



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104109652 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201410317420. 2

C12N 15/873 (2010. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 04

A01K 67/027 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/91 (2006. 01)

CGMCC No. 9155 2014. 04. 29

(71) 申请人 湖南师范大学

地址 410081 湖南省长沙市岳麓区麓山路
36 号湖南师范大学生命科学学院

(72) 发明人 肖亚梅 赵小阳 周勇华 汪妹
王姿力

(74) 专利代理机构 长沙朕扬知识产权代理事务
所(普通合伙) 43213

代理人 杨斌

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010. 01)

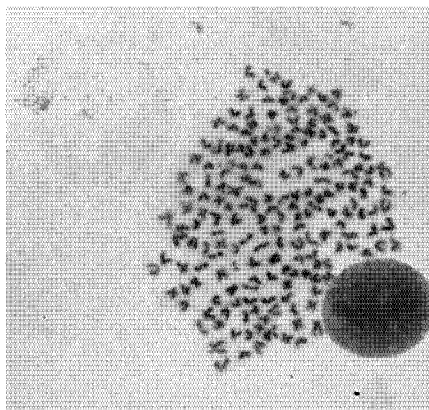
权利要求书2页 说明书6页 附图9页

(54) 发明名称

人工诱导四倍体鲫鱼细胞系及其培养方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种人工诱导四倍体鲫鱼细胞系,其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心且保藏号为 CGMCC No. 9155 的四倍体鲫鱼细胞系;其是以体外培养的二倍体鲫鱼细胞为原材料,待细胞生长密度达到 80%~90% 融合度时,再用 SP600125 进行处理,然后换成不含 SP600125 的常规培养基培养,培养传一代后再进行流式分析,测定 DNA 含量,同时检测处理培养后鲫鱼细胞的染色体倍性,经人工诱导与分选纯化得到了体外人工诱导的四倍体鲫鱼细胞系。通过诱导多能干细胞方法或者采用细胞核移植相结合的方法将本发明的四倍体鲫鱼细胞系的细胞核移植到去核卵中,可用于快速高效地创制四倍体鱼。



1. 一种人工诱导四倍体鲫鱼细胞系,其特征在于:所述人工诱导四倍体鲫鱼细胞系为保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心且保藏号为 CGMCC No. 9155 的四倍体鲫鱼细胞系。

2. 一种体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,包括以下步骤:首先,以体外培养的二倍体鲫鱼细胞为原材料,待细胞生长密度达到 80%~90% 融合度时,再用抑制剂 SP600125 加入细胞培养液中进行处理,SP600125 的处理浓度为 50~100 μ M 之间,处理时间在 48h 以上,然后换成不含 SP600125 的常规培养基培养,培养传一代后再进行流式分析,利用流式细胞仪测定 DNA 含量,同时利用细胞染色体制备工艺检测处理培养后鲫鱼细胞的染色体倍性,经人工诱导与分选纯化得到了体外人工诱导的四倍体鲫鱼细胞系。

3. 根据权利要求 2 所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其特征在于,所述二倍体鲫鱼细胞的体外培养的具体操作包括:

(1) 取尾鳍处理:以鲫鱼为对象,并从鲫鱼的尾鳍中剪取小块鳍条置于缓冲液中,对其进行反复漂洗;将漂洗后的鳍条剪碎至能在显微镜下看到游离的单个细胞即可,然后用缓冲液反复清洗,离心沉淀;

(2) 胰酶消化处理:向上述离心沉淀后的沉淀物中加入胰酶进行消化处理,至显微镜下观察有大量单细胞后,加含胎牛血清培养基终止反应,离心去上清,继续加入培养基,吸打混匀后将其均匀地铺于培养皿中,培养箱中培养后再加入新鲜培养基,第二天即在组织块周围有单层细胞长出,几天后将获得的单层细胞再次用胰酶进行消化处理,计数后直接接种于培养皿中,得到稳定的二倍体鲫鱼细胞。

4. 根据权利要求 3 所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其特征在于,所述取尾鳍处理的具体操作步骤包括:以鲫鱼为对象,先用酒精溶液消毒鲫鱼的尾鳍,然后用解剖剪从尾鳍的尾尖部剪下小块鳍条后置于含有磷酸缓冲液的培养皿中;在无菌操作台中,再用解剖镊子夹取该鳍条放到盛有酒精溶液的培养皿中进行漂洗,漂洗时间控制在 1 分钟以下;然后用解剖镊子夹取漂洗后的鳍条放入含磷酸缓冲液的 EP 管中,继续反复漂洗多次,最后一次漂洗后 EP 管中保留一定量磷酸缓冲液;将漂洗后的鳍条剪碎至能在显微镜下看到游离的单个细胞即可,然后用缓冲液反复清洗,离心沉淀。

5. 根据权利要求 3 所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其特征在于,所述胰酶消化处理的具体操作步骤包括:向所述沉淀物中先加入适量的 0.25wt% 的胰酶,消化处理 15min~30min,显微镜下观察有大量单细胞后,加入 10vol% 的胎牛血清培养基终止反应;离心去上清,继续加入适量的 DMEM 培养基,吸打混匀后将其均匀地铺于预先用明胶包被的培养皿中;再置于 28 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养至少 30min,然后再加入新鲜的 DMEM 培养基,第二天即在组织块周围有单层细胞长出,至少 7 天后将获得的单层细胞再次用 0.05wt% 的胰酶进行消化处理,计数后直接接种于明胶包被的培养皿中,再置于培养箱中继续培养即可。

6. 根据权利要求 2~5 中任一项所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其特征在于,所述体外培养的培养条件包括:细胞置于 28 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养,体外培养基为 DMEM 培养基,其中含有 10vol% 的胎牛血清、1vol% 的丙酮酸钠、1vol% 的非必需氨基酸、1vol% 的 L-谷氨酰胺、0.1vol% 的 β -巯基乙醇和 1vol% 的青霉素/链霉素。

7. 根据权利要求 2~5 中任一项所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其

特征在于,在所述抑制剂 SP600125 处理并进行传代的培养细胞中,待细胞生长密度达到 80%~90%融合度时,再次加入 50~100 μ M SP600125 进行处理 48h 以上,然后替换成不含抑制剂 SP600125 培养基培养 12h 后进行传代;按如此循环间隔处理模式培养处理 5 代以上,最后通过流式细胞仪进行流式分选,即得到体外诱导的四倍体鲫鱼细胞;再将该四倍体鲫鱼细胞继续培养传代,细胞稳定生长后再进行流式分选,直至得到纯净的四倍体鲫鱼细胞系。

8. 根据权利要求 7 所述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,其特征在于,所述流式分选的检测过程包括:利用流式细胞仪测定 DNA 含量以及利用细胞周期分析检测分选后四倍体鲫鱼细胞的增殖特性。

