

## 功能性电极快速伏安检测孔雀石绿

吕志林<sup>1</sup> 张旭志<sup>2</sup> 马绍赛<sup>2</sup> 周明莹<sup>2</sup> 赵俊<sup>2\*</sup> 孔青<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 用阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)修饰导电炭黑糊电极, 制备了对孔雀石绿(MG)具有高灵敏度的功能传感器。实验对 MG 在该功能电极上的电化学反应进行了研究, 并对影响测定的各种条件(制备糊电极所用导电材料种类; 功能试剂修饰量; 支持电解质的离子强度、pH 值、种类; 富集电位与时间等)进行了优化。在优化条件下, MG 的氧化峰电流( $i_{pa}$ )与其浓度在 5 ~ 200  $\mu\text{g/L}$  范围内呈线性关系, 检测限为 1.5  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N=3$ )。该方法具有较高的灵敏度、良好的重现性和稳定性。应用于测定经过简单过滤预处理后的淡水渔业水样, 平均回收率为 90%。

**关键词** 修饰电极 孔雀石绿 伏安法 渔业环境监测

**中图分类号** TS255.1;S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0115-07

## Rapid detection of malachite green by voltammetry based on functionalized electrode

LÜ Zhi-lin<sup>1</sup> ZHANG Xu-zhi<sup>2</sup> MA Shao-sai<sup>2</sup> ZHOU Ming-ying<sup>2</sup>  
ZHAO Jun<sup>2\*</sup> KONG Qing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,  
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** A special electrochemical sensor system for detecting malachite green (MG) based on sodium dodecyl sulfate functionalized conductive carbon black paste electrode was established. The electrochemical behaviors of MG at the functionalized electrode were studied. And the effecting factors, including conductive carbon materials, content of the modifying agent, ionic strength and species of the supporting buffer solution, pH, accumulation potential, and accumulation time were optimized. Under the optimized conditions, in the range of 5 ~ 200  $\mu\text{g/L}$ , the dependence of the anodic peak current on the concentration of MG was linear with a detection limit of 1.5  $\mu\text{g/L}$  (signal/noise = 3). This method exhibited high sensitivity, good stability and reproducibility. After a simple pretreatment by filtration, MG in real fresh water samples from fishery environment was detected. And the results were satisfactory with a 90%

国家自然科学基金(21005086)和基本科研业务费(2010-cb-01)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: zhaojun@ysfri.ac.cn (J. Zhao); kongqing@ouc.edu.cn (Q. Kong)

收稿日期: 2011-08-30; 接受日期: 2011-10-10

作者简介: 吕志林(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事电化学分析在食品与环境检测中的应用技术研究。E-mail: lz15745783@tom.com,

Tel: 18765266826

average recovery rate.

**KEY WORDS** Modified electrode Malachite green (MG) Voltammetry  
Monitoring on the fishery environment

孔雀石绿(Malachite Green, MG)属三苯甲烷类化合物,结构式见图1,是一种染料类杀菌剂,可用作治理鱼类或鱼卵的寄生虫、真菌或细菌感染,曾在很多国家的水产养殖疾病防治中被广泛使用(邱绪建等 2005)。近年来,其高毒、高残留和致癌、致畸、致突变等副作用逐渐暴露(刘峰延等 2006;李 宁 2005),人类长期食用有 MG 残留的水产品,容易造成亚慢性或慢性中毒。因此,20 世纪 90 年代以来,许多国家都将其列为水产养殖的禁用药物。但由于其抗菌效果好、价格便宜,不少养殖户和鲜活水产品运输者当前仍在违规使用。我国水产品和环境中 MG 残留超标严重,不仅带来了严重的生态环境问题,而且已成为影响我国水产品质量安全和国际市场竞争力的重要因素,因此,对其残留的检测与监控就显得格外重要。

MG 的检测方法有高效液相色谱法(张 丽等 2005; Rushing *et al.* 1997; Tarbin *et al.* 1998; Mitrowska *et al.* 2005)、高效液相色谱串联质谱法(Valle *et al.* 2005; Scherpenisse *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006; Andersen *et al.* 2006)、同位素稀释质谱法(汤 桦等 2008)、共振瑞利散射法(范 翔等 2006)、筛选柱法(张晓辉等 2006)等。这些方法虽然具有较高的灵敏度和很好的选择性,但也存在无法弥补之弊端:设备昂贵、维护费用及技术人员水平要求高、操作繁琐、检测周期长(Passapol *et al.* 2006)。特别是面对需要现场快速判定的大批量样品,以上检测方法的局限性尤其明显。

与光谱、色谱、质量等分析方法不同,电化学分析方法得到的是电信号,不用转换装置即可方便地自动化输出,因此,不但仪器结构简单、便携、造价低廉,而且应用能耗低,是典型的“绿色分析技术”。近年来,基于无汞电化学分析方法检测 MG 的研究已经取得了显著的进展(Yi *et al.* 2007; Sagar *et al.* 1994)。在已报道的理论基础上,作者利用导电炭黑和十二烷基硫酸钠(SDS)构建了一种新颖的功能糊电极,进一步提高了灵敏度、降低了检测限。应用于测定经过简单过滤预处理后的淡水渔业水样,得到了满意的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);三电极系统:碳糊电极(CPE)为工作电极( $\varnothing 10$  mm),铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极;玻碳电极(GCE,  $\varnothing 3$  mm);pHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂);LG16-W 型高速离心机(北京医用离心机厂)。

MG(国药集团化学试剂有限公司);SDS(上海强顺化学试剂有限公司);石蜡油(天津市广成化学试剂有限公司);导电炭黑(Conductive Carbon Black, CCB, 山东淄博华光化工厂);石墨粉(Graphite Powder, GP, 上海华谊集团胶体化学厂);其他试剂均为分析纯,未经进一步纯化;实验用水为超纯水( $18.2$  M $\Omega$ /cm, 厦门锐思捷中试纯水系统制备)。

### 1.2 孔雀石绿标准溶液的配制

0.050 g MG 用 2 ml 无水乙醇溶解后,纯水定容至 100 ml,其浓度为 0.5 g/L。4 °C 避光保存。

### 1.3 工作电极制备与使用

将过量 SDS 加入石蜡油中充分摇匀,形成饱和溶液,离心,取上清液。将此饱和溶液与 CCB 按 7 : 8 的比例,在玛瑙研钵中混合均匀,填充到直径为 10 mm 的聚四氟乙烯管中,铜丝作引线,制成工作电极,记作功能化 GCB 糊电极(Functionalized CCB Paste Electrode, FCCBPE)。相同方法制备不含 SDS 修饰剂的对比糊电极,

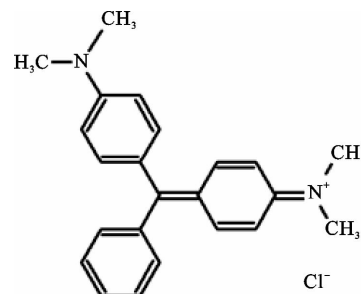


图1 MG 的结构式

Fig. 1 Chemical structure of MG

记作 CCB 糊电极 (CCB Paste Electrode, CCBPE)。采用 GP 为导电材料制备的对比糊电极,记作功能 GP 糊电极 (Functionalized GP Paste Electrode, FGPPE)。

使用前在称量纸上将电极磨成镜面。每次电化学扫描测量后,挤出约 0.5 mm 长的碳糊,磨平后即可再次使用。

#### 1.4 电化学实验

如非特殊说明,循环伏安法 (CV) 扫速为 0.100 V/s。微分脉冲伏安法 (DPV) 脉冲高度 0.050 V, 脉冲宽度 0.05 s, 脉冲周期 0.2 s。扫描过程中电解液静止无搅拌。实验在室温下完成 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 电极制备优化

