNA gene in MFB cells

M: 2000 bp 分子量标准; 1: 28S rRNA 扩增产物。
M: 2000 bp DNA marker; 1: PCR product of 28S rRNA gene.

均呈红色阳性表达(图 9)，表明建立的 MFB 细胞为神经元类细胞。

2.9 MFB 对常见水生病毒的敏感性

ISKNV、GCRV-I、KHV、CEV 和 CyHV-2 不能在 MFB 细胞中增殖，病毒接种 7 d 后均未出现 CPE，且盲传培养 7 次均未出现 CPE；MFRaIV、LMBRaIV、GSIV 接种 MFB 细胞，1~2 d 后均出现 CPE (图 10)，病毒滴度依次为 $10^{8.68 \pm 0.12}$ 、 $10^{8.36 \pm 0.15}$ 、 $10^{10.15 \pm 1.85}$ TCID₅₀/mL，对盲传 7 次后的样品进行 PCR 检测，结果显示，MFRaIV、LMBRaIV 和 GSIV 均能扩出单一的目的条带，ISKNV、GCRV-I、KHV、CEV 和 CyHV-2 无目的条带。

2.10 MFB 细胞瞬时转染

MFB 细胞传代 50 代后，采用脂质体转染 pEGFP-N1 质粒，转染后 48 h 在荧光倒置显微镜下观察，可见绿色细胞，以随机 5 个视野中绿色阳性细胞的数目占总细胞的比例为转染效率，绿色细胞阳性率可达 $(22.20 \pm 1.72)\%$ (图 11)。

3 讨论

细胞体外培养方法分为组织块移植法、机械分散法和消化分离法，其中消化分离法又分为胰蛋白酶消化法、胶原酶消化法和 EDTA 消化法(王宣刚等，2021)。本研究采用含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶和 I 型胶原酶消化法结合机械分离法，消化后获得的细胞量大，且该方式对细胞的损伤也较小(杨银芬等，2011)，可有效地提高细胞生长成稳定单层细胞的速度

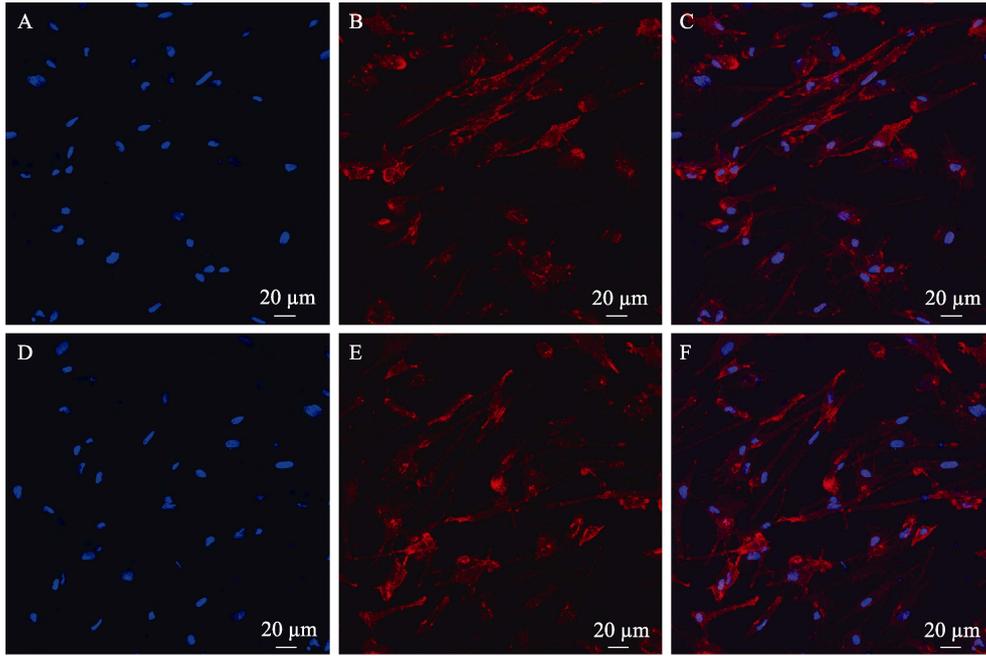


图 9 培养 5 d 的鳊脑神经细胞 Neu-N 和 β -tubulin 免疫荧光染色

Fig.9 NeuN and β -tubulin immunofluorescence staining of brain neurons on the 5th day

