

文章编号: 1004 - 7271(2001)03 - 0282 - 03
·研究简报·

Zn²⁺ 对日本对虾肝胰腺细胞培养 及其 RNA/DNA 比率的影响

Effects of Zn²⁺ on cultivating condition of hepatopancreatic cells
of *Penaeus japonicus* and the judgement of it by RNA/DNA ratio

王宏伟, 刘瑞兰, 商利新, 赵伟, 王维娜, 王安利

(河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

WANG Hong-wei, LIU Rui-lan, SHANG Li-xin, ZHAO Wei, WANG Wei-na, WANG An-li

(College of Life Science, Hebei University, Baoding, 071002, China)

关键词: 日本对虾; 细胞培养; Zn²⁺; RNA/DNA 比率

Key words: *Penaeus japonicus*; cells culture; Zn²⁺; RNA/DNA ratio

中图分类号: S917 文献标识码: A

日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 是一种经济价值很高的甲壳动物, 具有生命力旺盛, 抗病力强, 可短时间离水, 利于运输和鲜活上市等优点^[1]。但近年来, 病毒性虾病造成对虾养殖大面积减产, 而组织培养技术是研究病毒学的基础。建立细胞株(系)以供病毒的分离、纯化, 并进行各种特性的分析, 为进一步研究单克隆抗体奠定基础^[2]。培养对虾的免疫细胞是研究对虾免疫机能和筛选免疫增强药物的手段, 从而为解决虾病防治问题开辟一条有效途径^[3]。对虾的组织培养研究已于 1994 年列入国家海洋攀登 B 计划^[4]。Hu^[5]将中国对虾肝胰腺组织传代培养 28 代。胡珂等^[6]将中国对虾肝胰腺等组织细胞传至几十代。Hsu^[7]建立了世界上第一个对虾细胞系, 这是对虾组织培养研究工作的一个重大突破。但是, 在培养基中加入 Zn²⁺ 培养对虾细胞尚未见报道。本实验在培养基中加入不同浓度的 Zn²⁺, 观察其对细胞生长的影响情况, 并利用 RNA/DNA 比率进行评定, 以期找到最适合的 Zn²⁺ 浓度培养细胞。RNA/DNA 比率已经成为鉴定鱼类生长的新指标^[8], 但利用其评定对虾培养细胞的生长情况尚未见报道。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用虾

实验所用日本对虾购自保定市府河市场, 体长 8.5~10.5cm, 体重 6.13~10.34g, 于含青、链霉素的充气消毒海水暂养 6~8h 待用。

收稿日期: 2001-3-30

资助项目: 河北省重大科技攻关计划项目(85-93-29)

第一作者: 王宏伟(1970-), 女, 河北张家口人, 硕士, 讲师, 主要从事水生生物学研究。E-mail: whw66@263.net 或 whw68@hotmail

com, Tel: 0312-5079617

1.1.2 实验前的准备

培养基用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,热稳定盐溶液(0.07 MPa, 15min)和玻璃器皿(0.1 MPa, 20min)高压灭菌。干净的培养板放于超净工作台上紫外灯照射 12h 以上进行除菌。

1.2 实验方法

1.2.1 肝胰腺细胞原代培养

在无菌室中,将暂养对虾放入预冷的无菌海水中漂洗,再用 75% 酒精浸泡。摘取其肝胰腺放入小瓶,用 Hanks(平衡盐溶液)和双抗(青、链霉素)漂洗几次。将组织块剪成 1mm³ 左右,接种于培养板上,分别加入不同 Zn^{2+} 浓度的培养基,于 CO₂ 培养箱中,在 26℃ 供 5% CO₂ 条件下培养,每日用倒置显微镜观察其生长状况。

1.2.2 RNA/DNA 比率的测定

测定方法参考文献[9]。

2 实验结果

2.1 Zn^{2+} 对培养细胞的影响

Zn^{2+} 梯度下,大都可见贴壁生长的细胞,各浓度下可见成团成簇的圆形细胞,胞质清亮。折光性强,富立体感。其中 Zn^{2+} 浓度为 80 μ g/L 的,细胞生长最好,覆盖率达 90% 以上。而对照组 Zn^{2+} 为 0 μ g/L 时,细胞松散,贴壁不牢。见图 1,图 2。

