

# 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\*

张念慈 杨广智

(浙江省淡水水产研究所)

## 提 要

以草鱼吻端组织为材料,经体外培养建立了一个上皮样细胞和梭形细胞混合的细胞株,后又从中分离出一个上皮样细胞亚株,分别定名为 ZC-7901 和 ZC-7901S<sub>1</sub>。对两株细胞进行了基本生物学特性的测定,染色体数目和经长期传代后染色体数目稳定性的分析。实验表明,两株细胞为草鱼正常二倍体( $2n=48$ )细胞株。

体外培养的细胞,作为生物细胞各种生命活动的体外活模型,在生物学和医学的基础理论和应用技术的研究中均起着重要作用。细胞株由于可长期离体传代培养、具有均一的成分和稳定的生物学特性,并能大量多次提供细胞,因而更受重视。鱼类细胞培养的系统研究和建株实践,已有二十多年的历史<sup>[10,17]</sup>。自 Wolf 等(1962)建立的 RTG-2 细胞株和 Clem 等(1961)建立的 GF-1 细胞株问世以来<sup>[8,9]</sup>,见诸于文献的已有 60 余个鱼类细胞株相继建成。它们来自隶属于硬骨鱼类 17 个科 36 个种(或杂种)的各种组织,其中大多数细胞株来自淡水鱼类或溯河洄游性鱼类,仅 8 种是海水鱼类。在这些鱼类细胞株中,来自鲤科鱼类(Cyprinidae)的有 9 株<sup>[12]</sup>,但尚未见草鱼正常二倍体细胞株的报道。

我们曾于 1978—1979 年间培养成功当年草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的吻端、鳃盖膜、尾鳍、鳃丝、肠道组织的原代细胞,以及草鱼胚胎和三龄草鱼性腺的原代细胞。在此基础上,将其中的吻端细胞进行传代培养,也获成功。至今已连续培养 22 个月多,传至 120 余代,建立了细胞株。当传至 11 代时,又从中分离出一个上皮样细胞亚株,现已传至 90 余代。目前,两株细胞增长稳定。我们将这两株细胞分别定名为 ZC-7901 和 ZC-7901S<sub>1</sub>。本文报道这一工作。

## 材 料 和 方 法

(1) 原代细胞培养和传代培养:材料为本所实验鱼池饲养的 7—8 月龄小草鱼。选择健壮的鱼,洗净体表,在 0.01%高锰酸钾溶液中暂养半小时左右,然后剪取吻端表皮,

\* 本工作得到中科院细胞生物学研究所陈瑞铭教授和朱德厚、杨正洪、沈鼎武老师的指导,及杭州大学毛树坚老师的多方帮助;本文承中科院水生所倪达书教授审阅、修改;本所许谷星、陈旭华和沈仁澄同志协助部分实验。谨致谢忱。

在 70%酒精中浸漂 5—10 秒,按组织块法进行培养<sup>[9]</sup>。培养液为含 15%小牛血清和适量抗菌素的 199,用 5.6%  $\text{NaHCO}_3$  将培养液的酸碱度调到 pH7 左右。正常培养温度为 25—28°C。

待组织块周围的生长晕上细胞增殖旺盛而茂密时,用 0.25%胰蛋白酶消化,再用培养液制成细胞悬液(浓度约为  $1-2 \times 10^6$  个细胞/毫升),进行传代培养。5—6 代后,当细胞增长速度稳定时,传代接种的细胞浓度可降低到  $1.5 \times 10^5$  个细胞/毫升。

(2) 亚株分离:当上述细胞传至 11 代时,用毛细管蘸取经稀释为每毫升约 1000 多个细胞的悬液,分装于 30 多只培养瓶中静止培养。一个多月后,毛细管中的细胞由于不断增殖,逐渐延伸至管口,在培养瓶壁上形成小块细胞的集落。在显微镜下可见到少数培养瓶中的细胞集落,是以多角形上皮样细胞占绝对优势。选取了 2 瓶细胞,继续培养,适时以较稀的浓度传代(约  $10^4$  个细胞/毫升),淘汰疑有梭形细胞混杂的瓶子,如此逐渐分离到上皮样细胞亚株。

(3) 细胞形态:将组织块接种于  $22 \times 5$  毫米的小盖玻片上,置于链霉素瓶培养,待生长晕形成并扩大到一定面积时,取出小盖片,以 Carnoy 氏液固定,HE 染色,制成标本,在显微镜下观察原代细胞的形态,并用位相差显微镜对活体细胞进行观察。

