

17-22

马氏珠母贝外套膜组织培养的条件和方法初探*
A Preliminary Study on the Suitable
Conditions and Methods of the Mantle Tissue
Culture of the Pearl Oyster *Pinctada martensii*

王爱民 苏琼 阎冰 陈晓汉
Wang Aimin Su Qiong Yan Bing Chen Xiaohan

Q959.223.1

(广西海洋研究所 北海市南珠东路 536000)
(Guangxi Institute of Oceanography, East Nanzhu Road, Beihai, 536000)

刘汀
Liu Ting

(武汉大学生命科学院 武汉 珞珈山 430072)
(Life Science College, Wuhan University, Wuhan, 430072)

A 摘要 经过反复试验, 筛选出适宜于马氏珠母贝外套组织培养的平衡盐溶液 (改进的 MMBSS)、基本培养基; 确立了防止污染的组织净化方法, 并筛选出一种能促进细胞生长的贴壁物质 (SM)。其主要培养方法为: 用含抗生素的改进 MMBSS (青霉素 2000 U/ml, 链霉素 2500 U/ml) 洗涤 10 次, 再用不含抗生素的改进 MMBSS 清洗 5 次, 将组织切成 3 mm × 3 mm 的小块, 贴于含 0.5% SM 的培养瓶底, 加入改进的贝培养基, 在 20℃, pH6.8 条件下培养。经这种条件和方法培养的马氏珠母贝外套膜组织, 4 小时细胞开始游离, 3 天游离出来的细胞铺满瓶底, 4 天细胞分泌珍珠质, 培养 7 天大量的成纤维细胞出现, 细胞培养能持续数十天。

关键词 马氏珠母贝 外套膜 组织培养 条件 方法

贝类

Abstract Balance salt solution (BSS) based on the MMBSS and culture medium for the mantle tissue culture of the pearl oyster, *Pinctada martensii* were selected after repeated experiments. A decontaminating method for the culture was established, and a sticking material (SM) promoting the culture cells growth was also screened. The culture method for the mantle tissue of the pearl oyster is as follows. The strips of mantle tissue were rinsed 10 times with improved MMBSS containing 2000U/ml penicillin and 2500U/ml strep-

1995-06-19 收稿。

* 国家科委地方重大科技攻关项目

tomysin, and were washed 5 times with improved MMBSS without antibiotic, and then cut out into 3 mm×3 mm pieces. The tissue fragments were inoculated in the culture flasks covered with 0.5% SM, and 3 ml culture medium was added to each culture. The cultures were incubated at 20°C and pH 6.8. Four hours after initiation of the culture the epithelial-like cells began to migrate out from the explants. After 3ds culture, numerous epithelial-like cells were massed on the flask. By 4ds the pearl materials were secreted by the epithelial-like cells. After 7ds culture, fibroblast-like cells also began outward migration from the explants. The culture of mantle tissue can be maintained several ten days.

Key words *Pinctada martensii*, Pearl oyster, mantle, tissue culture, condition and method

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*), 又称合浦珠母贝, 是北部湾生产海水珍珠的主要贝类, 所产的“南珠”以质地细腻凝重、光润晶莹、浑圆剔透而驰名中外。珍珠养殖已成为广西沿海经济发展的支柱产业之一。

海水珍珠均为有核珍珠, 是经外套膜植片法培育的。这种方法由日本人西川藤吉于 1907 年发明的^[1], 但一直沿用至今未做过明显改进^[2]。所谓外套膜植片法, 即用人工手术将珍珠母贝外套膜组织分割成小片, 移植到育珠贝的组织中, 并植入珠核, 被植入的外套膜上皮经移行、增殖、包裹珠核形成珍珠囊, 尔后上皮细胞在珠核表面分泌珍珠质, 从而形成人工有核珍珠。

