

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200512001

http://www.yykxjz.cn/

代金彩, 聂竹兰, 刘洁雅, 洪继彪. 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  
DAI J C, NIE Z L, LIU J Y, HONG J B. Preliminary study on the establishment of kidney tissue cell lines in *Schizothorax eurystomus*.  
Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 61-68

## 宽口裂腹鱼中肾组织细胞系建立的初步研究\*

代金彩 聂竹兰<sup>①</sup> 刘洁雅 洪继彪

(塔里木大学动物科学学院 新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室  
塔里木珍稀鱼类研究中心 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要** 鱼类细胞培养是进行种质保存、基因功能分析、细胞工程育种等研究的重要材料和模型。为了建立濒危的宽口裂腹鱼(*Schizothorax eurystomus*)中肾组织细胞系,本研究以其中肾组织为材料,以组织块移植法启动细胞原代培养,待细胞稳定后再进行传代培养,建立宽口裂腹鱼中肾组织细胞系,命名为 EUM10。分析宽口裂腹鱼中肾细胞系冻存复苏能力和最适生长条件,且通过 PCR 技术检验污染状况,用线粒体基因片段分析鉴定细胞的来源。结果显示,宽口裂腹鱼中肾组织细胞的最佳培养基为 DME/F-12,最适温度为 25℃,最适血清浓度为 20%;细胞呈悬浮生长,生长曲线为“S”型曲线,第 10 代中肾组织细胞系细胞的群体倍增时间为 23.26 h;第 6 代细胞液氮冷冻保存 6 个月后,复苏存活率达 91.91%;经污染鉴定无污染现象;EUM10 第 10 代细胞线粒体 16S rRNA 序列分析结果与宽口裂腹鱼基因序列一致性为 99.81%,表明细胞系来自宽口裂腹鱼。本研究成功建立了宽口裂腹鱼中肾组织细胞系,可将宽口裂腹鱼中肾细胞系作为体外体系运用于宽口裂腹鱼的研究,如细胞遗传学、基因功能分析等,可为宽口裂腹鱼的基础研究和育种工作提供基础资料。

**关键词** 宽口裂腹鱼;中肾组织;细胞系;细胞培养

**中图分类号** Q952 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0061-08

宽口裂腹鱼(*Schizothorax eurystomus*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)、裂腹鱼属(*Schizothorax*),又名白条(龙见全等, 2019),其显著特征为下颚有角质,手触有较为明显的粗糙感。国外分布于阿姆河水系、锡尔河水系,国内分布于阿克苏河、渭干河、叶尔羌河、克孜勒苏河和伊犁河,是塔里木河水系的土著鱼类、新疆特有经济鱼类。由于人为和环境变化等原因,宽

口裂腹鱼的数量急剧减少,在自然环境中,宽口裂腹鱼产卵的受精率和成活率不高。2019 年 4 月在乌恰县境内的克孜勒河中捕捞到体长 6 cm 左右的宽口裂腹鱼,通过按压腹部,在泄殖孔出现大量的乳白色精液(图 1),且体长 6 cm 以下的宽口裂腹鱼也能按压挤出精液,表现出不同程度的早熟现象。环境变化、气候变化、栖息地的破坏加剧了裂腹鱼的濒危(魏杰等, 2020)。目前,市场上少见宽口裂腹鱼,市场价在 200~

\* 国家自然科学基金(31560721; 31860729)、新疆生产建设兵团中青年科技创新领军人才计划项目(2018CB033)和兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(HS201804)共同资助 [This work was funded by National Natural Science Foundation of China (31560721; 31860729), the Scientific and Technological Innovation Commanding Troops Talented Person Project financially supported by Xinjiang Production and Construction Corps for Young and Middle-Aged (2018CB033), and the Key Laboratory of Animal Science and Technology of Xinjiang Production and Construction Corps (HS201804)]. 代金彩, E-mail: 1477496028@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 聂竹兰, 教授, E-mail: niezhl2004@163.com