A、D: DAPI; B: Neu-N; C: A 与 B 合并图; E: β -tubulin; F: D 与 E 合并图

Neu-N 和 β -tubulin 阳性表达呈红色, DAPI 染的细胞核呈蓝色。

A, D: DAPI; B: Neu-N; C: Merged image of A and B; E: β -tubulin; F: Merged image of D and E
The positive expression of Neu-N and β -tubulin were red; the nuclei stained by DAPI were blue.

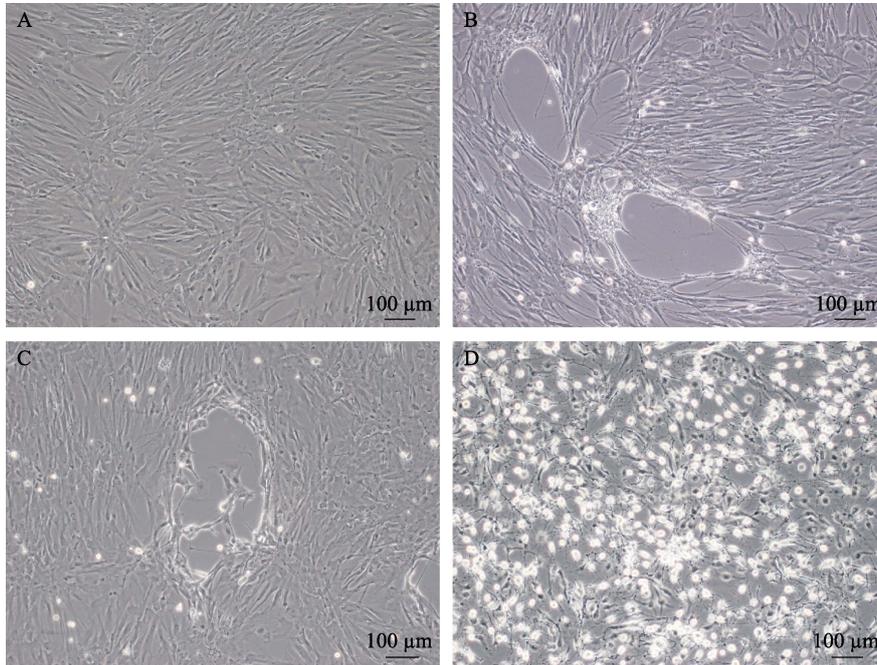


图 10 MFRaIV、LMBRaIV、GSIV 细胞毒接种 MFB 细胞引起的 CPE

Fig.10 CPE induced by MFB cells inoculated with MFRaIV, LMBRaIV and GSIV cytotoxicity

A: 正常 MFB 细胞; B: 接 GSIV 细胞毒 24 h 的 MFB 细胞;

C: 接 LMBRaIV 细胞毒 48 h 的 MFB 细胞; D: 接 MFRaIV 细胞毒 48 h 的 MFB 细胞

A: Normal MFB cells; B: CPE of MFB cells 24 hours GSIV post-infection; C: CPE of MFB cells 48 hours LMBRaIV post-infection; D: CPE of MFB cells 48 hours MFRaIV post-infection

