

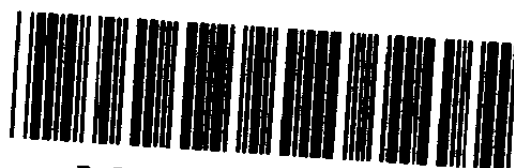
蓝明扬 赵郁光 编著

蚊细胞培养 及应用技术

Q2-33
LMY

蚊细胞培养及应用技术

蓝明扬 赵郁光 编著



A0014376

原子能出版社

前 言

本世纪以来，细胞体外培养技术在现代医学和生物科学中取得了令人瞩目的成就。当前，它不仅是研究生命科学理论的重要技术方法，而且日益成为生物工程的生产手段。

蚊虫是四害之一，除吸血骚扰外，还能传播疟疾、丝虫及多种病毒性疾病，危害极大。近来还有人认为蚊虫在艾滋病的传播中有一定作用。

对蚊虫的研究已从过去的单纯形态描述的经典学科，向以现代手段进行模拟分析的功能学科发展。建立蚊细胞的体外培养系统，正是进行模拟分析的好办法，它可以使人们在细胞水平上进一步研究蚊虫的生理、生化、遗传和毒理等。

随着分子生物学和体细胞遗传学的发展，蚊细胞的培养具有更重要的意义，尤其在目前对蚊虫的基因组了解甚少的情況下，使用培养细胞比使用整体蚊虫更为有利。基因表达可在控制的系统中进行，便利调节顺序的确定以及蛋白产物的分离和纯化，为转基因蚊虫——蚊虫防治的研究奠定了基础。

在研究蚊虫与疾病的关系中，蚊细胞用于虫媒病毒的分离和鉴定具独优的地位，并已经得到广泛的应用，并且近年已能用于病毒疫苗的研制。

蚊细胞系有助于丝虫（微丝蚴）体外培养系统的建立，疟原虫蚊期的体外培养系统更具吸引力，它可为药物的筛选、疫苗的研制提供更优的材料和方法。

在毒理检测中，毒理学家正在开辟体外培养检测的新途

径;一些新技术,如姐妹染色单体互换(SCE)、熟前凝聚染色体(PCC)等细胞遗传学方法只有在蚊细胞体外培养系统中才能进行。

用蚊细胞分离和大量生产昆虫病毒用于蚊媒的控制也有广阔前途。

由于我国蚊细胞培养工作起步较晚,许多工作者虽想开展这方面工作,但苦于缺乏系统介绍蚊细胞培养技术的资料,我们从抛砖引玉的角度出发,将前人的工作和自己的经验体会汇集成册,献给读者,如果对同行们有所帮助,那是作者最大的慰藉。

在蚊细胞培养研究工作中,作者得到首都医学院潘李珍,苏州医学院周志园、方几希、蒋滢、庄启元、毛棣华、王尧、吴昀、朱翔、陶步志,中国科学院上海昆虫研究所陈巧云,中国预防医学科学院微生物、流行病研究所董必军,寄生虫病研究所牛玲玲,复旦大学陈仲宜等教授、专家的支持和帮助,本书稿承蒙江苏省寄生虫病研究所所长吴中兴教授校阅,我所方洪元、包显清、周华云、沈宝祥、陆伟贤、钟春雷等同志参加部分工作,特此表示谢忱。

由于水平有限,不足和错误之处在所难免。真诚地希望读者对书中不妥和错误之处提出宝贵意见。

作 者

1991年6月

目 录

第一章	绪言.....	(1)
第二章	蚊细胞生长条件.....	(3)
	一、营养要求.....	(3)
	二、培养基.....	(9)
	三、温度.....	(22)
	四、气相和光.....	(23)
	五、渗透压.....	(24)
第三章	蚊细胞培养技术.....	(26)
	一、组织选择.....	(26)
	二、材料消毒.....	(26)
	三、取材.....	(28)
	四、原代蚊细胞生长的条件.....	(28)
	五、原代蚊细胞生长情况.....	(31)
	六、继代培养.....	(32)
	七、蚊细胞的冻存与复苏.....	(37)
	八、蚊细胞系的建立.....	(38)
第四章	蚊细胞的观察方法.....	(40)
	一、活细胞观察法.....	(40)
	二、细胞固定染色法.....	(41)
	三、细胞化学观察法.....	(44)
	四、透射电镜观察法.....	(57)
	五、扫描电镜观察法.....	(69)

