

2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：050007

作品名稱

海鱸血清濃度對海鱸鰭細胞成長的影響

得獎獎項

大會獎：三等獎

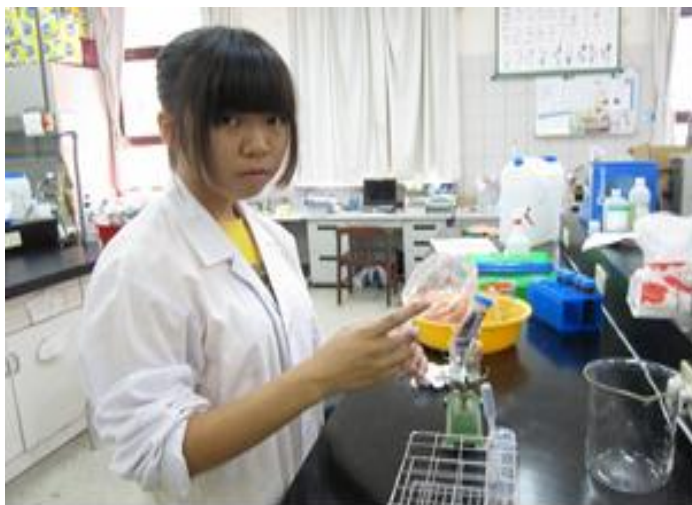
作者姓名：古大欣

就讀學校：國立馬公高級中學

指導教師：洪立菊

關鍵字：魚血清、魚類細胞株、細胞成長

作者簡介



我是古大欣，目前就讀國立馬公高級中學自然組二年級。從小在四面環海，風又很大的澎湖長大。小時候常跟著父親去海上箱網，看到養殖業者的辛苦也感受到他們拉網捕魚的喜悅。在國三那年，我踏入動物細胞培養的世界，見識到細胞分裂的奧妙。高一在老師的鼓勵下參加科展，發現科學領域是如此的寬廣。

非常榮幸有機會參加 2012 年台灣國際科學展覽會，期盼能藉此盛會拓展視野，觀摩國內外其他參展者的作品進而提升自己的能力。

摘要

本文以動物細胞培養方法探討培養基中添加海鱷血清(CS)來培養海鱷鰭細胞株(CF-2)的可行性。發現 CF-2 單層細胞培養在 L15-10/0 (L15 添加 10% FBS)、L15-5/5 (L15 添加 5%FBS 及 5%CS)、L15-2.5/7.5、L15-0/0、L15-0/1.25、L15-0/2.5、L15-0/5、L15-0/10 及 L15-0/20 等培養基 6 天後，其細胞數分別為最初的 4.16、10.8、12、0.97、4.9、5.64、8.14、11.36 及 9.72 倍。細胞接種於 L15-0/0、L15-0/1、L15-0/2、L15-0/4、L15-0/8 及 L15-0/16 等培養基 24 小時後，其附著率則分別為 23.1%、96.9%、94.8%、93%、84.5% 及 39.5%。

CF-2 繼代後直接培養在 28°C，L15-0/2 培養基中，細胞附著及成長良好，5-6 天後再以 1 對 2 進行繼代。目前已在 L15-0/2 培養基中培養 12 代以上，命名為 CF-2cs。在 1%-16% 海鱷血清濃度下，其增殖能力隨濃度增加而增加。培養在 pH 7.6、pH 7.3、pH 7.0 及 pH 6.7 的 L15-0/2 培養基中發現 pH 7.0 為其生長最適酸鹼度。CF-2cs 對嘉蠟魚虹彩病毒(RSIV)，文蛤呼腸病毒(HCRV)及淋巴囊腫瘤病毒(LCDV)等三種魚類病毒具有感受性。以 90%L15-0/2 及 10%DMSO 超低溫冷凍保存 CF-2cs，解凍後細胞附著及生長良好並在 2-3 天後長成單層。此外，L15-0/2 也可直接用來培養 RGB 及 RSS 兩種源自於玳瑁石斑及銀紋笛鯛的初代細胞。這些結果顯示海鱷血清可完全取代胎牛血清來培養魚類細胞。

