

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210412003

http://www.yykxjz.cn/

代金彩, 聂竹兰, 赵年桦, 任永丽, 魏杰. 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及盐碱度对其增殖的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 70-80

DAI J C, NIE Z L, ZHAO N H, REN Y L, WEI J. Establishment and the effect of salinity of cell lines derived from tail fin of *Schizothorax biddulphi*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 70-80

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及 盐碱度对其增殖的影响*

代金彩 聂竹兰^① 赵年桦 任永丽 魏杰

(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 为了建立塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)尾鳍细胞系,本研究采用组织块法,分别用含胎牛血清(FBS)的DME/F12培养基体外培养塔里木裂腹鱼尾鳍组织,初步建立了塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系(BICF1)。采用MTT法测定分析盐度(NaCl)和碱度(NaHCO₃)对其增殖的影响。结果显示,BICF1悬浮培养传至45代,最适培养液为DME/F12,最适FBS浓度为20%,最适温度为25℃。第10代BICF1的群体倍增时间为28.11 h,呈“S”型生长。第6代BICF1液氮冻存180 d后复苏,经台盼蓝染色计数,BICF1有(87.85±0.66)%的细胞具有活性,复苏后可增殖并传代。BICF1无细菌、真菌、支原体污染。第10代BICF1线粒体16S rRNA测序结果与GenBank基因序列进行一致性对比,结果显示,BICF1与JQ844133.1的一致率为100%,表明BICF1来自于塔里木裂腹鱼。BICF1增殖数量在盐度为1、2、4、6时呈上升趋势,在盐度为6、8、10时呈下降趋势;盐度为6时,BICF1增殖数量最高。BICF1增殖数量在碱度为2、3、4、5、6 g/L时呈上升趋势,在碱度为6、7、8、10 g/L时呈下降趋势;碱度为6 g/L时,BICF1增殖数量最高。细胞增殖数量随盐碱度增加呈现先升高后下降的趋势。本研究旨在为合理开发和利用塔里木裂腹鱼遗传资源以及建立和保护其种质资源提供一定的科学依据。

关键词 塔里木裂腹鱼;尾鳍组织;细胞培养

中图分类号 Q952 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0070-11

国家二级保护动物塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)、裂腹鱼属(*Schizothorax*),俗称“尖嘴鱼”,是我国的特有物

* 国家自然科学基金(31560721; 31860729)、自治区研究生科研创新项目(TDGRI201918)、国家大学生创新创业训练计划项目(202010757007)、中国海洋大学塔里木大学科研合作联合基金项目(ZHYLH201902)和华中农业大学塔里木大学科研合作联合基金项目(TDHNH201702; 2662017PY118)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31560721; 31860729), Research and Innovation Program for Graduate Students of Autonomous Region (TDGRI201918), Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (202010757007), Joint Research Fund between Ocean University of China and Tarim University (ZHYLH201902), and Huazhong Agricultural University and Tarim University Research Cooperation Joint Fund Project (TDHNH201702; 2662017PY118)].

代金彩, E-mail: 1477496028@qq.com

^① 通信作者: 聂竹兰, 教授, E-mail: niezhlan2004@163.com

收稿日期: 2021-04-12, 收修改稿日期: 2021-05-22

种(王德忠, 1998)。有关塔里木裂腹鱼的报道主要集中在其地理分布(张人铭等, 2007)、形态特征(杨天燕等, 2018)、繁殖特性(魏杰等, 2011)、线粒体基因组 DNA 结构分析(杨天燕等, 2011)、遗传标记开发(Luo *et al.*, 2012)及遗传多样性(海萨等, 2016)等方面。

鱼类组织细胞培养起步于 20 世纪 60 年代。最早的研究开始于海水鱼类组织细胞培养, 并建立蓝仿石鲈(*Haemulon sciurus*)尾鳍细胞系(CF-1)(Clew *et al.*, 1961); 但公认的第 1 个鱼类永久性细胞系是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系(RTG-2)(Wolf *et al.*, 1962)。之后建立了胖头鲮(*Pimephales promelas*)肌肉细胞系(FHM)(Gravell *et al.*, 1965)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)胚胎细胞系(SWT)(Kelly *et al.*, 1973)和大西洋鲑(*Salmo salar*)内脏细胞系(AS)(Nicholson *et al.*, 1973)。我国鱼类细胞培养技术发展于 20 世纪 70 年代, 早期研究主要是淡水养殖鱼类, 张念慈等(1981)建立了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)吻端细胞株(ZC-7901)及其上皮样细胞亚株(ZC-7901S1)。左文功等(1986)建立了草鱼肾脏组织细胞系(CIK)。随后, 魏彦章等(1987)建立了草鱼尾鳍细胞系(GCCF-2)。随着海水养殖鱼类的发展, 在 1997 年我国建立了 4 个永久的细胞系, 分别为牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)鳃组织细胞系(FG)、鲈(*Perca fluviatilis*)脾组织细胞系(SPS)和心组织细胞系(SPH)、真鲷(*Pagrus major*)鳍组织细胞系(RSBF)(童裳亮等, 1997)。随着各国鱼类细胞系建立的迅速发展, 进行细胞培养的鱼种类不断增多, 由淡水鱼类扩展到海水鱼类, 而且来源的组织更为广泛, 从鳍条、肌肉、性腺、内脏等组织扩展到肿瘤、垂体、神经组织等。其中, 因鳍条组织本身具有很强的再生能力, 细胞迁出成功率高, 同时, 取鳍条组织时不用杀死鱼, 因此, 有很多鱼类的细胞来源于鳍条组织, 如金头鲷(*Sparus aurata*)鳍条细胞(SAF-1)(Bejar *et al.*, 1997)、绿腹丽鱼(*Etilopterus suratensis*)尾鳍细胞(PSF)(Swaminathan *et al.*, 2010)、胡鲇(*Clarias batrachus*)鳍条细胞(ICF)(Babu *et al.*, 2011)和金鱼(*Carassius auratus*)尾鳍细胞(GFTF)(Yan *et al.*, 2011)。

盐碱度水平是影响硬骨鱼类生存、繁殖、发育、生长和生理功能的最重要环境因素之一, 会由于自然因素或人为因素而发生变化, 从而对养殖鱼类造成渗透调节胁迫, 影响其正常生长(Resley *et al.*, 2006)。水体中盐碱度水平对鱼类的存活有显著影响, 盐碱度过高或过低都会使鱼类的存活率显著的降低(Yao *et al.*, 2010)。鱼类细胞系是进行病毒学、环境毒理学、分子遗传学、基因功能分析、细胞遗传学