收稿日期: 2020-05-12, 收修改稿日期: 2020-05-31

400 元/kg, 资源量正在减少, 自治区拟将其列为保护鱼类(龙见全等, 2019)。

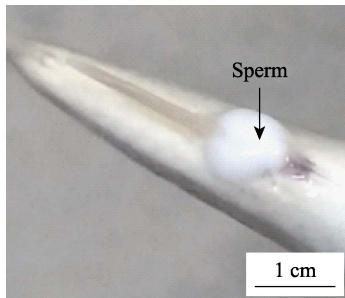


图1 宽口裂腹鱼挤出的精液  
Fig.1 Sperm squeezed out from *S. eurystomus*

细胞培养技术是在体外人工模拟体内环境的培养基中, 细胞经过大量培养成为简单的单细胞或极少分化的多细胞的技术。世界上第一个鱼类细胞系是由 Wolf 等(1962)建立的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系 RTG-2。我国最早建立的细胞系是张念慈等(1981)报道的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)吻端组织细胞系 ZC-7901 和上皮样细胞亚株 ZC-7901S1。目前, 关于鱼类细胞培养的细胞系的报道有 34 科 80 种 300 株(Fryer *et al.*, 1994), 并应用于病毒学、免疫学、细胞生物学、基因工程和环境毒理学等领域。

鱼类细胞培养材料来源广泛, 如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)肾脏细胞系 CCK (徐进, 2012)、赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)鳍条细胞系 SCF (邓亚林, 2016)、条斑星鲃(*Verasper moseri*)卵巢细胞系 BFO (Xu, 2015)及斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)肌肉、脑细胞系(王梦珂等, 2018)。近年来, 研究人员建立了肾组织细胞系并分析了其生物学特性, 如大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(郑在予等, 2017)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(赵建青等, 2019)、松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)(单莉娟, 2015)、草鱼(左文功等, 1984)和金钱鱼(*Scatophagus argus*)(张莹莹等, 2014)。本研究以宽口裂腹鱼中肾组织为材料, 以组织块移植法启动细胞原代培养, 待细胞稳定后进行传代培养, 建立宽口裂腹鱼中肾组织细胞系, 旨在为其种质资源、环境毒理学和基因工程的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2019 年 4 月于新疆克孜勒河采集宽口裂腹鱼, 取其中 1 条健康宽口裂腹鱼, 体重为 93.98 g, 体长为 15.89 cm, 全长为 18.66 cm。

DME/F12、L-15、MEM、RPMI-1640 和 M199 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; 磷酸缓冲液(PBS)、青霉素-链霉素双抗、二甲基亚砜(DMSO)和吉姆萨购自 Solarbio 公司; 台盼蓝和 0.25%胰酶购自 Biotopped 公司; MS-222 购自渔夫宝公司; 25 cm<sup>2</sup> 和 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶、15 mL 和 50 mL 离心管、移液管、细胞冻存管、24 孔细胞培养板均为 Corning 公司产品; 基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 宽口裂腹鱼的预处理** 将宽口裂腹鱼在实验室暂养 3 d 后, 放入 20 mg/mL 的 KMnO<sub>4</sub> 溶液中浸泡 30 min, 然后加入 0.1 μL/g 的 MS-222 麻醉剂麻醉, 致死。将鱼全身喷涂 75%酒精, 放入超净台的解剖盘中。取 4 个培养皿, 其中 1 个培养皿中加 75%酒精, 另 3 个培养皿均加含 500 IU/mL 的青霉素、500 μg/mL 的链霉素和 12.5 μg/mL 两性霉素 B 的 PBS。用解剖学方法取出宽口裂腹鱼鱼鳃之上、脊柱下侧的中肾, 将取出中肾组织放入 75%的酒精浸泡 30 s 之后, 再依次放入另外 3 个含有 PBS 的培养皿中浸泡。经处理的中肾组织放入 2 mL 无菌离心管中, 用无菌眼科剪剪至 1~3 mm 的大小均匀的组织碎块。

**1.2.2 原代培养与传代培养** 将已剪好的中肾组织碎块移入 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶, 放入 25℃的 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 观察贴壁情况, 过 4 h 后反相放置。6 h 后, 加入 1 mL 含 20% FBS、500 IU/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素和 500 μg/mL 两性霉素 B 的 DME/F-12 培养液, 正相放入 25℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。每天观察组织生长的情况。2~3 d 后更换培养液, 当宽口裂腹鱼中肾组织块周围出现细胞的悬浮物时, 悬浮细胞, 移至 15 mL 的离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液后加入 PBS 使细胞悬浮, 1000 r/min 离心 5 min, 如此重复 3 次。加入 DME/F-12 培养液, 按照 1:2 进行传代培养。第 5 代之后, 将培养液中的链霉素、青霉素和 FBS 的浓度分别调整为 200 μg/mL、200 IU/mL 和 15%, 到第 8 代时, 培养液换为含 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F-12 培养液。

**1.2.3 最佳培养基的选择** 使用 5 种培养基: DME/F-12、M199、L-15、MEM 和 RPMI-1640。观察细胞的生长状况。分别向培养基中加入 10% FBS 和 1% P/S, 混匀。取一定量的中肾细胞, 分别接种在 5 个培养基中, 中肾细胞数量保持一致。在 25℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 96 h, 在培养 0、24、48、72 和 96 h 时用血球计数板对细胞进行计数, 并绘制