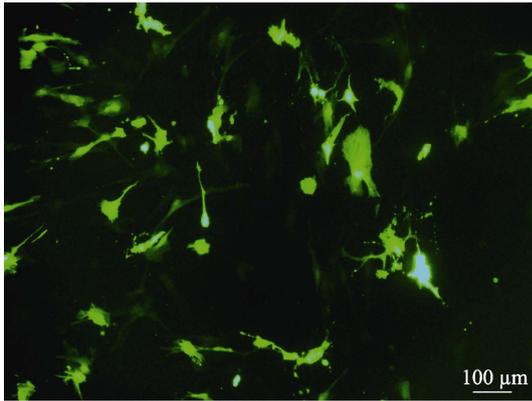


图 11 荧光显微镜下 Lipofectamine[®]2000 转染 pEGFP-N1 的 MFB 细胞

Fig.11 Fluorescent field expression of green fluorescent protein (GFP) in mandarin fish MFB cells

度。此外,该方法相比于组织块移植法,具有快速、操作简单等优点。

培养基种类、血清浓度、培养温度等条件,对细胞的增殖均至关重要,关于细胞培养生长特性的研究主要也集中在这几个方面(代金彩等,2021)。本研究使用了 5 种不同培养基、4 种不同血清浓度以及 4 种不同温度进行细胞培养,对不同条件下的细胞生长速度进行比较,发现 MFB 细胞最佳培养条件为 L-15 培养基,10%血清浓度,28℃下培养。在最适培养条件下,MFB 细胞数目的倍增时间约为 46.6 h。与另外一株鳊脑组织细胞(Chinese perch brain cell, CPB)的最佳培养基一致(Fu *et al.*, 2015),但与鳊鱼苗细胞(mandarin fish fry cell, MFF-1)的最适培养基 DMEM 不同(Dong *et al.*, 2008),这可能与细胞对营养物质的需求和本身生长特性有关,也可能与 MFB 是神经元类成纤维细胞而 MFF 是上皮样细胞有关。

染色体核型分析是鉴定细胞系的一个重要指标。染色体分析显示,第 25 代 MFB 染色体数分布在 20~60 之间,染色体众数为 56,出现频率为 20%,与已报道的鳊染色体数 $2n=48$ 有差异,表明 MFB 细胞在体外传代过程中,染色体出现畸变、缺失、断裂或重组。一般脊椎动物在传代约 50 代以后染色体数目才会出现变化(曾令兵等,2009),而 MFB 细胞在传代 25 代后染色体就出现了变化,说明 MFB 细胞在体外培养的过程中容易受环境的影响,但其机理有待于进一步研究。

Neu-N (neuronal nucleus)是一种神经系统特异性核调节分子,是一种特有的神经元结合蛋白,广泛应用于研究和诊断有丝分裂后的神经元抗原(Lind *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 1992)。 β -tubulin III 是成熟神经元的标志性骨架蛋白,主要分布在突触和胞浆中(Reynolds

et al., 1992; Manochantr *et al.*, 2015)。因此,本研究选取 Neu-N 和 β -tubulin III 作为检测指标。对传代 50 次后的细胞进行免疫荧光染色鉴定,共聚焦显微镜下观察神经元标志蛋白 β -tubulin 和神经元特异性蛋白 Neu-N 表达均为红色,并且整个视野下全部细胞均呈红色阳性表达,表明本研究所建立的 MFB 细胞为神经元细胞。