与种质保存等研究的材料和模型(周广舟等, 2011)。草鱼鳍细胞系可用于研究草鱼源维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)对宿主细胞的毒性及致死机制(刘明珠等, 2019); 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)尾鳍细胞(GiCF)可用于辛硫磷对 GiCF 毒性研究(赵燕楠等, 2020); 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)鳍细胞系用于研究铜、锌对泥鳅鳍细胞 DNA 损伤及金属硫蛋白表达的影响(姜姗等, 2020)。

本研究建立了塔里木裂腹鱼尾鳍组织细胞系, 测定了盐度(NaCl)和碱度(NaHCO₃)对其增殖的影响。本研究旨在为合理开发和利用塔里木裂腹鱼遗传资源以及建立和保护其种质资源提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用塔里木裂腹鱼于 2019 年 9 月取自新疆克孜勒河, 饲养在新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室。取其中 1 条健康雌塔里木裂腹鱼, 体重为 21.37 g, 全长为 15.46 cm。

DME/F12、L-15、MEM、RPMI-1640、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)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; 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 原代培养与传代培养 取健康塔里木裂腹鱼, 加入 0.1 μL/g 的 MS-222 麻醉剂麻醉后, 剪取上尾鳍。用 75% 的酒精对尾鳍进行消毒, 置于超净台中。取 4 个培养皿, 其中, 1 个加入 75% 的酒精, 3 个加入添加含 500 IU/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素、12.5 μg/mL 两性霉素 B 的 PBS。尾鳍放入酒精中 30 s, 然后依次在另外 3 个培养皿中浸泡, 之后将其放入 2 mL 无菌离心管中, 并用无菌眼科剪将其剪成大约 1~2 mm³ 的组织碎块, 向其中加入 500 μL 的 DME/F12 培养液, 将组织碎块移到 25 mm² 培养瓶中, 正相放入 25℃、5% 的 CO₂ 培养箱中, 观察细胞贴壁情况。4 h 后反相放置, 培养 2 h 后, 向其中加入 1 mL DME/F12 培养液(含 20% FBS、500 IU/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素、12.5 μg/mL 两性霉素 B), 正相放入 25℃、5% 的 CO₂ 培养箱中继续培养, 12 h 后加入 9 mL 培养液, 继续正相放置培养。每天用倒置荧光显微镜(AMG

EVOS F1)观察组织块迁移情况。

原代培养过程中, 更换培养液的时间为2~4 d。当组织碎块周围迁出细胞, 细胞浓度达 10^6 cells/mL 时, 按 1:2 的比例进行传代。直到第5代后, 青霉素、链霉素的浓度降低到 200 IU/mL 和 200 μ g/mL, FBS 浓度也降低到 15%。到第8代后, 使用含 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F12 培养液。

1.2.2 细胞生长曲线 将一定浓度的细胞接种到 24 孔细胞培养板, 分成 8 组, 每组 6 孔, 连续 7 d 常规培养, 用血球计数板进行计数, 每天记 1 组, 分析数据并绘制细胞生长曲线。细胞生长曲线的纵坐标为每天计数的细胞平均个数, 时间为横坐标。根据下面公式计算细胞的群体倍增时间:

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

式中, N_t 为时间 t 后的细胞数, N_0 接种细胞数(Nicholas, 1991)。

1.2.3 最佳培养基 检测 DME/F12、M199、L-15、MEM、RPMI-1640 共 5 种不同培养基维持细胞生长的能力。每种培养基中均补充 10% FBS 和 1% P/S。分别将一定浓度的细胞接种在不同的培养基中, 在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 条件下培养 96 h, 在 5 个时间点, 即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞的生长曲线。

1.2.4 最适培养温度 检测 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 不同温度对细胞生长的影响。所用培养液为含 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F12 培养液。在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 条件下培养 96 h, 在 5 个时间点即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞的生长曲线。

1.2.5 最适血清浓度 确定最适合的培养液及温度后, 其他条件一致, 设置不同 FBS 浓度(0、5%、10%和 20%), 在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 条件下培养, 在 5 个时间点, 即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线。

1.2.6 细胞冻存与复苏 配制 10% DMSO、20% FBS、70% DME/F-12 的细胞冻存液, 细胞浓度为 2×10^6 cells/mL, 倒入冷冻管, 液氮冻存。按细胞: 培养液=1:5 比例加入培养液使细胞悬浮, 复苏培养。

1.2.7 细胞污染鉴定 选用观察法与 PCR 法检测细胞是否被细菌、真菌、支原体污染。所用引物见表 1。

1.2.8 细胞来源鉴定 利用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)提取塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的基因组 DNA。通过 PCR 扩增提取 DNA。根据塔里木裂腹鱼 16S rRNA 设计引物, 扩增引物为 16SF 和 16SR (表 1)。配制 50 μ L 反应体系: 25 μ L $2 \times$ Taq PCR MasterMix, 引物各 2.5 μ L, 5 μ L 模板 DNA, 15 μ L 的灭菌超纯水。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56.8 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增反应结束后, 取 1 μ L PCR 产物在核酸蛋白检测仪上检测 DNA 的浓度; 取 8 μ L PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳检测。PCR 产物测序, 比较获得序列与已发表序列的一致率。

1.2.9 盐碱度对塔里木裂腹鱼细胞系增殖数量的影响 NaCl 盐度设置 1、2、4、6、8、10 共 6 个梯度。称取 NaCl 加入 DME/F12 培养液溶解, 溶解后再用 0.22 μ m 过滤筛过滤。

NaHCO₃ 碱度设置 2、3、4、5、6、7、8、10 g/L 共 8 个梯度。称取 NaHCO₃ 加入 DME/F12 培养液溶解, 溶解后再用 0.22 μ m 过滤筛过滤。

细胞铺板: 将第 10 代对数生长期 BICF1 用含 10% 胎牛血清 DME/F12 培养液调整密度为 1×10^4 cells/mL 的细胞悬液, 铺置于 96 孔细胞培养板上, 每种材料铺 6 孔。每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 25 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 12 h 后, 按分组分别加入不同浓度盐和碱, 各孔 20 μ L, 继续培养 24、48、72 h。之后将每个液体孔加入 20 μ L MTT 后继续培养 4 h, 小心吸出各孔内液体, 然后, 每孔加入 150 μ L DMSO。摇床

表 1 通用引物序列

Tab.1 Universal primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	参考文献 Reference
细菌 Bacteria	F: ATCAATAAGCGGAGGAAAAG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	万颖杰等(2005)
真菌 Fungus	F: ATCAATAAGCGGAGGAAAAG R: CTCTGGCTTCACCCTATTC	金敏等(2009)
支原体 Mycoplasma	F: TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC R: GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	龚巧玲等(2007)
塔里木裂腹鱼 16S rRNA <i>S.biddulphi</i> 16S rRNA	AAATCGGACCCACCATTTGGC GGCCGTTGAACCTTGTGGTCA	-