采用以前报道的方法(焦奎等 2005)优化制备糊电极时 CCB 和 SDS 饱和石蜡油的质量比。实验制备了一系列 CCB 与粘合剂不同配比(1:1, 2:1, 1:2, 3:4, 5:6, 7:8, 8:9 等)的糊电极并以  $10 \mu\text{mol/L}$  亚甲基蓝 (MB) 为电化学探针进行表征。考察氧化还原峰电位差 ( $\Delta E_p$ ) 与峰电流响应值 ( $i_p$ )。结果表明,当 CCB 含量太高时,制成的电极致密性不好,用于测定时溶液中成分能渗入其中;当 CCB 含量过低时,电极的分析化学性能不理想 ( $\Delta E_p$  大、 $i_p$  小、背景电流大);当二者的质量比为 7:8 时,制得的电极具有最好的综合性能。

此外,实验考察了不同导电材料对糊电极背景电流的影响。FCCBPE、GCE 和 FGPPE 于相同条件下在 0.6 mol/L PBS (pH 6.5) 中 CV 扫描,所得结果分别为图 2 中曲线 1、曲线 2、曲线 3。曲线 1 背景电流 (主要是电容电流) 明显小于曲线 3,甚至比  $\varnothing 3 \text{ mm}$  的 GCE 上的还要小,意味着较理想的电分析化学性能 (可获得较大信噪比)。

### 2.2 功能电极表征

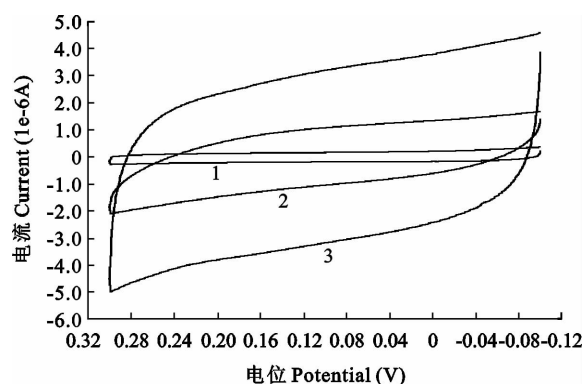
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  电对是接近理想状态的准可逆电对,对于一个具有理想表面状态的电极来说,它的  $\Delta E_p$  接近 59 mV ( $25^\circ\text{C}$ )。以 1 mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  为电化学探针对 FCCBPE 进行表征,考察其于 0.5 mol/L KCl 支持电解质中的 CV 响应。结果表明,其  $\Delta E_p$  为 64 mV,说明该电极表面接近于理想状态。对于可逆过程,由 Randles-Sevcik 公式 (Ye *et al.* 2004):

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C_0$$

可计算得电极有效面积  $A(\text{cm}^2)$ 。其中,  $D$  为反应物的扩散系数 ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $n$  为电极反应的电子转移数,  $\nu$  为扫速 (V/s),  $C_0$  为反应物的浓度 ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ),  $i_p$  为峰电流 (A)。由  $n=1$ ,  $D=6.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  (Bard *et al.* 1974), 得到 FCCBPE 电极有效活性面积为  $0.645 \text{ cm}^2$ 。

### 2.3 MG 的电化学行为

以 0.6 mol/L PBS 缓冲溶液 (pH 6.5) 为支持电解质, 0.5 mg/L 的 MG 在 FCCBPE 上具有灵敏的 CV 氧化峰 (图 3 曲线 1), 其氧化峰电流 ( $i_{pa}$ ) 为  $22.84 \mu\text{A}$ ; 同样扫描条件下, 在未用 SDS 功能化修饰的电极上, 其  $i_{pa}$  为  $15.88 \mu\text{A}$  (图 3 曲线 2)。这说明修饰剂的存在具有明显的增敏作用。可能的原因: 该条件下溶液中带有正电荷的 MG 分子受到阴离子型表面活性剂 SDS 亲水端  $\text{SO}_3^-$  的静电作用。在两种电极上 MG 的氧化峰电位



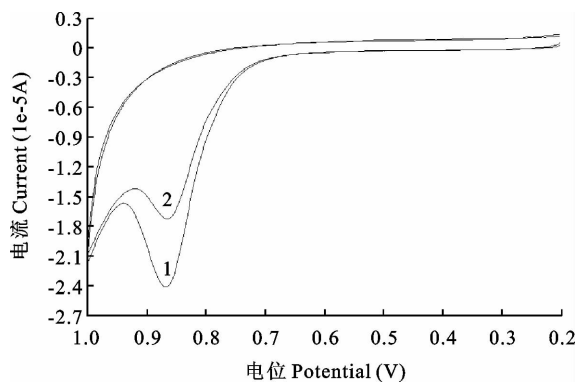
In 0.6 mol/L PBS (pH 6.5). Scan rate: 0.100 V/s,  
Quiet time: 5 s

图 2 FCCBPE(1)、GCE(2)和 FGPPE(3)  
在 PBS 中的循环伏安

Fig. 2 Cyclic voltammograms of FCCBPE (1),  
GCE(2) and FGPPE (3)

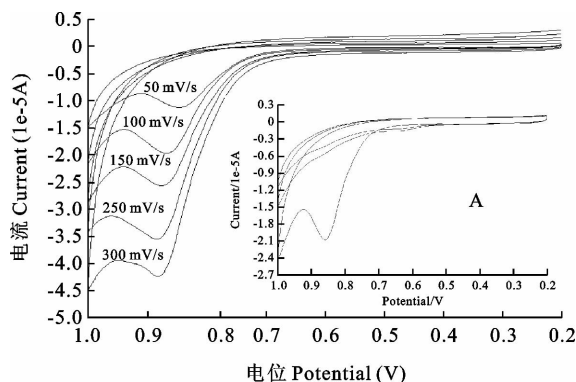
( $E_{pa}$ )都是 0.860 V,说明修饰没有电催化效果。CV 曲线上没有相应的还原峰出现,没有说明电极反应过程是不可逆的,这与以前的报道(Yi *et al.* 2007)相符。

FCCBPE 上,在 0.050 ~ 0.300 V/s 范围内,随着扫速  $v$  的增加,MG 的  $E_{pa}$  和  $E_{1/2}$  都规则正移(图 4)。扫速  $v$  与  $i_{pa}$  呈良好的线性关系(回归方程:  $i_{pa} = 10.686 v + 0.624, \mu A, R^2 = 0.992 1$ ),意味着 MG 在 FCCBPE 上的电极过程受吸附控制(Passapol *et al.* 2006)。此外,多扫伏安曲线(图 4 插图)中从第 2 圈开始  $i_{pa}$  急剧降低,也表明 MG 的电极过程受吸附控制。同时表明,MG 的氧化产物在电极上很可能吸附较强,解吸较慢,阻碍了本体溶液中底物的靠近。



In 0.6 mol/L PBS (pH 6.5)  
Accumulation time: 300 s. Accumulation potential:  
0.600 V. Scan rate: 0.100 V/s

图3 MG在FCCBPE(1)和CCBPE(2)上的循环伏安  
Fig.3 Cyclic voltammograms of 0.5 mg/L MG  
at the FCCBPE (1) and the CCBPE (2)



Scan rate (V/s, from top to bottom): 0.050, 0.100,  
0.150, 0.250 and 0.300. Accumulation time:240 s. Other  
conditions as in Fig. 3. Inset: the successive cyclic  
voltammogram of MG at the FCCBPE (Scan rate:0.100 V/s)

图4 MG在FCCBPE上于不同扫速下的循环伏安  
Fig.4 Cyclic voltammograms of MG at the FCCBPE

在 pH 3.3 ~ 7.3 范围内,MG 的  $E_{pa}$  随支持电解质 pH 值的增加而有规律地负移(图 5),回归方程为  $E_{pa} = -0.032 4 \text{ pH} + 1.754(\text{V}, R^2 = 0.993 9)$ ,说明 MG 在 FCCBPE 上的电极过程为 2 电子、2 质子转移。