病毒需要在活细胞内增殖,因此敏感细胞系的建立是开展病毒研究的重要基础(王津津等,2016)。本研究使用 MFB 细胞对 8 种常见水生病毒进行培养,发现 MFRaIV、LMBRaIV 和 GSIV 均能产生典型 CPE,病毒滴度分别达到 $10^{8.68\pm 0.12}$ 、 $10^{8.36\pm 0.15}$ 、 $10^{10.15\pm 1.85}$ TCID₅₀/mL,说明 MFB 细胞对 MFRaIV、LMBRaIV 和 GSIV 均敏感,且 GSIV 在 MFB 细胞中的复制水平高于 MFRaIV 和 LMBRaIV。而 MFB 细胞对 ISKNV、GCRV-I、KHV、CEV 和 CyHV-2 不敏感。国内已经建立的来源于鳊苗的细胞系 MFF (Dong *et al.*, 2008)和来源于鳊脑组织的细胞系 CPB (Fu *et al.*, 2015)对 ISKNV 均敏感,滴度分别为 $10^{6.58}\sim 10^{6.62}$ 和 $10^{6.6}\sim 10^{7.4}$ TCID₅₀/mL。本研究建立的 MFB 细胞接种 ISKNV 后,不产生 CPE,且盲传 7 代 PCR 未能检出病毒特异的核酸目的条带,说明本研究的 MFB 细胞与 Fu 等建立 CPB 有一定差异(Fu *et al.*, 2015)。此外,GSIV 在 MFB 细胞中滴度高达 $10^{10.15\pm 1.85}$ TCID₅₀/mL,高于感染鲤鱼上皮瘤细胞的滴度 ($10^{9.5}\sim 10^{10.5}$ TCID₅₀/mL)(Meng *et al.*, 2014),说明该细胞是一种对 GSIV 高度敏感的细胞系,具有较高的科研价值和重要的产业应用潜力。将外源基因转染进细胞对于基因的功能研究是非常关键的一步。陈晓武等(2018)研究建立了一种使用体外包装逆转录病毒感染的方法,转染鳊胚胎细胞的效率可达(20±5)%,而另一株鳊脑细胞(CPB)的瞬时转染效率为 10%(FU *et al.*, 2015)。本研究使用 Lipofectamine[®]2000 将 pEGFP-N1 转染 MFB 细胞的效率可达 20%以上,表明 MFB 细胞可作为功能表达研究的工具。

本研究成功建立了鳊脑组织细胞系,并且发现鳊蛙虹彩病毒(MFRaIV)、大口黑鲈蛙虹彩病毒(LMBRaIV)和大鲩虹彩病毒(GSIV)均能在 MFB 细胞系上产生典型的细胞病变效应(CPE),同时还发现该细胞可用于外源基因的功能研究,不仅丰富了鳊细胞资源,而且为进一步研究鳊病毒感染机理以及疾病防控技术提供了重要的实验材料。