Abstract

The effects of cobia serum (CS) on cell growth and partial characteristics in an adhesion culture of cobia fin cells (CF-2) were investigated. The cell proliferation ratios of CF-2 monolayer cultured in L15-10/0 (L15 supplemented 10% FBS), L15-5/5 (L15 supplemented 5%FBS and 5%CS), L15-2.5/7.5, L15-0/0, L15-0/1.25, L15-0/2.5, L15-0/5, L15-0/10 and L15-0/20 respectively for 6 days were 4.16、10.8、12、0.97、4.9、5.64、8.14、11.36 and 9.72. However, the cell attachment ratio of CF-2 cells cultured in L15-0/0, L15-0/1, L15-0/2, L15-0/4, L15-0/8 and 15-0/16 after 24 h. were 23.1%, 96.9%, 94.8%, 93.84% and 39.5% respectively. CF-2 cell has been subcultured in L15-0/2 medium for more than 12 passages and designated CF-2cs. Propagation of CF-2cs was CS dependent (1-16%) and was susceptible to red sea bream iridovirus (RSIV), lymphocystis disease virus (LCDV) and hard clam reovirus (HCRV). Using 90% L15-0/2 and 10% DMSO for the cryopresevation, the thawed CF-2cs cells were viable and grew to confluence within 2-3 days when incubated in L15-0/2 medium at 28 °C. In addition, L15-0/2 can also be used to culture two primary cells namely RGB and RSS. This suggests cobia serum could substitute FBS to culture fish cells.

壹、研究動機

台灣自 1981 年陳秀男及郭光雄兩位教授發表第一株魚類細胞株 EO-2 後，迄今已從 13 科 19 種魚類建立出 49 株以上的魚類細胞株。早年多以淡水魚做為細胞培養的材料，自 90 年代起，隨著海水養殖的興起及技術的進步，細胞株均源自於養殖的海水魚，其中石斑高達 18 株，故知源自於某種魚類細胞株數量的多寡和該魚種的產業發展有密切關聯 (滕，民 97)。

Lakra et al. (2010)整理已發表在期刊上的魚類細胞株，計至 2010 年共有 283 株魚類細胞株被建立並應用在病毒學研究，同時也朝向於研究生理學、毒物學及污染學等領域。這些魚類細胞株主要是培養在添加 10-15%胎牛血清(FBS)的 L-15 培養基中，而其中有六株細胞的培養基中除含有 FBS 外也添加 1%-5%魚類血清。

理論上，魚血清內的因子和其同源個體內的受體應有較強的作用力，也就是說其促進魚類細胞生長的能力應更強。然而，胎牛血清也含有一些已知及未知「成長因子」，容易大量取得及有多年被使用的經驗，故在培養基中添加胎牛血清似乎是理所當然的選擇。但，胎牛血清已被證實會阻止魚類細胞分化甚至誘導細胞死亡(Ganassin et al., 1992)，加上「狂牛症」的出現導致胎牛血清售價提高，故胎牛血清並不是最適當用來培養魚類細胞的血清。所以自 Wolf and Quimby (1966)以來就有研究人員嘗試在培養基中只添加魚類血清來建立及培養魚類細胞株，目前也有生物技術公司在販售鮭魚血清 <http://www.antikoerper-online.de>。

Hayashi and Ooshiro (1986)發現紅魚及鯊魚血清對單層初代細胞的附著及成長均出現負面影響。隨後雖然發現添加 1.25%鱒魚血清對培養虹鱒肝細胞的附著及增生有促進作用(Kocal et al., 1987)，可是 Part et al. (1993)以 5%虹鱒魚血清培養虹鱒鰓初代細胞，發現其細胞附著率下降至以胎牛血清培養效果的 35%-50%間。Salvo et al. (2000)嘗試以 F10-199 培養基中添加同源魚的血清擬建立 *Metynnis roosevelti* 肝組織初代細胞，但細胞附著及形成單層的效果均很差。然而，Rathore et al. (2001)在 minimum essential medium (MEM)培養基中添加 10%魚類血清卻成功建立了北非鯰魚(*Clarias gariepinus*)鰓及腎臟的初代細胞 (primary cell culture)。

魚類血清也曾被用來誘發金魚紅色腫瘤(erythrophoma)細胞分化成黑色素細胞(Matsumoto et al., 1982; Chou et al., 1989)。Rosa et al. (2010)比較烏鰡魚血清(gilthead seabream serum; GSS)及胎牛血清對 2 株源自於魚骨骼細胞株(VSa13 及 VSa16)成長(proliferation)及礦化(mineralization)的影響，結果發現 GSS 可促進 VSa-13 及 VSa16 的成長，且隨著 GSS 劑量增加而增加，其除誘發細胞外型改變外且還可控制 VSa13 細胞內和骨骼相關基因以特定方式朝細胞分化及礦化方向進行。此外，魚類血清也被嘗試應用在培養魚類細胞株(Hahimoto et al., 1997)昆蟲細胞株(Sawyer and Sawyer, 1995a)及哺乳類細胞株(Fujiwara et al., 2007; 2009; 2010; Sawyer and Sawyer, 1995b)。