对于吸附控制不可逆电极氧化反应,由公式

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{\alpha nF} [\ln \left[ \frac{RTk_s}{\alpha nF} \right] - \ln v]$$

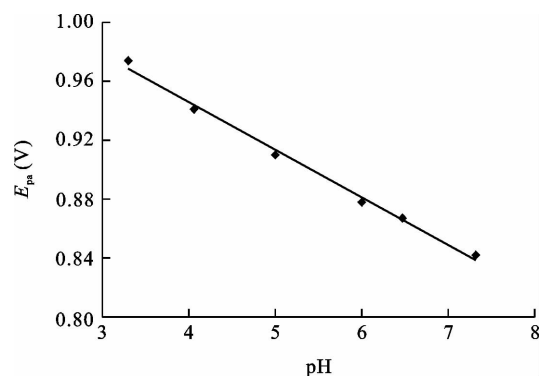
可以求得 MG 的电极表面反应标准速率常数  $k_s$ 。

式中,  $\alpha$  为电子转移系数,  $E^0$  为标准电极电位,  $R$  为气体常数(8.314 J/mol K),  $T$  (K)为温度,  $n$  为电子转移数,  $F$  为法拉第常数(96485.338 C/mol)。图 6 是  $E_{pa}$  和  $\ln v$  的关系图。由图 6 可见,  $E_{pa}$  与  $\ln v$  具有良好的线性,其线性关系为:  $E_{pa} = 0.021 3 \ln v + 0.914$

4(V,  $R^2 = 0.997 2$ ,  $v$  的单位为 V/s),由斜率可以计算得到  $\alpha$  的值为 0.6。  $E^0$  可以由电极上  $E_{pa}$  随扫速  $v$  变化的关系曲线外推到  $v = 0$  与纵轴的交点得到(图 7),其值为 0.851 5V。由图 7 可得  $k_s$  的值为  $2.0 \text{ s}^{-1}$ 。

## 2.4 测定条件优化

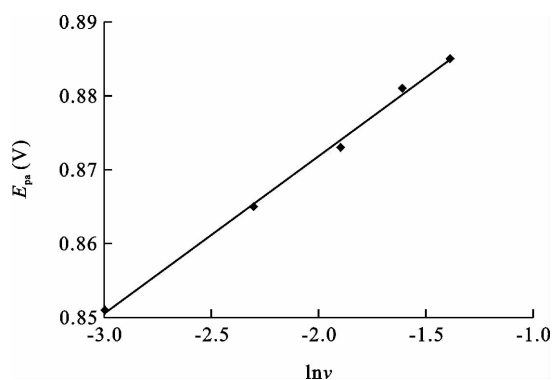
本研究考察了支持电解质种类的影响。以常见的 Britton-Robinson、PBS、柠檬酸-柠檬酸钠、醋酸-醋酸钠、Tris-盐酸缓冲溶液或中性的氯化钾溶液为支持电解质,结果发现 0.5 mg/L 的 MG 在 PBS 缓冲溶液中的 CV 曲线峰形最好,灵敏度最高,所以其他实验中皆以 PBS 为支持电解质。



Conditions as in Fig. 3

图5  $E_{pa}$  随 pH 的变化曲线

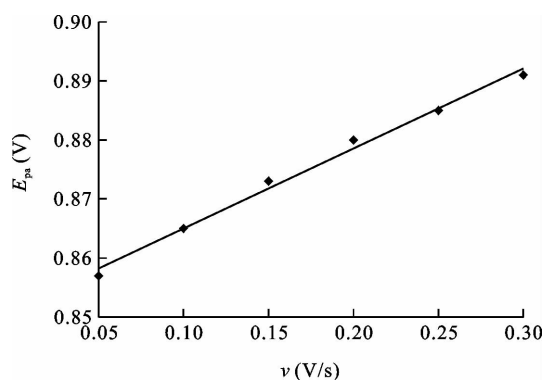
Fig.5 The plot of  $E_{pa}$  vs. pH



Conditions as in Fig. 4

图 6  $E_{pa}$  与  $\ln v$  的关系

Fig. 6 The plot of  $E_{pa}$  vs.  $\ln v$



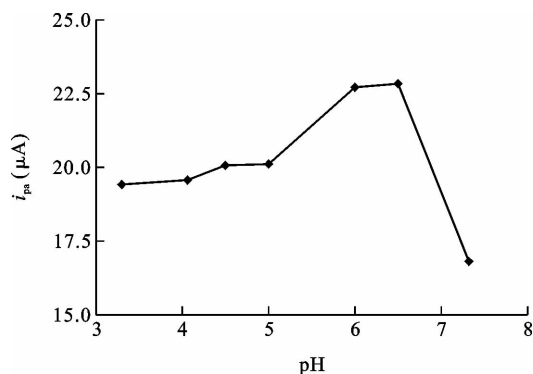
Conditions as in Fig. 4

图 7  $E_{pa}$  与扫速  $v$  的关系

Fig. 7 The plot of  $E_{pa}$  vs  $v$

实验研究了富集时间对电化学测定的影响。在 FCCBPE 上, 0.5 mg/L MG 的  $i_{pa}$  在 0 ~ 300 s 范围内随着时间的增加而增大, 而后稍有下降。为了获得较好的灵敏度, 其他未作说明的实验都保持富集时间为 300 s。

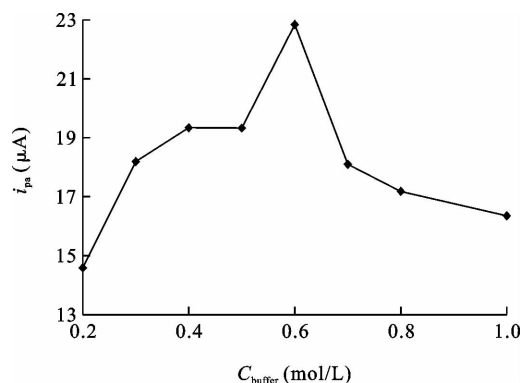
以一系列不同 pH 的 PBS 缓冲溶液为支持电解质, 0.5 mg/L 的 MG 在 FCCBPE 上  $i_{pa}$  与 pH 值呈现明显关系且在 pH 6.5 时具有最大值(图 8), 说明电极对该底物的富集效应受  $H^+$  浓度(活度)影响, 这可能是修饰电极表面双电层内电荷等微观结构与 pH 值有关造成的。为了获得较好的分析灵敏度, 其他实验中均采用 pH 6.5 的缓冲溶液。



Conditions as in Fig. 3

图 8 MG 的  $i_{pa}$  与 pH 值关系

Fig. 8 The relationship between the  $i_{pa}$  of MG and pH of the PBS



Conditions as in Fig. 3

图 9 MG 的  $i_{pa}$  与 PBS 浓度关系

Fig. 9 The dependence of  $i_{pa}$  of MG on the concentration of PBS (pH 6.5)

将浓度为 1 mol/L 的 PBS(pH 6.5) 稀释不同的倍数, 以 FCCBPE 为工作电极考察 0.5 mg/L MG 的 CV 响应, 结果表明, 其  $i_{pa}$  与缓冲溶液的离子强度具有明显关系(图 9)。为了获得较好的检测灵敏度, 其他实验中选用 0.6 mol/L 的 PBS 为支持电解质。

如图 10 所示, 0.600 V 恒电位富集 300 s 后, MG 在 FCCBPE 上的 CV 响应为曲线 1; 相同条件下, 开路富集 300 s 后 MG 在 FCCBPE 上的 CV 响应为曲线 2。曲线 1 具有更好的峰形与更大的  $i_{pa}$ , 说明正电位富集对 MG 的伏安检测具有增敏效应。进一步研究结果表明, 在 0.200 ~ 0.700 V 范围内, MG 的  $i_{pa}$  先是随着富集电位的增加而增加, 于 0.600 V 处达到最大值, 而后又急剧降低。因此, 0.600 V 被选为最佳富集电位。