9. 一种如权利要求 1 所述的或者如权利要求 2~8 中任一项方法获得的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系的应用,其特征在于:通过诱导多能干细胞方法或者采用细胞核移植相结合的方法将所述四倍体鲫鱼细胞系的细胞核移植到去核卵中,用于快速高效地创制四倍体鱼。

人工诱导四倍体鲫鱼细胞系及其培养方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人工诱导鲫鱼细胞系及其培养方法和应用,尤其涉及一种人工诱导四倍体鲫鱼细胞系及体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化方法和相关应用。

背景技术

[0002] 自然界中生物通常以二倍体形式存在。然而,许多生物在其进化史上存在着多倍化事件,研究显示,脊椎动物至少经历了两轮四倍体化的过程。目前认为,通过染色体加倍来形成新的物种是一条可行的进化途径。多倍体育种作为一种重要的遗传育种和性状改良方法,它可以获得三套或者三套以上完整染色体组,从而使后代可能在生长速度、抗逆性、抗病性等方面表现出品种优势,经济效益显著。

[0003] 杂交育种是培育多倍体鱼的重要途径,但大多数杂交后代不育或育性低下,同时鱼类性成熟时间长、繁殖周期长,这严重制约了鱼类多倍体的培育。

[0004] 如何利用现代生物学手段和方法来建立快速高效的新型多倍体诱导技术体系,就成为本领域技术人员面临和需要解决的技术难题。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种可用于进行细胞学、发育遗传学、免疫学和遗传育种等领域,且具有重要科研价值和应用价值的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系,还相应提供一种流程简洁、可操作性强、诱导效率高的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提出的技术方案为一种人工诱导四倍体鲫鱼细胞系,所述人工诱导四倍体鲫鱼细胞系为保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心且保藏号为 CGMCC No. 9155 的四倍体鲫鱼细胞系。

[0007] 作为一个总的技术构思,本发明还提供一种体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,包括以下步骤:首先,以体外培养的二倍体鲫鱼细胞为原材料,待细胞生长密度达到 80%~90% 融合度时,再用 JNK 信号通路的抑制剂 SP600125 (anthrapyrazolone, $C_{14}H_8N_2O$) 加入细胞培养液中进行处理(即加入培养液中进行细胞培养),SP600125 的处理浓度为 50~100 μM (优选接近 100 μM),处理时间在 48h 以上,然后换成不含 SP600125 的常规培养基培养,培养(一般不少于 12h)传一代后再进行流式分析,利用流式细胞仪测定 DNA 含量,同时利用细胞染色体制作工艺检测处理培养后鲫鱼细胞的染色体倍性,结果表明鲫鱼细胞发生 G_2/M 期阻滞,经人工诱导与分选纯化得到了体外人工诱导的四倍体鲫鱼细胞系。

[0008] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法,优选的,所述二倍体鲫鱼细胞的体外培养的具体操作包括:

[0009] (1) 取尾鳍处理:以鲫鱼为对象,并从鲫鱼的尾鳍中剪取小块鳍条置于缓冲液中,对其进行反复漂洗;将漂洗后的鳍条剪碎至能在显微镜下看到游离的单个细胞即可,然后用缓冲液反复清洗,离心沉淀;

[0010] (2) 胰酶消化处理：向上述离心沉淀后的沉淀物中加入胰酶进行消化处理，至显微镜下观察有大量单细胞后，加含胎牛血清培养基终止反应，离心去上清，继续加入培养基，吸打混匀后将其均匀地铺于培养皿中，培养箱中培养后再加入新鲜培养基，第二天即在组织块周围有单层细胞长出，几天后将获得的单层细胞再次用胰酶进行消化处理，计数后直接接种于培养皿中，得到稳定的二倍体鲫鱼细胞系。

[0011] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法，更优选的，所述取尾鳍处理的具体操作步骤包括：以鲫鱼为对象，先用酒精溶液消毒鲫鱼的尾鳍，然后用解剖剪从尾鳍的尾尖部剪下小块鳍条后置于含有磷酸缓冲液 (PBS) 的培养皿中；在无菌操作台中，再用解剖镊子夹取该鳍条放到盛有酒精溶液的培养皿中进行漂洗，漂洗时间控制在 1 分钟以下；然后用解剖镊子夹取漂洗后的鳍条放入含磷酸缓冲液的 EP 管中，继续反复漂洗多次，最后一次漂洗后 EP 管中保留一定量磷酸缓冲液；将漂洗后的鳍条剪碎至能在显微镜下看到游离的单个细胞即可，然后用缓冲液反复清洗，离心沉淀。

[0012] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法，更优选的，所述胰酶消化处理的具体操作步骤包括：向所述沉淀物中先加入适量的 0.25wt% 的胰酶，消化处理 15min ~ 30min，显微镜下观察有大量单细胞后，加入 10vol% 的胎牛血清培养基终止反应；离心去上清，继续加入适量的 DMEM 培养基，吸打混匀后将其均匀地铺于预先用明胶 (gelatine) 包被的培养皿中；再置于 28℃、5% CO₂ 的培养箱中培养至少 30min，然后再加入新鲜的 DMEM 培养基，第二天即在组织块周围有单层细胞长出，至少 7 天后将获得的单层细胞再次用 0.05wt% 的胰酶（由于是原代培养的细胞所以此处优选低浓度的胰酶）进行消化处理，计数后直接接种于明胶包被的培养皿中，再置于培养箱中继续培养即可。

[0013] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法，优选的，所述体外培养的培养条件包括：细胞置于 28℃、5% CO₂ 的培养箱中培养，体外培养基为 DMEM 培养基，其中含有 10vol% 的胎牛血清 (FBS)、1vol% 的丙酮酸钠、1vol% 的非必需氨基酸 (NEAA)、1vol% 的 L-谷氨酰胺、0.1vol% 的 β-巯基乙醇和 1vol% 的青霉素 / 链霉素 P/S (penicillin/streptomycin)。

[0014] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法，优选的，在所述抑制剂 SP600125 处理并进行传代的培养细胞中，待细胞生长密度达到 80% ~ 90% 融合度时，再次加入 50 ~ 100 μM SP600125 进行处理 48h 以上，然后替换成不含抑制剂 SP600125 培养基培养 12h 后进行传代；按如此循环间隔处理模式培养处理 5 代以上（循环间隔即是指加 SP600125 进行处理培养与不加 SP600125 进行常规培养的轮换交替进行），最后通过流式细胞仪进行流式分选，即得到四倍体鲫鱼细胞；再将该四倍体鲫鱼细胞继续培养传代，细胞稳定生长后再进行流式分选，直至得到纯净的四倍体鲫鱼细胞系。

[0015] 上述的体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法，优选的，所述流式分选的检测过程包括：利用流式细胞仪测定 DNA 含量以及利用细胞周期分析检测分选后四倍体鲫鱼细胞的增殖特性。