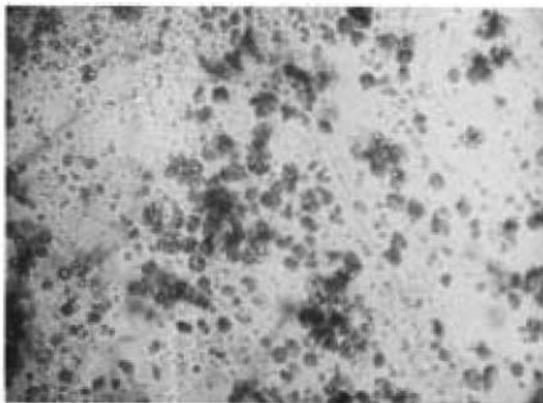


图 1 培养基中加入 Zn^{2+} 为 0 μ g/L 的日本对虾肝胰腺细胞

Fig.1 Cultured hepatopancreatic cells of *Penaeus japonicus* with the medium added Zn^{2+} 0 μ g/L

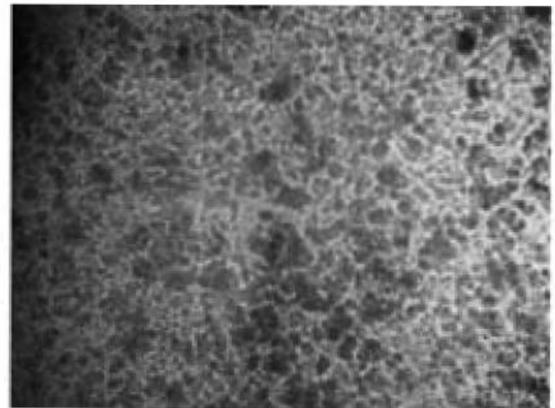


图 2 培养基中加入 Zn^{2+} 为 80 μ g/L 的日本对虾肝胰腺细胞

Fig.2 Cultured hepatopancreatic cells of *Penaeus japonicus* with the medium added Zn^{2+} 80 μ g/L

2.2 测定 RNA/DNA 比率的结果

不同的 Zn^{2+} 浓度条件下,肝胰腺细胞的 RNA/DNA 值有所不同(表 1), Zn^{2+} 浓度为 80 μ g/L 时出现峰值,并且通过 one-way ANOVA 方差分析进行差异显著性检验,得出 80 μ g/L 的一组与对照组差异显著 ($P = 0.0034 < 0.05$)。

表 1 不同 Zn^{2+} 浓度下 RNA/DNA 比率

Tab.1 RNA/DNA ratio under a series of concentration gradients of Zn^{2+}

编号	1	2	3	4	5	6
Zn^{2+} (μ g/L)	0	40	60	80	100	120
RNA/DNA	19.855 ± 12.574 2	18.299 ± 0.215 4	33.562 ± 0.723 2	57.190 ± 3.066 8	20.642 ± 0.241 1	35.114 ± 12.729 2

3 讨论

通过不同 Zn^{2+} 浓度梯度条件下对日本对虾肝胰腺细胞的原代培养,进行原代细胞的光镜观察,并测定其 RNA/DNA 比率。二者所得结论基本一致,以此初步探讨了细胞生长的最适 Zn^{2+} 浓度。

Zn^{2+} 对细胞生长的影响,以前过多地重视了它的毒害作用,而忽视了它作为生物必需元素的作用。 Zn^{2+} 通过结合到细胞膜结构物上或通过金属催化的脂质氧化反应能使原生质和内膜处于稳定状态,对细胞膜结构和功能方面起到重要作用。 Zn^{2+} 还是碳酸酐酶、羧肽酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶等的组成成分或激活剂。故而,微量的 Zn 对核酸代谢有影响。