传代细胞的形态,是将细胞悬液接种于预先放有小盖片的链霉素瓶,培养 72 小时,再按上法制成染色标本,在显微镜下观察,结合用位相差显微镜对活体细胞进行观察。

(4) 细胞生长速度测定:以  $1.5 \times 10^5$  个细胞/毫升和  $0.75 \times 10^5$  个细胞/毫升的浓度传代,定时观察,测定其长成致密单层细胞所需的培养时间;同时,分别以  $0.5 \times 10^5$  个细胞/毫升和  $1 \times 10^5$  个细胞/毫升的浓度将 ZC-7901 和 ZC-7901S<sub>1</sub> 进行传代,每隔 24 小时任取 4 瓶细胞计数,取平均值绘成生长曲线图。

(5) 细胞分裂指数测定:挑选生长良好的单层细胞,制成  $1.5 \times 10^5$  个细胞/毫升的悬液,接种于预先放在链霉素瓶中的小盖片上,36 小时起每隔 24 小时任取三个样品,以 Carnoy 氏液固定,HE 染色,制成标本,在位相差显微镜下统计 2000—3000 个细胞中的分裂相数,以其千分比作为分裂指数,并绘制成曲线图。

(6) 细胞对温度的适应性及冰冻保存:将细胞传代后分别在 12°C、20°C、25—28°C、30—32°C、36—37°C 下培养,定时观察;另将细胞置于普通冰箱(2—4°C)中 7 天至数月,再移至 25—28°C 下培养,观察结果。

用含 10%甘油的培养液,将细胞制成悬液(约  $2-3 \times 10^6$  个细胞/毫升),封装于安瓿中,置液氮冰冻保存,每隔三个月复苏。

(7) 细胞染色体分析:参考人类白细胞染色体标本的制作方法<sup>[4]</sup>,制成原代细胞和传代细胞的染色体标本,在油镜下随机统计,并择优照相。

原代细胞统计了 160 个细胞中期分裂相;ZC-7901 细胞株统计了第 50 代细胞的 166 个中期分裂相;ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞株统计了第 30 代细胞的 143 个中期分裂相。

为了了解细胞在长期离体培养下的稳定性,对 ZC-7901 株的第 120 代细胞的染色体数目分布作了统计。共统计了 202 个细胞中期分裂相。

## 实 验 结 果

(1) 建株过程: 组织块接种后 36—40 小时, 周缘长出少量透明的鱼鳞状细胞, 以后这种细胞逐渐增多并形成生长晕。增长好的组织块, 经过 5—6 天, 生长晕可扩大到直径 15 毫米左右。此时即可择优传代。第一次传代的成功率较低, 长成单层细胞的时间较长且参差不齐, 一般均在 20 天以上, 长的达 2 个多月; 以后几代, 细胞生长亦不甚稳定。5—6 代后, 开始稳定在 4 天左右传代一次。此后细胞对环境越来越适应, 能保持迅速而稳定的增殖。至今, 已连续培养 22 个多月, ZC-7901 细胞株传至 120 余代, ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞株传至 90 余代, 仍未见衰。

(2) 细胞形态: 原代细胞绝大多数为上皮样细胞, 呈多角形。在生长晕上, 细胞排列疏密不一, 大小不等, 靠近组织块处, 细胞较密而小, 生长晕边缘处, 细胞较疏而大, 但细胞核的大小并无差别; 细胞绝大多数为单核, 偶见双核和三、四核的细胞。

ZC-7901 细胞株为多角形上皮样细胞与梭形细胞的混合群体; 随着培养时间和传代次数的增长, 上皮样细胞比例增加。上皮样细胞的核呈圆形或略呈椭圆形。在 H.E. 染色标本上, 其核着色比梭形细胞核为浅, 细胞质着色更浅, 特别在铺展得较大的细胞中, 胞质为极淡的桃红色, 甚至细胞界限也不明显。梭形细胞核呈椭圆形, H.E. 标本中, 核着色深, 为紫红色, 胞质为桃红色, 细胞多呈梭形, 也有分叉的多枝形和针形的。有的梭形细胞两端会形成细线状的突起, 犹如鞭毛, 伸展得很远, 或与另一细胞的类似突起相接。

ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞株是单纯的多角形上皮样细胞群体。但在久不换培养液时, 上皮样细胞会变得瘦长, 形似梭状。

(3) 细胞生长速度: 两株细胞生长均较迅速。传代接种后 30—40 分钟细胞就能贴壁; 3—4 小时, 部分细胞开始铺展, 呈新月形、多角形或分叉多枝形等多种形态; 24 小时后形成群岛状的小块单层细胞, 散布于培养瓶壁。以  $1.5 \times 10^6$  个细胞/毫升的浓度接种, 4 天左右可形成致密的单层细胞; 以  $0.75 \times 10^6$  个细胞/毫升的浓度接种, 6~7 天可形成致密单层。两株细胞的生长曲线见图 1 和图 2。