培养 20 min, 酶联免疫检测仪 490 nm 波长下测定各孔的 OD 值。通过计算, 得出细胞相对增殖率:

$$\text{相对增殖率} = \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{空白对照组}} \times 100\%$$

使用 SPSS 20 软件包对数据进行统计学分析, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。多组间比较用方差分析, 两组间比较采用 T 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞原代培养与传代培养

观察塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长状态。3 d 后, 细

胞贴壁且组织块周围逐渐有细胞迁出; 7 d 后, 细胞正常迁出; 13 d 后, 细胞铺满细胞瓶 70%; 18 d 后, 细胞出现悬浮现象(图 1); 19 d 后, 进行原瓶传代。细胞浓度到 10^6 cells/mL 时, 进行 1:2 传代, 此后每隔 2~4 d 传代 1 次。细胞悬浮生长, 成功传至 45 代。

2.2 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长曲线

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系第 10 代细胞的生长曲线呈“S”型, 0~1 d 为潜伏期, 1~4 d 为指数生长期, 4~5 d 为平台期, 5 d 之后为衰退期(图 2)。第 10 代塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的群体倍增时间为 28.11 h, 细胞分裂旺盛。

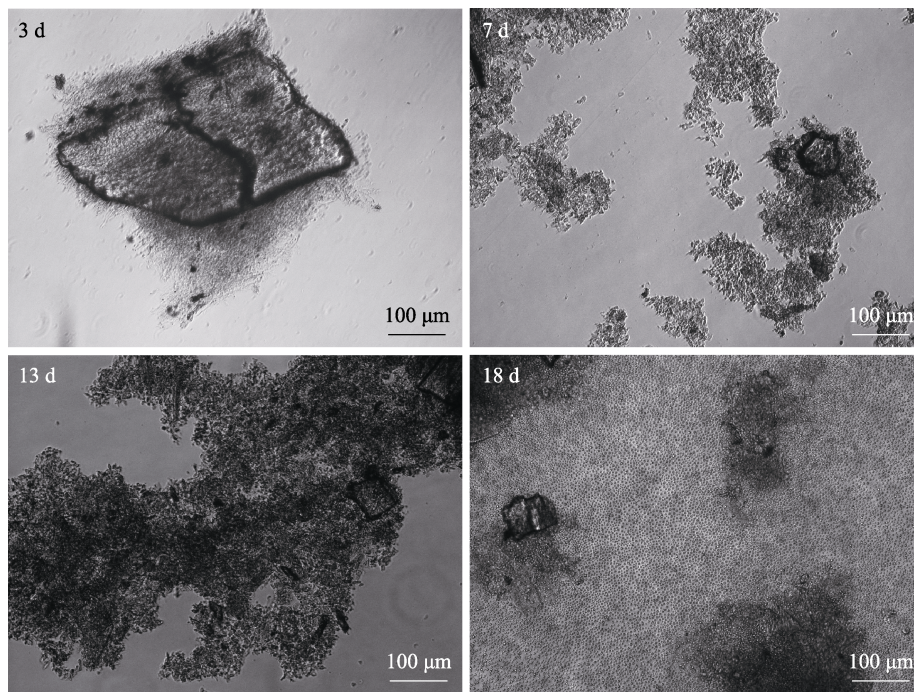


图 1 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞原代培养的不同阶段
Fig.1 Different stages of primary culture of tail fin cells of *S. bidulphi*

2.3 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最佳培养基

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在 DME/F12、M199、L-15、MEM、RPMI-1640 不同培养基中维持细胞生长的能力如图 3 所示, 在这些培养基中均能生长, 但在 DME/F12 培养基中细胞生长最好。因此, DME/F12 为最佳培养基($P < 0.05$)。

2.4 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适培养温度

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在 30°C 生长最慢, 25°C 生长最快, 20°C 生长较快, 在 20°C ~ 25°C 范围内, 皆能良性生长(图 4), 生长的最适温度为 25°C ($P < 0.05$)。

2.5 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适血清浓度

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在未加血清的培养基中生长明显低于添加血清的细胞生长, 随着血清浓度 5%、10%、20% 依次增大, 细胞生长依次加快, 当 FBS 浓度为 20% 时, 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长明显最快($P < 0.05$)(图 5)。

2.6 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞冻存与复苏

对塔里木裂腹鱼第 6 代尾鳍细胞系进行液氮冷冻, 保存 40、90 及 180 d 后复苏, 经台盼蓝染色并计数统计, 40 d 存活率为 $(91.49 \pm 0.69)\%$, 90 d 存活率

为(88.41±0.80)%, 180 d存活率为(87.85±0.66)%, 90和180 d存活率差异不显著($P>0.05$)(表2)。细胞具有活性,且复苏后增殖速度快(图6),可正常传代(图7)。

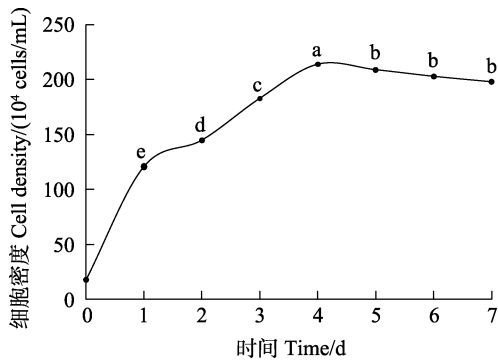


图2 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长曲线

Fig.2 The growth curve of tail fin cells of *S. biddulphi*

标有不同字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。下同。
Means with different letters are significantly different ($P<0.05$). The same as below.

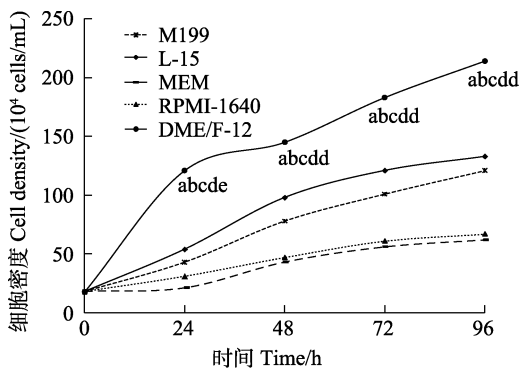


图3 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最佳培养基

Fig.3 Optimum medium of tail fin cells of *S. biddulphi*

小写字母表示同一时间下 BICF1 多重比较。下同。
Indicated with lowercase letters for BICF1 multiple comparisons at the same time. The same as below.