我国海水珍珠的人工养殖始于 50 年代, 经过几十年的发展, 生产规模不断扩大, 但珍珠的质量和产量却始终徘徊不前, 甚至滑坡, 成为困扰珍珠养殖业亟待解决的首要问题。造成这种状况的原因一方面是珍珠贝育苗中近亲繁殖, 使种质退化, 以及育珠期缩短, 影响了珍珠的质量; 另一方面是传统的外套膜植片法技术中固有的缺点, 导致育珠贝死亡率高、吐核率高、优珠率低, 影响珍珠质量和产量的进一步提高。有鉴于此, 有必要寻找新的育珠方法。根据珍珠囊形成的原理, 运用现代组织培养技术及生物工程技术, 体外培养珍珠囊, 插囊育珠, 以及进一步进行体外培育珍珠(试管珍珠), 也许是从根本上提高海水珍珠质量和产量的最佳方案。外套膜的组织培养是这些研究工作的最基本的前提。国内在淡水育珠蚌^[3,4], 国外在日本马氏珠母贝的外套膜的组织培养均获得了成功^[5,6]。我们根据本实验室的条件, 建立了一套较完善的马氏珠母贝外套膜组织培养的技术, 使培养结果令人满意, 现将结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用马氏珠母贝购于北海市营盘镇黄稍淡水口湛海珍珠养殖场, 为 1~2 龄的育珠贝。

1.2 实验方法

1.2.1 配制海水贝类的平衡盐溶液 (MMBSS)

(1) 按町井昭等的方法配制^[7] 每升中含有: NaCl 26.22g; KCl 1.08g; MgSO₄ 3.18g; MgCl₂ 2.20g; CaCl₂ 1.12g; NaHCO₃ 0.30g; NaH₂PO₄ 0.044g; 蔗糖 0.30g。

(2) 改进的 MMBSS 将町井昭等的 MMBSS 中的 CaCl_2 除去, 单独配制成 0.5% CaCl_2 溶液, 使用时, 每 100 ml MMBSS 中加 4 ml 0.5% CaCl_2 , 使其 CaCl_2 的最终浓度达到 0.02 g/ml。

1.2.2 配制外套膜组织培养基 按表 1 的配方配制町井昭法培养基和改进的培养基。

1.2.3 组织净化处理方法

首先, 除去实验用贝表面附着的脏物, 在实验室内用过滤海水充气暂养, 不投饵, 每天换水 2 次, 2 天后使用。实验时, 将贝用 70% 酒精浸泡 30 秒, 用手术刀切开闭壳肌中部, 在无菌室中切下外套膜, 并除去裙带部分, 置无菌海水中待处理。

将外套膜组织分别放入表 2 含不同种类抗生素的改进 MMBSS 洗涤 10 次, 然后用无抗生素的改进 MMBSS 清洗 5 次, 把处理后的外套膜组织切成 3 mm × 3 mm 的小块, 分别置于培养瓶中, 每个培养瓶底部贴 9 块组织块, 加入改进的培养基 3 ml, 置 20℃ 培养箱中培养, 5 天后检查污染情况。

1.2.4 培养温度和 pH 值的筛选

(1) 温度 五组材料, 每组 4 瓶, 分别用温度为 10℃、15℃、20℃、25℃和 30℃培养, 每日观察细胞生长情况。

(2) pH 值 五组材料, 每组 4 瓶, 分别用值为 pH 6.5, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 的培养基培养, 每日观察细胞生长情况。

1.2.5 细胞贴壁物质——SM 的作用

用浓度分别为 2%、1%、0.5%和 0.25%的 SM 处理培养瓶底, 与未处理的培养瓶对照, 检查培养 48 小时后组织块的贴壁情况。

2 结果与讨论

2.1 组织净化的效果

由于贝类的内脏团直接同环境——海水相接触, 因而外套膜粘有大量的细菌、霉菌、藻类和原生动物, 在组织培养中极易造成污染^[6]。清洗不干净或抑菌不彻底, 往往造成组织培养污染, 使组织培养失败。从本试验结果(表 3)看, 单独使用一种抗生素, 并不能有效地防止污染, 每次培养总会出现污染。同时使用高浓度的青霉素和链霉素可使污染率降低到最低、甚至无污染。尽管用无菌的 MMBSS (无抗生素) 充分洗涤组织, 但无法除去和抑制污染。在培

表 1 两种不同的珍珠贝外套膜培养基

成 份	町井昭法 ^[7]	改进的培养基
TC199 × 10 (贮存液)	1.0	1.0
补充盐溶液*	25.0	
水解乳蛋白 (10%)	5.0	5.0
珍珠贝体液	10.0	10.0
胎牛血清	10.0	10.0
NaHCO_3 (5%)		0.7
卡那霉素 (0.1g/ml)	0.1	0.05
青霉素 ($2 \times 10^5 \text{U/ml}$)		0.05
链霉素 ($2.5 \times 10^5 \text{U/ml}$)		0.05
蒸馏水	48.2	
改进的 MMBSS		74

* 补充盐溶液: NaCl 102.4g; KCl 1.8g; CaCl_2 5.1g; MgCl_2 11.8g; MgSO_4 16.7g; 蒸馏水 1000ml.

