

# 灰飞虱胚胎组织细胞的分离和原代培养技术

陈来, 吴祖建\*, 傅国胜, 林奇英, 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所, 福州 350002)

**摘要:** 为建立灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallen 单层细胞株, 以 Grace 培养基为基础, MM 培养基、水解乳清蛋白、酵母抽提物和胎牛血清 (FBS) 为营养添加因子, 共配成 7 种全培养基, 用以培养灰飞虱胚胎组织细胞。7 种培养基均可维持灰飞虱胚胎切块组织细胞的贴壁培养 1~4 周, 而培养基 5 (1Grace + 1MM + 20% FBS) 则可维持贴壁培养达 2 个月以上, pH 8.0 的 0.25% 胰蛋白酶在 37°C 下酶解组织块 5~10 min 的分离效果较好。实验获得较适合灰飞虱胚胎组织细胞生长的配方和组织酶解分离方法。

**关键词:** 灰飞虱; 胚胎组织; 细胞培养; 培养基

中图分类号: Q962 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)03-0455-05

## Development of an *in vitro* culture system of primary tissues and cells from embryo of *Laodelphax striatellus* Fallen

CHEN Lai, WU Zu-Jian\*, FU Guo-Sheng, LIN Qi-Ying, XIE Lian-Hui (Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** To build cell layer line of *Laodelphax striatellus* Fallen, seven different full culture media, including MM medium, lactalbumin hydrolysate, yeast extract and fetal bovine serum (FBS) based on Grace medium, were developed and tested to culture the tissues and cells from embryo of *L. striatellus*. The results indicated that these tissues and cells could survive keeping close to the bottom of medium for at least 1-4 weeks, and for even 2 months in the medium No. 5, which was made up of one Grace medium, one MM medium respectively and 20% FBS. Furthermore, effective hydrolyzation of the tissues was reached when they were pretreated for 5-10 min with 0.25% trypsin under the condition of pH 8.0 at 37°C. The suitable culture recipe to the tissues and cells from embryo of *L. striatellus* and a good method to separate tissues were proposed.

**Key words:** *Laodelphax striatellus*; embryonic tissues; cell culture; culture media

水稻条纹病毒 (rice stripe virus, RSV) 作为纤病毒属 *Tenuivirus* 的一个成员 (Murphy *et al.*, 1995), 在生物学性质或基因组结构和表达策略等方面均具有许多独特的特性, 是研究病毒-介体-寄主互作机制的理想材料 (谢联辉等, 2001)。水稻条纹病毒由灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallen 以持久性方式经卵传播, 在禾谷类作物上有很广的寄主范围, 广泛分布于我国 16 个省市, 曾造成严重损失, 据本所 1997~2003 年实地调查表明, 该病目前在辽宁、北京、河南、山东、上海、云南仍十分常见, 特别是云南保山、楚雄、昆明, 北京双桥, 河南原阳, 山东济宁及苏北等地, 田间发病更为普遍, 有的田块颗粒无收 (林含新

等, 1997; 魏太云, 2003)。应用水稻原生质体等技术, 对水稻条纹病毒基因及其编码蛋白的功能以及它们在植物寄主体内的表达策略已有较深入研究 (明艳林, 2001), 但对于病毒在介体昆虫灰飞虱体内复制与表达研究甚少, 主要局限于细胞病理学的研究 (吴爱忠等, 2001)。关于灰飞虱组织细胞培养仅见日本学者 Kimura 等 (1996) 的报道。因此, 我们试图通过细胞原代培养技术建立灰飞虱细胞株, 以用于研究水稻条纹病毒在灰飞虱细胞内的复制与表达规律, 希望能为从分子与细胞水平上揭示病毒-介体间的关系提供好的细胞培养方法。实验中我们首次应用显微银针解剖技术切取了灰飞虱胚胎组织块,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39900091)

作者简介: 陈来, 男, 1976 年 7 月生, 福建长汀人, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0591-3769714; Fax: 0591-3769704; E-mail: wuzujian@126.com

收稿日期 Received: 2004-02-11; 接受日期 Accepted: 2004-06-14

优化了组织细胞分离方法,并进行了灰飞虱胚胎组织细胞培养。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试材料:**本所人工饲养的健康灰飞虱种群。