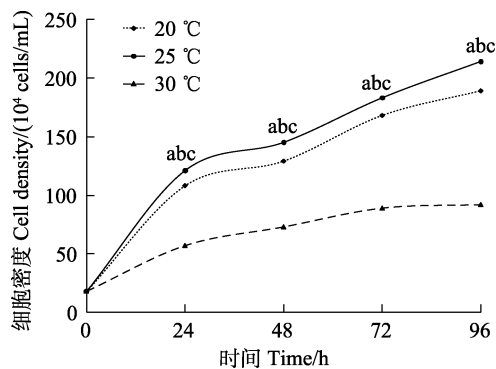


图4 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适培养温度

Fig.4 Optimum culture temperature of tail fin tissue cell of *S. biddulphi*

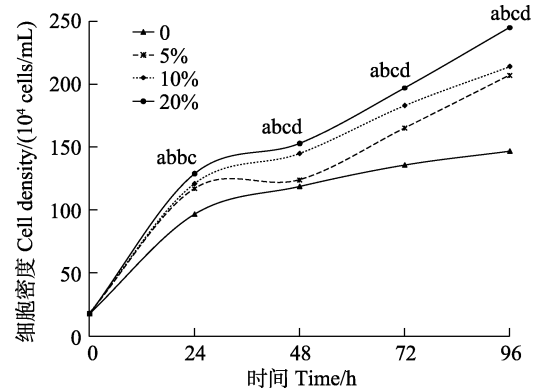


图5 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适血清浓度
Fig.5 Optimum serum concentration of tail fin tissue cells of *S. biddulphi*

表2 冻存后复苏存活率

Tab.2 Survival rate of recovery after freezing

冻存时间 Freezing time /d	复苏存活率 Recovery survival rate /%
40	91.49±0.69 ^a
90	88.41±0.80 ^a
180	87.85±0.66 ^a

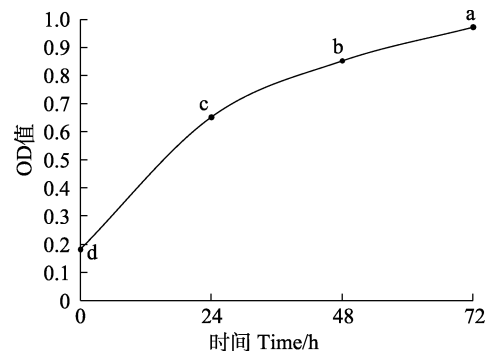


图6 MTT法测定复苏细胞增殖
Fig.6 Determination of the resuscitated cells by MTT method

2.7 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞污染与检测鉴定

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞中提取细菌、真菌和支原体,经过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,塔里木裂腹鱼尾鳍细胞未被污染。

2.8 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞来源鉴定

用基因组DNA试剂盒提取塔里木裂腹鱼尾鳍细胞DNA,经PCR扩增,在琼脂糖凝胶中电泳检测,PCR产物目的条带大小符合16S rRNA的大小。经测序后的序列片段与数据库中的GenBank进行Blast比对。塔里木裂腹鱼尾鳍细胞同源性与GenBank中发

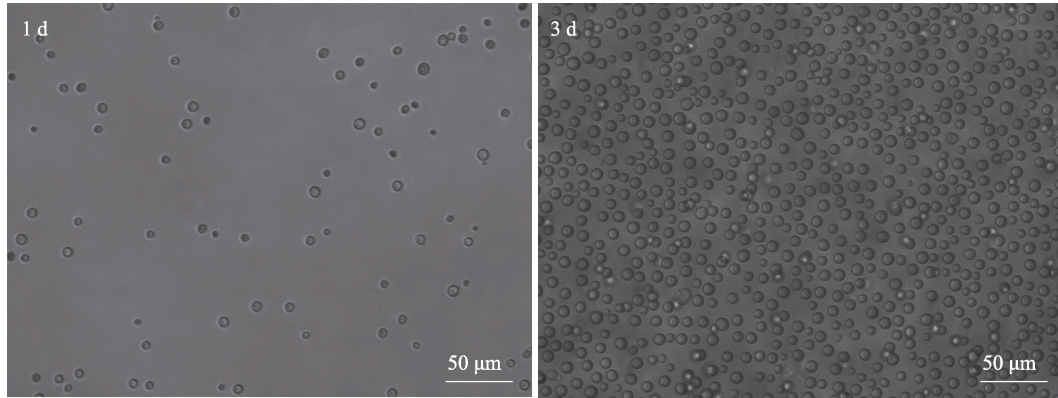


图 7 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞复苏培养

Fig.7 The resuscitation culture of tail fin of *S. biddulphi*

布的来源于塔里木裂腹鱼线粒体基因(JQ844133.1)的序列达到 100%;证明尾鳍细胞来自于塔里木裂腹鱼。

2.9 MTT 法检测各组盐碱度的细胞增殖数量

2.9.1 盐度对塔里木裂腹鱼尾鳍细胞增殖数量的影响 在盐度一定的情况下, BICF1 的增殖数量随时间延长而下降, 盐度对 BICF1 的相对增殖数量的抑制可随时间延长而增强。BICF1 增殖数量在盐度为 1、2、4、6 时呈上升趋势, 在盐度为 6、8、10 呈下降趋势, 盐度为 6 时, BICF1 增殖数量最高。BICF1 增殖数量随盐度增加呈先升高后下降的趋势(表 3 和图 8)。

2.9.2 碱度对塔里木裂腹鱼尾鳍细胞增殖数量的影响 在碱度一定时, BICF1 的增殖数量随时间(24、48、72 h)延长而下降, 碱度对 BICF1 的相对增殖数量的抑制随时间延长而增强。在同一时间点上, BICF1 增殖数量在碱度 2、3、4、5、6 g/L 时呈上升趋势, 在碱度为 6、7、8、10 g/L 时呈下降趋势, 碱度为 6 g/L 时, BICF1 增殖数量最高。BICF1 增殖数量随 NaHCO₃ 碱度增加呈先升高后下降的趋势(表 4 和图 8)。

3 讨论

本研究以塔里木裂腹鱼尾鳍组织为材料, 采用组织块移植法成功进行了塔里木裂腹鱼尾鳍组织细胞原代培养, 命名为 BICF1。BICF1 在 10% FBS 的 DME/F12 培养液中生长良好。细胞培养常用的培养液有 L-15、MEM 和 M199, 但不同的鱼类对环境要求不尽相同, 因此, 不同鱼类的最适培养基亦不同。青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)尾鳍细胞系(BC-Fin)的最佳培养液为 L-15(张雪萍等, 2016); 麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)鳍细胞系的最佳培养液为 MEM(杨坤等, 2013); 匙吻鲟(*Polyodon spathula*)鳍细胞系(PF-Fin)的最佳培养液为 M199(肖艺等, 2010);

表 3 盐度对 BICF1 增殖的影响(Mean±SD)