5 种培养基中细胞的生长曲线。

**1.2.4 最适温度的选择** 观察不同温度(20℃、25℃和 30℃)对中肾细胞生长的影响。每种温度下的培养基皆为 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F-12 培养基。在 0、24、48、72 和 96 h, 使用血球计数板对细胞进行计数, 并绘制不同温度下的生长曲线。

**1.2.5 最适血清浓度的选择** 在得到最适温度和培养基后, 保持其他条件一致, 调节 FBS 浓度(0%、5%、10%和 20%)。将相同数量的中肾细胞接种于除血清浓度不同而其他条件均相同的培养基中, 放在 25℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养, 在培养 0、24、48、72 和 96 h 时, 用血球计数板对细胞进行计数, 并绘制不同 FBS 下的生长曲线。

**1.2.6 标准生长曲线** 取中肾细胞溶液, 接种到 24 孔培养板上, 将其分为 8 组, 每组 3 个孔, 放入 25℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 连续 7 d 计数, 使用血球计数板每天计数 1 次。以天数为横坐标( $t$ ), 以每天计数的平均数为纵坐标(细胞密度 $\times 10^4$ ), 计算细胞群体倍增的时间:

$$T=t \cdot \lg / \lg(N_t/N_0)$$

式中,  $N_t$  为时间  $t$  时的细胞数,  $N_0$  为起始细胞数。

**1.2.7 细胞冻存与复苏** 冻存: 配置 10%二甲亚砜、20% FBS、70% DME/F-12 的细胞冻存液, 预冷, 细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/mL, 倒入冷冻管, 液氮中保存。

复苏: 按细胞: 培养液=1: 5 的比例, 细胞复苏培养, 在培养 0、24、48 和 72 h 时, 用 MTT 法测定细胞的 OD 值, 绘制细胞复苏后增殖曲线。

**1.2.8 细胞污染与检测鉴定** 细胞培养过程中容易被污染, 为了检查培养过程是否受到污染, 采用通用引物, 用 PCR 技术进行鉴定(表 1)。

**1.2.9 细胞来源鉴定** 用基因组 DNA 试剂盒提取中肾组织细胞 DNA。根据宽口裂腹鱼 16S rRNA 设计引物(表 1)。通过 PCR 扩增, 50  $\mu$ L 反应体系: 25  $\mu$ L  $2 \times Taq$  PCR MasterMix, 引物各 2.5  $\mu$ L, 5  $\mu$ L 模板 DNA, 15  $\mu$ L 的灭菌超纯水。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 48.9℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 循环 35 次。扩增反应结束后, 取 8  $\mu$ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测。PCR 产物测序, 比较并获得与 GenBank 中已发表序列的一致率。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

引物名称 Primer	引物序列 Primer Sequence	参考文献 Reference
细菌 Bacteria	F: 5'-ATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	万颖杰等(2005)
真菌 Fungus	F: 5'-ATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' R: 5'-CTCTGGCTTCACCCTATTC-3' F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	金敏等(2009)
支原体 Mycoplasma	F: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3' R: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	龚巧玲等(2007)
宽口裂腹鱼 16S rRNA <i>S. eurystomus</i> 16S rRNA	F: 5'-GCAAAAGAGTGGGAAGAA-3' R: 5'-GGAAAAGTAGCGTTACAGATAG-3'	-

## 2 结果

### 2.1 原代培养与传代培养

每天观察细胞瓶, 从 4 d 后开始, 宽口裂腹鱼的中肾组织块周围开始迁出细胞, 由组织块向周围溢出, 形状呈不规则团状连接结构(图 2a); 第 9 天开始, 70% 的细胞瓶底面被铺满(图 2b); 第 15 天, 细胞呈悬浮生长(图 2c), 按照 1: 2 进行传代培养, 每天观察细胞生长状况, 生长速度较快。

### 2.2 最适培养基

在 M199、L-15、MEM、RPMI-1640 和 DME/F-12 培养基中同条件培养 4 d, 在每个时间相对细胞数量为 DME/F-12>L-15>RPMI-1640>M199>MEM, 其中, DME/F-12 增势较大(图 3)。3 d 后, 除 DME/F-12 外, 其他 4 种培养基的增长速度趋于平缓。L-15 比其他 3 种培养基效果较好, 在 2 d 后较为明显。M199 和 RPMI-1640 效果较为相似, RPMI-1640 略高一点。相比之下, 最适培养基为 DME/F-12。