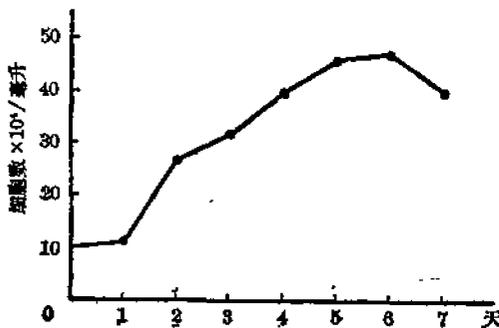


图 1 ZC-7901 细胞的生长曲线

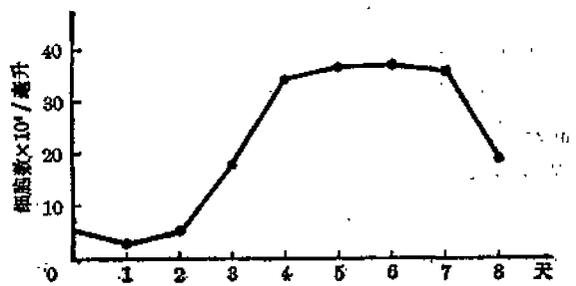


图 2 ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞的生长曲线

(4) 细胞分裂指数: ZC-7901 细胞株的分裂指数如图 3; ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞株的分

裂指数如图4。

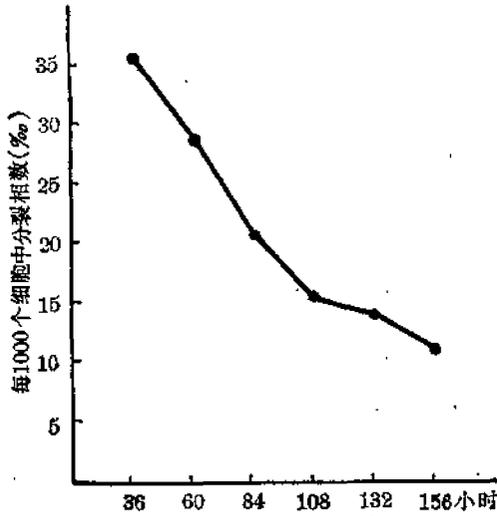


图3 ZC-7901 细胞的分裂指数

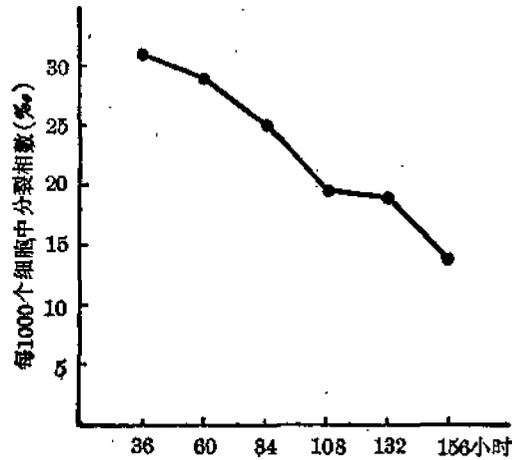


图4 ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞的分裂指数

从图3和图4可以看出,两株细胞均具有旺盛的增殖能力。它们的分裂指数的高峰在36小时左右。此时,ZC-7901细胞株的分裂指数为36.5%,ZC-7901S<sub>1</sub>细胞株的分裂指数为32.3%,这说明它们在传代后短时间内就开始旺盛增殖。以后,增殖率随着培养瓶中细胞密度的增大而递降,至156小时,分别下降至12.3%和14.3%。

(5) 细胞对温度的适应性及冰冻保存: 两株细胞在12°C时仍有极缓慢的增殖;20°C时增殖加快;25—28°C时增殖最佳;30—32°C时增殖十分旺盛,但细胞在形成小块单层后就很快卷缩结团,不能在整个培养瓶壁形成致密的单层细胞,随后即从瓶壁脱落;36—37°C时细胞大部死亡,残存者亦不贴壁,久后亦死。

在2—4°C的冰箱中,细胞存放7天至2个月,取出置于25—28°C下培养,能恢复增殖,正常传代;甚至在2—4°C下保存5个多月后,尚有少量细胞能恢复增殖和传代。

细胞在-196°C液氮中冰冻半年后,复苏良好,能继续增殖传代。

(6) 染色体数目: 原代细胞染色体的数目为 $2n=48$ 。通过对160个细胞中期分裂相的统计, $2n=48$ 的分裂相数占78.1%; $2n \neq 48$ 的分裂相占21.9%。染色体数目分布情况见图5。