**1.1.2 培养基与添加因子:**M 氏培养基(MM medium)自配,戈氏培养基(Grace medium)购自美国 Sigma 公司,水解乳清蛋白购自美国 Hyclone 公司,酵母抽提物购自美国 Oxiod 有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 虫卵获取与消毒:**剪取带灰飞虱虫卵的小麦苗或水稻苗,经含 1% 次氯酸钠的 70% 无水乙醇溶液处理 10 min;在解剖镜下从苗上用小银针小心挑取虫卵,每次选取处于红眼期的灰飞虱卵 12~20 粒,挑到玻璃皿中,超纯水洗 3 次,然后挑入 Eppendorf 管中,用含 1% 次氯酸钠的 70% 无水乙醇溶液处理 15 min,再用超纯水洗 3 次。

**1.2.2 胚胎组织块切取:**将 Rinaldini 盐(薛庆善, 2001)滴入双凹片上,虫卵用银针移入 Rinaldini 盐中,在解剖镜下用解剖刀切除虫卵尾部共生菌团,并将胚胎切片移入另一双凹片中用银针挑除虫卵壳后,将切片挑入另一凹穴中小心剔除几丁质外壳及脂肪。

**1.2.3 酶解分离:**将胚胎切片挑入含 0.5 mL 0.25% 胰蛋白酶液(pH 8.0)(薛庆善, 2001)培养瓶中,分别置于室温(25℃)下 15 min, 37℃ 下 3 min、5~10 min 和 20 min。

**1.2.4 添加全培养基:**滴加 1 mL 的全培养基,经数小时待组织块沉淀后小心吸掉旧培养基,换上 1~1.5 mL 新鲜培养基,用 parafilm 封口后移入铝盒中置于(27.5±1)℃的光照培养箱中避光培养。每隔 7~8 天换一半培养基。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚胎组织块切取技术比较

培养 24 h 后观察,用显微银针解剖技术分离出的分离物,50 瓶中 9 瓶有共生菌 1~4 个,其余未发现共生菌,而用显微玻璃微针分离技术分离出的分离物中共生菌数量较多,且残留有不少的玻璃碎片

(图 1:A)。结果表明:采用银针和解剖刀在载玻片上切取组织块,操作准确性高,可彻底除去共生菌,而且,银针不易吸附组织块,操作方便,需时短,分离时组织块损失少。因此,显微银针解剖技术适合灰飞虱胚胎组织细胞的分离。

### 2.2 酶解分离方法比较

在室温(25℃)下处理 15 min,贴壁组织块及贴壁细胞少,悬浮组织块多,并多呈紧密团块状(图 1:C),与 37℃ 下酶解 3 min 的效果相近;在 37℃ 下酶解 5~10 min,贴壁细胞较其他对照组多,且梭形和聚落状(4~10 个细胞)贴壁细胞较多(图 1:E),贴壁组织块边缘游离细胞较多(图 1:B);在 37℃ 下酶解 20 min,单个圆形贴壁细胞增多(图 1:D),组织块多呈半贴壁状且可见明显的细胞轮廓。因此,在 37℃ 下酶解 5~10 min 分离效果较好,表现为梭形聚落状贴壁细胞、贴壁组织块及其周围游离的细胞较多。胰蛋白酶较常用于组织细胞分离,其最适工作 pH 值为 8.0,温度为 37℃。酶解作用时间过长、浓度和温度过高对离体组织细胞都有不利影响。本实验结果表明:pH 值为 8.0、温度为 37℃、胰蛋白酶浓度为 0.25% 的条件下,适合灰飞虱胚胎组织细胞分离的最佳酶解时间为 5~10 min。这样可以在较短的时间内获得细胞疏松度适当、大小适宜的细胞团块和贴壁细胞。