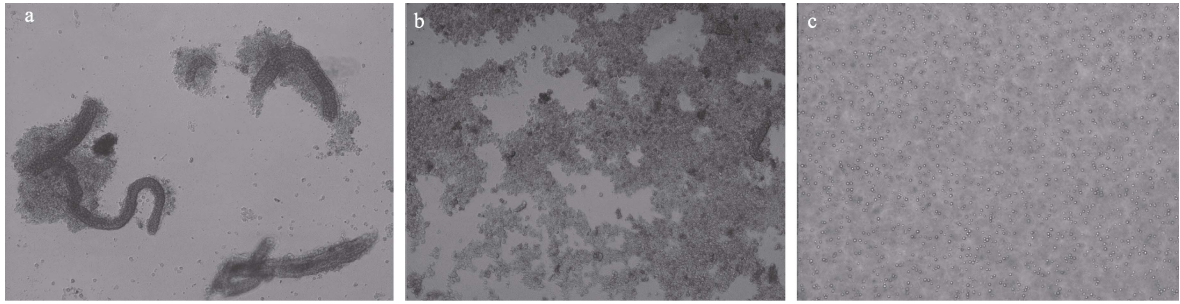


图2 宽口裂腹鱼中肾组织细胞原代培养  
Fig.2 Primary culture of kidney tissue cells of *S. eurystomus* (100 μm)

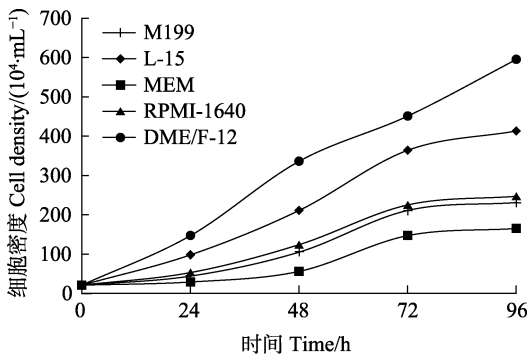


图3 细胞培养的最适培养基  
Fig.3 Optimal medium for cell culture

2.3 最适温度

在3种较适宜温度20℃、25℃和30℃下，将中肾细胞同条件培养4d后，统计中肾细胞数量(图4)。20℃和25℃时，效果非常相似，而这2个温度相对于30℃，效果更明显，在1d后开始出现差别。20℃比25℃效果较好，但并不明显，尤其在2、3d中几乎相似，4d后出现差别，25℃细胞数量略高于20℃。因此，最适温度为25℃。

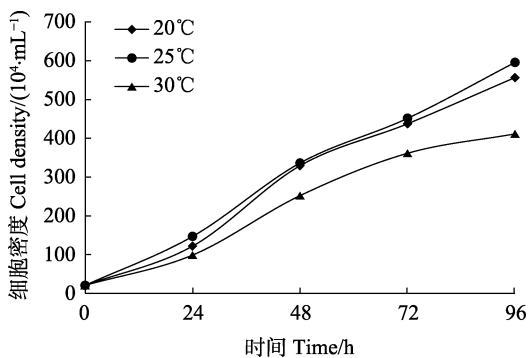


图4 细胞培养最适温度  
Fig.4 Optimum temperature for cell culture

2.4 最适血清

取定量中肾细胞在0(对照组)、5%、10%和20%的浓度血清培养基中同条件培养，除在对照组血清中

生长较缓，在其余浓度的血清中均生长较好。在10%和20%浓度的血清中细胞生长的数量较为接近，尤其在1、3和4d时。而在5%浓度血清中，生长情况明显比除对照组外的浓度组效果差。除对照组血清培养基外，其他培养基中的细胞生长速度均较快(图5)。比较4组数据，最适血清的浓度为20%。

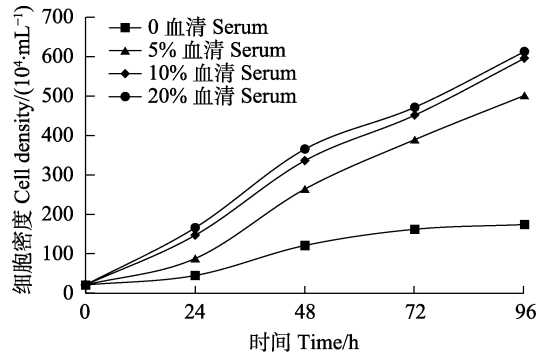


图5 细胞培养的最适血清  
Fig.5 Optimum serum for cell culture

2.5 标准生长曲线

绘制生长曲线(图6)。接种一定数量的细胞，在最适条件下生长，在1~4d时细胞生长的速度较快，到5~6d时生长速度放缓趋于平稳，之后细胞数量下降。经计算，细胞群体倍增的时间为23.26h。