[0016] 作为一个总的技术构思，本发明还提供一种的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系的应用，通过诱导多能干细胞 (iPSCs) 方法或者采用细胞核移植相结合的方法将所述四倍体鲫鱼细胞系的细胞核移植到去核卵中，用于快速高效地创制四倍体鱼。

[0017] 与现有技术相比，本发明的优点在于：本发明的上述技术方案中，原材料鲫鱼隶属

于鲤科 (Cyprinidae)、鲫属 (Carassius)、鲫种 (Carassius auratus) 中的二倍体鱼 ($2n = 100$), 而本发明通过 SP600125 诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化, 成功获得了四倍体鲫鱼细胞系, 本发明体外诱导获得的四倍体鲫鱼细胞系可用于进行细胞学、发育遗传学、免疫学和遗传育种等理论研究, 以及通过与诱导多能干细胞 (iPSCs) 相结合的方法, 或者采用细胞核移植技术将体外诱导四倍体细胞的细胞核移植到去核卵中, 开展创制四倍体鱼的应用研究。本发明体外诱导四倍体鲫鱼细胞系的建立具有明显的科学价值和重要的潜在经济价值。另外, 本发明也克服了鱼类性成熟时间长、繁殖周期长等制约多倍体研制的因素; 本发明建立的体外诱导四倍体鲫鱼细胞培养、分选和纯化技术, 不仅流程简洁、可操作性强, 而且具有诱导效率高的优点, 具有良好的应用前景。

[0018] 本发明中的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系于 2014 年 4 月 29 日提交中国北京中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC) 进行保藏, 保藏的生物材料名称为 4NfinP9, 分类命名为人工诱导四倍体鲫鱼细胞系, 保藏编号为 CGMCC No. 9155。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案, 下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍, 显而易见地, 下面描述中的附图是本发明的一些实施例, 对于本领域普通技术人员来讲, 在不付出创造性劳动的前提下, 还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0020] 图 1 为本发明实施例中二倍体鲫鱼细胞体外原代培养 P_0 后的显微照片。

[0021] 图 2 为本发明实施例中二倍体鲫鱼细胞体外传代培养 P_5 后的显微照片。

[0022] 图 3 为本发明实施例中对照组的二倍体鲫鱼细胞经培养后的显微照片。

[0023] 图 4 为本发明实施例中 SP600125 处理后的二倍体鲫鱼细胞经 48h 培养后的显微照片。

[0024] 图 5 为本发明实施例中对照组的二倍体鲫鱼细胞经培养后的流式图。

[0025] 图 6 为本发明实施例中 SP600125 处理后的二倍体鲫鱼细胞经 48h 培养后的流式图。

[0026] 图 7 为本发明实施例中对照组的二倍体鲫鱼细胞经常规培养多代后的流式图。

[0027] 图 8 为本发明实施例中 SP600125 处理后的二倍体鲫鱼细胞经循环间隔培养多代后的流式图。

[0028] 图 9 为本发明实施例中 SP600125 处理后经循环间隔培养多代后获得的四倍体鲫鱼细胞继续培养的 P_1 代的显微照片。

[0029] 图 10 为本发明实施例中 SP600125 处理后经循环间隔培养多代后获得的四倍体鲫鱼细胞继续培养的 P_2 代的显微照片。

[0030] 图 11 为本发明实施例中 SP600125 处理后经循环间隔培养多代后获得的四倍体鲫鱼细胞继续培养的 P_3 代的流式分选纯化图。

[0031] 图 12 为本发明实施例中对照组二倍体鲫鱼细胞经常规培养至 P_3 代的流式图。

[0032] 图 13 为本发明实施例中 SP600125 处理后经循环间隔培养多代后获得的四倍体鲫鱼细胞继续培养的 P_3 代的显微照片 (10X)。

[0033] 图 14 为本发明实施例中 SP600125 处理后经循环间隔培养多代后获得的四倍体鲫鱼细胞继续培养的 P₃ 代的显微照片 (20X)。

[0034] 图 15 为本发明实施例中对照组二倍体鲫鱼细胞 (2n = 100) 的核型分析图 (100X)。

[0035] 图 16 为本发明实施例中体外诱导四倍体鲫鱼细胞 (4n = 200) 的核型分析图 (100X)。

具体实施方式

[0036] 为了便于理解本发明,下文将结合说明书附图和较佳的实施例对本发明作更全面、细致地描述,但本发明的保护范围并不限于以下具体的实施例。

[0037] 除非另有定义,下文中所使用的所有专业术语与本领域技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的专业术语只是为了描述具体实施例的目的,并不是旨在限制本发明的保护范围。

[0038] 除有特别说明,本发明中用到的各种试剂、原料均为可以从市场上购买的商品或者可以通过公知的方法制得的产品。

[0039] 实施例:

[0040] 一种本发明的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系,该人工诱导四倍体鲫鱼细胞系为保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心且保藏号为 CGMCC No. 9155 的四倍体鲫鱼细胞系。

[0041] 上述本实施例的人工诱导四倍体鲫鱼细胞系是通过以下体外诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化的方法获得,具体包括以下步骤:

[0042] 1. 建立稳定的二倍体鲫鱼细胞系:

[0043] 1.1 取尾鳍处理:选取年幼健康生命力旺盛的鲫鱼一条,在细胞培养室的准备间内,用 75% 的酒精溶液消毒该实验鲫鱼的尾鳍,然后用解剖剪从尾鳍的尾尖部剪下一小块 (约 1cm²) 的鳍条放到含有 PBS 的 35mm 培养皿中,并放在无菌操作台中;再用解剖镊子夹取鳍条放入盛有 75% 酒精溶液的 35mm 培养皿中,并夹住鳍条在培养皿中左右漂洗数十次,漂洗杀菌时间控制在 1 分钟以下,之后用解剖镊子夹取漂洗后的鳍条放入含 PBS 的 1.5ml EP 管中,继续反复漂洗 3 次,每次 30 秒,最后一次漂洗后 EP 管中保留大约 150 μl 的 PBS 到下一步骤中使用。

[0044] 1.2 破碎处理:将漂洗后的鳍条采取机械剪碎至能在显微镜下看到游离的单个细胞,然后用缓冲液反复清洗,离心沉淀;具体操作是,在上述步骤 1.1 后装有鳍条的含 150 μl PBS 的 1.5ml EP 管中,用无菌的解剖剪刀将鳍条剪碎成极碎的小块,直到在显微镜下能看到游离的单个细胞即可停止,然后加入 1ml 的 PBS 进行清洗,1200rpm 离心 3min,之后吸走上清再重复清洗一次,得到沉淀物。

[0045] 1.3 胰酶消化处理:向上述离心沉淀后的沉淀物中加入适量的 0.25wt% 胰酶进行消化处理 15min ~ 30min,至显微镜下观察有大量单细胞消化出来以后,加入含 10vol% FBS 的胎牛血清培养基终止反应,1200rpm 离心 3min,去上清,继续加入 200 μl DMEM 培养基 (含 10% vol FBS+1vol% 的 P/S),吸打混匀后将其均匀地铺于预先用 0.2wt% 明胶包被的 35mm 培养皿中,将培养皿置于 28℃、5% CO₂ 的培养箱中培养至少 30min,再加入 1.5ml 新鲜的