有意思的是, 正如许多报道(张 卉等 2005; 张 军等 2004; 邓桂春等 2002), CV 扫描所用的起始电位对 MG 的电极响应也具有显著影响。在以上所述优化条件下, 作者在 -0.300 ~ 0.500 V 范围内改变 CV 扫描起始电位, 分别记录 0.5 mg/L 的 MG 在 FCCBPE 上的伏安响应。结果表明, 在 -0.300 ~ 0.200 V 范围

内,  $i_{pa}$  随起始电位的增加而不断增大, 而后再增加采用的起始电位,  $i_{pa}$  反而下降(该现象的原因尚待深入探讨)。其他实验中, 均采用 0.200 V 作为 CV 扫描所用起始电位。

考察 FCCBPE 制备中 SDS 修饰剂含量对富集效果的影响。结果表明, 在 0 至饱和范围内, 随着溶在石蜡油中的 SDS 的含量的增加, 所制备的电极对 MG 的富集能力逐渐增加。而如果将固体 SDS 直接混进糊电极中将引起背景电流的猛增。因此, 其他实验中采用饱和 SDS 的液体石蜡制备功能电极。

电极的更新性能也得到研究。将制备的糊电极挤出约 0.5 mm 后磨平, 即可再次用来测定 0.5 mg/L MG 的 CV 响应。 $i_{pa}$  的相对标准偏差(RSD)为 4.9% ( $n=5$ ), 说明重现性令人满意。

## 2.5 共存物质影响

实验考察了一些常见的金属离子和有机物对 20  $\mu\text{g/L}$  MG (约  $5.48 \times 10^{-8}$  mol/L) 测定的影响。结果表明, 250 倍(摩尔浓度, 下同)以内,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对测定几乎没有干扰; 50 倍以内, 多巴胺、维生素 E 和黄嘌呤对测定几乎没有干扰; 5 倍以内的抗坏血酸对测定干扰不明显。

## 2.6 工作曲线与重现性、稳定性

在优化条件下, 采用 DPV 技术对 MG 进行测定。结果表明, 在 5 ~ 200  $\mu\text{g/L}$  范围内, MG 的浓度与  $i_{pa}$  的大小呈良好的线性关系, 回归方程为  $i_{pa} = 6.3559 C_0 - 14.488$  (nA,  $C_0$  的单位为  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2 = 0.9989$ ), 最低检测限为 1.5  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N = 3$ )。用 6 枚不同的 FCCBPE 检测同一 50  $\mu\text{g/L}$  的 MG,  $i_{pa}$  的 RSD 为 4.5%; 用同一枚 FCCBPE 每 2d DPV 扫描 1 次 50  $\mu\text{g/L}$  的 MG,  $i_{pa}$  的 RSD 为 5.7% ( $n=6$ ), 说明该检测方法具有较理想的稳定性和重现性。

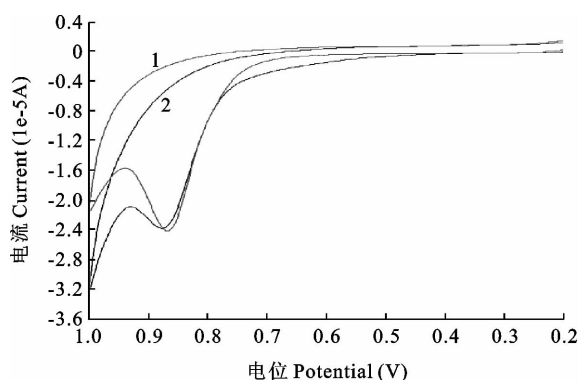
## 2.7 渔业水样(淡水)应用

实验采集青虾育苗车间水体样品 2 份(江苏 1 和浙江 1); 鲤鱼池塘养殖水体样品 2 份(山东 1 和山东 2); 鲜活水产品运输水体样品 2 份(运 1 和运 2), 经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 加入等体积的 1 mol/L 的 PBS(pH 6.5) 进行测定, 并分别对 6 个样品进行加标回收实验, 结果见表 1。回收率偏低的原因目前还有待深入探讨。

表 1 实际样品的测定结果

Table 1 Results of determination of practical samples

样品 Sample	检测值( $\mu\text{g/L}$ ) Determined value	加标值( $\mu\text{g/L}$ ) Standard addition	测得值( $\mu\text{g/L}$ ) Recovery of standard	RSD(%)( $n=5$ )	平均回收率 Average recovery (%)( $n=5$ )
江苏 1	未检出 Not detected	10	$8.3 \pm 0.1$	5.7	83
浙江 1	未检出 Not detected	10	$8.8 \pm 0.2$	6.0	89
山东 1	未检出 Not detected	10	$8.2 \pm 0.1$	4.8	82
山东 2	未检出 Not detected	10	$8.8 \pm 0.2$	5.1	88
运 1	10.1	10	$18.1 \pm 0.1$	4.7	90
运 2	未检出 Not detected	10	$8.3 \pm 0.1$	5.1	83



Conditions as in Fig. 3

Accumulation potential: 0.600 V (1) and opening (2)

图 10 不同富集电位条件下 MG 在 FCCBPE 上的循环伏安

Fig. 10 Cyclic voltammograms of MG at the FCCBPE

### 3 结论

较之于传统的固体工作电极或修饰电极(Yi *et al.* 2007; Saga *et al.* 1994),以 SDS 为修饰剂的 CCB 糊电极表现出较大的活性表面积,较小的背景电流,因而具有更理想的电分析化学性能。源于分子间静电作用,其对溶液中的 MG 表现出显著的伏安增敏作用。应用于淡水渔业水样的检测,该传感器体系不但表现出较高的灵敏度,而且重现性和稳定性也令人满意。加上这种电化学检测 MG 的模式不但仪器结构简单、便携,造价低廉,而且应用能耗低,可以快速、自动给出定量数据,因此在实际样品检测中具有潜在的应用价值。