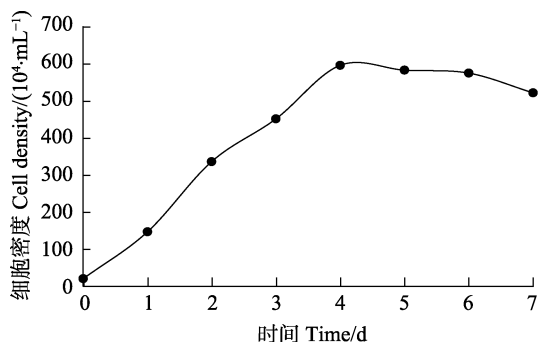


图6 细胞生长标准曲线  
Fig.6 Standard curve of cell growth



## 2.6 细胞冻存与复苏

冻存细胞复苏后, 经台盼蓝染色, 细胞计数并计算存活率, 重复 10 组取平均值。对第 6 代细胞液氮冷冻保存后, 复苏经台盼蓝染色并计数统计, 6 个月后复苏存活率达 91.91% (表 2); 细胞具有活性, 且复苏后增殖速度快 (图 7), 可正常传代 (图 8)。

表 2 冻存后复苏的存活率

Tab.2 Survival rate of recovery after freezing

冻存时间 Freezing time (d)	复苏存活率 Recovery survival rate (%)
40	95.78
90	92.06
180	91.91

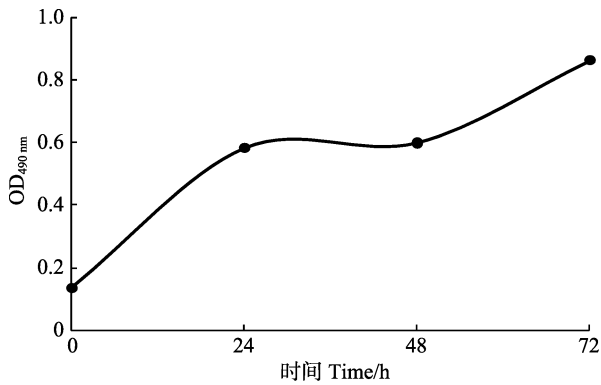


图 7 MTT 法测定复苏细胞增殖

Fig.7 MTT was used to determine the value added of resuscitated cells

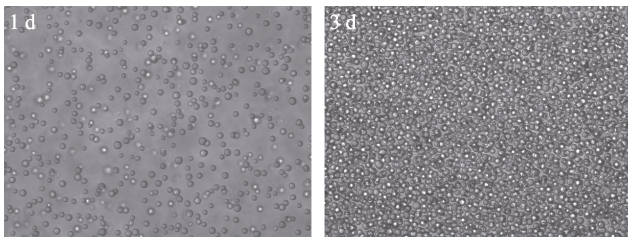


图 8 宽口裂腹鱼中肾组织细胞复苏培养

Fig.8 Recovery culture of mesonephros cells in *S. eurystomus* (50  $\mu$ m)

## 2.7 细胞污染与检测鉴定

经 PCR 法鉴定细菌、真菌、支原体污染, 样品均无与阳性对照组一致的条带, 样品中无细菌、真菌、支原体, 宽口裂腹鱼中肾组织细胞未被污染 (图 9)。

## 2.8 细胞来源鉴定

经 PCR 扩增, 获得 1077 bp 的基因片段, 在琼脂糖凝胶中电泳检测, 大小符合 (图 10)。测序序列片段, 并在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对。结果显示,