ZC-7901细胞株的染色体数目为 $2n=48$ 。通过对第50代细胞的166个中期分裂相的统计, $2n=48$ 的分裂相占72.3%, $2n \neq 48$ 的分裂相数占27.7%。染色体数目分布情况见图6。

ZC-7901S<sub>1</sub>细胞株的染色体数目为 $2n=48$ 。通过对第30代细胞的143个中期分裂相的统计, $2n=48$ 的分裂相占74.7%, $2n \neq 48$ 的分裂相占25.3%。染色体数目分布情况见图7。

ZC-7901细胞株第120代细胞的染色体分布情况如图8。通过对202个中期分裂相的统计,其中 $2n=48$ 的分裂相占68.3%;在 $2n \neq 48$ 的分裂相中, $2n$ 为49和50的占

14.3%, 2n 为 95 和 96 的四倍体占 8.4%。

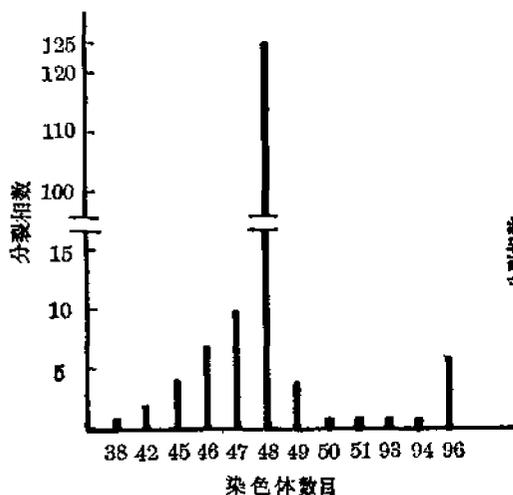


图5 草鱼吻端原代细胞的染色体数目分布

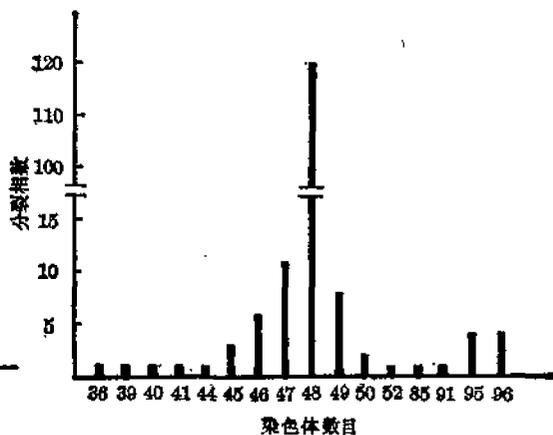


图6 ZC-7901 细胞株第 50 代细胞的染色体数目分布

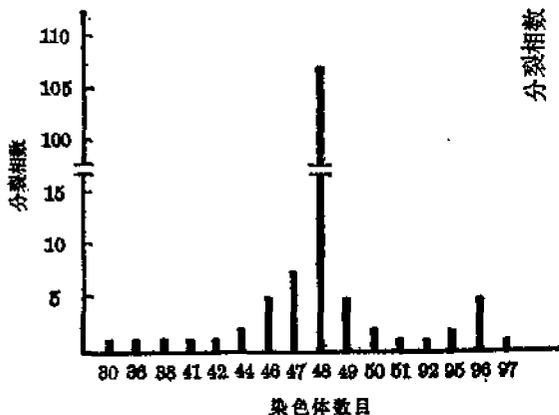


图7 ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞株第 30 代细胞的染色体数目分布

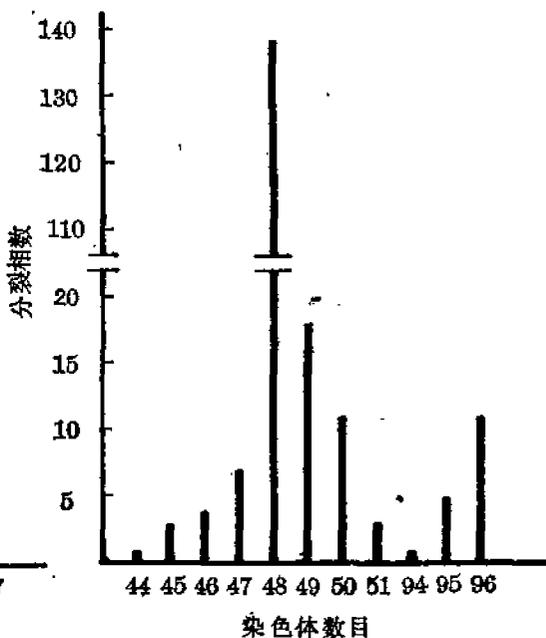


图8 ZC-7901 细胞株第 120 代细胞的染色体数目分布

## 讨 论

1. 不少研究者业已证明, 鱼类组织培养的方法, 基本上可采用哺乳动物的方法。Clem 等(1961)将温水性鱼的组织在室温下用较短的时间(0.5—1.5 小时)消化, 培养获