第五章	蚊细胞系简介	(73)
一、白纹伊蚊细胞系——Aa ₂ -678、Aa ₆ -678、Aa-778(潘李珍等, 1980)		(73)
二、白纹伊蚊C6/36株(Igarashi, 1978)		(77)
三、白纹伊蚊细胞系——Aalb-105(蓝明扬、赵郁光, 1990)		(78)
四、埃及伊蚊细胞系——Aaeg-1289、Aaeg-190(朱翔、蓝明扬, 1990)		(78)
五、中华按蚊细胞系——As-684(潘李珍等, 1989)		(80)
六、中华按蚊卵巢细胞系——Anso-242(蓝明扬等, 1990)		(81)
七、中华按蚊细胞系——Ans-102(蓝明扬等, 1990)		(83)
八、嗜人按蚊细胞系——Ana-104(蓝明扬等, 1990)		(83)
九、三带喙库蚊细胞系——CT-188(颜林等, 1989)		(85)
十、淡色库蚊细胞系——Cpp-512(赵郁光、蓝明扬, 1990)		(87)
第六章	蚊细胞遗传学研究技术	(89)
一、蚊细胞样品的准备		(90)
二、蚊细胞染色体标本的制备		(91)
三、蚊细胞染色体的核型		(93)
四、染色体显带与有关技术		(94)
1. C带		(96)
2. G-11带		(101)

	3. Cd带.....	(102)
	4. 变动带.....	(103)
	5. Q带.....	(103)
	6. G带.....	(105)
	7. R带.....	(107)
	8. 高分辨染色体显带技术.....	(108)
	9. 染色体的脆性位点.....	(111)
	10. 姐妹染色单体差别染色.....	(111)
	11. 银染色.....	(116)
	12. 中心粒银染色.....	(118)
	13. 着丝粒的银染色.....	(118)
	14. 微核试验.....	(119)
	15. 抗体染色技术.....	(120)
	16. 限制性内切酶显带.....	(123)
	五、观察染色体的方法.....	(126)
	六、蚊细胞熟前凝聚染色体(PCC).....	(135)
	七、染色体显微切割与微克隆技术.....	(141)
	八、染色体的扫描电镜标本制备.....	(144)
	九、研究染色体的意义.....	(145)
	十、染色体研究与蚊虫防制.....	(146)
第七章	蚊细胞系的鉴定.....	(149)
	一、形态特征.....	(149)
	二、染色体特征.....	(150)
	三、血清学分析.....	(151)
	四、蛋白质及同工酶的检测.....	(152)
	五、DNA探针.....	(154)
第八章	蚊细胞系的生物化学研究.....	(156)

	一、蚊细胞的氨基酸代谢.....	(156)
	二、蛋白质和同工酶分析.....	(169)
	三、糖.....	(176)
	四、胆固醇.....	(178)
第九章	单克隆抗体技术.....	(180)
第十章	杀虫剂对蚊细胞的作用.....	(196)
	一、杀虫剂对培养蚊细胞的杀伤作用.....	(196)
	二、杀虫剂对蚊细胞的遗传学效应.....	(198)
	三、生物杀虫剂对培养蚊细胞的作用.....	(199)
	四、抗敌百虫蚊细胞系的建立.....	(200)
第十一章	观察疟原虫在蚊细胞系培养中的发育过程	(202)
第十二章	观察丝虫微丝蚴在蚊细胞系培养中的发育 过程.....	(207)
第十三章	蚊细胞系对病毒的敏感性及病毒分离技术	(212)
	一、蚊细胞在检测虫媒病毒中应用的概况	(212)
	二、蚊细胞在乙型脑炎病毒检测上的应用	(216)
	三、蚊细胞在登革出血热病毒检测上的应用	(219)
	四、4种蚊细胞系对乙型脑炎病毒的敏感性 测定.....	(221)
	五、4种蚊细胞系对登革出血热Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型 病毒的敏感性测定.....	(221)
第十四章	DNA介导的基因转移.....	(223)

第十五章 附录	(228)
一、几种蚊虫的饲养方法	(228)
1. 中华按蚊、嗜人按蚊	(228)
2. 三带喙库蚊	(229)
3. 淡色库蚊	(230)
4. 白纹伊蚊、埃及伊蚊	(230)
二、若干试剂的配制方法	(231)
1. 平衡盐溶液的配制	(231)
2. 盐类结晶水等值的换算表	(233)
3. 离心速度和离心力换算表	(236)
4. 酒精稀释表	(237)
5. 缓冲液的配制	(238)
参考资料	(239)