海鱺為澎湖箱網養殖最大且最多的魚種，產量最高時平均每天約宰殺 550 尾，一年以 300 天計算則其流入海域的血液約有 6.6 噸，明顯影響澎湖內灣海域的生態環境(古及陸，民 97)。目前澎湖因冬天常出現寒潮導致養殖數量銳減，但海鱺一年可成長 5-6 公斤且肉質鮮美等因素已誘使一些國外業者陸續投入生產 (Benetti et al., 2010)。



澎湖海水箱網



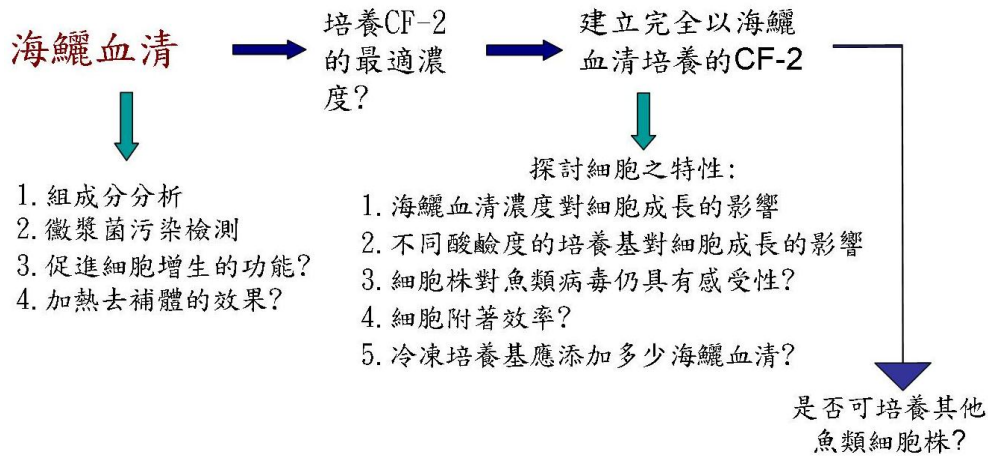
箱網養殖的海鱺

貳、研究目的

本研究擬以不同比例的海鱷魚血清濃度取代胎牛血清來培養海鱷鰭細胞株 (CF-2)，觀察其對細胞外部型態及成長的影響。其目的在探討海鱷魚血清完全取代胎牛血清的可行性，期望能減少胎牛血清的使用量及降低海鱷養殖產業對海洋污染，達到永續經營的概念。

參、研究設備及器材

實驗架構



一、材料:

1. 細胞株:

實驗中使用到的細胞株有 RGB (Ku et al., 2009), RSBF (Ku et al., 2010), CF-2(鄭兆廷, 民 99), RSS (陸及古, 民 100), TO-2(Chen et al., 1983)及 GBC1(wen et al., 2008)。TO-2 及 GBC1 分別由台灣大學生命科學系陳秀男系教授及高雄大學生命科學系溫秋明副教授贈送, 其餘均來自澎湖科技大學水產養殖系古鎮鈞教授實驗室。所有細胞均培養在添加 10%的胎牛血清的 Leibowitz medium L-15 中, 恆溫培養的溫度為 28°C。