### 参 考 文 献

- 邓桂春,徐 斌,张渝阳,李秀艳,臧树良. 2002. 生物样品中砷的阴极溶出伏安法测定. 分析测试学报, 21(4): 8~10
- 刘峰延,葛家春,朱晓华. 2006. 孔雀石绿在水产动物体内的分布及新陈代谢. 中国水产, (1): 58~59
- 李 宁. 2005. 孔雀石绿对健康的影响. 国外医学(卫生学分册), 32(5): 262~264
- 汤 桦,陈大舟,张庆合,于慧梅,徐锐锋. 2008. 同位素稀释质谱法测定三文鱼中的孔雀石绿. 化学通报在线预览版: 1~8
- 邱绪建,林 洪,江 洁. 2005. 鱼药孔雀石绿及关联化合物检测方法研究进展. 海洋水产研究, 26(2): 92~96
- 张 丽,文 红,王 红. 2005. 高效液相色谱法检测鱼类产品中孔雀石绿及无色孔雀石绿的残留. 中国卫生检验杂志, 15(12): 1483~1484
- 张晓辉,孔 蕾,滕鸿云,郑天伦,王 扬,黄家庆. 2006. 养殖水体中孔雀石绿的快速检测技术. 水利渔业, 26(06): 101~101
- 张 卉,汪振辉. 2005. 单壁碳纳米管/聚合物修饰玻碳电极的电化学行为及酪氨酸的伏安测定. 分析试验室, 24(3): 27~30
- 张 军,邓培红,匡云飞,黎拒难. 2004. 多巴胺在维生素 B1 修饰碳黑微电极上的电化学行为研究. 分析化学研究报告, 32(11): 1421~1425
- 范 翔,吕昌银,刘运美,何爱桃,贺元文,宁 玲. 2006. 共振瑞利散射法测定孔雀石绿. 中国卫生检验杂志, (10): 1158~1169
- 焦 奎,张旭志,徐桂云,孙 伟. 2005. ssDNA/十八酸修饰碳糊电极的制备及伏安法表征. 化学学报, 63(12): 1100~1104
- Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., and Roybal, J. E. 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. J. Agric. Food Chem. 54(13): 4517~4523
- Bard, A. J., and Faulkner, L. R. 2001. Electrochemical Methods (2nd edition), New York: Wiley, 211
- Laviron, E. 1974. Adsorption, auto-inhibition, and autocatalysis in paleography and in linear Potential sweep voltammetry. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 52(3): 355~359
- Lee, K. C., Wu, J. L., and Cai, Z. W. 2006. Determination of malachite green and leucomalachite green in edible gold fish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. B, 843(2): 247~251
- Mitrowska, K., Posylniak, A., and Zmudzki, J. 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. J. Chromatogr. A, 1089(1-2): 187~192
- Passapol, N., Thiraporn, C., Orawon, C., Motomizu, S., and Chuanwatanakul, S. 2006. Cost-effective flow cell for the determination of malachite green and leucomalachite green at a boron-doped diamond thin-film electrode. Anal. Sci. 22(1): 111~116
- Rushing, L. G., and Thompson, J. H. C. 1997. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leucometabolites in cat fish or trout tissue by high performance liquid chromatography with visible detection. J. Chromatogr. 688(2): 325~330
- Sagar, K., Smyth, M. R., Wilson, J. G., and McLaughlin, K. 1994. High performance liquid chromatographic determination of the triphenylmethane dye, malachite green, using amperometric detection at a carbon fiber microelectrode. J. Chromatogr. A. 659(2): 329~336
- Scherpenisse, P., and Bergwerff, A. A. 2005. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 529(1-2): 173~177
- Tarbin, J. A., Barnes, K. A., and Bygrave, J. 1998. Screening and confirmation of trip henylmethane dyes and their leucometabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS. Analyst, 123(12): 2567~2571
- Valle, L., Diaz, C., Zanococ, A. L., and Richtera, P. 2005. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1067(1-2): 101~105
- Ye, J. S., Wen, Y., Zhang, W. D., Gan, L. M., Xu, G. Q., and Sheu, F. S. 2004. Nonenzymatic glucose detection using multi-walled carbon nanotube electrodes. Electrochem. Commun. 6(1): 66~70
- Yi, H. C., Qu, W. Y., and Huang, W. S. 2007. Electrochemical determination of malachite green using a multi-wall carbon Nanotube modified glassy carbon electrode. Microchim. Acta. 160(1-2): 291~296

# 鱼类细胞培养技术研究进展

艾庆辉 李庆飞 麦康森

(海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

**摘 要** 鱼类细胞培养技术是一种重要且有潜力的生物学研究技术手段和方法。随着生物技术的发展,越来越多的鱼类细胞系(株)被建立。鱼类细胞培养的具体方法因细胞种类而异,但是总体上有共同之处。作者针对鱼类细胞培养的发展现状、应用与特点、方法技术进行综述,并为鱼类细胞培养的发展前景作出展望。

**关键词** 鱼类 细胞培养 原代培养 培养技术

**中图分类号** S968.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0122-07

## Advances in research on fish cell culture techniques

AI Qing-hui LI Qing-fei MAI Kang-sen

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**ABSTRACT** Fish cell culture techniques are important and promising tools for biology studies. With the development of biological technology, an increasing number of fish cell lines have been established. Although the procedures for developing fish cell lines varied with cell sources, basic principles were similar. In this paper, the status of fish cell culture development, application and characteristics as well as culture techniques were reviewed, with emphasis on the perspectives for fish cell culture development.

**KEY WORDS** Fish Cell culture Primary culture Culture techniques

水生动物尤其是鱼类细胞培养是从 20 世纪 60 年代才开始的。相比哺乳动物细胞培养而言,虽然起步较晚,但是发展非常迅速。随着细胞培养技术的不断进步,越来越多的鱼类细胞培养获得成功,并且被广泛应用于鱼类遗传学、病毒学、药理学、环境保护以及生物技术等多方面。

### 1 细胞培养的研究现状

鱼类细胞培养,始于 20 世纪 60 年代,由 Wolf 等(1976)建立了世界上第一个鱼类细胞系,即虹鳟鱼生殖腺细胞系——RTG-2。随后,Gravell 又建立了另一个鱼类细胞系——胖头鱼肌肉细胞系 FHM。此后,鱼类细胞培养研究发展非常迅速。据 Fryer 等(1994)报道,世界上共有超过来自 34 个科、76 个种的 159 株鱼类细胞系。截止到目前,已有的细胞系应该远远超过这个数目。自 1981 年张念慈、杨广智建立了我国最早的鱼类细胞系——草鱼吻端组织细胞系以来,我国已经建立了数十余种细胞株(系),其中主要以淡水鱼细胞培养为主。近几年随着海水养殖业的高速发展,海水鱼细胞的培养也越来越受到重视,已报道的有牙鲆鱼鳃细胞系 FG、



鲈鱼脾细胞系 SPS、鲈鱼心细胞系 SPH、真鲷鳍细胞系 RSBF、花鲈胚胎干细胞系、漠斑牙鲆胚胎干细胞系、大菱鲆鳍细胞系、点带石斑鱼脾脏细胞系 GS 等细胞系(童裳亮等 1998; 叶寒青等 2004; Qin *et al.* 2006)。

## 2 鱼类细胞培养的应用与特点

最初鱼类的细胞培养主要应用于鱼类病毒的分离、鉴定以及病毒疫苗的制备, Wolf 等(1976)利用 RTG-2 细胞系分离出第一个鱼类病毒——传染性胰坏死病毒。随后,各种鱼类病毒随着不同鱼类细胞系的建立被分离出来。目前已经应用到环境毒理学、鱼类肿瘤学、生理学、内分泌学、遗传学和资源保护等方面。鱼类的细胞培养应用范围如此之广主要是由于鱼类细胞培养作为一种新兴的研究工具有着自己独特的优势:1)细胞培养产品标准化程度高、变异程度较低,维护无需较多的人力资源。2)真实性与快速性。离体培养鱼类细胞尤其是原代培养细胞,仍然具有很高的功能分化性,其生理生化功能接近在体状态(Tocher *et al.* 1989),而且实验周期不受实验动物生长周期的影响,可以快速获得实验结果。3)可重复性。在离体条件下,可以精确控制实验条件,排除其他影响因素的干扰,可以有针对性地开展研究。

鱼类细胞培养的原理以及技术都是借鉴哺乳动物细胞培养,但是与哺乳动物细胞培养相比,鱼类细胞培养却有着自己独有的特点:1)由于鱼类是变温动物,耐温范围较广,因此鱼类细胞培养对于温度的要求没有哺乳动物细胞培养那么严格。冷水性鱼类如大西洋鲑细胞生长温度一般在 15~20℃(Koren *et al.* 1997),而温水性鱼类细胞如草鱼在 20~30℃ 仍然可以保持活力(唐 玫等 2001),还有一些广温性鱼类如牙鲆和鲈鱼的耐温性则更广(童裳亮等 1998)。2)相比哺乳动物细胞培养,鱼类细胞可以耐受的渗透压范围更为宽广,因此被广泛应用于环境生态学等生物研究领域。3)对于某些细胞培养如淋巴细胞,细胞需要外部刺激才能够在体外不断增殖。哺乳动物淋巴细胞需要外源刺激物(如白细胞介素)周期性的不断刺激才能达到体外长期培养目的,但是鱼类淋巴细胞只需要一次或者不需要刺激,就可以保持体外长期增殖状态(Miller *et al.* 1994)。4)与哺乳动物细胞培养不同,鱼类细胞培养不需要频繁地传代以维持细胞活力(7~14d 或者更久),传代后的培养条件也基本不需要经常改变,减少了劳动力消耗(Fryer *et al.* 1994)。