### 2.3 培养结果

**2.3.1 分离物形态:**培养 24 h 后在 Leica 倒置显微镜下观察组织块和游离细胞。(1)组织块:有的组织块周围有细胞游离,酶解较强的组织块细胞轮廓清晰,一般呈半贴壁;贴壁的组织块有的细胞结合在一起分不清细胞界限、有的则伪足伸出成放射状(图 1:B)。(2)游离细胞:半贴壁的细胞呈圆形有大、中、小三类(图 1:I);小的圆形细胞在光学显微镜下呈较亮与较暗两类;贴壁的细胞呈梭形(图 1:B)、蝌蚪形、圆形(图 1:E)和长条形细胞(图 1:G),有些聚落,有些则结合成片分不清细胞界限(图 1:F);梭形细胞还通过伪足相连成网(图 1:H);贴壁细胞有些随培养时间的延长伪足及细胞体表面出现小泡、变暗、萎缩,最后只剩下部分细胞痕迹,或边缘出现缺刻、变暗、浮起、死亡,有些细胞则连接成线。除小圆形、蝌蚪形贴壁细胞、未融合组织块的细胞外,其余细胞内均有明暗不等的颗粒。培养的组织细胞在形态学上与鳞翅目昆虫体外培养细胞相似(谢荣栋等, 1980)。贴壁细胞中以梭形、蝌蚪形和长条形贴壁细胞为主,属成纤维细胞型细胞,一般是起源于中胚

层;其余分散内有颗粒的细胞大多是具有吞噬作用的单核巨噬细胞系统的细胞,如颗粒性白细胞、淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞等(薛庆善,2001)。

**2.3.2 不同水平添加因子对细胞培养的影响:**由于体外组织细胞对培养基的理化环境(如渗透压,pH值等)很敏感,因此应小幅调整添加因子。表1表

明:添加20%胎牛血清的MM培养基和配方2对分离物具有相同的培养效果;酵母抽提物有促进分离物贴壁的作用;MM培养基与Grace培养基组合可较明显地促进分离物贴壁生长,其中以1:1配比达较好的培养效果,是7种培养基组合中最适合灰飞虱离体组织细胞贴壁培养的配方。