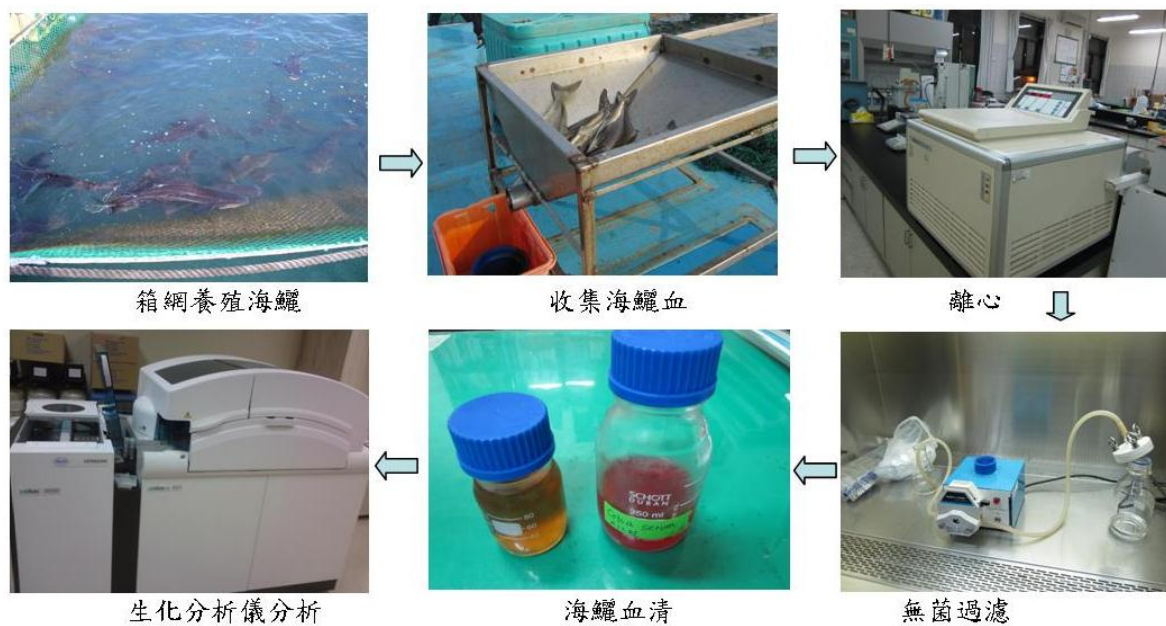
2. 培養基的製備:

將 Leibovitz medium L-15 (Flow Laboratories, Scotland)粉狀培養基溶於二次蒸餾水, 調整酸鹼度後以內含 0.22 μ m 濾紙的無菌過濾器過濾。加入所需濃度的胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS, GIBCO)或海鱧血清(cobia serum, CS) 及 100 IU/ml 之 penicillin 及 100 ug/ml 之 streptomycin (GIBCO)後, 貯藏於 4°C 下備用。

含 5% FBS 及 5% CS 的 L-15 以 L15-5/5 表示, 而含 0% FBS 及 2% CS 者則以 L15-0/2 表示, 其餘依此類推。

3. 海鱷魚血清的製備及組成分分析:

海鱷血取自天和海洋開發股份有限公司位於澎湖縣二崁海域的箱網養殖場。將海鱷冰暈後宰殺排的血收集後，於 4°C 靜置過夜。以 461g (SIGMA 3-12) 離心 10 分鐘後，取其上清液，保存在 -80°C。使用前取適量先分別以 0.8 μ m 及 0.45 μ m 針筒過濾器過濾後，再以無菌的 0.22 μ m 針筒過濾器 (Sartorius Stedim Biotech GmbH 37070 Goettingen Germany) 在無菌操作台內過濾。過濾後的海鱷血清保存在 50 ml 的無菌瓶中，貯藏於 4°C 下備用。部分進行黴漿菌檢測，部份送至國軍澎湖醫院生化檢驗中心以生化分析儀進行組成分分析。



4. EDTA-磷酸緩衝溶液 (Phosphate-Buffered Saline: PBS-EDTA)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
EDTA	0.2 g
二次蒸餾水	1000 mL

高溫滅菌後，保存於室溫。

5. 胰蛋白酶溶液(1%)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
EDTA	0.2 g
Trypsin	1 g
二次蒸餾水	1000 mL

以 0.22μm 滅菌過濾膜過濾後，保存於 4 °C。

6. TAE buffer (50X) (AMRESCO)

Tris base	0.04 M
Acetate	0.04 M
EDTA	0.001M

使用前稀釋 100 倍

7. Agarose gel (2%)

Agarose	2 g
TAE buffer	98 ml
Ethidium Bromide	5ul

二、設備與器材：



無菌操作台



倒立顯微鏡



粒度計數器



二次蒸餾水製造機



高溫高壓滅菌釜



乾燥箱



離心管(50 ml)



等臂天平



離心機



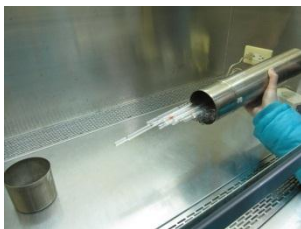
吸管輔助器



電秤



滅過菌的實驗用品



刻度吸量管



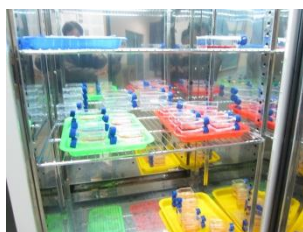
過濾膜 ($0.22\ \mu\text{m}$)