与 GenBank 中发布的来源于宽口裂腹鱼线粒体基因 (NC0369331) 的序列同源性为 99.81%。证明细胞系来自宽口裂腹鱼。

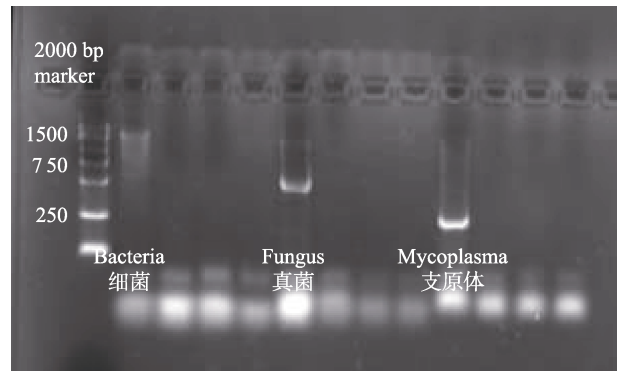


图 9 细菌、真菌、支原体 PCR 鉴定结果

Fig.9 PCR identification results of bacteria, fungi and mycoplasma

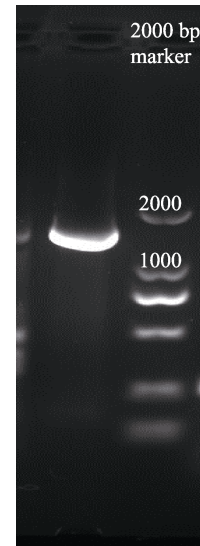


图 10 宽口裂腹鱼中肾组织细胞 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Fig.10 PCR amplified products of 16S rRNA gene of mesonephros cells in *S. eurystomus*

## 3 分析与讨论

宽口裂腹鱼是新疆的土著鱼类, 在 20 世纪 60 年代数量仍然可观, 但由于人为因素和环境变化, 现已成为濒危物种。随着宽口裂腹鱼的数量急剧下降, 保护宽口裂腹鱼已刻不容缓。建立宽口裂腹鱼的细胞系, 可以有效保护宽口裂腹鱼的种质资源, 为细胞生物学、环境毒理学和基因工程的研究奠定基础。如王京真等 (2010) 对长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*) 的静脉细胞进行培养, 尝试转染 SV40 大 T 抗原, 得到永久细胞系。

关于鱼类细胞培养生长特性的研究主要集中在培养基、温度、血清、冻存复苏等方面。本研究采用 DME/F-12、L-15、RPMI-1640、M-199 和 MEM 培养基,应用于宽口裂腹鱼中肾组织细胞的体外培养, DME/F-12 培养基的效果最好,而在前人研究的鱼类细胞培养中大部分采用的是 L-15 (Wang *et al.*, 2003; Leibovitz *et al.*, 1977; Fryer *et al.*, 1994), 其有效的缓冲系统可防止 pH 的过大波动,可保证细胞的长时间培养,符合鱼类细胞的生长特征,如云纹石斑鱼 (*Epinephelus moara*) 肾组织细胞系 (EMK) (Liu *et al.*, 2018) 最佳培养基为 L-15, 但不适宜本研究中的宽口裂腹鱼的细胞培养。本研究使用 DME/F-12 培养基时,宽口裂腹鱼中肾组织细胞生长更好,可能由于不同种鱼类生长环境不同,且所需营养不同。除了 L-15 培养基,其他培养液也逐渐应用于鱼类细胞培养,如 RPMI-1640 和 M199 等。大多数细胞的生长与温度密切相关,鱼类是变温动物,其细胞培养的温度范围比哺乳动物广。宽口裂腹鱼在 20℃~30℃ 条件下均能生长,最佳温度为 25℃,此时的细胞生长良好、稳定,过高或过低的温度均对细胞的生长有影响。樊廷俊等 (2007) 研究表明,大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 鳍细胞体外培养在 16℃~20℃ 均能生长,最适温度为 20℃~24℃; 张念伟等 (2017) 对大菱鲂脑细胞体外培养,18℃~30℃ 均能生长,最适温度为 24℃; Wang 等 (2014) 对大黄鱼肾组织细胞均能生长,在 28℃ 时生长最好。鱼类细胞的生长温度范围比较广,宽口裂腹鱼中肾组织细胞体外培养在 20℃~30℃ 均能生长,这与本研究一致。不同种和同一种不同部位的细胞来源,生长温度也不尽相同,因此,鱼类细胞培养确定培养温度至关重要。在同一条件下,用不同浓度的胎牛血清培养细胞时,胎牛血清组比无血清组的细胞生长好。在 5%、10% 和 20% 血清中生长时,10% 和 20% 浓度的血清比 5% 血清组生长差别明显,说明牛血清浓度对细胞的生长有明显影响 (李自良等, 2020)。当血清浓度为 10% 和 20% 时,细胞的生长不是特别明显,但相对 10% 浓度的血清,20% 浓度的血清效果最好,与相关文献的结果相似 (Li *et al.*, 2017; 谭凤霞, 2008)。

本研究中,宽口裂腹鱼中肾细胞呈现悬浮生长,悬浮培养的细胞一般为淋巴细胞等血液系统来源的细胞,这种细胞体积小,缺乏粘附分子的表达, Ribas 等 (2014) 研究抗炎药物对淡水鱼虎利齿脂鲤 (*Hoplias malabaricus*) 的原代肾细胞培养的影响时应用的肾细胞呈悬浮状态。宽口裂腹鱼中肾细胞呈悬浮生长可能与其体积和粘附分子的表达有关系,具体原因有待于进一步研究。