Tab.3 Effects of salinity on BICF1 cell proliferation

盐度 Salinity	BICF1 /%		
	24 h	48 h	72 h
1	81.73±2.98 ^{A,a}	80.77±5.16 ^{A,a}	79.78±3.03 ^{A,a}
2	81.80±2.12 ^{A,a}	81.25±5.14 ^{A,a}	80.46±3.25 ^{A,a}
4	83.10±3.12 ^{A,a}	82.38±7.53 ^{A,a}	80.77±3.55 ^{A,a}
6	84.93±1.86 ^{A,a}	83.39±3.12 ^{A,a}	81.62±2.16 ^{A,a}
8	82.43±3.23 ^{A,a}	79.71±6.83 ^{A,a}	79.17±3.61 ^{A,a}
10	80.96±7.86 ^{A,a}	66.67±4.56 ^{B,b}	64.39±2.68 ^{B,b}
F	0.624	7.561	32.359
P	0.683	0.000	0.000

注: 标有不同字母表示组间有显著差异($P < 0.05$), 其中, 大写字母为不同盐度同一时间下 BICF1 多重比较, 小写字母为同一盐度不同时间下 BICF1 多重比较。下同。

Note: The means with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The capital letters are BICF1 multiple comparisons at the same time with different salinity, and the small letters are BICF1 multiple comparisons at the same time with the same salinity. The same as below.

表 4 NaHCO₃ 碱度对 BICF1 增殖的影响

Tab.4 Effect of NaHCO₃ alkalinity on BICF1 cell proliferation (Mean±SD)

NaHCO ₃ / (g/L)	BICF1 /%		
	24 h	48 h	72 h
2	98.81±1.38 ^{A,a}	97.52±7.86 ^{A,a}	95.01±6.20 ^{A,a}
3	99.99±4.74 ^{A,a}	98.42±7.66 ^{A,a}	97.30±10.94 ^{A,a}
4	102.39±1.41 ^{A,a}	100.81±7.29 ^{A,a}	97.51±9.25 ^{A,a}
5	110.92±1.04 ^{B,a}	108.38±1.68 ^{A,a}	98.18±13.48 ^{A,a}
6	123.47±8.76 ^{C,a}	117.33±1.47 ^{B,b}	107.41±9.23 ^{B,c}
7	115.47±2.52 ^{D,a}	112.78±9.29 ^{B,a}	107.31±6.58 ^{C,b}
8	114.50±4.94 ^{E,a}	110.87±1.02 ^{B,a}	106.92±3.18 ^{D,a}
10	108.28±1.06 ^{F,a}	100.43±4.86 ^{B,a}	94.17±9.32 ^{E,b}
F	5.564	3.516	2.828
P	0.000	0.004	0.015

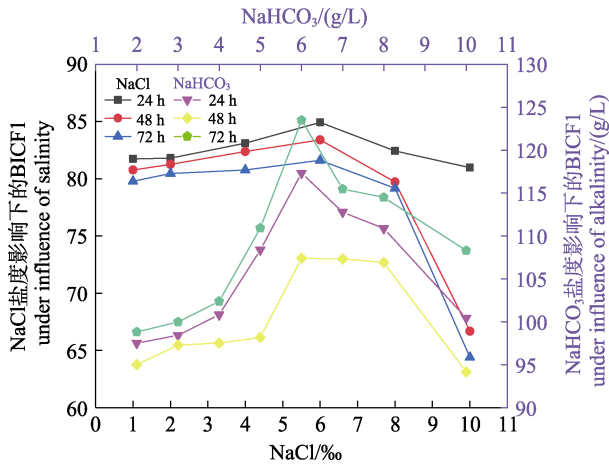


图8 不同浓度 NaCl/NaHCO₃对 BICF1 细胞增殖数量的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of NaCl/NaHCO₃ on the number of proliferation of BICF1 cells

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)鳍细胞系的最佳培养液为 DMEM/F12(王缙云等, 2018), 本研究中筛选了 DME/F12、L-15、MEM、RPMI-1640 和 M199 培养基, 得出 DME/F12 为最佳培养液。鱼类组织细胞生长温度范围和哺乳类组织细胞比较, 范围比较广。BICF1 在 20℃~25℃均能正常生长。研究表明, 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与鲈(*Perca fluviatilis*)鳍细胞系为广温性(童裳亮等, 1997), 本研究与已报道的鱼类细胞的温度适应范围是一致的(Wang *et al*, 2010), 这与鱼类是变温动物有很大关系。在 0、5%、10%、20%的 FBS 中生长时, 未加 FBS 的生长速度明显低于添加 FBS 的生长速度, 在 FBS 为 20%时生长最快, FBS 浓度对细胞生长有明显的影响, 与已报道的研究相似(王缙云等, 2018)。本研究测定的第 10 代 BICF1 生长曲线呈“S”型生长曲线, 1 d 为指数生长期。红鳍东方鲀鳍细胞系在 2~4 d 为指数生长期, 4~5 d 为平稳期(王缙云等, 2018), 5 d 之后为衰退期。与红鳍东方鲀鳍细胞相比, BICF1 进入指数生长期更快。

本研究塔里木裂腹鱼 BICF1 呈悬浮生长。贴壁培养型的细胞, 细胞膜表面含有大量黏附因子。这些黏附因子可激活不同的信号通路调节贴壁细胞的活性和增殖, 如整合素(integrins)活化黏着斑激酶(focal adhesion kinase)激活信号通路抑制细胞内源性的凋亡(Zhong *et al*, 2012; Hofmann *et al*, 2007)。悬浮培养的细胞一般为淋巴细胞等血液系统来源的细胞, 细胞体积小, 缺乏粘附分子的表达(姬广超等, 2020; 徐伟等, 2020)。在塔里木裂腹鱼 BICF1 染色体的制备中发现, 用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗时间达 90 min。有研究报道, 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀)×鞍带石斑

鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂) F₁ 染色体制备中低渗时间为 25 min (刘莉等, 2016); 鲤(*Procypris rabaudi*)染色体标本的制备中低渗的时间控制在 35 min (耿波等, 2003); 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)染色体标本的制备中低渗的时间控制在 40 min (宋立民等, 2010); 灰海马(*Hippocampus erectus*)染色体标本的制备中低渗的时间为 50 min (刘鑫等, 2020); 报道的研究中低渗的时间在 25~50 min。因此, 推测塔里木裂腹鱼 BICF1 细胞膜不易破裂, 与 BICF1 细胞膜的坚韧程度有关。用物理方法进行贴壁型细胞的悬浮驯化时, 使细胞发生失巢凋亡(anoikis)(王朋朋等, 2021), 无血清与生物反应器驯化使贴壁细胞产生失巢凋亡的拮抗。目前, MDCK(吴培培等, 2016)、BHK-21(赵彩红等, 2019)、Hi5-SF(马伟等, 2017)、PK15(刘天伦等, 2019)等被驯化。塔里木裂腹鱼 BICF1 培养中可能产生类似于失巢凋亡的调节。塔里木裂腹鱼肾细胞呈悬浮生长的状态, 可能与其体积和细胞膜表面粘附分子的表达及细胞膜坚韧程度有关, 可能与类似于失巢凋亡的调节有关, 具体原因有待于进一步研究。