L-15 培養基



液態氮冷凍桶



恆溫培養箱



T-25 角瓶



電磁攪拌器



胎牛血清及海鱷血清



實驗室一景

肆、研究過程或方法

一、繼代培養:

倒立顯微鏡下觀察,發現細胞長滿單層時即可在無菌操作台中進行繼代培養。首先將角瓶中的舊培養基倒掉,加入 PBS-EDTA 清洗後倒棄,再加入約 3ml 胰蛋白酶溶液,移至倒立顯微鏡(Nikon TR-2000S)下觀察,待細胞收縮後倒棄胰蛋白酶溶液。以手輕拍角瓶使細胞脫離生長面並分散成顆粒。加入 15ml 新鮮培養基,混合均勻後再平均分配到新的培養瓶中。通常一個培養瓶經繼代培養後,可分配成三個培養瓶。

二、連續顯微照相:

將培養細胞的 T-25 角瓶置於倒立顯微鏡觀察台上,使用拍照軟體(ACT- 2U)進行觀察,調焦後以每 3 分鐘拍攝 1 次方式拍攝 150 次。再以 Windows Movie Maker 軟體,製成影片。觀察細胞分裂及移動的情形。

三、細胞計數:

4-well 平盤中的細胞以 PBS-EDTA 清洗後添加 1ml 胰蛋白酶溶液,待細胞收縮後直接以吸管吸吐孔內的胰蛋白酶溶液將細胞沖散。將細胞懸浮液加入內含 9ml PBS 的專用計數杯中。使用粒度計數器(Z1 Coulter^R Particle Counter, Beckman) 計算每孔介於 10um-30um 的顆粒數。細胞數=顆粒數 x 20。

四、L15 添加不同比例之 FBS/CS 對 CF-2 細胞成長的影響: (實驗 1)

將一定數量細胞接種於含 L15-10/0 培養基的 4-well 平盤中,每孔細胞數目相同,置於 28°C 培養箱。隔夜後取出 1 個 4-well 平盤計算各孔之細胞數目。其餘 4-well 平盤則倒棄培養基, PBS-EDTA 清洗後分別加入 1ml 的 L15-10/0、L15-5/5、L15-2.5/7.5、L15-0/0、L15-0/1.25、L15-0/2.5、L15-0/5、L15-0/10 及 L15-0/20 培養基,置於 28°C 培養箱中培養。每日觀察其外觀變化並拍照。6 天後自培養箱取出,分別計算其細胞數目。實驗為四重複。

五、去補體海鱷血清對 CF-2 成長的影響:(實驗 2)

將一定數量細胞接種於含 L15-10/0 培養基的 4-well 平盤中，每孔細胞數目相同，置於 28℃ 培養箱。隔夜後取出 1 個 4-well 平盤計算各孔之細胞數目。其餘 4-well 平盤則倒棄培養基，PBS-EDTA 清洗後分別加入內含去補體(56℃，30 分鐘處理)及未去補體海鱷血清之 L15-0/0、L15-0/1.25、L15-0/2.5、L15-0/5、L15-0/10 及 L15-0/20 培養基，置於 28℃ 培養箱中培養。每日觀察其外觀變化並拍照。6 天後自培養箱取出，分別計算其細胞數目。實驗為四重複。

六、海鱷血清濃度對 CF-2 附著率之影響:(實驗 3)

將一定量細胞分別接種至內含培養基之 4-well 平盤中，使其最後血清濃度為 15-0/0、L15-0/1、L15-0/2、L15-0/4、L15-0/8 及 L15-0/16 並置於 28 °C 培養箱培養。24 小時後自培養箱取出，分別觀察其外觀並拍照及計算細胞數目。實驗為四重複。

七、建立以全海鱷血清培養的 CF-2 細胞株:(實驗 4)

CF-2 繼代後直接培養在內含 L15-0/4，L15-0/2 或 L15-0/1 培養基的 T-25 角瓶中，放置在 28℃ 恆溫培養箱中培養。細胞長滿單層後進行繼代，並以 1 對 2 方式進行分裝。觀察細胞生長狀況。

八、海鱷血清濃度對 CF-2cs 成長的影響:(實驗 5)