DMEM 培养基,第二天即可看到组织块周围有单层细胞长出;大约一周后将获得的单层细胞用 0.05wt% 的胰酶消化后计数直接接种在 0.2wt% 明胶包被的培养皿中,再置于 28℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,得到稳定的二倍体鲫鱼细胞系。

[0046] 2. 体外培养:

[0047] 以上述步骤 1 建立的二倍体鲫鱼细胞系为原材料,采用培养箱进行体外培养,体外培养的培养条件包括:培养温度 28℃,培养气氛 5% CO₂;体外培养基为 DMEM 培养基,其中还有含 10vol% 的胎牛血清、1vol% 的丙酮酸钠、1vol% 的非必需氨基酸 (NEAA)、1vol% 的 L-谷氨酰胺、0.1vol% 的 β-巯基乙醇和 1vol% 的青霉素/链霉素 P/S。该二倍体鲫鱼细胞体外原代培养 P₀ 和传代培养 P₅ 后的显微照片分别如图 1 和图 2 所示。

[0048] 3. SP600125 处理:

[0049] 待体外培养后的细胞生长密度达到 80%~90% 融合度时,加入 SP600125 进行处理,SP600125 的处理浓度为 100 μM,处理时间为 48h。另取一组加入 1% 的 DMSO (二甲基亚砜) 作为对照组。

[0050] 4. 常规培养:

[0051] 经过上述的 SP600125 处理后换成不含 SP600125 的常规培养基进行培养,培养 12 小时后进行传代。此时,正常的二倍体鲫鱼细胞 (对照组) 和本实施例 SP600125 处理 48h 后的鲫鱼细胞的显微照片分别如图 3 和图 4 所示。将得到的细胞用流式细胞仪进行分选,可以获得体外诱导的多倍体鲫鱼细胞。体外诱导的多倍体鲫鱼的形态特征通过普通的倒置显微镜进行观察,增殖特征和多倍化细胞的分选都通过流式细胞仪进行分析和分选,对照组和本实施例的分析结果分别如图 5 和图 6 所示,图 5 和图 6 表明,本发明中 SP600125 的处理诱导细胞周期发生 G₂/M 阻断,获得了体外诱导多倍化鲫鱼细胞。且检测结果表明,获得的细胞形态比正常二倍体细胞大,增殖速度比正常二倍体细胞慢,这为后续体外诱导四倍体鲫鱼细胞系的培养奠定了坚实的基础。

[0052] 5. 循环间隔培养:

[0053] 在上述培养传一代后,待细胞生长密度达到 80%~90% 融合度时,再次加入 100 μM 的 SP600125 进行处理;按如此循环间隔处理模式培养处理 5 代以上 (循环间隔即是指加 SP600125 进行处理培养与不加 SP600125 进行常规培养的轮换交替进行)。

[0054] 6. 分选检测:

[0055] 最后通过流式细胞仪对上述循环间隔培养后的鲫鱼细胞系进行流式分选,对照组和本实施例的分析结果分别如图 7 和图 8 所示,图 7 和图 8 表明,本发明中 SP600125 的处理诱导细胞周期发生 G₂/M 阻断,获得体外诱导四倍体鲫鱼细胞;再将该四倍体鲫鱼细胞继续培养传代,培养的 P₁ 代和 P₂ 代的显微照片分别如图 9 和图 10 所示,培养到第三代后细胞稳定生长,再进行流式分选,直至得到纯净的四倍体鲫鱼细胞系;培养的 P₃ 代的流式分选图如图 11 所示 (图 12 为对照组正常二倍体鲫鱼的流式图),分选纯化得到的纯净的四倍体鲫鱼细胞系的显微照片如图 13 和图 14 所示。流式分选包括利用流式细胞仪测定 DNA 含量,同时利用细胞染色体制备工艺检测处理培养后鲫鱼细胞的染色体倍性,经诱导分选得到了多倍化的鲫鱼细胞系。

[0056] 通过显微观察、细胞染色体制备技术、流式细胞测定法对本实施例体外诱导获得的四倍体鲫鱼细胞主要生物学特性进行研究,以上附图及照片的结果显示:显微观察细胞

形态正常,生长稳定,细胞形态比正常二倍体细胞大,增殖速度比正常二倍体细胞慢;细胞染色体制片得到的四倍体细胞系 $4n = 200$ (参见图 15 和图 16),流式细胞分选表明得到的为四倍体细胞。

[0057] 上述本发明实施例利用体外培养的二倍体鲫鱼尾鳍为材料,通过 SP600125 处理产生 G_2/M 期阻断,从而高效地诱导二倍体鲫鱼细胞多倍化;再通过分选和纯化,获得了体外诱导四倍体鲫鱼细胞系。目前体外诱导四倍体鲫鱼细胞已连续传了 5 代,形成了一个稳定的体外诱导四倍体鲫鱼细胞系 ($4n = 200$)。