表 2 含不同抗生素的改进 MMBSS

成 份	A	B	C	D
改进的 MMBSS (ml)	200	200	200	200
青霉素 (U/ml)	2000	2000		
链霉素 (U/ml)	2500	2500		

养中霉菌污染最常见、细菌污染较少，说明单独使用抗生素仅抑制细菌污染、同时使用两种或多种抗生素既能抑制细菌污染，又能抑制霉菌污染。

上述净化过程虽能抑制细菌和霉菌，但对原生动不起作用。所幸的是培养数天后，原生动因不适应培养环境会自动死亡。因此，原生动的污染不会影响整个培养过程。

培养组织用含高浓度抗生素的 MMBSS 处理后，要用不含抗生素的 MMBSS 清洗数次，以除去组织中残留的抗生素，因高浓度抗生素会抑制组织块中细胞的生长和迁移。

2.2 培养基的筛选

通过对两种不同配制方法的培养基（表 1）进行比较，筛选合适的培养基。一是直接用町井昭等的方法，此法所用盐溶液为补充盐溶液，二是在不改变前法有机成份的基础上，用改进的 MMBSS 代替补充盐溶液，并增加青霉素和链霉素两种抗生素。经反复试验表明，町井昭等的培养基不适应本实验条件及我区马氏珠母贝外套膜的培养，因补充盐溶液浓度过高，常发生结晶沉淀，有过饱和现象，细胞生长及迁出较少，而且细胞极度收缩；而用本实验室配制的培养基，细胞生长及游离出来较多，细胞形态正常，上皮细胞占绝对优势。我们根据珍珠贝外套膜，特别是上皮细胞钙代谢旺盛的特点^[8]，降低培养基中钙离子浓度，对细胞培养是有益的。体外培养外套膜上皮细胞使原来的钙代谢途径发生改变，因无钙运输通道，仅能将碳酸钙等直接排到细胞外，若碳酸钙积累过快、过多，细胞则无法转运，使细胞内碳酸钙沉淀积累，导致细胞衰老和死亡。另外，培养基中钙离子的降低，能促进细胞从组织块中迁移出来，因为钙离子是细胞连接的重要物质，降低钙浓度、能使细胞连接疏松^[9]。

增加培养基中抗生素的种类和降低抗生素浓度，能有效地综合防止污染，又不会对细胞产生影响。

2.3 培养温度和 pH 值的确定

在体外组织培养中温度和 pH 值是两个重要的环境因子。经多次试验，结果分别以表 4 和表 5 表示。珍珠贝外套膜组织培养的最适温度为 20℃ 左右，最适 pH 值为 6.8~7.0。

由于贝类属于变温动物，其生长与环境的变化相关，因此对温度和 pH 值的变化有较强的耐受力。在体外培养中，外套膜组织对温度和 pH 值的最适应范

围较为狭窄；温度低于 15℃ 时，细胞虽能生长，但生长缓慢，细胞游离出来的较少，温度高于 25℃，则细胞明显老化，大量死亡，呈团块状结构。pH 值高于 7.2，细胞从组织块中迁移出来的较少，pH 值低于 6.5，细胞的生长明显受到抑制。pH 值在 6.8 左右，培养的外套膜组织块周围有大量粘液分泌，粘液有刺激细胞生长的作用。在培养中可依据粘液的分泌状况来判断 pH 值是否合适。