第一章 绪 言

蚊虫种类多、分布广，几乎有人类的地方就有蚊类的踪迹。全世界有蚊虫3000多种，其分布的北界可达北极圈，南界为大陆各洲的南端。我国有蚊虫300多种。蚊虫是最重要的医学节肢动物之一，它能传播疟疾、丝虫、乙型脑炎、登革出血热等多种虫媒病毒性疾病；还可机械地传播乙型肝炎病毒。近年的研究认为蚊虫还可能是艾滋病的传播媒介。在我国南方某些地方曾发生过疟疾、登革出血热的大流行，严重地威胁人民群众的健康和生命。因而它是全国爱国卫生运动中“除四害”的重要对象。

近代医学科学研究，随着分子生物学与细胞生物学的崛起，为在细胞水平进行分析研究奠定了基础。目前，组织培养工作正在各个学科中普遍开展起来。由于组织培养技术和理论的新突破，人类在细胞学、细胞生物学、遗传学、肿瘤学、药理学、寄生虫学、胚胎发生学等各领域的研究进一步深化，从而取得了巨大成就。虽然1915年 Goldschmidt 就着手于蚕的精母细胞培养，观察精子形成过程；但长期以来，由于昆虫体液的生化分析困难较大，加之，它还随不同的发育阶段而变化，又缺乏满意的生长培养基的生物化学基础知识，从而昆虫组织培养发展的速度远远落后于脊椎动物组织培养发展的速度。直到1962年 Grace 建成第一个昆虫细胞株——树胶蛾卵巢细胞系 (*Antheraea eucalypti* Ae)、1966 年建立了第一个医学节肢动物细胞系——埃及伊蚊 (*Aedes*

aegypti) 幼虫细胞系后, 大大促进了昆虫组织培养工作。

蚊细胞培养就是将蚊的组织或细胞在离体条件下进行培养, 並建立蚊细胞系和单个细胞克隆的细胞株。这一技术已成为进行细胞水平研究蚊虫的不可缺少的手段。用蚊细胞培养技术, 可获得大量、纯一的蚊细胞材料并进行一系列研究。对于形态, 除用光学显微镜观察外, 还采用了细胞化学染色法, 使形态学、生物化学或生理学有机地联系起来进行研究; 用电子显微镜进行亚细胞结构观察。培养蚊细胞更是研究蚊虫细胞遗传学和分子生物学的好材料; 可用它进行染色体核型、各种显带、熟前凝聚染色体的研究, 并作为制备DNA探针的材料。也可用它进行蚊的生化代谢的研究。也曾用蚊细胞研究杀虫剂的杀虫机制和毒力的测定。也可用它进行疟原虫、丝虫在蚊体阶段发育情况的观察, 还可用它测定对各种病毒的敏感性, 进行病毒分离和临床诊断。昆虫的细胞已经用于基因工程生产。有生产出人类 α -干扰素、白细胞介素II等重要生物活性物质, 及生产乙型肝炎病毒疫苗的报告; 也有氯霉素乙酰转移酶基因(Cat)在蚊细胞系中的表达和制成登革病毒减毒活疫苗的报道。蚊细胞系的应用研究, 已逐步向基因工程方向发展。我国先后已建立按蚊、库蚊、伊蚊各2种, 共13个蚊细胞系, 并开始进行理论和应用研究。相信蚊细胞培养工作将会对上述各项工作的进一步深入研究作出应有的贡献。

第二章 蚊细胞生长条件

从本世纪30年代起,许多学者就从事于蚊细胞的体外培养工作。当时由于条件的限制,如采用的培养方法及其生长条件尚不清楚等,在很长时间内未能获得连续传代的细胞系。因此了解蚊细胞对营养的要求等生长条件,是培养成功与否的关键之一,也是研究各种细胞的生物学特征的需要。随着科学的发展,人们运用现代科学手段,对医学昆虫进行了细胞生理、生化、遗传及免疫学等方面的深入研究,从而逐步阐明它的营养代谢等方面的一些问题。

一、营养要求

1、水 水是细胞的主要化学成分和生存环境,又是一种良好的溶媒,一切营养物质和代谢产物都必须溶解在水中,才能为细胞所吸收和排泄。而且,溶液对维持细胞形态、进行生物化学反应、热量传导、调节渗透压和酸碱度的平衡有着重要作用。水对细胞呼吸的影响很大,细胞发生脱水便会抑制其呼吸作用而死亡。体外培养的细胞对水的质量很敏感,水的纯度不够,即使其中一些含量极微的元素,有时也会对细胞有不利的影响,甚至引起中毒而死亡。

纯化水可以是离子交换水和蒸馏水。前者仅去离子,而仍带有非离子物质和有机质,后者则不能去离子。用于细胞培养的纯水,宜用去离子水,再用玻璃蒸馏器蒸馏2次后使用。水质经过检查,导电度欧姆值为 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \Omega$ 的才算合格。同时存放时间不宜超过2周,最好现制现用。