得成功; Wolf 等(1960)在 4°C下将鱼组织连续搅拌消化 18—20 小时,制得细胞悬液进行培养,即冷消化法,培养成功多种鱼体组织<sup>[8,9]</sup>。我们采用了组织块法,培养成功草鱼细胞,表明这种方法对草鱼也很适用。从某种程度上看,组织块法也许更易获得原代细胞。因为组织块的存在,使培养环境与整体动物的生理环境不至于差异太大,这对离体细胞的生存和增殖有利。因此,有的研究者把组织块培养法叫做“母培养”。我们采用组织块母培养法培养了数十例草鱼的各种组织,除污染者外,成功率是较高的。

不少报道和我们的工作表明,淡水硬骨鱼类细胞的培养条件,诸如酸碱度、渗透压和培养基等,均接近于哺乳类。Wolf 认为,淡水硬骨鱼类的血液化学组成接近于人类而不同于蛙类,因而蛙用 Ringer 氏液对淡水硬骨鱼类来讲是低渗液,不宜采用。他建议采用 Earle 液和 Hanks 液<sup>[10]</sup>。尾里建二郎建议采用 Dulbecco 的磷酸平衡盐溶液(PBS)和 Hanks 液<sup>[9]</sup>。我们在培养中使用 Hanks 液, PBS 和 Earle 氏液为基础盐溶液的培养基,均获良好效果,与 wolf 和尾里的意见相一致。鱼类细胞的培养基,同样也可采用哺乳动物的培养基,其中 Eagles MEM 加小牛血清较常用<sup>[9]</sup>。我们采用 M 199 加 15%小牛血清,得到良好增殖;此外,曾试用 RPMI1640 培养基,效果也不差。

2. 从 ZC-7901 细胞株中分离出 ZC-7901S<sub>1</sub> 亚株,是一个饶有兴趣的问题。很明显,这种方法具有一定的偶然性,分离成功的机率也较小。我们制备了 30 多个放有毛细管的培养瓶,多数不是不能继续增殖,就是细胞集落中有上皮样细胞和梭形细胞两种类型,只有 2 瓶形成以上皮样细胞占绝对优势的细胞集落。在以后的传代中,又发现其中一瓶也混有梭形细胞而废弃,最后只获得由一只瓶子传下来的上皮样细胞;而且,在毛细管接种时,细胞虽已稀释,但吸入一根毛细管的细胞一般仍有数以百计,增殖后延伸到毛细管口的细胞集落,不能保证是来自一个细胞,因此不是 Colon 系。但是,这种方法比较简便,对于粗分不同类别的细胞,也许是一种可供尝试的办法。

3. 鱼类细胞培养的温度,是引起人们注意的重要问题。早期的一些关于冷血动物组织培养的文献曾认为,鱼类组织培养必须在 18°C以下<sup>[10]</sup>。后来的工作证明,这个意见是不很全面的。现在已有了在 31°C和 37°C下培养成功的鱼类细胞株(MacKenzie, 1973)<sup>[10]</sup>。而且,多数鱼类细胞株都有一个较广的适温范围<sup>[12]</sup>。Wolf (1973)指出,北方种系的鱼,如鲑鱼的细胞,在 5—25°C能增殖,以 20°C最好;南方种系的鱼的细胞,在 15—35°C增殖,以 25—30°C最好<sup>[10]</sup>。我们建立的两个细胞株,在 25—28°C获得最佳增殖,并在 12—32°C范围内均有不同程度的增殖,其增殖速度随温度增高而加快。这说明两株草鱼细胞能在相当广阔的温度范围内增殖;另一方面,两株细胞在 2—4°C下存放 7 天至 2 个月后再移至 25—28°C下培养,仍能继续增殖和传代,甚至在 2—4°C下存放 5 个多月,也还有少量细胞存活,移至 25—28°C下仍能恢复增殖和传代,这充分表明,作为冷血动物的鱼类细胞,在离体培养时对温度的适应性是极强的;而细胞在 36—37°C下死亡的事实,又表明其对低温的耐受力大大超过对高温的耐受力。

两株细胞在液氮中冰冻半年后复苏良好,这一结果与 Wolf 等(1980)所述的资料相符<sup>[12]</sup>,表明草鱼细胞株同样可用液氮进行冰冻保存。冰冻的方法,我们采用人体肝癌细胞株的方法,实验的结果表明这种方法对鱼也是适用的。