本研究对第 10 代中肾组织细胞进行生长曲线测定,细胞的生长曲线为“S”型。在第 4 天时,细胞生长达到峰值,由于空间和营养不足等原因,细胞生长开始减弱。将细胞放入液氮中冷冻后,6 个月后复苏,复苏存活率达到 91.91%,细胞生长正常,可以传代,生长很旺盛。

细胞是实验的重要模型,污染却是实验中最大的阻碍,对实验结果造成严重影响。比较常见的污染有细菌、真菌、支原体等。在细胞污染鉴定过程中,通过 PCR 技术对细胞进行检测,操作简单。结果证明,培养过程中未受到污染。

采用进化缓慢的保守序列 16S rRNA,进一步对细胞来源鉴定,经分析,与宽口裂腹鱼序列一致性为 99.81%,表明其来源于宽口裂腹鱼。

#### 4 结论

本研究以宽口裂腹鱼中肾组织为材料进行体外培养,建立了宽口裂腹鱼中肾组织细胞系。宽口裂腹鱼作为新疆特色经济鱼类,细胞系的建立对宽口裂腹鱼的生物学、细胞工程、基因工程和种质资源保护等都有重要意义,可为新疆特色渔业建设提供支持。

#### 参 考 文 献

- DENG Y L. Establishment and application of a cell line derived from fin of *Squaliobarbus curriculus*. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2016 [邓亚林. 赤眼鳟鳍条细胞系的建立及应用研究. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- FAN T J, GENG X F, CONG R S, *et al.* Establishment of a novel fin cell line from turbot, *Scophthalmus maximus*. Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences), 2007, 37(5): 759-766 [樊廷俊, 耿晓芬, 丛日山, 等. 大菱鲂鳍细胞系的建立. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(5): 759-766]
- FRYER J L, LANNAN C N. Three decade of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fish. Journal of Tissue Culture Methods, 1994, 16(1): 87-94
- LEIBOVITZ A. Preparation of medium L-15. Methods in Cell Science, 1977, 3(2): 557-559
- LI P, ZHOU L, WEI S, *et al.* Establishment and characterization of a cell line from the head kidney of golden pompano *Trachinotus ovatus* and its application in toxicology and virus susceptibility. Journal of Fish Biology, 2017, 90(5): 1944-1959
- LI Z L, WANG J M, ZHAO C H, *et al.* Study on the effect of different types of bovine serum on MDCK cell. Journal of Biology, 2020, 37(4): 21-25 [李自良, 王家敏, 赵彩红, 等. 不同类型牛血清对 MDCK 细胞培养效果研究. 生物学杂