我们的结果同日本学者町井昭在日本马氏珠母贝上得到的结果不一致，日本马氏珠母贝

表 3 含不同种类抗生素的改进 MMBSS 对组织培养的影响

组 别	A	B	C	D
培养瓶数	8	7	8	5
污 染 数	0	2	2	5
污 染 率 (%)	0	28.5	25	100

表 4 不同温度对外套膜细胞生长的影响

温度	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
生长*	+	+	+++	++	+

*: +, 差; ++, 好; +++, 很好。

表 5 不同 pH 值对外套膜组织细胞生长的影响

pH 值	6.5	6.8	7.0	7.2	7.4
生长*	++	+++	+++	++	+

*: +, 差; ++, 好; +++, 很好。

外套膜组织培养最适温度为 25℃, 最适 pH 值为 7.4~7.6^[7]。这种差异可能是不同种群对环境的不同适应性造成的。

2.4 细胞贴壁物质的效果

SM 是从海洋生物体内提取的大分子物质, 天然、无毒、具组织相容性以及能形成网状膜结构, 故选用它作为贴壁物质。从试验中可看出, 经 SM 处理的培养瓶, 组织块贴壁明显加强, 尤其以浓度为 0.5% 者效果最佳 (表 6), 在观察中发现, 细胞从组织块中迁移的速度及数量都明显地好于对照组, 并能使悬浮细胞贴壁, 因此, 用 SM 解决了组织培养中常见的组织和细胞悬浮现象。

在组织培养中, 最常见的细胞贴壁因子有纤粘蛋白、多聚赖氨酸, 血清铺层因子和冷不溶球蛋白等^[9], 但这类物质提取困难, 商品价值昂贵, 我们选用的 SM 制备方便, 价格低廉、效果明显, 因此除用于

表 6 SM 对外套膜组织贴壁的影响

SM 浓度	2%	1%	0.5%	0.25%	对照
组织块数	24	25	24	26	26
贴壁数	19	20	22	21	3
贴壁率 (%)	79	80	91	81	11.5

细胞培养外, 还可能发展成一种在珍珠养殖上处理珠核、促进育珠小片贴核、促进上皮细胞迅速生长形成珍珠的产品。

2.5 外套膜组织培养中细胞的生长状况

根据本实验室的条件, 通过反复试验、筛选, 确定了一套马氏珠母贝外套膜组织培养的方法: 用含抗生素的改进 MMBSS (青霉素 2000U/ml, 链霉素 2500U/ml) 洗涤外套膜组织 10 次, 再用无抗生素的改进 MMBSS 清洗 5 次, 将组织块切成 3mm² 的小块, 贴于涂有 0.5% SM 的培养瓶底, 加入改进的贝培养基。在 20℃, pH6.8 条件下培养, 每两日更换一次培养基。

利用本实验的培养技术, 马氏珠母贝外套膜培养 4 小时后, 上皮细胞从组织块向四周迁移 (图 1); 培养 30 小时, 游离细胞不断增加 (图 2); 培养到第 3 天游离的上皮细胞在局部区域铺满培养瓶底 (图 3); 培养到第 6 天, 从组织块中迁移出成纤维细胞 (图 4); 以后部分细胞开始衰老, 但大多数细胞仍保持生长状态, 可持续数十天 (图 5)。培养组织分泌珍珠质从培养的第 4 天开始, 旺盛的分泌活动持续时间较长。因此, 本实验室建立的马氏珠母贝外套膜组织培养技术是较成功的。



图 1 培养 4 小时的外套膜组织块 (×300)

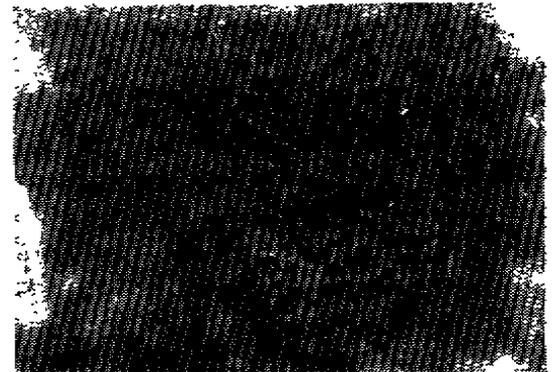


图 2 培养 30 小时的外套膜组织块 (×300)