## 3 鱼类细胞培养的分类

鱼类细胞培养同哺乳动物细胞培养一样,包括原代培养和传代培养两个阶段。原代培养是指直接从动物的组织器官获得细胞所做的首次培养;传代细胞培养则是对体外生长的细胞进行扩大和继代,传代培养的细胞有些生存期有限,称之为有限细胞系;已获得无限繁殖能力持续生存的细胞系称为无限细胞系。一般来说传代培养的细胞随着继代次数的增多,会逐渐失去原代培养细胞的生理生化功能特性,而原代培养细胞仍然保留部分甚至全部同在体细胞一样的生理功能特性,细胞仍然保持高度的分化性以及功能性,因此,原代培养细胞被认为可以取代动物活体开展部分生命科学研究(Segner 1998; Zhou *et al.* 2006)。就目前细胞培养的应用现状而言,原代细胞培养所应用的研究领域更为宽广,在某些研究领域如环境毒理学研究、鱼类生理学研究 and 遗传学研究等方面的作用更是传代培养的细胞所无法代替的。

## 4 鱼类细胞培养的取材

目前,已经建成超过 160 个鱼类细胞系,所涉及的鱼类包括淡水鱼类、海水鱼类以及溯河鱼类。用于细胞培养的实验鱼类个体要健壮无病,体表鳞片黏液完整没有外伤,选择实验鱼类之前最好了解该鱼种群的健康史,避免选用某些携带内源性病菌的鱼类(Wolf *et al.* 1976a)。鱼类细胞原代培养所取材的组织器官来源很多,鱼类胚胎和幼鱼的各种组织,分化程度低,分裂潜能大,病毒携带少,适合作为原代培养的材料;另外成鱼的性腺、肾脏、肝脏、脾脏、心脏、鳍条、鳃、鳃上皮、皮肤、吻端、内分泌组织、血液、肌肉组织以及骨骼细胞的原代培养,均已有报道(Miller *et al.* 1994; Bouma *et al.* 2005; Norum *et al.* 2005; Sakai 2006; Alvarez *et al.* 2007; Wood *et al.* 2007; Katakura *et al.* 2009)。

## 5 鱼类细胞原代培养的取材方法

由于鱼类种类、年龄、性成熟度、不同组织器官的生理结构不同,不同细胞生活的内环境也千差万别,因此,

对于来自不同组织器官材料的取材方法、培养方式以及培养条件也因细胞而异。在无菌环境下从鱼体取出要培养的组织细胞,需要对所取材料进行一定的处理后接入到培养板(瓶)中进行培养,通常有如下几种方法:

1)组织块固定法。将组织从鱼体中取出后,剪成约小块,按照一定的排列方式将组织块贴在培养瓶(皿)中,待组织块贴紧后,加入培养液后放入培养箱中培养。由于这种方法相对简单易学,受到许多初学者的青睐(Wolf *et al.* 1976a)。

2)机械分散法。适用于细胞间连接较松散的组织,如肝脏、肾脏、胚胎组织以及幼鱼全鱼。将完整或者剪碎的组织挤压通过筛网,将过滤后得到的组织离心清洗后加入营养液培养。

3)络合剂分散法。目前使用的络合剂主要是EDTA(乙二胺四乙酸),EDTA可以螯合细胞间的 $\text{Ca}^{2+}$ ,从而打破细胞之间的耦合连接,使细胞连接松散,稍微吹打后即可分散。该法多用于囊胚细胞培养及上皮型细胞系的传代或者作为其他分离方法的辅助手段。

4)酶消化法。该方法是目前采用较为广泛的方法,适用于绝大多数组织器官,并且在贴壁细胞传代时也多用此种方法。经常采用的消化酶有胰蛋白酶、胶原酶等。利用消化法得到的细胞量大,均一性好,细胞贴壁后可迅速形成单层。需要注意的是要视不同组织掌握消化酶的浓度以及消化时间,否则会因消化过度而对细胞产生损伤(Wolf *et al.* 1976b)。

5)密度梯度分离法。用于从鱼类外周血液中和淋巴器官中分离游离细胞,主要方法有Ficoll梯度离心、蔗糖梯度离心以及Percoll梯度离心,其原理是利用不同性质的分离介质形成密度梯度,水平离心细胞混合液后即可达到分离纯化待培养细胞的目的(Blaxhall *et al.* 1985)。

## 6 鱼类细胞原代培养方法

鱼类细胞种类多、细胞特性多样,因此培养方式也千差万别,目前主要采用的培养方法主要有以下几种类型:

1)贴壁培养法。大多数的鱼类细胞(如肝脏、脾脏、鳍条等组织)具有贴附生长的性质,属于贴壁依赖性细胞,大致有以下4种生长类型:成纤维型细胞、上皮型细胞、游走型细胞和多态型细胞。鱼类组织或者细胞接种到培养板(皿)中后,加入培养液后培养,细胞首先会贴附于培养材料底壁上,经过一段时间的潜伏期后,细胞开始进入指数增生期,细胞数目大量增多,最后逐渐在培养板中混合形成单层。在贴壁细胞培养中,细胞能否成功贴壁是细胞培养成败的关键。细胞贴壁是一个非常复杂的多因素相关过程,支持物表面的清洁程度、所带电荷以及培养基中的一些蛋白、激素、多肽类物质都会影响到细胞贴壁。采用氨基酸或者胞外基质包被的培养板会促进培养细胞贴壁,此外由于在血清和鱼皮提取物中存在一些特殊物质如纤连蛋白、细胞表面蛋白和胶原蛋白等促贴壁物质,因此在培养基中添加血清、鱼皮提取物等物质也会有助于细胞贴壁(Lee *et al.* 1993; Rabergh *et al.* 1995)。

2)悬浮培养法。区别于贴壁培养法,悬浮培养法培养的细胞胞体圆形,不贴于支持物上,不具有贴壁依赖性,多用于某些特殊细胞的培养,如白细胞以及少数类型的癌细胞。以鱼类白细胞培养为例,以密度梯度离心法分离出白细胞,清洗后即可加入培养基进行悬浮培养。刚分离出的鱼类白细胞大都处于 $G_0$ ( $G_1$ )期,细胞本身并不增殖,需要加入促有丝分裂素[如刀豆蛋白(ConA)、植物凝集素(PHA)、佛波醇(PMA)]才能促进白细胞分裂增殖(Blaxhall *et al.* 1985; Miller *et al.* 1994)。此外,鱼类血清的加入对于刺激白细胞的有丝分裂增殖也是必不可少的。

3)组织切片培养法。保持体外培养细胞的功能完整性是细胞原代培养的重要任务,而细胞与组织、细胞之间的交互作用有助于细胞的某些功能性基因的表达(Clayton *et al.* 1985)。利用组织切片培养方法,可以使细胞在体外仍然具有和体内情况一样的胞间作用,有助于减少细胞培养中经常出现的部分细胞功能丢失现象。组织切片培养法是指将离体动物组织剪切成长约2 mm左右的小块,置于不断滚动中的无菌容器中培养。在这样的培养条件下,最大限度保证了细胞之间的相互作用,减少了由于分化导致的细胞损失;存在的主要缺点是不能进行细胞计数,无法对实验进行精确定量分析,另外由于组织小块内外部分从培养基中获得的营养物质的效率不同,细胞生长的均一性、同步性较差(Janssens *et al.* 1994)。