4. 两株细胞的染色体数目,均为  $2n = 48$ ,与原代细胞的染色体数目相一致。据报道

(Ojima 等, 1972; 长江水产研究所等, 1975; 管瑞光等, 1979; 刘凌云等, 1979), 草鱼正常二倍体染色体数目确定为  $2n = 48$ <sup>[1,2,5,14]</sup>。我们建立的两株细胞的染色体分析结果与上述报道相吻合。

在人类染色体的研究中, 已积累了大量的资料可供借鉴。参考人二倍体核型指标最低标准(Jean, 1977), 染色体异常(包括断裂, 超二倍体, 亚二倍体, 多倍体和结构异常)的最大容许值为 37%, 亦即正常二倍体染色体的比例至少应占 63%<sup>[11]</sup>。我们建立的两株细胞的正常二倍体染色体的比例均在此标准以上, 故认为它们至今仍保持着正常二倍体染色体的数目, 属正常二倍体细胞株。

从两株细胞的染色体数目的分布情况来看, 除占大多数的二倍体染色体( $2n = 48$ )外, 还有亚二倍体、超二倍体、亚四倍体和四倍体出现。这些异倍体的产生, 原因是多方面的, 其中之一是在染色体标本的制作过程中造成的。但与此同时, 也不能排除细胞在长期离体培养下发生变异的可能性。

在人类和其它哺乳类动物的细胞培养研究中, 有的细胞株经过长期培养后发生变异早已被证明, 并且这种变异可在染色体数目上表现出来<sup>[7]</sup>。鱼类细胞株经过长期培养是否也会发生变异? Wolf 等在最近的一篇关于鱼类细胞株的全面综述中, 根据哺乳动物的情况提到了这一可能性, 但未能列举证实某一鱼类细胞株发生变异的文献<sup>[12]</sup>。纵观我们建立的草鱼吻端细胞株的原代细胞、第 50 代细胞和第 120 代细胞的染色体数目分布情况,  $2n = 48$  的中期分裂相的比例分别为 78.1%、72.3% 和 68.3%, 这三个比例虽均在二倍体细胞株的范围之内, 但其趋势是下降的。如果这不是一种偶然的话, 那末这种趋势是否预示着该细胞株再经过若干世代的培养后, 将发生某种变异? 这一问题有待继续观察研究。

5. 自 Hayflick 等人胚细胞培养实验, 证明人正常二倍体细胞的寿命是有限度的以来, 一般认为人二倍体细胞株传至 50 代左右, 寿命即告终止<sup>[7]</sup>, 唯癌细胞或变异(或转化)细胞株可永久传代<sup>[6,7]</sup>。在其他动物的正常二倍体细胞培养研究中, 有人认为乌龟的二倍体成纤维细胞可传 90—125 代, 鸡的二倍体细胞可传 15—35 代, 并认为动物正常双倍体细胞在体外培养的寿命与该动物的寿命长短有关。在鱼类上, 有关鱼类体外培养细胞寿命的资料甚少, 但在鱼类细胞培养研究中, 已有传了 300 代而染色体基本不变的鱼类细胞株的报道<sup>[16]</sup>, 世界上最早的鱼类细胞株 RTG-2 和 GF-1 已培养了近 20 年<sup>[12]</sup>。由此看来, 也许鱼类体外培养细胞的寿命要比人的长得多, 抑或鱼类体外培养细胞的寿命与活体动物的寿命之间的关系另有规律? 这是一个令人感兴趣的问题。至于我们建成的草鱼吻端细胞株, 迄今传至 120 余代, 其二倍体染色体的分裂相比例还保持在正常范围之内, 即细胞株至今还保持二倍体细胞株的基本特性。该细胞株的寿命有多长? 是到一定世代后寿命终止, 还是转化为另一可永久传代的变异细胞株? 有待进一步观察研究。

## 结 语

本实验采用组织块母培养法, 获得草鱼吻端组织原代细胞; 以含 15% 小牛血清的 M199 为培养液, pH7 左右, 在 25—28°C 下, 经传代培养建成了草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901。该细胞株为上皮样细胞与梭形细胞混合的细胞群体。当 ZC-7901 细胞传至 11