参 考 文 献

CHEN X W, SHEN Y W, ZHAO J L, *et al.* Culture and

- application of *Siniperca chuatsi* embryo cell line. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1626–1634 [陈晓武, 申亚伟, 赵金良, 等. 鳊胚胎细胞系的建立与应用. *水产学报*, 2018, 42(10): 1626–1634]
- DAI J C, NIE Z L, LIU J Y, *et al.* Preliminary study on the establishment of kidney tissue cell lines in *Schizothorax eurystomus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 61–68 [代金彩, 聂竹兰, 刘清雅, 等. 宽口裂腹鱼中肾组织细胞系建立的初步研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 61–68]
- DONG C F, WENG S P, SHI X J, *et al.* Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus Research*, 2008, 135(2): 273–281
- DONG J J, SUN C F, TIAN Y Y, *et al.* Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 76–84 [董浚键, 孙成飞, 田园园, 等. 翘嘴鳊主要形态性状与体重的相关性及雌雄形态性状差异分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 76–84]
- FU X Z, LI N Q, PENG Y Y, *et al.* Cloning and expression of *ORF093* gene and the immune effect of its recombinant protein of infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 427–433 [付小哲, 李宁求, 彭媛媛, 等. 鳊传染性脾肾坏死病毒 *ORF093* 基因的克隆、表达及其重组蛋白的免疫原性分析. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 427–433]
- FU X Z. Development of a Chinese perch cell line susceptible to ISKNV and mechanism of virus replication relying on glutamine. Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2017 [付小哲. 鳊传染性脾肾坏死病毒敏感细胞系的建立及病毒增殖依赖于谷氨酰胺的机制研究. 西北农林科技大学博士研究生学位论文, 2017]
- FU X, LI N, LAI Y, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: Development and characterization. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32–45
- HE J G, WONG S P, HANG Z J, *et al.* Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1998, 37(5): 74–77 [何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(5): 74–77]
- LI L J, LUO Y Z, LIU X Q, *et al.* Molecular surveillance of *Cyprinid herpesvirus 2* in goldfish cultured in China. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(1): 92–96 [李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断. *华中农业大学学报*, 2013, 32(1): 92–96]
- LIANG H R, HANG Y C, FU X Z, *et al.* Development of a duplex PCR for the detection of *Siniperca chuatsi* ranairidovirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(3): 290–295 [梁红茹, 黄瑜聪, 付小哲, 等. 鳊蛙病毒及鳊弹状病毒双重 PCR 检测方法的建立及应用. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(3): 290–295]
- LIND D, FRANKEN S, KAPPLER J, *et al.* Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of Neuroscience Research*, 2005, 79(3): 295–302
- LU Y, AGUIRRE A A, HAMM C, *et al.* Establishment, cryopreservation, and growth of 11 cell lines prepared from a juvenile Hawaiian monk seal, *Monachus schauinslandi*. *Methods in Cell Science*, 2000, 22: 115–124
- MANOCHANTR S, MARUPANTHORN K, TANTRAWATPAN C, *et al.* The expression of neurogenic markers after neuronal induction of chorion-derived mesenchymal stromal cells. *Neurological Research*, 2015, 37(6): 545–552
- MENG Y, MA J, JIANG N, *et al.* Pathological and microbiological findings from mortality of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Archives of Virology*, 2014, 159(6): 1403–1412
- MULLEN R J, BUCK C R, SMITH A M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 1992, 116(1): 201–211
- REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255(5052): 1707–1710
- WANG G, LAPATRA S, ZENG L, *et al.* Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Methods in Cell Science*, 2004, 25(3/4): 211–220
- WANG J J, LIU Y, YU L, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovary cell line and its susceptibility to spring viremia of carp virus. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 56–61 [王津津, 刘莹, 于力, 等. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 56–61]
- WANG X G, KONG X F, WANG X T, *et al.* Isolation, culture, and characterization of macrophages from the head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 55–61 [王宣刚, 孔祥福, 王欣桐, 等. 牙鲆头肾巨噬细胞的分离培养与鉴定. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 55–61]
- WU B, FANG C L, ZHANG Y P, *et al.* The assessment of biological parameters and stock biomass of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 21–26 [吴斌, 方春林, 张燕萍, 等. 鄱阳湖翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)的生物学参数及资源量的估算. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 21–26]
- YANG C T, WANG W M, CAO L. Prevention and treatment of common diseases in mandarin fish culture. *Reservoir Fisheries*, 2008, 28(3): 104–107 [杨承泰, 王卫民, 曹玲.

- 鳊鱼养殖中的常见疾病及其防治. 水利渔业, 2008, 28(3): 104–107]
- YANG Y F, KAO G L, GAO A W, *et al.* The influence of digestive enzymes and fetal bovine serum on culture of bovine mammary epithelial cells. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2011, 32(9/10): 46–48 [杨银芬, 考桂兰, 高爱武, 等. 消化酶及胎牛血清对奶牛乳腺上皮细胞培养的影响. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(9/10): 46–48]
- ZENG L B, LI X L, ZHANG L, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from kidney of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 75–81 [曾令兵, 李晓莉, 张林, 等. 斑点叉尾鲷肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国水产科学, 2009, 16(1): 75–81]
- ZHAO J Q, JIA P, LIU W Z, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from the kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 382–390 [赵建青, 贾鹏, 刘文枝, 等. 罗非鱼肾脏细胞系的建立及其生物学特性. 中国水产科学, 2019, 26(2): 382–390]

(编辑 马瑾艳)

Establishment of a Cell Line Derived from the Brain Tissue of Mandarin Fish *Siniperca chuatsi* and Its Susceptibility to Infection by Fish Viruses

LUO Xiaowen¹, ZENG Lingbing¹, JIANG Nan¹, AI Taoshan², FAN Yuding¹,
LI Bo², XIE Debing², MENG Yan¹, ZHOU Yong^{1①}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei 430223, China;
2. Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430065, China)