4) 滋养层培养法。也叫做共培养法(Co-culture),多见于鱼类干细胞的培养。干细胞是一类未分化的具有全能性的细胞,体外培养的关键技术是如何避免干细胞发生分化,在离体条件下仍然保持多能性。滋养层培养技术作为一种较为成熟的培养方法广泛应用在鱼类的干细胞培养。滋养层(Feeder layer)是同源性的细胞培养物,干细胞接种到滋养层中,利用滋养层细胞产生的分化抑制因子可以保持干细胞在体外长时间保持未分化的多能性状态(Evans *et al.* 1981)。当前,利用该技术已经成功建立了斑马鱼、青鲮鱼、花鲈的胚胎干细胞系(Wakamatsu *et al.* 1994; Sun *et al.* 1995; Chen *et al.* 2003)和虹鳟、鲤鱼的造血干细胞系(Diago *et al.* 1998; Ganassin *et al.* 1999; Katakura *et al.* 2009)。对斑马鱼和青鲮鱼的胚胎成纤维滋养层的研究发现,成纤维生长因子具有同滋养层分化抑制因子一样的抑制干细胞分化功能(Bradford *et al.* 1994; Wakamatsu *et al.* 1994)。哺乳动物造血干细胞滋养层分泌的造血干细胞生长因子、胞外基质蛋白和细胞粘连分子对维持离体造血干细胞的全能性和体外增生性有重要作用,但这些因子在鱼类造血干细胞滋养层中的作用目前尚不明确。然而随着无滋养层干细胞的培养成功,相信将会有助于回答这一科学问题(Hong *et al.* 2000; Katakura *et al.* 2009)。

5) 嵌入式培养法。是针对生殖细胞培养而设计的一种培养方法,传统的生殖细胞培养方法由于外植块的表体比(表面积/体积)较低,阻碍了氧气以及营养物质通过滋养层到达组织块内部而导致生殖细胞发生坏死,无法达到体外长期培养的目的。而采用机械振荡培养方法虽然有助于增加氧气与营养物质进入组织块内部,但却容易导致组织的机械损伤(Nagler *et al.* 1994)。嵌入式培养法则可以克服上述缺点,在普通的细胞培养板中间插入具有良好渗透性的微孔膜,微孔膜上下皆注入培养基,组织块置于微孔膜上,培养基可以通过微孔膜到达细胞的两侧,使细胞可以从培养基获得足够的营养物质(Miura *et al.* 1991)。与普通塑料培养板培养的细胞相比,利用嵌入式培养法培养的细胞更能代表其体内真实状态,可极大地改善细胞分化,扩大培养细胞的生物应用,达到体外长期培养生殖细胞的目的。利用该方法,Miura等(1991)体外培养日本鳗鲡 *Anguilla japonica* 睾丸组织达到21d,Amer等(2001)体外培养远东哲罗鱼 *Hucho perryi* 睾丸组织15d后仍然观察到完整的生精现象,Bouma等(2005)将长期培养的虹鳟睾丸组织移植到鱼体后,组织中的精母细胞仍然可以正常发育成为成熟的精子细胞。

6) 重组培养法。鱼类的鳃是一个特殊的器官,是因为鱼类鳃上皮细胞所特有的生理极性,可以生活在异相(水相、体液相)介质环境中。传统方法是在均相环境中培养鳃细胞,导致鳃细胞所具有的许多功能丧失,如细胞的生理极性以及 $\text{Na}^+$ 与 $\text{Cl}^-$ 的吸收转运能力(Wood *et al.* 1997)。重组培养法结合了滋养层培养法和嵌入式培养法的优点,专门为改进鱼类鳃细胞培养而设计。该方法将改进后的插入式培养板的上下两部分注入不同的培养基,给鳃细胞营造了一个异相的生活环境,然后将鳃细胞接种在培养板的渗透性滤膜上培养,待铺垫细胞(Pavement cell)形成后,利用二次接种嵌入法(Double-Seeded Insert, DSI)形成重组鳃细胞单层(Fletcher *et al.* 2000),即将富线粒体细胞(Mitochondria-Rich Cells, MRCs)接种到铺垫细胞单层上,最后得到由85%的铺垫细胞与15%的与离子转运密切相关的MRCs细胞组成的重组鳃细胞单层,这两种细胞比例与鱼类鳃中的细胞比例基本一致(Wood *et al.* 2002)。利用重组培养技术,可以使鱼类鳃细胞生长状态更接近于在体情形,细胞所具有的电生理学特性、离子吸收转运以及氨分泌等高度分化的生理特性仍然保留,不失为一个很有前景的细胞培养技术(Wood *et al.* 2002,2007)。

7) 灌注培养法。组织环境中抑制因素的积累是细胞密度提高的主要限制因素(林福玉等 1999),如氨离子(Ryll *et al.* 1994)、乳酸、 $\text{CO}_2$ (Hu *et al.* 1997)。灌注培养技术的出现,解决这一难题,为细胞大规模培养开辟了广阔的前景。在灌注培养系统中,细胞保留在反应系统中,排除旧培养液的同时不断加入新的培养基,为细胞连续培养提供充足的营养成分,带走代谢产物,使细胞达到很高的生长密度。较之其他方法,灌注培养方法可以提高生产效率,大大降低劳动力消耗。更重要的是与静态培养方法相比,灌注培养方法得到的细胞呈现出更为全面的细胞功能性。

## 7 前景展望

目前,虽然鱼类细胞培养已经取得了许多成果,但是在这一研究领域仍然有许多问题尚未解决,值得我们

去深入研究,鱼类细胞培养技术有着广阔的发展前景。

1) 无血清培养基的研究开发与优化。无血清培养基的优势在于避免了因为血清的批次、质量、成分等对细胞培养造成的污染、毒性作用和不利于产品纯化等影响(郭立格等 2001),此外对于某些生物学研究如营养素代谢、激素的胞外调控、信号转导等机制的研究需要借助于无血清培养基的支持(Tocher *et al.* 1995; Vegusdal *et al.* 2005)。因此开发既无血清又无蛋白或蛋白含量极低的第3代双无培养基(Serum-free, Protein-free medium)以及无血清无蛋白适合多种细胞生长的第四代全能型培养基就显得迫切而具有现实意义(陈昭烈等 1994)。

2) 保证体外长期培养的细胞保持分化状态。鱼类原代细胞培养的技术关键点在于尽可能在体外条件下模拟体细胞生活的内环境,减少由于分化(去分化或再分化)导致的细胞损失,尽可能保持细胞在离体条件下的生理功能完整性(Segner 1998)。短期培养(5~8d)的细胞功能基因可以正常表达,但是长期体外培养条件下的细胞许多功能会丢失。可能是由于体外培养条件下缺少在体条件下的营养供给、细胞间相互作用和神经激素调控等作用,因此,需要不断优化培养条件,使培养条件最大限度接近体内细胞生长的真实情形。

3) 筛选高效的生物学检测指标。随着离体培养时间的延长,细胞可能会出现部分功能缺失或改变,同时会伴随着许多生理学指标的改变,通过检测其中某些敏感的细胞生物学指标可以监测所培养细胞是否发生功能分化。如在胚胎干细胞的培养中,细胞碱性磷酸酶以及端粒酶活性的存在是ES细胞体外多能性保留的标志(Wakamatsu *et al.* 1994; Hong *et al.* 1996),某些标记基因(Marker Gene)的体外表达也可以被认为是细胞功能完整性的记号(Katakura *et al.* 2009)。