2、无机电解质 无机离子不仅提供酶和代谢活动、细

胞生命所需要的成分，且在维持渗透压、促成细胞与培养瓶玻璃的粘连、缓冲和调整溶液的酸碱度方面起着重要作用。若干微量元素对细胞也是不可缺少的。可是，离子之间也存在着互相颀颀的作用，例如钙、镁能使细胞渗透性降低，而钾、钠能使细胞膜的渗透性增高。这些离子在溶液中保持一定的比例，才能使正常细胞维持生理平衡。

平衡盐溶液 (Balanced salt solution, BSS) 又称生理盐水，是由无机离子、葡萄糖等和水组成的溶液。加入酚红为的是指示溶液的pH。在培养过程中常用作细胞洗涤液及配制各种培养基的基础液。常用的配方如表2-1。

表2-1 几种常用BSS(g/L)

	Ringer	PBS	Tyrode	Earle	Hanks	Dulbecco	D-Hanks
NaCl	9.00	8.00	8.00	6.80	8.00	8.00	8.00
KCl	0.42	0.20	0.20	0.40	0.40	0.20	0.40
CaCl ₂	0.25		0.20	0.20	0.14	0.10	
MgCl ₂ · 6H ₂ O			0.10			0.10	
MgSO ₄ · 7H ₂ O				0.20	0.20		
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O		1.56			0.06		0.06
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O			0.05	0.14		1.42	
KH ₂ PO ₄		0.20			0.06	0.20	0.06
NaHCO ₃			1.00	2.20	0.35		0.35
葡萄糖			1.00	1.00	1.00		
酚 红				0.02	0.02	0.02	0.02

钙维持细胞膜的坚固性，镁是某些酶系统参加者，两者又是细胞贴壁作用的必需物质。它们有使细胞凝聚的作用，因而配制分散细胞的消化液和特殊用途的细胞洗涤液时，宜采用钙、镁离子含量较低的 Dulbecco 液和无钙、

镁离子的D-Hanks液, 以及更简单的PBS。

3、碳水化合物 它是细胞生存必需的能源, 有的是合成蛋白质和核酸的成分。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸钠。细胞靠糖的氧化而获得能量。葡萄糖是最重要的碳水化合物, 不仅可供给能量, 还可合成糖元而贮备能源, 且对维持渗透压也有作用。许多细胞还可利用其它糖类作为能源。如白纹伊蚊和致倦库蚊的细胞在葡萄糖缺少时, 可以有选择地分解海藻糖和果糖。如在致倦库蚊细胞的培养基中仅含有葡萄糖时, 则其存活能力就要下降。我们用PAS法染色时, 见中华按蚊卵巢细胞系的胞浆中存在大量的糖元。

4、脂肪及脂肪酸 蚊虫摄取的食物中不需含脂肪类物质, 而体外培养蚊细胞时则需要固醇、脂肪及脂肪酸参与代谢。Mc Means等(1975)发现蚊细胞内的棕榈油酸(Palmitoleic acid)、油酸(Oleic acid)和花生酸(Arachidic acid)的含量较培养液中的高, 而亚油酸和棕榈(Palmitic)却较培养液中的低, 并且, 随着细胞的生长, 脂肪酸链的长度将增长。Yang等(1976)报道, 随着蚊细胞培养时间的不同, 脂肪酸有变化, 1,2-甘油乙酯, 1,3甘油二酯(1,2-and 1,3-diglyceride)的双链脂肪酸增多, 含自由脂肪酸(Free fatty acid)和甘油三脂(Triglyceride)比例增加。在白纹伊蚊和埃及伊蚊细胞系的对数生长期, 胆固醇脂(Sterolester)也同样成倍增长。在细胞对数生长期后的停滞阶段, 脂肪酸发生变化, 肽链含量下降。

Butters和Hughes(1981)在埃及伊蚊细胞系加入放射性标记的棕榈酸盐后转化为以磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamine)为主的鞘脂类。