Abstract Fish cells play an important role in virus isolation, identification, functional gene analysis, and biological product preparation. Mandarin fish *Siniperca chuatsi* is one of the most popular aquaculture species. With a rapid increase in production, the occurrence of diseases has also increased. Moreover, there are very few cell lines of mandarin fish that can be used for virus isolation and gene function identification. In this study, the body surface of mandarin fish was disinfected with povidone-iodine and 75% alcohol. The brain tissue was removed and washed in PBS buffer containing 2×antibiotic-antimycotic 4~5 times in a biosafety cabinet. The tissue was cut into blocks of approximately 3 mm³ with sterilized ophthalmic scissors in a sterile petri dish. After digestion at 37°C for 0.5~1 h, the tissue blocks were cleaned with L-15 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). The suspension was centrifuged at 1000 r/min for 5 min, and the tissue blocks were transferred into a cell culture flask. A medium containing 30% FBS, penicillin, streptomycin, bFGF, and IGF was added to the cell culture flask, which was placed in an incubator at 28°C for primary culture to establish the brain tissue cell line. To determine the growth properties of the new mandarin fish brain (MFB) cells, the cells were seeded onto 24-well plates with L-15 medium containing 10% FBS at an initial density of 5×10⁴ cells per well. Cell growth rates were compared under different conditions, including five different media, four different serum concentrations, and four different temperatures. The optimal culture conditions for MFB cells were L-15 containing 10% FBS at 28°C. Under the optimal culture conditions, the doubling time of MFB cell number was ~46.6 h. Chromosome numbers for the 25th generation MFB ranged from 20 to 60, with a mode of 56 and frequency of 20%. Using the total genomic DNA of MFB cells as a template, specific primers were designed for the 28S rRNA gene. A partial gene fragment of 528 bp was obtained by PCR amplification, consistent with the expected size. The PCR-amplified fragments were sequenced and

① Corresponding author: ZHOU Yong, E-mail: zhouy@yfi.ac.cn

compared with the GenBank database by BLAST analysis. The sequence was consistent with that published in GenBank for the mandarin fish 28S rRNA gene (EF120974). Confirming that the cell line was derived from mandarin fish. NeuN (neuronal nucleus) is a neuro-specific nuclear regulatory molecule and a unique neuronal binding protein that is widely used in the study and diagnosis of neuronal antigens after mitosis. β -tubulin III is a signature skeletal protein of mature neurons and is mainly distributed in the synapses and cytoplasm. The purity of MFB cells was determined by immunofluorescence cytochemistry (using β -tubulin and Neu-N). The results showed that all cultured MFB cells were neuron-like. Virus research requires the establishment of a sensitive cell line that allows for the proliferation of viruses in living cells. In this study, MFB cells were used to culture common aquatic viruses. The results of the virus sensitivity test showed that MFRaIV, LMBRaIV, and GSIV could infect and produce typical cytopathic effects in MFB cells, with titers of $10^{8.68\pm 0.12}$, $10^{8.36\pm 0.15}$, and $10^{10.15\pm 1.85}$ TCID₅₀/mL, respectively; thus, MFB cells are sensitive to MFRaIV, LMBRaIV, and GSIV. The replication level of GSIV in MFB cells was higher than that in MFRaIV and LMBRaIV. MFB cells were insensitive to ISKNV, GCrV-I, KHV, CEV, and CyHV-2. Transfection of exogenous genes into cells is a crucial step in gene function research. After 50 passages, Lipofectamine[®]2000 was used to transfer pEGFP-N1 into MFB cells. Green cells were observed under a fluorescence inverted microscope 48 h after transfection. The transfection efficiency was determined as the proportion of green positive cells in five random fields; the proportion of green cells was (22.20±1.72)%. In conclusion, a cell line derived from the brain tissue of mandarin fish was successfully established in this study. It is sensitive to a variety of aquatic animal viruses and can be used for gene transfection. It not only enriches the available resources of mandarin fish cells but also provides important experimental materials for further research into infection mechanisms and the development of virus and disease prevention technologies.

Key words Mandarin fish *Siniperca chuatsi*; Brain tissue; Cell line; Biological characteristics; Viral susceptibility