

牛的卵泡颗粒细胞采集与培养^{*}

吴赛辉

(黑龙江省农科院畜牧研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 本试验培养了牛的颗粒细胞, 并且进行了细胞的冷冻与复苏, 建立了一套颗粒细胞的培养方法, 为后期的牛体细胞核移植技术做准备。

关键词: 牛; 颗粒细胞; 培养

中图分类号: S 814. 8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002—2767(2006)01—0061—02

Collect and Culture Granulosa Cell of the Cow

WU Sai-hui

(Animal Husbandry Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: The major objective of this study was to culture bovine granulosa cell of cow, tested the method of refrigeration and resuscitation of the cell, established the cultivation of granulosa cell in vitro, prepared for the later period cow somatic cell nucleus—transplant technology.

Key words: cow; granulosa cell; culture

动物组织、细胞的离体培养很早就被人们认识和研究, 经过几十年的发展, 已有比较成熟的方法。当前组织培养技术已广泛应用于生物学和医学各个研究领域。近年来随着体细胞克隆动物的成功, 且近来体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)、体外生产胚

胎(IVP)被人们重视, 这方面的研究也很多。但是早期胚胎体外发育存在“发育阻断现象”, 即 50% 以上的胚胎发育至 8 ~ 16 细胞阶段后, 很难再继续发育下去, 这就要求用一种方法来提高其发育能力。为此, 许多实验室采用颗粒细胞共培养术来消减早

^{*} 收稿日期: 2005—11—23

作者简介: 吴赛辉(1980—), 男, 河北省石家庄市栾城县人, 学士, 实研, 从事胚胎工程研究。Tel: 0451—86657928, E-mail: wusaihuig-zqy@163.com

一个方面。预防接种一定要选择对号、有效和安全的疫苗, 否则不能预防和控制口蹄疫的发生和流行。

5.3 有效隔离

有效隔离可预防畜群与毗邻的潜在感染的野生动物或家畜接触。严禁从疫区(场)购买患病牲畜或其肉制品。饲养场区和屠宰场的工作人员要做好自身的防护工作, 接触病畜后应立即洗手消毒, 防止患病畜的分泌物和排泄物等落入口鼻和眼睑膜或是伤口处。做好饲养场所、饲喂工具和饲草饲料等生产资料和生产工具的消毒工作, 防止向周围环境散播病毒。

5.4 高水平的卫生措施和高质量的管理实践

在适当条件下, 通过单独的“扑灭”政策, FMD 可以被根除, 如英国、日本、丹麦和爱尔兰。在其他

国家或地区, 每年对易感动物的预防接种与屠宰相结合, 期待在 FMD 暴发事件中消灭病毒和根除本病。

参考文献:

- [1] 冯学平. 口蹄疫疫情与控制[J]. 中国兽医科技, 1986, (1): 62-64.
- [2] 薛景山. 国际口蹄疫的监测与控制[J]. 中国兽医科技, 1991, (7): 44-46
- [3] 柳纪省. 口蹄疫研究进展[J]. 中国兽医科技, 1993, (3): 17-21.
- [4] 江鹏斐. 口蹄疫研究进展[J]. 中国农业科学, 2000 (6): 93-100.
- [5] 龚团莲, 孙立杰, 毛景东等. 口蹄疫研究概述[J]. 内蒙古民族大学学报, 2001, 16(2): 393-396.
- [6] 汪洋, 亢文华, 白永平, 等. 口蹄疫研究概况[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(9): 47-49.
- [7] 刘在新, 谢庆阁. 口蹄疫防治技术的研究和发展[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(5): 18-21.