Timothy等(1984)证实,生长于含脂肪类物质培养基中的细胞,可利用其中的脂肪酸进行代谢。

5.氨基酸 氨基酸是组成蛋白质的基本单位,用以合成蛋白质的原料,还参与生殖过程。不同种类的细胞对氨基酸要求各异,但有若干种氨基酸细胞自身不能合成,必须依靠培养液供给,称为必需氨基酸。它们是精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸、胱氨酸、酪氨酸及色氨酸。谷氨酰胺具有特殊作用,能促进各种氨基酸进入细胞膜。几乎所有细胞对谷氨酰胺均有较高的需求,需用谷氨酰胺合成核酸和蛋白质;在缺少谷氨酰胺时,细胞生长不良而死亡。Igasach(1973)在使白纹伊蚊从M-M培养基过渡到MEM培养基时发现,当细胞培养在MEM/M-M的比值为9/1时增殖良好,但再减少混合培养基中M-M的成分时,将导致细胞生长停止。然而,混合培养基中的M-M成分可用7种非必需氨基酸——丙氨酸、天门冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸,甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸所替代。其中丝氨酸和脯氨酸尤为重要。小牛血清能否有效地支持细胞生长,亦主要与血清中丝氨酸及脯氨酸含量有关。Mitsuhashi(1978, 1980)的研究表明,蚊细胞生长的必需氨基酸包括:半胱氨酸、蛋氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、亮氨酸、赖氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸。其中半胱氨酸和谷氨酰胺缺乏时,可迅速阻止细胞的生长。而其它必需氨基酸的缺乏,在几代之后也将影响细胞的生长; α , β -丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和谷氨酸似非细胞生长直接必需的氨基酸,其中 β -丙氨酸的缺乏对细胞生长具有明显的刺激作用。蚊细胞对甘氨酸的要求尚无定论。我们培养蚊细胞

时,在T C199培养液中,再加入0.03%谷氨酰胺。谷氨酰胺在溶液中很不稳定,应置-20℃冰冻保存,用前加入培养液内。如果加有谷氨酰胺的培养液在4℃冰箱贮存2周以上时,还应重新加入原来量的谷氨酰胺。

鉴于昆虫生理代谢的特殊性,其血淋巴中游离氨基酸的含量(约含350mg/ml)常为脊椎动物的50~100倍;氨基酸对全部渗透压所占的百分比大于40%。而对于人仅为1%。我们曾用DNS-Cl(丹酰氯)荧光试剂标记氨基酸,然后采用聚酰胺(Polyamide)薄膜层析方法,测定中华按蚊和嗜人按蚊的成蚊及其幼虫的游离氨基酸含量,发现它们间的含量各有差异,如表2-2。

一般培养中的蚊细胞比蚊本身需要更多的氨基酸。故在培养液中应含有充足的氨基酸才行。为此,我们在配制蚊细胞培养基时,除以T C199为基础外,另加预先高压处理过的0.4%水解乳白蛋白,以增加氨基酸的含量(表2-3),明显提高了细胞繁殖率。

我们在培养中华按蚊卵巢细胞系(Anso-242)时,每2天用日本全自动氨基酸分析仪检测培养液中18种氨基酸的动态变化表明,谷氨酸(含谷氨酰胺)消耗量最大(以第8天计,耗掉原量的96.25%),消耗量次之的是精氨酸(64.8%)、甲硫氨酸(57.14%)、天冬氨酸(41.16%)、赖氨酸(42.19%)、苯丙氨酸(38.89%)、亮氨酸(25.5%)、异亮氨酸(15.79%)。其余的消耗量则不甚明显。而嗜人按蚊细胞系(Ana104)消耗量顺序是,谷氨酸(86.50%),酪氨酸(41.17%),鸟氨酸(49.6%),半胱氨酸(31.8%)和精氨酸(18.51%)。

6. 维生素 维生素是维持细胞生长的一种生物活性物质,它们在细胞中大多形成酶的辅基或辅酶,对细胞代谢有

表2-2 两种按蚊游离氨基酸的测定 ($\times 10^{-9} \text{mol/L/10只}$)

	赖氨酸	丙氨酸	甘氨酸	丝氨酸	脯氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	缬氨酸	苯丙氨酸	苏氨酸	甲硫氨酸	NH ₃
中华按蚊 (雄虫)	23.46	23.73	24.17	13.04	30.39	8.37	17.0	14.37	20.48	13.96	4.62	48.74
中华按蚊 (雌虫)	17.68	17.93	18.85	8.49	21.77	5.22	9.56	7.53	13.59	8.48	2.93	39.42
中华按蚊 四龄幼虫	16.22	12.12	20.77	5.90	7.69	4.25	7.48	9.96	20.10	5.48	3.44	32.38
嗜人按蚊 (雌虫)	8.43	13.63	10.73	3.73	9.35	2.58	4.96	4.11	6.62	4.48	2.04	20.07
嗜人按蚊 (雄虫)	9.93	15.69	8.99	5.16	10.88	4.24	6.95	6.51	7.36	3.92	1.92	25.18
嗜人按蚊 四龄幼虫	14.73	9.33	19.99	8.56	10.99	6.59	8.83	11.00	18.75	7.76	2.72	16.82