培養在只含海鱷血清培養基的 CF-2 細胞命名為 CF-2cs。將一定量細胞分別接種至內含培養基之 4-well 平盤中，使其最後血清濃度為 15-0/0、L15-0/1、L15-0/2、L15-0/4、L15-0/8 及 L15-0/16 並置於 28 °C 培養箱培養。每隔 1 天或 2 天自培養箱中取出，分別觀察其外觀並拍照及計算細胞數目。實驗為四重複。

九、培養基酸鹼度對 CF-2cs 成長的影響:(實驗 6)

將一定量 CF-2cs 細胞分別接種至內含不同酸鹼度 L15-0/2 培養基的 4-well 平盤中，使其培養基最後酸鹼度分別為 pH7.6，pH7.3，pH7.0 及 pH6.7，置於 28℃ 培養箱中培養。每隔 1 天或 2 天自培養箱中取出，分別觀察其外觀並拍照及計算細胞數目。實驗為四重複。

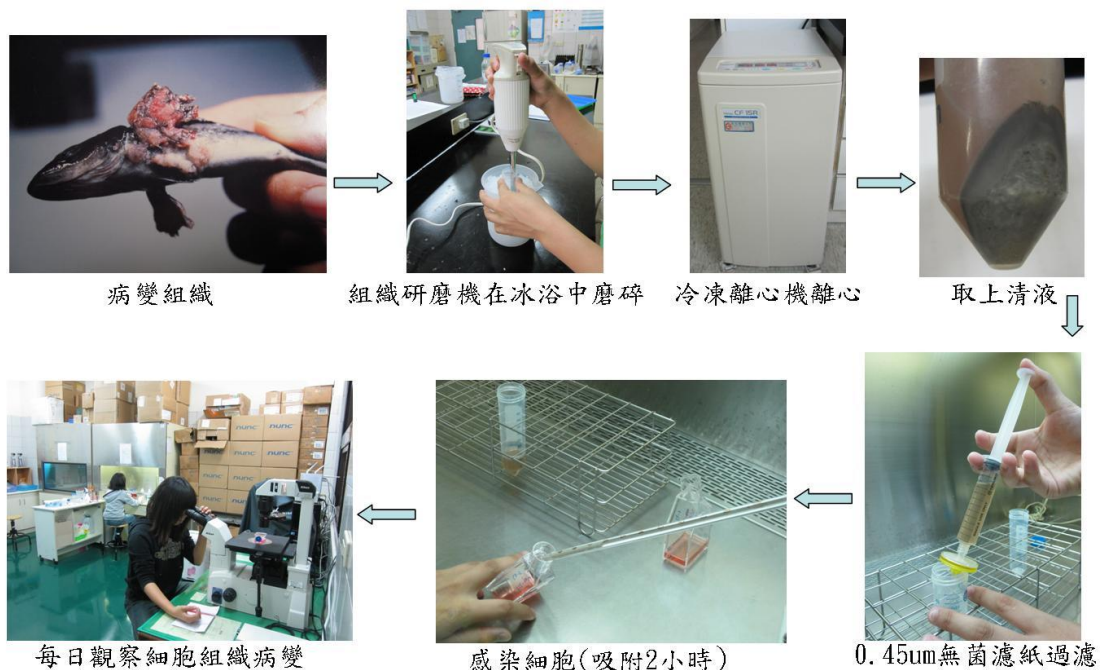
十、細胞附著效率:(實驗 7)

將 CF-2cs 細胞適度稀釋使之為 1000 細胞/ml。分別取 1000 個及 100 個細胞接種於 6-well 平盤中並培養於 28 °C。10 天後將培養盤取出，以 PBS-EDTA 清洗，10% 福馬林固定 10 分鐘後，再以 1% 結晶紫染色。計算每孔的細胞群落。

十一、細胞對四種魚類病毒的感受性:(實驗 8)

四種魚類病毒分別為淋巴囊腫瘤病毒(LCDV)，嘉蠟虹彩病毒(RSIV)，文蛤呼腸病毒(HCRV)及石斑魚神經壞死病毒(NNV)。RSIV，HCRV 及 NNV 為保存在-80 °C 的病毒液。LCDV 為為保存在-80°C 的病毒組織。故在實驗前先將病魚鰭組織浸泡在內含 L15 培養基的離心管中，利用均質機在冰浴中研磨 1 分鐘，再以 4500 rpm 離心 10 分鐘。將上清液以 0.45 um 無菌針筒過濾器過濾。