代时,从中分离出一个上皮样细胞亚株 ZC-7901S<sub>1</sub>。两个细胞株至今已连续培养 22 个多月,分别传至 120 余代和 90 余代。

两个细胞株的生长迅速,以  $1.5 \times 10^5$  个细胞/毫升传代,4 天左右可长成致密单层;细胞增殖旺盛,接种后 36 小时分裂指数达高峰,ZC-7901 株为 36.5%,ZC-7901S<sub>1</sub> 株为 32.3%,以后随细胞密度的增加而递减,至 156 小时分别下降至 12.3%和 14.3%;细胞对温度适应性强,在 12—32°C 范围内均有不同程度的增殖,25—28°C 为最佳温度,在 2—4°C 下可保存 7 天至 2 个月,在液氮中可长期保存。两个细胞株的染色体数为  $2n = 48$ ,与草鱼正常二倍体细胞的染色体数相同,故为正常二倍体细胞株。

### 参 考 文 献

- [1] 长江水产研究所育种室、武汉大学生物系动物教研室,1975。几种经济鱼类及其杂种染色体的初步研究。淡水渔业科技杂志,2:11—13。
- [2] 刘凌云,1979。草鱼染色体组型的研究。动物学报,26(2):126—131。
- [3] 陈瑞铭等,1978。人体肝癌体外细胞系 BEL-7402 的建立及其特性。实验生物学报,11(1):38。
- [4] 周焕庚、郑斯英,1974。人体微量血液体外培养制备染色体标本的简易方法。中华医学杂志,54:368—370。
- [5] 谷瑞光、宋峥,1979。草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较。遗传学报,6(2):205—209。
- [6] 大星章一,1975。培养人癌细胞的鉴定。(日)大星章一、菅野晴夫主编(吴政安、王永潮、李申德译)。人癌细胞培养,78~79。科学出版社。
- [7] 菅野晴夫,1975。人癌细胞培养的意义。(日)大星章一、菅野晴夫主编(吴政安、王永潮、李申德译)。人癌细胞培养,1—3。科学出版社。
- [8] 江草周三,1978。鱼の感染症,6。恒星社厚生阁。
- [9] 尾里建二郎,1976。鱼类、两生类的组织培养。中井肇之助等编,组织培养,560—563。东京朝仓书店。
- [10] 濑户武司,1964。冷血動物の組織培養,特に两生類の培養法について。遺伝学雑誌,39(4):268—274。
- [11] Jean, H. Priest., 1977. Medical Cytogenetics and Cell Culture, 2nd Edition, 302. Lea & Febiger, Philadelphia.
- [12] Wolf, K. and Joyce A. Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and Viruses A current listing for fishes. IN VITRO, 16(2):168—179.
- [13] MacKenzie, L. S. and Stephenson, N. G., 1973. Goldfish tissues. Tissue culture methods and applications (Kruse, JR., P. F. and Patterson, JR., M. K. ed.), 148—146, Academic Press, New York and London.
- [14] Ojima, Y., Hayashi, M. and Ucno, K., 1972. Cytogenetic studies in lower vertebrates. X. Karyotype and DNA studies in 15 species of Japanese Cyprinidae. Japan. J. Genetics, 47(6): 431—440.
- [15] Sigel, M. M. and Beasley, A. R., 1973. Marine teleost fish tissues. Tissue culture methods and applications (Kruse, JR., P. F. and Patterson, JR., M. K. ed.), 133—135, Academic Press, New York and London.
- [16] Wolf, K., 1963. Physiological salines for freshwater teleosts. The Progressive Fish-Culturist, 25(3):135—144.
- [17] Wolf, K., 1965. Some recent developments and applications of fish cell and tissue culture. The progressive Fish-culturist, 27(2):67—73.
- [18] Wolf, K., 1973. Freshwater fishes. Tissue culture methods and applications (Kruse, JR, P. F. and Patterson, JR, M. K. ed.), 138—143, Academic Press, New York and London.

## THE ESTABLISHMENT OF STRAIN ZC-7901 AND SUBSTRAIN ZC-7901S<sub>1</sub> FROM THE SNOUT TISSUE CELLS OF GRASS CARP

Zhang Nianci and Yang Guangzhi

(Fresh water Fisheries Institute of Zhejiang Province)

### Abstract

By using the technic of tissue culture we have successfully established a strain of complex of epithelial-like and fibroblast-like cells from the snout tissue of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), and it is denoted as strain ZC-7901. The medium used in the cultivation is "199" supplemented with 15% fetal bovine serum containing a moderate amount of antibiotics. The incubation temperature is at 25-28°C. A substrain of single epithelial-like cells is also obtained from ZC-7901 cells of 11th generation, which is named substrain ZC-7901S<sub>1</sub>.