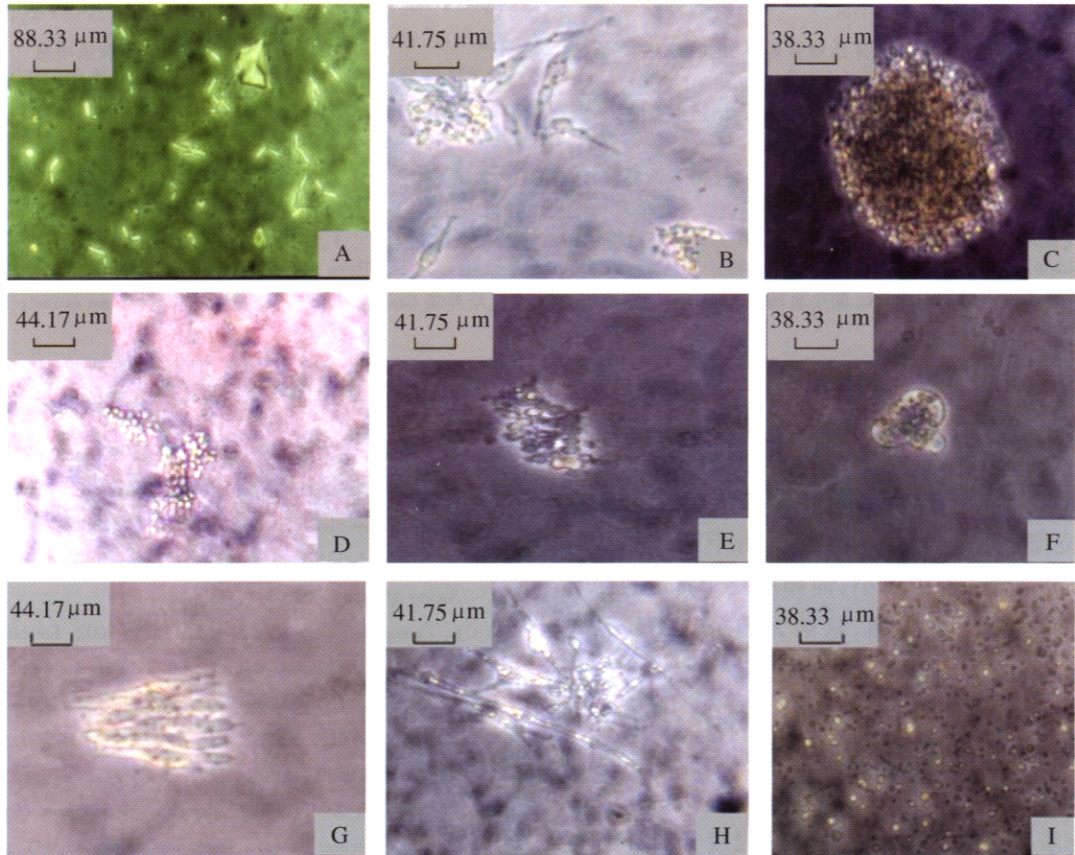


图1 培养物中的各种形态细胞

Fig. 1 Diversified cells cultured in media

A: 用显微玻璃微针分离法所得分离物中的共生菌与玻璃碎片 Yeast and fragments of glass in separations by glass micro-needle; B: 用显微银针解剖技术所得的组织块及其游离出的梭形贴壁细胞,没有共生菌 Tissues with accreting cells, and shuttle-like cells, sole or adhering each other, without yeast, separated by silver micro-needle; C: 室温(25℃)和 pH 8.0 下 0.25% 胰蛋白酶酶解 15 min 的组织块 Tissue pretreated for 15 min with 0.25% trypsin under the condition of pH 8.0 and room temperature (25℃); D: 组织块在 37℃ 和 pH 8.0 下 0.25% 胰蛋白酶酶解 20 min 所分离的细胞 Cells from tissues pretreated for 20 min with 0.25% trypsin under the condition of pH 8.0 and 37℃; E: 圆形的聚落状贴壁细胞 Round cells sticking to the bottom of bottle, gathering together; F: 梭形贴壁细胞,内有亮颗粒,细胞粘连在一起,分不清细胞界限 Shuttle-like cells adhering together, with bright particles inside, the borders of cells are invisible; G: 贴壁的长条形细胞 Long-stripe cells sticking to the bottom of bottle; H: 梭形贴壁细胞通过伪足粘连成网 Shuttle-like cells adhering each other by pseudopod to form a net; I: 圆形半贴壁细胞,有大、中、小三类 Round cells sticking to bottom partly, including large size, median size and small size.

表 1 7 种全培养基组合及其对分离物的培养情况

Table 1 The seven full culture media and their effects to the culture of separations

编号 Code	配方 Recipe	贴壁时间 Time of adherence	生长情况 Growing state
1	M 氏培养基中添加 20% 胎牛血清 MM + 20% FBS	2 周 Two weeks	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
2	戈氏培养基添加 0.3% 水解乳蛋白、0.3% 酵母抽提物和 20% 胎牛血清 Grace + 0.3% HL + 0.3% YE + 20% FBS	2 周 Two weeks	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
3	戈氏培养基添加 0.3% 水解乳蛋白和 20% 胎牛血清 Grace + 0.3% HL + 20% FBS	3 周 Three weeks	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
4	2 份戈氏培养基加 1 份 M 氏培养基再加 20% 胎牛血清 2Grace + 1MM + 20% FBS	1 月 One month	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
5	等份戈氏培养基和 M 氏培养基再加 20% 胎牛血清 1Grace + 1MM + 20% FBS	2 月以上 Above two months	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
6	戈氏培养基添加 0.2% 水解乳蛋白、0.2% 酵母抽提物和 20% 胎牛血清 Grace + 0.2% HL + 0.2% YE + 20% FBS	3 周 Three weeks	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly
7	戈氏培养基添加 0.33% 水解乳蛋白、0.33% 酵母抽提物和 20% 胎牛血清 Grace + 0.33% HL + 0.33% YE + 20% FBS	3 周 Three weeks	小圆细胞有缓慢增殖 Little round cells was duplicating slowly

MM : M 氏培养基 MM medium ; FBS : 胎牛血清 Fetal bovine serum ; Grace : 戈氏培养基 Grace medium ; YE : 酵母抽提物 Yeast extract ; HL : 水解乳清蛋白 Lactalbumin hydrolysate .