取培養在 T-25 角瓶且生長良好的 CF-2cs 細胞，分別接種 LCDV，RSIV，HCRV 及 NNV 病毒液 0.5ml，吸附 2 小時後倒棄病毒液體，以 PBS-EDTA 清洗後加入 L15-0/2 新鮮培養基，放置在 28°C 恆溫箱中培養。每日觀察是否出現細胞組織病理變化(Cytopathic effect; CPE)，連續觀察 10 天。若沒有出現 CPE，則將之繼代並再觀察 10 天。



十二、超低溫冷凍保存: (實驗 9)

以 PBS-EDTA 清洗培養在 T-75 角瓶中的 CF-2cs 細胞，加入胰蛋白酶，待細胞收縮後將細胞拍散，以刻度吸管將細胞收集至 50 mL 離心管，再以 180 g 離心 10 分鐘後。小心倒棄上清液後，輕輕敲散離心管底部之細胞。加入 10 mL 冷凍培養基 (10% DMSO, 90% L15-0/2)，混合均勻後將其分裝至冷凍小管中並置於保麗龍箱內。以膠帶密封後置於-80°C 中逐步降溫。隔夜將小管固定在鋁條上並快速冷凍保存在液態氮桶中。1 個月後取出冷凍小管，在室溫下以自來水沖洗冷凍小管瓶身進行解凍。解凍後將細胞接種在內含 L15-0/2 培養基之 T-25 角瓶內，置於 28°C 培養箱中培養。隔日觀察其附著及成長情形。



十三、他種魚類細胞株培養在 L15-0/2 的表現: (實驗 10)

TO-2, GBC1, RGB, RSBF 及 RSS 等魚類細胞繼代後分別加入 10-15 ml L15-0/2 之新鮮培養基，混合均勻後再平均分配到新的培養瓶中。觀察繼代後細胞的外型表現及成長情形。每隔 6-7 天繼代 1 次，連續觀察 1 個月以上。

十四、黴漿菌檢測: (實驗 11)

1. 樣品製備:

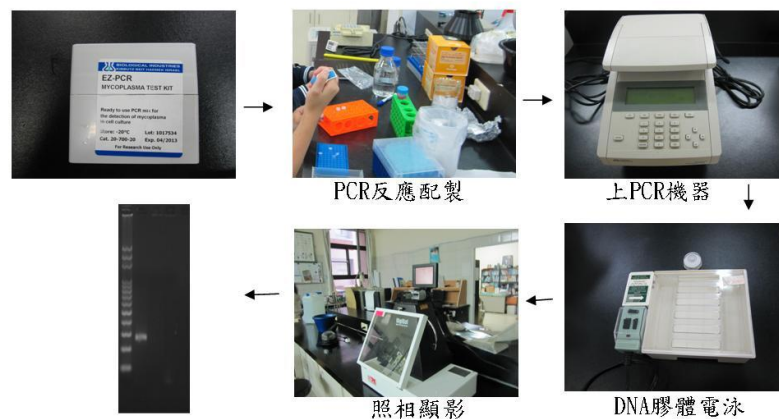
使用微量吸管抽取 0.5-1mL 海鱷血清至微量離心管中，以 300rpm 離心 5 分鐘 (HITACHI himacCF-15R)。抽取上清液並再以 15000 rpm 離心 15 分鐘。小心地倒棄上清液並加入 50 μ l Buffer Solution，以微量吸管將之充分混合。95°C 加熱 3 分鐘 (Thermolyne Dri-Bath Type 17600)。後，保存於- 20 °C 或立刻進行下列步驟。

2. 聚合酶連鎖反應

將 5 μ l 的樣品或 1 μ l 正反應模板加入 PCR 專用的微量離心管中，離心管內含有 35 μ l 二次蒸餾水及 10 μ l 的 Reaction Mix。將之置於聚合酶連鎖反應器 (GenewAmp RPC^R System 2700) 進行循環加熱反應，反應程式為 94 $^{\circ}$ C 30 秒，而後以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 2 分鐘、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 35 次循環。最後以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 2 分鐘、72 $^{\circ}$ C 5 分鐘結束反應。

3. 電泳膠分析擴大的產物:

反應結束後，以 2 % 洋菜膠體進行電泳分析。取 20 μ L 的 PCR 產物及 2.5 μ L 的 100 bp ladder DNA Marker 分別加入電泳膠體之孔洞中。以 100V 電壓進行電泳。將電泳膠片置於紫外光燈箱上觀察與拍照。