At present both the strain and substrain have been maintained in proliferation for over 22 months through 120 and 90 generations respectively, and the cells of them are able to reproduce with approximately  $1.5 \times 10^5$  cells per millilitre in concentration. About 4 days, a monolayer cells can be found clearly in the culture. After 36 hours, the index of mitotic division of the ZC-7901 is 36.5%, while that of the ZC-7901S<sub>1</sub> is 32.3%; and then at 156 hours after propagation the former is gradually decreased to 12.3% and the latter to 14.3%. The chromosome number of each cell in these two strains is  $2n = 48$ .

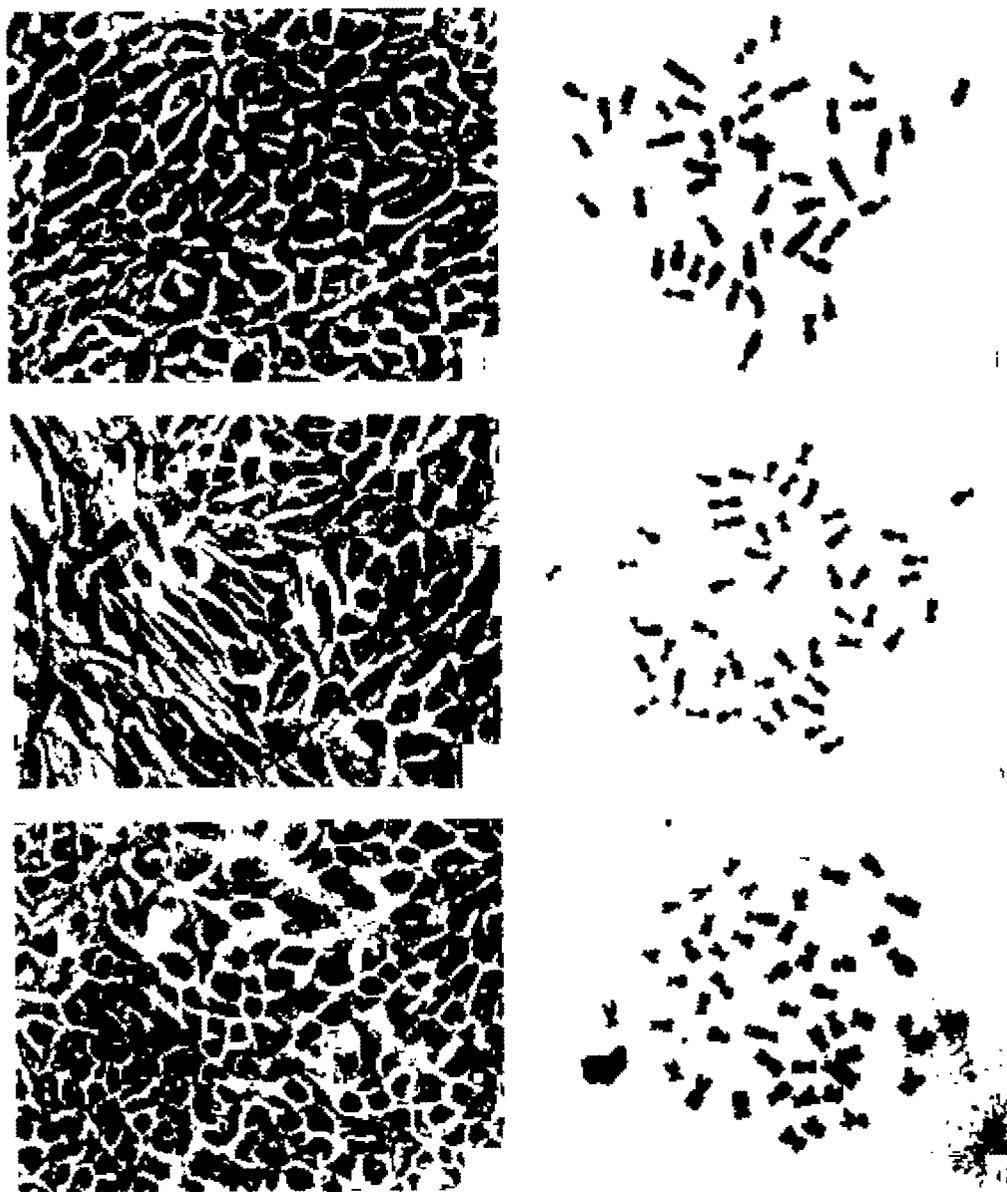


图 版

1. 原代草鱼的吻端细胞活体照相,  $\times 200$
2. 第50代 ZC-7901 细胞, H. 16, 染色标本照相,  $\times 300$
3. 第20代 ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞, H. 16, 染色标本照相,  $\times 300$
4. 原代草鱼的吻端细胞的染色体。
5. ZC-7901 细胞的染色体。
6. ZC-7901S<sub>1</sub> 细胞的染色体。