关于 RNA/DNA 比率,Bullow^[10]认为首先研究鱼类生长与 DNA 的关系, RNA/DNA 与鱼类生长之间呈正相关。生长良好的鱼 RNA/DNA 较大,生长差的鱼 RNA/DNA 较小^[8]。研究表明,在蛋白质合成的体系中,信使 RNA 及转运 RNA 是重要的组分, RNA 含量与蛋白质合成速率之间呈正相关。而蛋白质合成越多,表明细胞生长越旺盛。1992 年有学者利用鲤白肌中 RNA/DNA 作为评价生态环境的指标^[11]。赵振山等^[12]的实验也表明了肌肉中的 RNA/DNA 比率能非常灵敏地反映鱼类生长和蛋白质含量。由此可见, RNA/DNA 比率由于与蛋白质合成状况正相关,从而反映细胞生长的状况。本实验作为一次尝试,将 RNA/DNA 比率用于培养的日本对虾肝胰腺细胞生长状况的评定。实验结果表明,细胞在额外加 Zn^{2+} 浓度 $80\mu\text{g/L}$ 的培养条件下生长最旺盛。 $40\mu\text{g/L}$ 和 $60\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} 浓度对其影响不显著,而 $100\mu\text{g/L}$ 和 $120\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} 浓度对细胞生长的促进作用较 $80\mu\text{g/L}$ 的有所降低,影响也不显著。曾有报道,在中国对虾生长的水体里加入 0.1mg/L Zn^{2+} ,其体长体重都有增加; Zn^{2+} 增加到 0.5mg/L 对虾也生长,但趋势减小;在 1mg/L 水体中对虾没有生长,甚至有下降现象^[13],虽然以上实验是向海水中加入 Zn^{2+} ,而本实验则是直接给细胞加 Zn^{2+} ,但反映出较相似的影响趋势。测定结果与光镜观察结果相符,初步认为 $80\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} 浓度是此培养基较适当的加入量。至于最适加入量以及其它必需金属离子对培养细胞的作用有待进一步研究。

河北大学生命科学学院 1997 级生物学专业梁红柱、袁飞、杨军、张振强,1998 级生物技术专业侯雅宾、孟翠丽等学生参加了部分实验工作,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 李太武,苏秀榕.中国对虾和日本对虾 6 种同工酶的比较研究[J].海洋学报,1997,19(2):85-88.
- [2] 李霞.浅谈对虾细胞培养方法和应用前景[J].国外水产,1993,(4):1-3.
- [3] 张晓华,王立平,徐怀恕.对虾组织培养研究进展及其开发应用的潜在价值[J].海洋湖沼通报,1996,2:78-82.
- [4] 童焱亮.海洋动物的细胞培养与应用[J].生物工程进展,1994,4(6):47-48.
- [5] Hu K. Studies on a cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* Kishinouye [J]. Asian Fish Sci, 1990, 3: 299-307.
- [6] 胡珂,王立平,段爱梅.中国对虾的组织培养[J].水产学报,1991,15(4):328-331.
- [7] Hsu Y E. Development of an in vitro subculture system for prawn tissues[J]. Asian Fisheries Society Special Publication, 1995, 10: 161-170.
- [8] 赵振山,林可椒.鉴定鱼类生长的新指标—RNA/DNA[J].水利渔业,1988(1):50-51.
- [9] Buckley L J. Relationships between RNA - DNA ratio, prey density, and growth rate in *Atlantic Cod* (*Gadus morhua*) larvae [J]. J Fish Res Bd Can, 1979, 36: 1497-1502.
- [10] Bullow F J. RNA/DNA ratios as indicator resent growth rates of a fish [J]. J Fish Res Bd Can, 1970, 27: 2343-2349.
- [11] 司亚东,金有坤,周洪琪,等.鲤鱼白肌中 RNA/DNA 值与生长的关系[J].上海水产大学学报,1992,1(3-4):159-167.
- [12] 赵振山,林可椒,张益明,等.用 RNA/DNA 比率评定鲤的生长及其配合饲料的营养价值[J].水产学报,1994,18(4):257-264.
- [13] 刘发义,梁德海,孙风.低浓度 Zn^{2+} 对中国对虾的亚急性致毒效应[J].海洋科学,1991(2):7-9.