细胞来源的鉴定通常采用 16S rRNA、12S rRNA 和 Cytb 等基因片段, 本研究选择 16S rRNA 进行鉴定, BICF1 序列分析结果与塔里木裂腹鱼基因序列一致性为 100%, 证明细胞系来自于塔里木裂腹鱼。

塔里木裂腹鱼曾是新疆博斯腾湖主要经济鱼类, 由于开荒造田, 农田盐碱水大量排入湖水, 盐碱度逐年升高(刘立彭, 1983)。水体中盐碱度水平对鱼类存活有显著影响, 盐碱度过高或过低都会显著降低鱼类的存活率(张雅芝等, 2009; 秦志清等, 2010)。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)盐碱度的耐受性研究中发现, 盐度为 20 时, 仅少数个体能存活 96 h; NaHCO₃ 碱度为 12 g/L 时, 96 h 全部死亡(赵丽慧等, 2014); 对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)急性低盐胁迫, 并检测当盐度由 2 到 0 时, 其存活率随盐度的下降而降低(李智等, 2020); 当碳酸盐碱度为 0~44.58 mmol/L、pH 为 9.0~10.0 时, 随着碳酸盐碱度浓度的上升, 缢蛏的存活率明显下降(叶博等, 2019)。本研究中, 盐度为 1~6 时, BICF1 增殖数量上升; 盐度为 6~10 时, BICF1 增殖数量下降; 盐度为 6 时, BICF1 增殖数量最高。NaHCO₃ 碱度为 2~6 g/L 时, BICF1 增殖数量上升; 碱度为 6~10 g/L 时, BICF1 增殖数量下降; 碱度为 6 g/L 时, BICF1 增殖最高。本研究中, 盐碱度过高或过低都会使塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的存活率降低。红鲫(*Carassius auratus* red)鳍细胞系被建立被用于抗药性和抗病性的研究, 细胞系可用于毒性筛选和病毒分离的材料(Xiao *et al*, 2018)。草鱼鳍细胞系用

于研究草鱼源维氏气单胞菌对宿主细胞的毒性致死机制(刘明珠等, 2019); 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)尾鳍细胞(GiCF)用于辛硫磷对 GiCF 毒性研究, 表明 GiCF 可作为农药的细胞毒性研究材料(赵燕楠等, 2020)。本研究中, 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系可作为研究盐碱度对塔里木裂腹鱼的影响的材料, 可为其选择育种和功能基因研究提供良好的载体。

参 考 文 献

- BABU V, NAMBI K, CHANDRA V, *et al.* Establishment and characterization of a fin cell line from Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(5): 355–364
- BEJAR J, BORREGO J J, ALVAREZ M C. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 1997, 150(1/2): 143–153
- CLEW L W, MOEWUS L, SIGEL M M. Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1961, 108(3): 762–766
- GENG B, LIANG L Q, SUN X W. The search for the blood lymphocytic cell cultivation of the common carp and the preparation of chromosomes. *Chinese Journal of Fisheries*, 2003(2): 32–34 [耿波, 梁利群, 孙效文. 鲤鱼血淋巴细胞培养及染色体制备条件探索. *水产学杂志*, 2003(2): 32–34]
- GONG Q L, ZHENG L, ZHANG H L, *et al.* Testing lab animal dermatophytes using PCR method. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2007, 17(3): 132–135 [龚巧玲, 郑龙, 张换铃, 等. PCR 方法检测实验动物皮肤病原真菌. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(3): 132–135]
- GRAVELL M, MALSBERGER R. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965, 126(1): 555–565
- HAYSA A, GUO Y, MENG W, *et al.* Genetic diversity and population differentiation of *Schizothorax biddulphi* based on mtDNA control region sequences. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 944–954 [海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 基于线粒体控制区序列的塔里木裂腹鱼遗传多样性及种群分化分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 944–954]
- HOFMANN C, OBERMEIER F, ARTINGER M, *et al.* Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 587–600
- JI G C, WANG X M, SU M M, *et al.* Analysis of lymphocyte subsets to predict their killing activity. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2020, 13(27): 172–173 [姬广超, 王晓明, 苏苗苗, 等. 淋巴细胞的亚群分析预测其杀伤活性研究. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(27): 172–173]
- JIANG S, LI X, LI Z Z, *et al.* Toxicity of copper sulfate and zinc chloride on DNA damage and metallothionein gene expression in loach cell lines. *Fisheries Science*, 2020, 39(3): 381–387 [姜珊, 李霞, 李状状, 等. 铜、锌对泥鳅细胞 DNA 损伤及金属硫蛋白表达的影响. *水产科学*, 2020, 39(3): 381–387]
- JIN M, HUANG A H, CHEN Z L, *et al.* Detection of common fungal pathogens by general primer PCR. *Journal of Environment and Health*, 2009, 26(11): 969–971 [金敏, 黄爱华, 陈照立, 等. 常见致病真菌通用引物 PCR 检测技术研究. *环境与健康杂志*, 2009, 26(11): 969–971]
- KELLY R K, LOH P C. Some properties of an established fish cell line from *Xiphophorus helleri* (red swordtail). *In Vitro*, 1973, 9(2): 73–80
- LI Z, PENG M X, YE B, *et al.* Effects of acute low salinity on *Sinonovacula constricta* survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytosis of hemocytes. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 489–495 [李智, 彭茂潇, 叶博, 等. 急性低盐度对缢蛏存活率、 Na^+/K^+ -ATPase 活性以及血淋巴细胞吞噬能力的影响. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 489–495]
- LIU L, ZHANG Y, CHEN C. Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid F_1 (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 33–40 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂) F_1 染色体制备方法及其核型分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 33–40]
- LIU L P. Comments on the Bosten Lake fishery and its resource multiplication. *Freshwater Fisheries*, 1983(3): 12–14 [刘立彭. 博斯腾湖渔业及其资源增殖的意见. *淡水渔业*, 1983(3): 12–14]
- LIU M Z, YU Q, XIAO H H, *et al.* Study on cytotoxicity and apoptosis of *Aeromonas veronii* to grass carp pectoral fin cell. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(3): 213–218 [刘明珠, 余庆, 肖贺贺, 等. 维氏气单胞菌对草鱼背鳍细胞的毒性及凋亡研究. *广西科学院学报*, 2019, 35(3): 213–218]
- LIU T L, LANG H B, KONG S. Domestication of a PK15 cell line to suspension culture by serum-free medium. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(9): 12–18 [刘天伦, 郎洪彬, 孔飒. PK15 细胞的无血清全悬浮驯化研究. *中国兽药杂志*, 2019, 53(9): 12–18]
- LIU X, ZHANG D, LIN T T, *et al.* Chromosome preparation and karyotype of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*). *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(6): 907–914 [刘鑫, 张东, 林听听, 等. 灰海马染色体制备及核型分析. *水产学报*, 2020, 44(6): 907–914]
- LUO W, NIE Z L, ZHAN F B, *et al.* Rapid development of microsatellite markers for the endangered fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) using next generation sequencing and cross-species amplification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(11): 14946–14955
- MA W, WANG J M, MA G L, *et al.* Establishment and