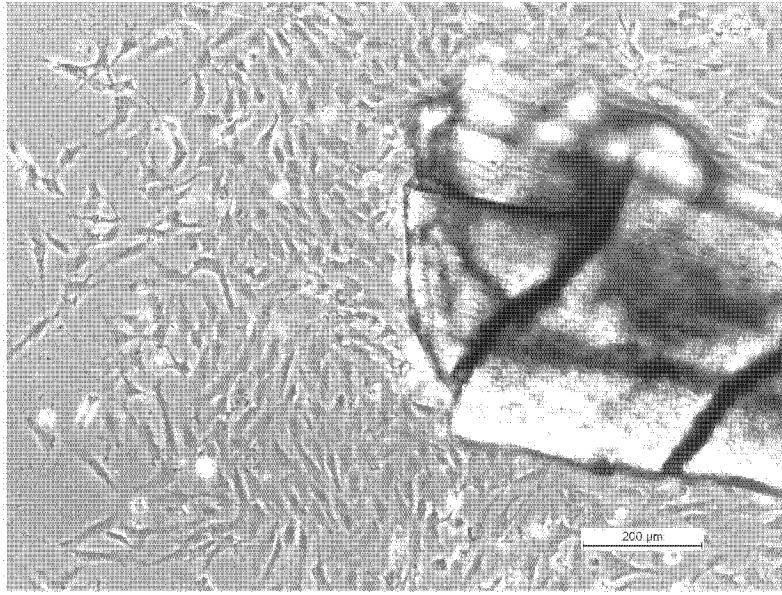


图 1

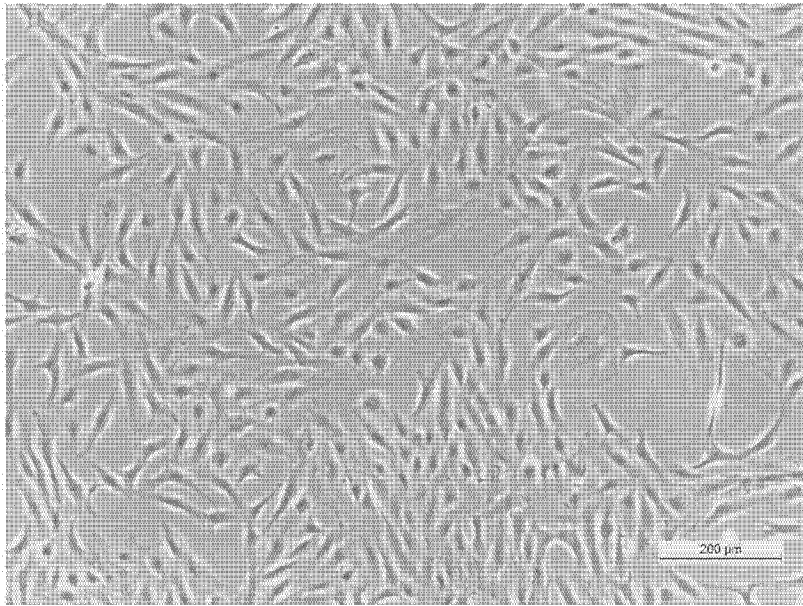


图 2

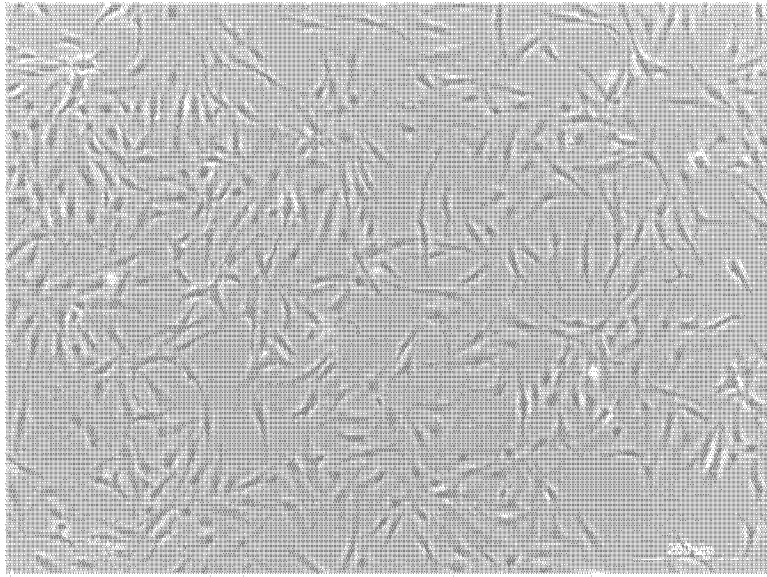


图 3

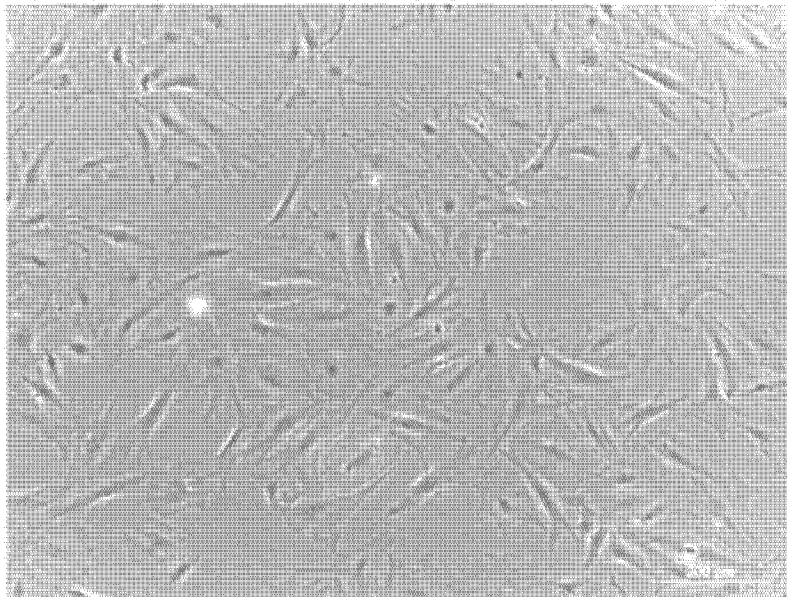


图 4