### 3 讨论

昆虫幼虫或蛹的卵巢和胚胎由于分化程度较低,是建立细胞系较理想的材料。由于灰飞虱虫体仅 2~4 mm 左右,若虫更小,而卵不足 1 mm,且虫体腹部和虫卵内皆有共生菌,这给无菌分离组织块增加了困难。为了无菌获得较多的组织块,本实验采用了小银针(半寸针灸针)作为解剖工具,具有不易锈,不易粘,耐高压和易于操作等优点。一般昆虫细胞的原代培养不用酶液分离组织块,本实验应用低浓度的酶液在其最适 pH 值和最适温度条件下作短时间消化,以大量获得疏松适当、大小适宜的组织团块和聚落细胞群。实验中采用的低幅调整营养因子添加浓度的方法获得了较适合灰飞虱胚胎组织细胞培养的培养基配方组合,其理化因子得到了优化。由于昆虫细胞系建立的工作需时较长(一般要 1~3 年或更长)(薛庆善,2001;Sudeep *et al.*,2002;李长友等,2002)培养基的更换时隔也值得探讨,本实验中采用每隔 7~8 天更换一半培养基的方法,可以尽量减低新鲜培养基对培养物的不利影响并利于空气更新。本实验结果为灰飞虱胚胎组织细胞的分离技术摸索出了一条较好的途径,初步找到了较适合灰飞虱胚胎组织细胞培养的培养基配方及培养条件,为建立灰飞虱细胞株乃至最终建立水稻条纹病毒与其媒介灰飞虱互作机制的新研究模式做了有意义的探索。

### 参考文献 (References)

- Kimura I, Murao K, Isogai M, Ando Y, Suga H, Tanji Y, Uyeda I, Shikata E, 1996. Tissue culture of vector planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallen of rice black-streaked dwarf virus (RBSDV), and inoculation of the virus to their cell monolayers. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 62(3):338.
- Li CY, Zheng GL, Wang XY, Song J, Li GX, 2002. Establishment of a cell line from the hemocytes of *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 45(2):279-282.[李长友, 郑桂玲, 王晓云, 宋捷, 李国勋, 2002. 八字地老虎血球细胞系的建立. *昆虫学报* 45(2):279-282]
- Lin HX, Lin QY, Xie LH, 1997. Research development of rice stripe virus (RSV) molecular biology. *Virologica Sinica*, 12(3):203-209.[林含新, 林奇英, 谢联辉, 1997. 水稻条纹病毒分子生物学研究进展. *中国病毒学*, 1(3):203-209]
- Ming YL, 2001. Duplication and Expression of Rice Stripe Virus (RSV) in Rice Protoplast. Master Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University.[明艳林, 2001. 水稻条纹病毒在水稻原生质体中的复制和表达. 福建农林大学硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD, 1995. Classification and nomenclature of viruses: Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.*, 10:316.
- Sudeep AB, Mourya DT, Shouche YS, Pidiyar V, Pant U, 2002. A new cell line from the embryonic tissue of *Helicoverpa armigera* Hbn. (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 38(5):262-264.
- Wei TY, 2003. Genomic Structure and Molecular Population Genetics of Rice Stripe Virus (RSV), Ph.D. Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University.[魏太

- 云, 2003. 水稻条纹病毒的基因组结构及其分子群体遗传. 福建农林大学博士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Wu AZ, Zhao Y, Qu ZC, Shen DL, Pan ZG, Su DM, 2001. Subcellular location of disease specific protein of rice stripe virus (RSV) in *Laodelphax striatellus* Fallen. *Chinese Science Bulletin*, 46(14):1183-1186. [吴爱忠, 赵艳, 曲志才, 沈大棱, 潘重光, 苏德明, 2001. 水稻条纹叶枯病毒(RSV)的SP蛋白在介体灰飞虱内的亚细胞定位. 科学通报, 46(14):1183-1186.]
- Xie LH, Wei TY, Lin HX, Wu ZJ, Lin QY, 2001. Molecular biology of rice stripe virus (RSV). *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*, 30(3):269-279. [谢联辉, 魏太云, 林含新, 吴祖建, 林奇英, 2001. 水稻条纹病毒的分子生物学. 福建农林大学学报, 30(3):269-279.]
- Xie RD, Liu XG, Yang SY, Hu YJ, 1980. Culture of hemocytes and ovarian cells from three lepidopterous insect species. *Acta Entomologica Sinica*, 23(3):249-251. [谢荣栋, 刘栖干, 杨淑艳, 胡有健, 1980. 三种鳞翅目昆虫的血球细胞和卵巢细胞的体外培养. 昆虫学报, 23(3):249-251.]
- Xue QS, 2001. *The Theory and Technology of In Vitro Culture*. Beijing: Science Press. 846-880. [薛庆善, 2001. 体外培养的原理与技术. 科学出版社. 846-880.]

(责任编辑: 黄玲巧)