- 志, 2020, 37(4): 21–25]
- LIU X F, WU Y H, WEI S N, *et al.* Establishment and characterization of a brain cell line from kelp grouper *Epinephelus moara*. *Journal of Fish Biology*, 2018, 92(2): 298–307
- LONG J Q, HU R Y, DENG J Q, *et al.* Research on capture and domestication techniques of wild *Schizothorax eurystomus*. *Scientific Fish Farming*, 2019(4): 35–36 [龙见全, 胡仁云, 邓俊强, 等. 野生宽口裂腹鱼的捕捉及驯化养殖技术的研究. *科学养鱼*, 2019(4): 35–36]
- RIBAS J L C, DA SILVA C A, DE ANDRADE L, *et al.* Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 296–303
- SHAN L J. Establishment and characterization of kidney cell lines from rough skin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2015 [单莉娟. 松江鲈肾细胞系的建立及生物学特性分析. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- TAN F X. Establishment of three fish cell lines and research on the sensitivity of twelve fish cell lines to heavy metal toxicity. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2008 [谭凤霞. 三株鱼类细胞系的建立和十二株鱼类细胞系对重金属毒性的敏感性研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2008]
- 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*, 2003, 25(3): 211–220
- WANG J Z, JI W, XIAO W H, *et al.* A preliminary study of cell culture *in vitro* derived from Yangtze finless porpoise umbilical vein. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 436–441 [王京真, 姬伟, 肖武汉, 等. 长江江豚脐静脉细胞体外培养的初步研究. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 436–441]
- WANG M K, ZHU H, WANG Y J, *et al.* Establishment and characterization of two cell lines derived from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* muscle and brain. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2018, 48(6): 67–74 [王梦珂, 朱鹤, 王玉珏, 等. 斑石鲷肌肉、脑细胞系的建立与生物学特性. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(6): 67–74]
- WANG X H, WANG K R, NIE P, *et al.* Establishment and characterization of a head kidney cell line from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84(5): 1551–1561
- WEI J, CAO X Q, REN Y L, *et al.* Anatomy and histological observation of digestive system in *Schizothorax eurystomus*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(1): 120–126 [魏杰, 曹希全, 任永丽, 等. 宽口裂腹鱼消化系统解剖和组织学观察. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 120–126]
- WOLF K, QUIMBY M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 1962, 135(3508): 1065–1066
- XU J. Establishment of channel catfish kidney cell line and pathology study of channel catfish hemorrhagic disease. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2012 [徐进. 斑点叉尾鲷肾脏细胞系建立与出血病病原学研究, 华中农业大学博士研究生学位论文, 2012]
- XU X H, FAN T J, JIANG G J, *et al.* Establishment and characterization of a new marine fish cell line from ovary of barfin flounder (*Verasper moseri*). *Journal of Ocean University of China*, 2015, 14(6): 1105–1110
- ZHANG N C, YANG G Z. The establishment of strain ZC-7901 and substrain ZC-7901S<sub>1</sub>, from the snout tissue cells of Grass carp. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(2): 111–118 [张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S<sub>1</sub> 的建立和特性观察. *水产学报*, 1981, 5(2): 111–118]
- ZHANG N W, LIU X F, WANG N, *et al.* Establishment of a brain cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(5): 820–826 [张念伟, 刘肖峰, 王娜, 等. 大菱鲆脑细胞系的建立. *农业生物技术学报*, 2017, 25(5): 820–826]
- ZHANG Y Y, LIANG X M, ZENG W G, *et al.* Establishment and characterization of a new euryhaline fish kidney cell line of spotted *Scatophagus argus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 213–218 [张莹莹, 梁雪梅, 曾文刚, 等. 金钱鱼肾细胞系的建立及生长特性研究. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 213–218]
- 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): 165–173 [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): 165–173]
- ZHENG Z Y, YANG J X, CHEN X X, *et al.* Development and characterization of a new cell line derived from the kidney of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32(10): 1051–1056 [郑在予, 杨金先, 陈秀霞, 等. 大黄鱼肾脏组织细胞系(YCK)的建立. *福建农业学报*, 2017, 32(10): 1051–1056]
- ZUO W G, QIAN H X, XU Y F, *et al.* Establishment of kidney cell lines CIK from Grass carp. *Freshwater Fisheries*, 1984(2): 38–39 [左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立. *淡水渔业*, 1984(2): 38–39]

## Preliminary Study on the Establishment of Kidney Tissue Cell Lines in *Schizothorax eurystomus*

DAI Jincal, NIE Zhulan<sup>①</sup>, LIU Jieya, HONG Jibiao

(College of Animal Science, Tarim University; Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production and Construction, Alar, Xinjiang 843300, China)

**Abstract** Fish cell culture is an important model for germplasm preservation, gene function analysis, and cell engineering breeding. Therefore, it is of great significance to establish cell lines for the endangered *Schizothorax eurystomus*. The aim of this study was to establish a kidney tissue cell line for *S. eurystomus*, for which mesonephric tissue was used. The primary cell culture was initiated by tissue block transplantation and the subculture was carried out after the cells were stabilized. A kidney cell line (EUM10) was established. To analyze the cryopreservation and resuscitation ability of renal cell lines and the optimal growth conditions for *S. eurystomus*, PCR was used to detect contamination and mitochondrial gene fragment analysis was used to identify the source of the cell. The results showed that the optimal medium for *S. eurystomus* kidney tissue cells was DME/F-12, the optimal temperature was 25°C, and the optimal serum concentration was 20%. The cells grew in suspension and the growth curve was S-shaped. The growth curve shows that the population doubling time of the kidney tissue cell line cells in the 10th generation was 23.26 h. After 6 months of cryopreservation with liquid nitrogen, the recovery/survival rate was 91.91% (6th generation). *S. eurystomus* shares 99.81% of the gene sequence identity with a split-bellied fish from Tarim, which proves that the cell line originates from a wide-mouthed split-bellied fish. In this study, a kidney cell line for *S. eurystomus* was successfully established. Kidney cell lines can be used as in vitro systems to study various aspects of fish, such as cytogenetics and gene function analysis. This study provides the basic data for the initial research into and breeding of *S. eurystomus*.

**Key words** *Schizothorax eurystomus*; Kidney tissue; Cell line; Cell culture

① Corresponding author: NIE Zhulan, E-mail: niezhl2004@163.com