- identification of Hi5-SF suspension cell line. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, 26(2): 173–178 [马伟, 王家敏, 马桂兰, 等. Hi5-SF 悬浮细胞系的建立及鉴定. 西北农业学报, 2017, 26(2): 173–178]
- NICHOLAS H A, TERRY R, ALLEN W, *et al.* Evaluation of flow cytometric methods for determining population potential doubling times using cultured cells. *Cytometry Part A*, 1991, 12(3): 234–241
- NICHOLSON B L, BYRNE C. An established cell line from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1973, 30(70): 913–916
- QIN Z Q, ZHANG Y Z, LIN Y J, *et al.* Effects of salinity on growth and survival of young *Paralichthys lethostigma*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(2): 1–5 [秦志清, 张雅芝, 林越超, 等. 盐度对漠斑牙鲆幼鱼生长与存活的影响. 水产学杂志, 2010, 23(2): 1–5]
- RESLEY M J, WEBB Jr. K A, HOLT G J. Growth and survival of juvenile coibia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 2006, 253(1/2/3/4): 398–407
- SONG L M, WANG W M, WANG Y F. The tissue cultivation of fins and preparation of chromosomes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010, 25(6): 502–505 [宋立民, 王卫民, 王玉芬. 黄颡鱼鳍组织培养及染色体制备条件的研究. 大连海洋大学学报, 2010, 25(6): 502–505]
- SWAMINATHAN T R, LAKRA W S, GOPALAKRISHNAN A, *et al.* Development and characterization of a new epithelial cell line PSF from tail fin of green chromide, *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 2010, 46(8): 647–656
- TONG S L, LI H, MIAO H Z. Four continuous cell lines of three marine fish species were established. *Progress in Biomedical Engineering*, 1997, 17(3): 3–4 [童裳亮, 李宏, 苗宏志. 牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立. 生物工程进展, 1997, 17(3): 3–4]
- WAN Y J, ZHANG J L, AN J. Rapid detection of bacterial or microbial contamination in cell cultures. *Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery*, 2005, 14(2): 88–90 [万颖杰, 张俊磊, 安静. 细胞培养中细菌类微生物污染的快速检测. 同解手术学杂志, 2005, 14(2): 88–90]
- WANG D Z. The Schiz. Othoracinae fish in Xinjing. *Arid Zone Research*, 1998, 15(4): 26–32 [王德忠. 新疆的裂腹鱼亚科鱼类研究. 干旱区研究, 1998, 15(4): 26–32]
- WANG J Y, LI X, QIN Y J, *et al.* Establishment and characterization of fin cell lines from redfin puffer *Takifugu rubripes*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(6): 703–708 [王缙云, 李霞, 秦艳杰, 等. 红鳍东方鲀鳍细胞系的建立及生长特性研究. 大连海洋大学学报, 2018, 33(6): 703–708]
- WANG P P, HUANG S L, ZHANG Y K, *et al.* Research progress on serum free suspension culture of mammalian cells. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 48(3): 839–845 [王朋朋, 黄书林, 张云科, 等. 哺乳动物细胞无血清全悬浮培养技术研究进展. 中国畜牧兽医, 2021, 48(3): 839–845]
- WANG X L, CHEN S L, SHA Z X, *et al.* Establishment and characterization of a new cell line from the kidney of spotted halibut *Verasper variegates*. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 9(2): 162–168
- WEI J, NIE Z L, LI J, *et al.* Morphological and histological observation of gonadal development of Tarim schizotharacin *Schizothorax biddulphi*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2011, 26(3): 227–231 [魏杰, 聂竹兰, 李杰, 等. 塔里木裂腹鱼性腺形态学与组织学的研究. 大连海洋大学学报, 2011, 26(3): 227–231]
- WEI L, NIE Z L, ZHAN F B, *et al.* Rapid development of microsatellite markers for the endangered fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) using next generation sequencing and cross-species amplification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13: 14946–14955
- WEI Y Z, LU R H, BAI G D. Establishment of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) caudal fin diploid cell line GCCF-2 and analysis of some of its biological characteristics. *Journal of Fisheries of China*, 1987, 11(4): 269–275 [魏彦章, 陆仁后, 白国栋. 草鱼尾鳍组织二倍体细胞系 GCCF-2 的建立及其部分生物学特性分析. 水产学报, 1987, 11(4): 269–275]
- WOLF K, QUIMBY M. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, 1962, 135(3508): 1065–1066
- WU P P, TANG Y H, CHU X, *et al.* Domestication of MDCK suspension cell lines for the H9 subtype of avian influenza virus proliferation and its biological characteristics evaluation. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(6): 1377–1383 [吴培培, 唐应华, 褚轩, 等. 适应 H9 亚型禽流感病毒增殖的 MDCK 悬浮细胞株的驯化及其生物学特性. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1377–1383]
- XIAO J, FU W M, ZHOU W, *et al.* Establishment of fin cell lines and their use to study the immune gene expression in cyprinid fishes with different ploidy in rhabdovirus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 88: 55–64
- XIAO Y, ZENG L B, LI X L, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of paddlefish, *Polyodon spathula walbaum*. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(4): 533–540 [肖艺, 曾令兵, 李晓莉, 等. 匙吻鲟鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(4): 533–540]
- XU W, FANG S J, GUAN R, *et al.* Immunomodulatory effect of *Atractylodis macrocephalae* Koidz polysaccharides on mouse lymphocytes. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(13): 1573–1577 [徐伟, 方思佳, 关然, 等. 白术多糖对小鼠淋巴细胞的免疫调节作用. 中国免疫学杂志, 2020, 36(13): 1573–1577]