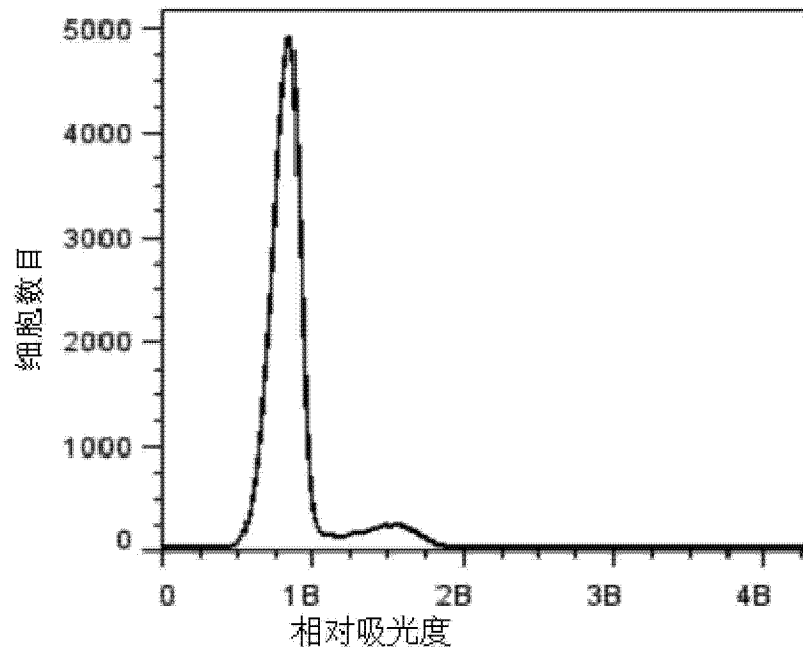


图 5

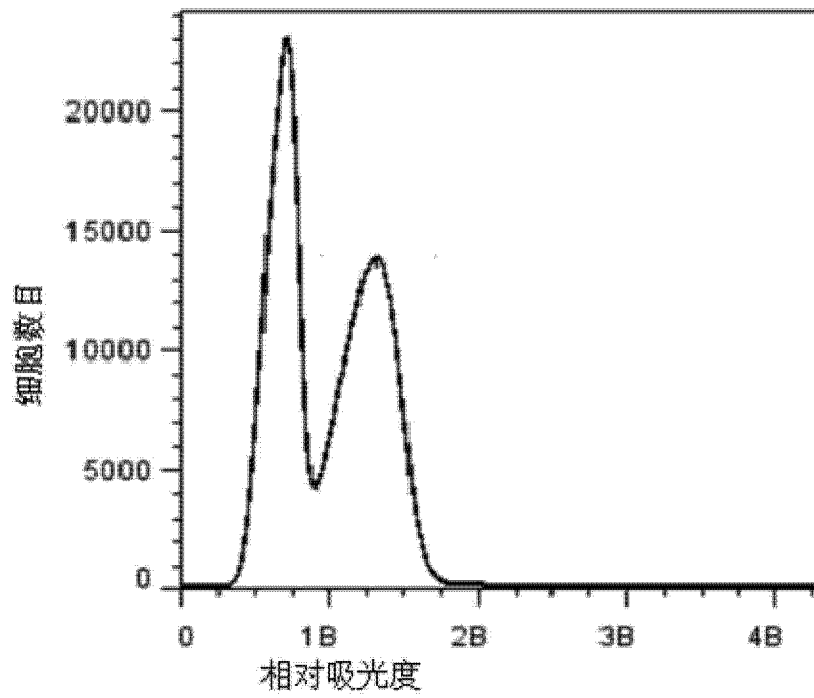


图 6

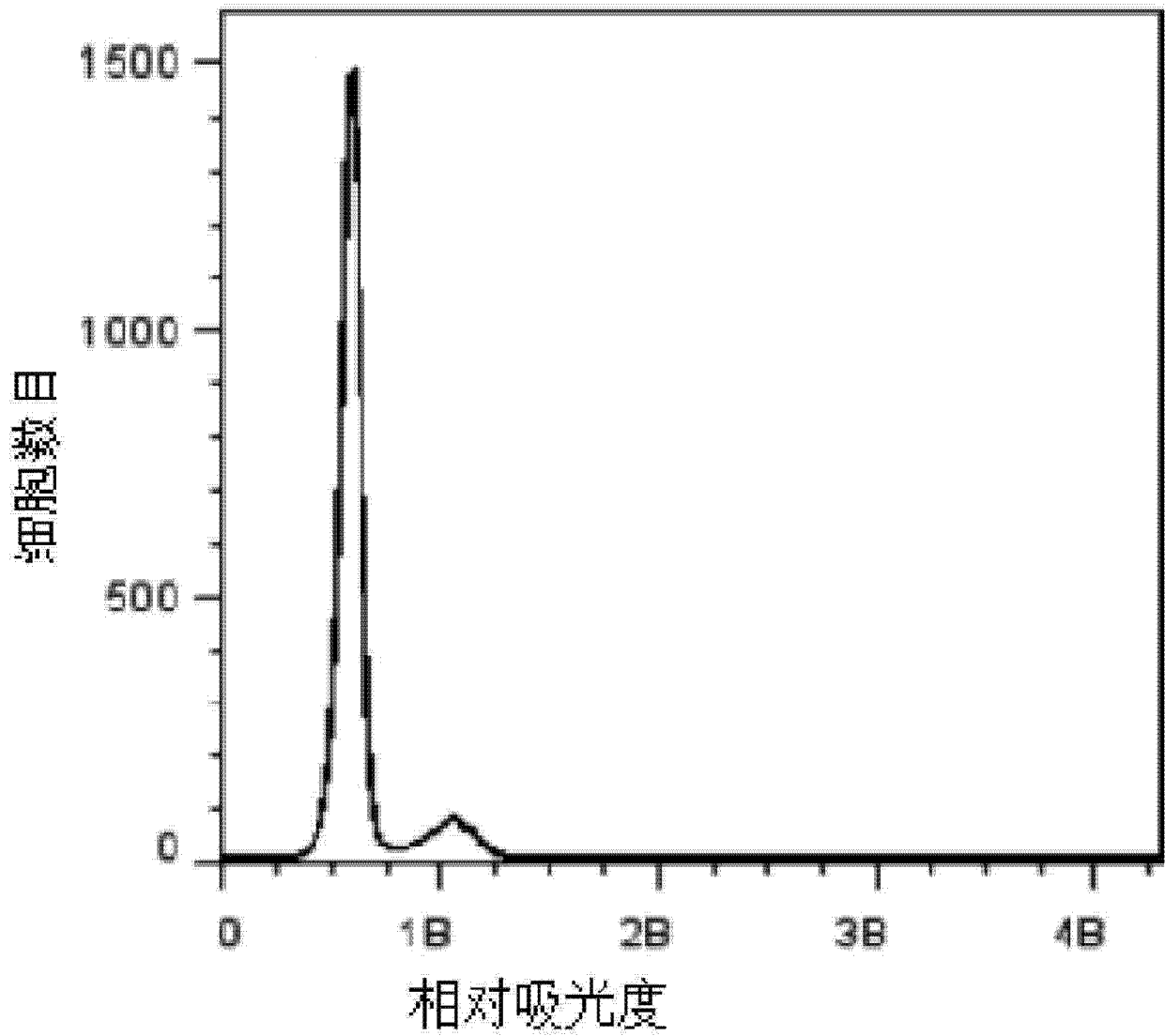


图 7

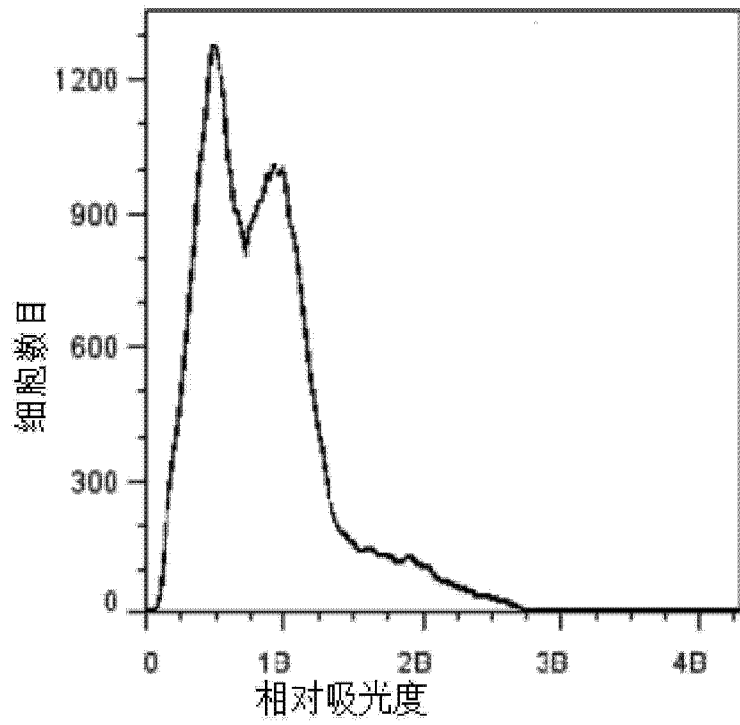


图 8