4) 新的细胞培养技术的开发。相比哺乳动物细胞培养而言,鱼类细胞培养难度较大,相当多的鱼类组织器官的细胞培养至今尚未成功。这就需要我们不断开发新的细胞培养技术,优化培养条件,解决这一难题;同时目前已有的细胞大规模培养技术,如鱼类细胞的微载体培养技术、转瓶培养技术、细胞的生物反应器培养技术等还不是很完善,还需要进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 唐 玫, 马广智. 2001. 草鱼头肾淋巴细胞体外转化培养影响因素的研究. 华南师范大学学报: 自然科学版, 4: 5~8
- 王宏伟, 王安利, 王维娜, 郭立格. 2001. 水产动物细胞培养方法及前景. 河北大学学报(自然科学版), 21(2): 198~202
- 林福玉, 陈昭烈, 刘 红, 黄培宝. 1999. 大规模动物细胞培养的问题及对策. 生物技术通报, (1): 32~35
- 童裳亮, 李 宏, 苗宏智. 1998. 牙鲆鱼鳃细胞系(FG), 鲈鱼脾与心细胞系(SPS)与(SPH)以及真鲷鳍细胞系(RSBF)的建立与部分特性测定. 鱼类病害研究, 20(1-2): 16~21
- 叶寒青, 陈松林, 沙珍霞. 2004. 不同因子对花鲈胚胎干细胞增殖的影响. 水产学报, 28(5): 493~498
- 陈昭烈, 肖成祖. 1994. 动物细胞无血清培养基及其应用. 生物工程进展, 14(5): 23~27
- Alvarez, M. C., Bejar, J., Chen, S. L., and Hong, Y. H. 2007. Fish ES cells and applications to biotechnology. *Mar. Biotechnol.* (New York, N. Y.), 9(2): 117~127
- Amer, M. A., Miura, T., Miura, C., and Yamauchi, K. 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* 65(4): 1 057~1 066
- Blaxhall, P. C., and Hood, K. 1985. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. *J. Fish Biol.* 27(6): 749~755
- Bouma, G. J., Cloud, J. G., and Nagler, J. J. 2005. An *in vitro* system for the long-term tissue culture of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testis. *J. Exp. Zool.* 303A(8): 698~703
- Bradford, C. S., Sun, L., and Barnes, D. W. 1994. Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(2): 78~86
- Chen, S. L., Sha, Z. X., and Ye, H. Q. 2003. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos. *Aquaculture*, 218(1-4): 141~151
- Clayton, D. F., Harrelson, A. L., and Darnell, J. E. 1985. Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol. Cell. Biol.* 5(10): 2 623~2 632
- Diago, M. L., Lopez-Fierro, P., Razquin, B., and Villena, A. 1998. *In vitro* haemopoiesis induced in a rainbow trout pronephric stromal cell line

- (TPS). *Fish Shellfish Immunol.* 8(2): 101~119
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(9): 154~156
- Fletcher, M., Kelly, S. P., O'Donnell, M. J., and Wood, C. 2000. Transport properties of cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: a novel preparation with mitochondria-rich cells. *J. Exp. Biol.* 203: 1 523~1 537
- Fryer, J. L., and Lannan, C. N. 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *Meth. Cell. Sci.* 16(2): 87~94
- Ganassin, R. C., and Bols, N. C. 1999. A stromal cell line from rainbow trout spleen, RTS34st, that supports the growth of rainbow trout macrophages and produces conditioned medium with mitogenic effects of leukocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Ani.* 35(2), 80~86
- Hong, Y., Chen, S., and Scharl, M. 2000. Embryonic stem cells in fish: current status and perspectives. *Fish Physiol. Biochem.* 22(2): 165~170
- Hu, W. S., and Aunins, J. G. 1997. Large-scale mammalian cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(2): 148~153
- Janssens, P. A., and Grigg, J. A. 1994. Organ culture of fish tissues. *Biochem. Mol. Biol. Fishes*, 3: 375~386
- Katakura, F., Takizawa, F., Yoshida, M., Yamaguchi, T., Araki, K., Tomana, M., Nakao, M., Moritomo, T., and Nakanishi, T. 2009. Co-culture of carp (*Cyprinus carpio*) kidney haematopoietic cells with feeder cells resulting in long-term proliferation of T-cell lineages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 131(1-2): 127~136
- Koren, C. W., Sveinbjornsson, B., and Smedsrod, B. 1997. Isolation and culture of endocardial endothelial cells from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Cell Tissue Res.* 290(1): 89~99
- Lee, L. E. J., Clemons, J. H., Bechtel, D. G., Caldwell, S. J., Han, K. B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D. D., and Bols, N. C. 1993. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol. Toxicol.* 9(3): 279~294
- Miller, N. W., Chinchar, V. G., and Clem, L. W. 1994. Development of leukocyte cell lines from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Meth. Cell Sci.* 16(2): 117~123
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., and Nagahama, Y. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(3): 5 774~5 778
- Nagler, J. J., Tyler, C. R., and Sumpter, J. P. 1994. Ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured within lamellae survive well, and sequester and process vitellogenin. *J. Exp. Zool.* 269(1): 45~52
- Norum, M., Bøgwald, J., and Dalmo, R. A. 2005. Isolation and characterisation of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) macrophages. *Fish and Shellfish Immunol.* 18(5): 381~391
- Qin, Q. W., Wu, T. H., Jia, T. L., Hegde, A., and Zhang, R. Q. 2006. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *J. Virol. Meth.* 131(1): 58~64
- Rabergh, C. M., Kane, A. S., Reimschuessel, R., and Lipsky, M. M. 1995. Viability and induction of tyrosine aminotransferase in rainbow trout hepatocytes cultured on laminin and polylysine in a serum-free medium. *Meth. Cell Sci.* 17(3): 207~215
- Ryll, T., Valley, U., and Wagner, R. 1994. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44(2): 184~193
- Sakai, N. 2006. *In vitro* male germ cell cultures of zebrafish. *Methods.* (San Diego, Calif), 39(3): 239~245
- Segner, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A; Mol. Integr. Physiol.* 120(1): 71~81
- Sun, L., Bradford, C. S., and Barnes, D. W. 1995. Feeder cell cultures for zebrafish embryonal cells in vitro. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4(1): 43~51
- Tocher, D. R., Carr, J., and Sargent, J. R. 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells; differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 94(2): 367~374
- Tocher, D. R., Dick, J. R., and Sargent, J. R. 1995. Development of an in vitro model of essential fatty acid deficiency in fish cells. *Prostag. Leuko. Ess. Fatty Acids*, 53(5): 365~375
- Vegusdal, A., Gjoen, T., Berge, R. K., Thomassen, M. S., and Ruyter, B. 2005. Effect of 18:1n-9, 20:5n-3, and 22:6n-3 on lipid accumulation and secretion by Atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*, 40: 477~486
- Wakamatsu, Y., Ozato, K., and Sasado, T. 1994. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(4): 185~191
- Wolf, K., and Quimby, M. C. 1976a. Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. *Meth. Cell Sci.* 2(4): 445~448
- Wolf, K., and Quimby, M. C. 1976b. Primary monolayer culture of fish cells initiated from trypsinized tissues. *Meth. Cell Sci.* 2(4): 453~456
- Wood, C. M., and Part, P. 1997. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. *J. Exp. Biol.* 200: 1 047~1 059
- Wood, C. M., Kelly, S. P., Zhou, B., Fletcher, M., O'Donnell, M., and Eletti, B. 2002. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish

gill. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1566(1-2): 72~83

Wood, C., Tsui, T., and Galvez, F. 2007. Cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: Tools for understanding gill function. *Comp. Biochem. Physiol.-Part A: Mol. Integra. Physiol.* 146: 69~73

Zhou, B. S., Liu, C. S., Wang, J. X., Lam, P. K., and Wu, R. S. 2006. Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquat. Toxicol.* (Amsterdam, Netherlands), 80(2): 109~118

## 《渔业科学进展》编辑部网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部已从2010年1月开始采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者访问黄海水产研究所网站(<http://www.ysfri.ac.cn>)右下角的“《渔业科学进展》期刊网上投稿系统”。投稿程序请参看《渔业科学进展》网络化稿件处理系统作者使用指南。

如有疑问,请致电 0532-85833580 陈严老师或 0532-85800117 王建坤老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询,E-mail: [chenyan@ysfri.ac.cn](mailto:chenyan@ysfri.ac.cn)。

《渔业科学进展》编辑部

2012年6月20日