- YAN W, NIE P, LU Y. Establishment, characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from goldfish, *Carassius auratus* (L.) tail fin. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(10): 757–768
- YANG K, ZHU D M, WANG W M. Studies on fin tissue cultivation, Ag-NORS and C-banding patterns of *Pseudorasbora parva*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 20–25 [杨坤, 祝东梅, 王卫民. 麦穗鱼鳍条组织培养及染色体 Ag-NORS 和 C-带研究. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 20–25]
- YANG T Y, MENG W, GUO Y, *et al.* The multivariate morphometric analysis of *Schizothorax biddulphi* and *Schizothorax irregularis*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, 37(3): 221–227 [杨天燕, 孟玮, 郭焱, 等. 塔里木裂腹鱼和厚唇裂腹鱼多变量形态学分析. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(3): 221–227]
- YANG T Y, ZHANG R M, GUO Y, *et al.* Comparative study on partial mitochondrial COI gene of *Aspiorhynchus laticeps* and *Schizothorax biddulphi*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(1): 45–50 [杨天燕, 张人铭, 郭焱, 等. 扁吻鱼和塔里木裂腹鱼线粒体 COI 基因片段的比较研究. *水生态学杂志*, 2011, 32(1): 45–50]
- YAO Z L, LAI Q F, ZHOU K, *et al.* Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(3): 397–402
- YE B, CHENG Z Y, PENG M X, *et al.* Effects of pH and carbonate alkalinity on survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytic ability of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(8): 1723–1732 [叶博, 程之扬, 彭茂潇, 等. 急性 pH 和碳酸盐碱度对缢蛏存活率、 Na^+/K^+ -ATPase 活性及血淋巴吞噬能力的影响. *水产学报*, 2019, 43(8): 1723–1732]
- ZHANG N C, YANG G Z. The establishment of strain ZC-7901 and substrain ZC-7901S₁ 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-7901S₁ 的建立和特性观察. *水产学报*, 1981, 5(2): 111–118]
- ZHANG R M, GUO Y, MA Y W, *et al.* A Survey on the resource and distribution of *Schizothorax biddulphi* gunther. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(6): 76–78 [张人铭, 郭焱, 马燕武, 等. 塔里木裂腹鱼资源与分布的调查研究. *淡水渔业*, 2007, 37(6): 76–78]
- ZHANG X P, ZENG L B, CHEN Q, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of *Mylopharyngodon piceus*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(2): 3–9 [张雪萍, 曾令兵, 陈倩, 等. 青鱼鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. *淡水渔业*, 2016, 46(2): 3–9]
- ZHANG Y Z, LIU D E, FANG Q S, *et al.* Effects of temperature and salinity on growth and survival rate of young *Epinephelus coioides*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2009, 14(1): 8–13 [张雅芝, 刘冬娥, 方琼珊, 等. 温度和盐度对斜带石斑鱼幼鱼生长与存活的影响. *集美大学学报(自然科学版)*, 2009, 14(1): 8–13]
- ZHAO C H, WANG M H, ZANG R X, *et al.* Growth characteristics and tumorigenic of suspension cultured BHK-21 cells. *Journal of Northwest Minzu University (Natural Science)*, 2019, 40(4): 53–59 [赵彩虹, 王美皓, 臧荣鑫, 等. 悬浮培养型 BHK-21 细胞生长特性及成瘤性研究. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(4): 53–59]
- ZHAO L H, JIA J H, ZHANG Y H, *et al.* The tolerance and growth of three strains of *Oreochromis niloticus* in salinity-alkalinity water. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 26–32 [赵丽慧, 笄金华, 张艳红, 等. 3 种品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)盐碱耐受性和生长比较. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 26–32]
- ZHAO Y N, ZHOU H Z, LI W J, *et al.* Transcriptome analysis of the caudal fin cell line of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)(GiCF) affected by the pesticide phoxim. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(11): 4953–4963 [赵燕楠, 周宏正, 李婉娟, 等. 辛硫磷胁迫对异育银鲫细胞基因表达的影响. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(11): 4953–4963]
- ZHONG X, RESCORLA F J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: Understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cellular Signalling*, 2012, 24(2): 393–401
- ZHOU G, GUI L, LI Z, *et al.* Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(8): 2058–2067
- ZHOU G Z, JING H J. Application development of fish cell lines on virology research. *Letters in Biotechnology*, 2011, 3: 21–26 [周广舟, 景红娟. 鱼类细胞系在病毒学研究中的应用进展. *生物技术通讯*, 2011, 3: 21–26]
- ZUO W G, QIAN H X, XU Y F, *et al.* Establishment of kidney cell lines CIK from grass carp. *Freshwater Fisheries*, 1984, 14(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, 14(2): 38–39]

Establishment and the Effect of Salinity of Cell Lines Derived from Tail Fin of *Schizothorax biddulphi*

DAI Jincai, NIE Zhulan^①, ZHAO Nianhua, REN Yongli, WEI Jie

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

Abstract To establish the caudal fin cell line of *Schizothorax biddulphi*, this study employed the tissue block method with fetal bovine serum (FBS) DME/F12 medium for *in vitro* cultivation of the tail fin, using previously established tail-fin cell lines (BICF1) of *S. biddulphi*. In this study, the effect of NaCl salinity and NaHCO₃ alkalinity on the proliferation of tail fin cells was investigated using the MTT method. The main results are as follows: the BICF1 suspension culture was propagated to 45 generations. The optimum medium was DME/F12. The optimal FBS concentration was determined to be 20%. The optimum temperature was 25°C. The population doubling time of the 10th generation BICF1 was 28.11 h, showing an "S" type growth. The 6th generation BICF1 in liquid nitrogen was recovered after freezing for 180 days. Trypan blue staining showed that after recovery, (87.85±0.66)% of BICF1 cells were active, and the cells could proliferate and pass to next generation. The BICF1 cell line is free of contamination by bacteria, fungi, and mycoplasma. The sequencing results of mitochondrial 16S rRNA of the 10th generation BICF1 were consistent with the GenBank gene sequence, and the consistency rate of BICF1 and JQ844133.1 was 100%, proving that BICF1 was from *S. biddulphi*. BICF1 cell proliferation increased with salinity of 1, 2, 4, and 6, but decreased with salinity of 6, 8, and 10; BICF1 cell proliferation was the highest at 6. The NaHCO₃ alkalinity of BICF1 increased at 2, 3, 4, 5, and 6 g/L, whereas the proliferation of BICF1 cells decreased at 6, 7, 8, and 10 g/L, respectively. BICF1 cell proliferation was the highest at 6 g/L. Cell proliferation first increased and then decreased with increasing salinity and alkalinity. This study aimed to provide a scientific basis for the rational development and utilization of genetic resources of *S. biddulphi*, including the establishment and protection of the germplasm.

Key words *Schizothorax biddulphi*; Tail fin; Cell culture

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