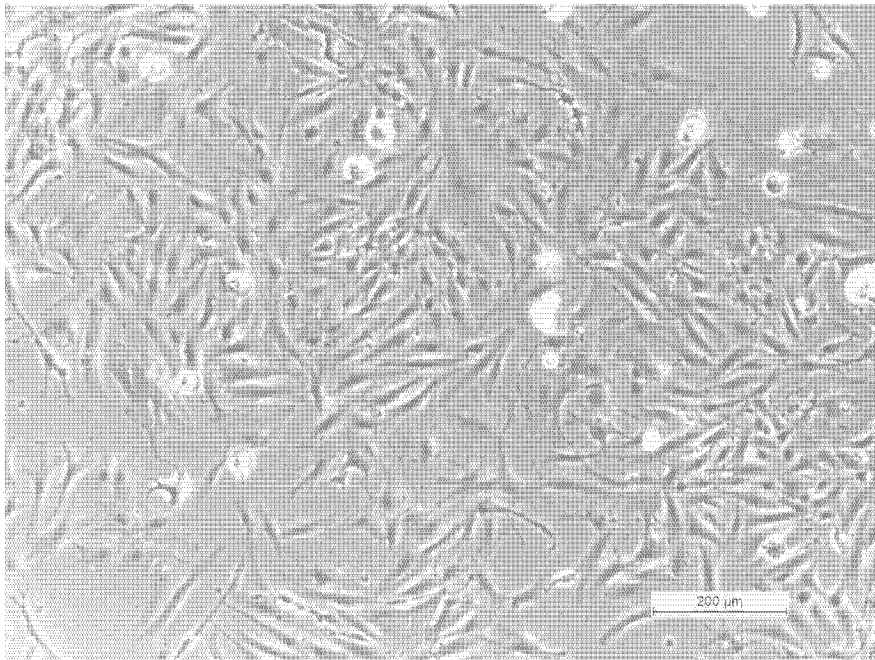


图 9

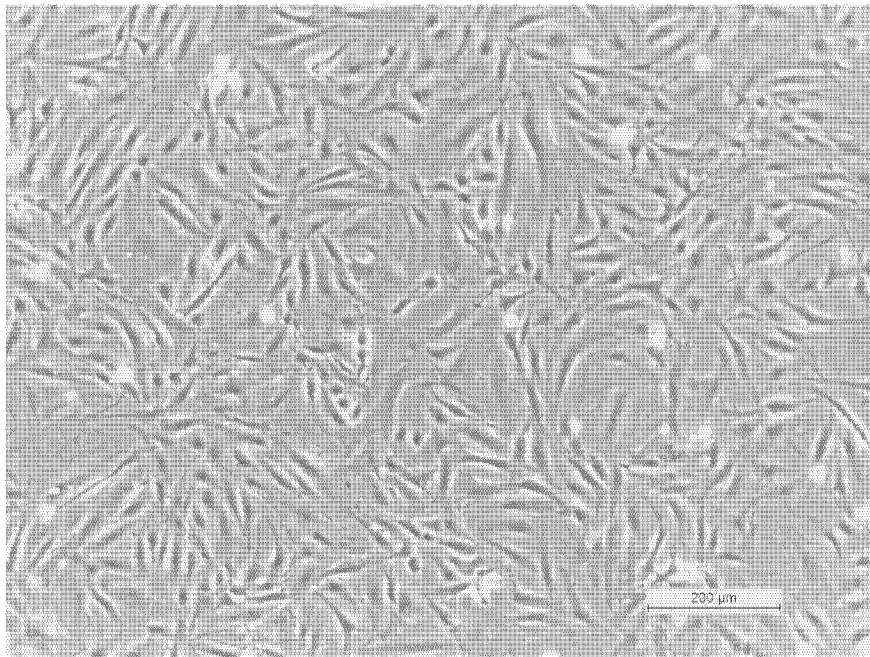


图 10

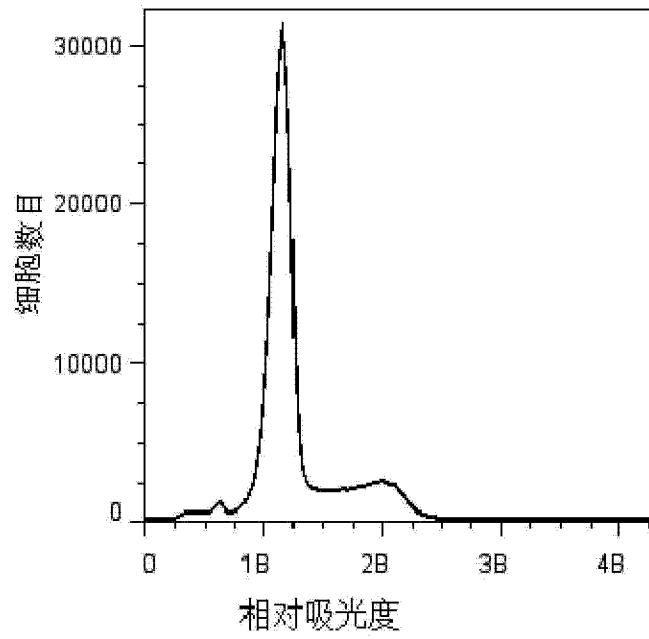


图 11

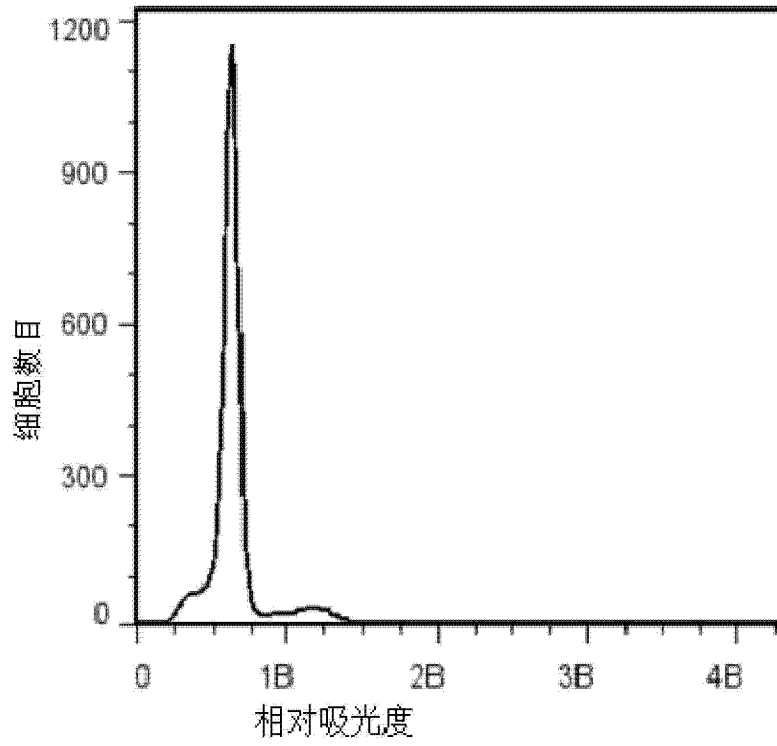


图 12