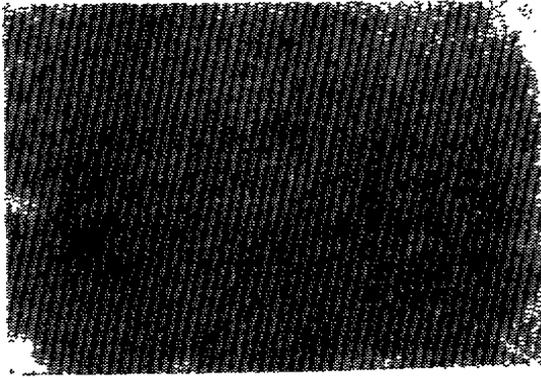


图 3 培养 3 天, 大量的上皮细胞 ($\times 300$)

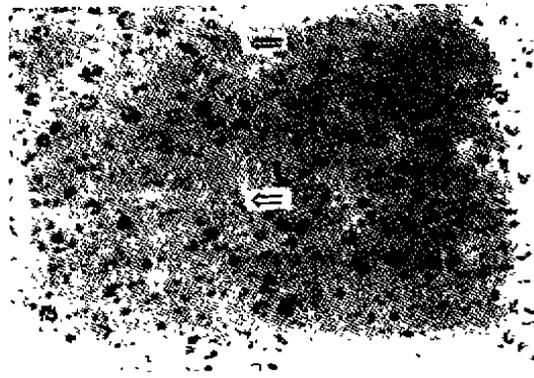


图 4 培养 6 天, 出现的成纤维细胞 ($\times 120$, 箭头所示)

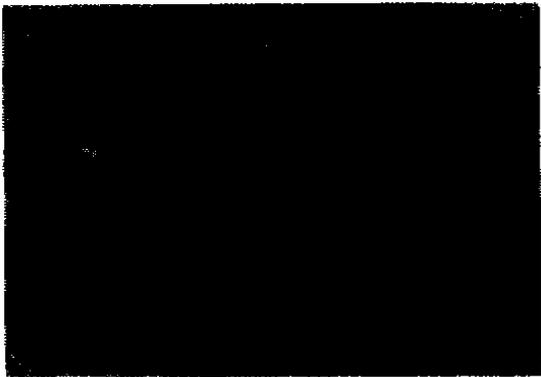


图 5 培养 30 天的细胞 ($\times 120$)

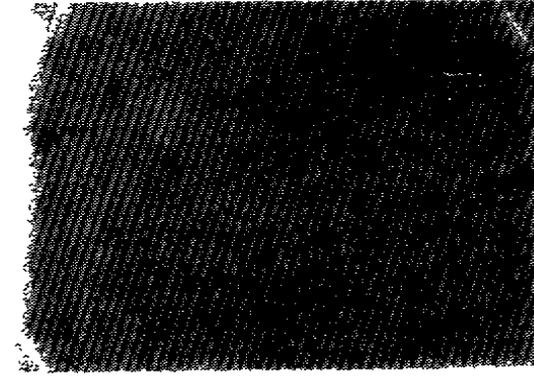


图 6 培养 10 天, 细胞分泌的物质 (折光) 相差照片 ($\times 180$)

参 考 文 献

- 1 小林新二郎, 渡部哲光著, 熊大仁译. 珍珠的研究. 北京: 农业出版社, 1966: 57~58.
- 2 町井 昭. 真珠の培养, 组织培养, 1989, 15 (4): 144~147.
- 3 石安静. 河蚌外套膜的组织培养. 水产学报, 1983, 7 (2): 155~157.
- 4 刘绍龙, 石安静. 育珠贝外套膜组织培养适宜条件的研究. 四川大学学报 (自然科学版), 1993, 30 (1): 107~114.
- 5 町井 昭. 真珠袋形成に関する组织学的研究. 国立真珠研究所报告, 1968, (13): 1489~1539.
- 6 町井 昭. 贝的组织培养. 蛋白质 核酸 酵素, 1989, 34 (3): 193~196.
- 7 Machii A, Wada, K T. Some marine invertebrate tissue culture. Invertebrate Cell System Application. Vol. II. ed. by JMitsuhashi Florida, CRC Press. 1989: 225~233.
- 8 Garcia - Gasca et al. Microscopic anatomy of the mantle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). J. Shellfish Res. 1994, 13 (1): 85~91.
- 9 鄂 征. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 43~98.

(责任编辑: 莫鼎新 唐铃弟)