期胚胎体外培养的阻断现象^[1]。本试验拟培养牛颗粒细胞,建立牛颗粒细胞的培养方法,为牛体细胞核移植技术做准备。

1 材料与方法

1.1 牛颗粒细胞的原代培养

牛卵巢购于屠宰厂。将卵巢用 30℃ 的生理盐水冲洗干净,置于 30℃ 的生理盐水中,在 4 h 内用暖瓶带回实验室。将带回实验室的牛卵巢用生理盐水冲洗 1~2 遍,然后拿进无菌室中,用 PBS 洗 3 遍,用手术刀片划破卵巢表面直径 2~6 mm 的卵泡,用注射器吸取 PBS 培养液冲洗卵泡腔,在实体镜下收集卵丘及卵丘卵母细胞复合体。并在镜下用 PBS 清洗 5~6 遍,置于小培养皿中加 1 mL 胰酶室温消化,边消化边吹打,边观察,当大部分颗粒细胞游离出来后,加入 5 mL 含 10% 血清、1% 青—链霉素的 DMEM/F12 终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清用 1 mL 无血清 DMEM/F12 重悬沉淀,然后加无血清 DMEM/F12 至 3 mL,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,用 1 mL 含 10% 血清、1% 青—链霉素的 DMEM/F12 重悬沉淀,细胞计数,调整密度 $10^6/\text{mL}$,接种于 25 mL 的培养瓶,于 5% CO_2 、38.5℃ 的 CO_2 培养箱中培养。约 12 h 后观察。待细胞长至 90% 汇合时传代、冻存或制作共培养滴(中间每 2 d 换液一次)。

1.2 传代培养

在混合生长的原代或传代细胞培养中,吸除培养瓶中的培养液,加入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 清洗一次后,加入 0.25% 胰蛋白酶 PBS 液,室温消化 3 min,观察贴壁的颗粒细胞开始变圆时,拍打培养瓶底,见颗粒细胞悬浮后,用 1 mL 微量移液器轻轻吹打几次,此时颗粒细胞绝大部分可悬浮,加入 3 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,吸取混和液离心收集细胞,计数稀释并接种培养。

1.3 细胞冻存与解冻

1.3.1 细胞冻存 消化培养的细胞,加入 10% FCS 和 10% 二甲基亚砜(DMSO)分装于冻存管中,先将冻存管置 4℃ 5 h,然后移入 -20℃ 过夜,再放入液氮长期保存。

1.3.2 细胞复苏 将液氮中保存的冻存管取出,在空气中停留 5~10 s,放入 38℃ 水浴中迅速融化,酒精擦拭管壁后吸出细胞悬液,滴加 10 倍含 10% FCS 的 DMEM 培养液,混匀后 1 000 r/min 离心 5 min,除去上清液,再加适量培养液重悬,离心洗涤两次,制备成密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种培养。6~10 h 后待细胞贴壁后可部分换液,移去细胞碎片,以后每隔 48 h 换液 1 次。

2 结果及讨论

2.1 牛颗粒细胞的原代和传代培养

原代贴壁的颗粒细胞,未成纤维样细胞,形状为梭形或不规则三角形,呈放射状排列。传代培养时,接种密度 10^6 个/mL ($1 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL),培养第 2~3 d 开始贴壁,第 3~6 d 呈优势生长,7 d 左右长满平皿底。由于试验需求只传至 7 代,仍然生长旺盛,可继续传代。

能够影响体外培养的细胞生长的因素很多,例如营养条件、培养温度、培养液的酸碱度等^[2]。营养条件是细胞体外生长的基本条件,体外培养细胞的营养条件主要通过培养液来供给。血清是由很多分子量不同的生物分子组成的极为复杂的混合物,包括各种血浆蛋白、肽类、脂肪、糖类、无机物质以及血小板凝集时释放的各种生长因子。血清中含有激素与生长调节因子,生长因子能够刺激细胞生长分化与增生^[3]。

2.2 细胞冻存与解冻

经冻存的细胞复苏后于体外培养,其贴壁速度相当于分离后直接培养的颗粒细胞^[4]。而生长速度与直接接种培养的颗粒细胞没有明显的差别,复苏的颗粒细胞经传代培养后的生长情况与不经冻存的细胞传代后的生长情况没有差别。

参考文献:

- [1] Prather R S, Simes M M, First N L. Nuclear transplantation in early pig embryos[J]. Biol Reprod, 1989, 41: 414-418.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001 130-131.
- [3] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004.

欢迎投稿 欢迎刊登广告