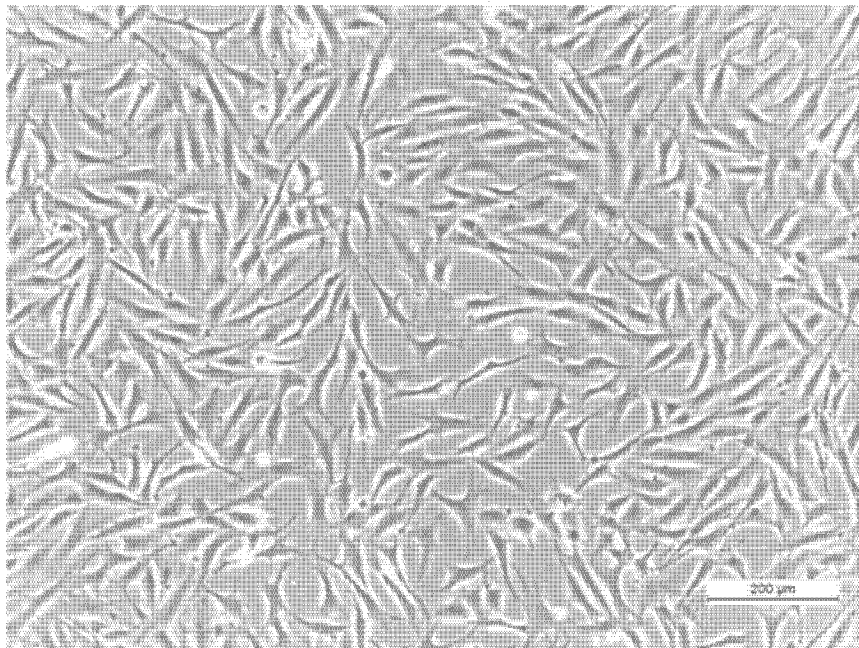


图 13

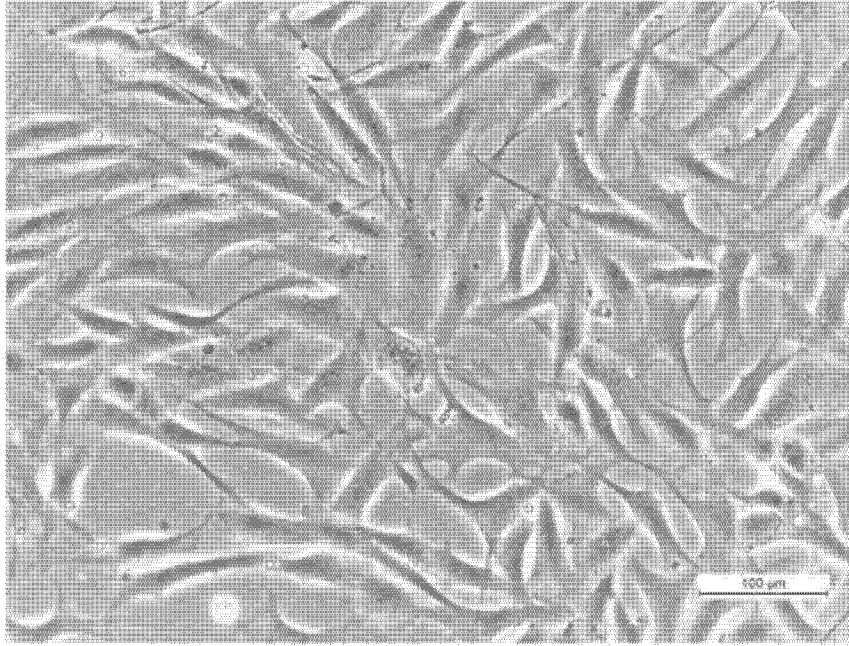


图 14

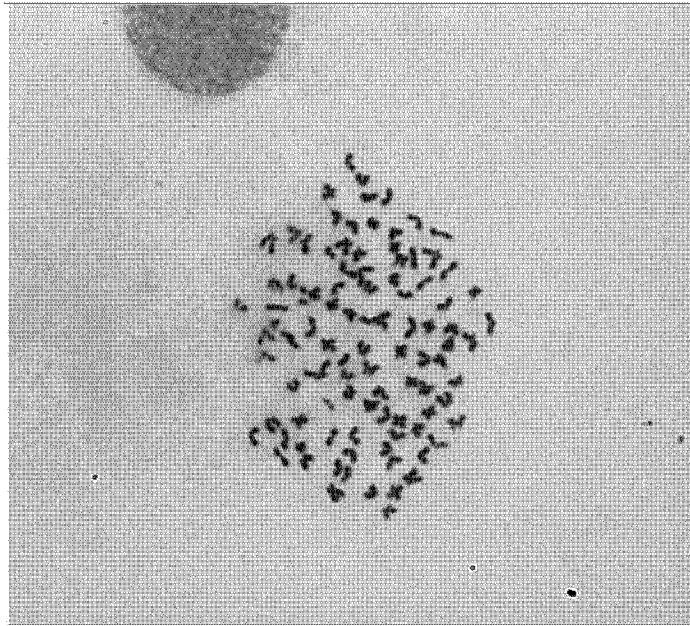


图 15

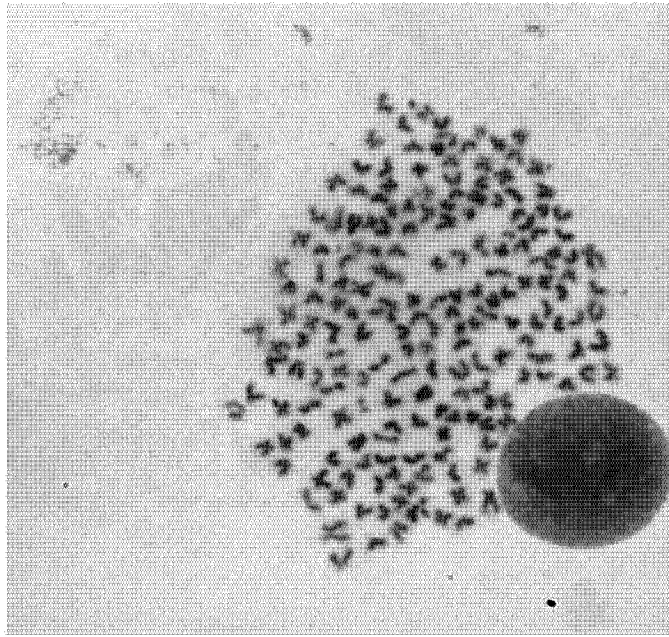


图 16