伍、研究結果

CF-2 為源自於海鱷鰭組織的附著型細胞，例行培養在 28°C，L15-10/0 的培養基。外型為纖維狀(Fig.1A)，長滿後細胞間的輪廓不明顯(Fig.1B)。當細胞在「饑餓」時 (超過 5-7 天未繼代)，細胞質出現空泡，細胞核周圍會出現黑點(Fig.1C)。

一、L15 添加不同比例之 FBS/CS 對 CF-2 細胞成長的影響: (實驗 1)

CF-2 於 L15-10/0 隔夜培養並形成單層後，分別更換成含不同比例%FBS/%CS (10/0、5/5、2.5/7.5、0/0、0/1.25、0/2.5、0/5、0/10 及 0/20)的 L15 培養基。6 天後計算其細胞數目，發現其細胞數分別為最初細胞數的 4.16、10.8、12、0.97、4.9、5.64、8.14、11.36 及 9.72 倍 (Fig. 2)。

二、去補體海鱷血清對 CF-2 成長的影響 (實驗 2)

CF-2 單層細胞分別培養在含去補體(56°C，30 分鐘處理)及未去補體海鱷血清之 L15-0/0、L15-0/1.25、L15-0/2.5、L15-0/5、L15-0/10 及 L15-0/20 等培養基 6 天後，發現去補體海鱷血清促進 CF-2 單層成長的效率約為未去補體海鱷血清的 3/4 (Fig. 3)。

三、海鱷血清濃度對 CF-2 附著率之影響: (實驗 3)

將定量細胞分別培養在 L15-0/0、L15-0/1、L15-0/2、L15-0/4、L15-0/8 及 L15-0/16 培養基中 24 小時後其附著率分別為 23.1、96.9、94.8、93、84.5 及 39.5 (Fig.4)。培養在 L15-0/0 細胞快速附著及伸展，其他組則隨海鱷血清濃度增加其附著及伸展能力漸緩。細胞聚集無法均勻散布的現象也越趨顯著(Fig. 5)。

四、建立以全海鱷血清培養的 CF-2 細胞株: (實驗 4)

CF-2 繼代後直接培養在內含 L15-0/4，L15-0/2 或 L15-0/1 培養基的 T-25 角瓶中，放置在 28°C 恆溫培養箱中培養。細胞約 4-6 天長滿單層。繼代後以 1 對 2 方式進行分裝。發現培養在 L15-0/4 的細胞之細胞質會出現較多黑點，而 L15-0/1 則成長較緩慢，故以 L15-0/2 作為例行培養的濃度。目前已繼代 12 次以上，細胞生長良好，命名 CF-2cs (Fig.6)。

五、海鱺血清濃度對 CF-2cs 成長的影響:(實驗 5)

CF-2cs 在不含血清的培養基中並不增生，但細胞增殖數會隨著海鱺血清濃度(1%至 16%)增加而增加(Fig.7)，然出現在細胞聚集及細胞質的黑點也隨之增加(Fig.8)。

六、培養基酸鹼度對 CF-2cs 成長的影響:(實驗 6)

CF-2cs 直接接種在 pH 7.6, pH 7.3, pH 7.0 及 pH 6.7 的 L15-0/2 培養基 7 天後，其細胞增殖數以培養在 pH 7.3 者最高，pH 7.0 者次之，然後為 pH 6.8，最差者為 pH 7.6 (Fig. 9)。細胞外型則以培養在 pH 7.0 及 pH 6.8 者最為“健康”，而培養在 pH 7.6 及 pH 7.3 的細胞外型則嫌“瘦長”(Fig. 10)。

七、CF-2cs 的細胞附著效率:(實驗 7)

分別接種 1000 個及 100 個 CF-2cs 細胞至內含 L15-0/2 (pH 7.0) 6-well 平盤中，10 天後計算細胞群落，發現其細胞附著效率均為 0。

八、CF-2cs 細胞對四種魚類病毒的感受性:(實驗 8)

CF-2cs 感染 RSIV 在 3 天時出現反光顆粒狀細胞，最後脫離單層漂浮在培養基中，繼代後，前述 CPE 現象更加明顯。HCRV 的細胞則在感染 2 天後出現細胞融合或破裂等徵狀，5 天後所有細胞均破裂。而感染 LCDV 的 CF-2cs 則在 5-6 天時才出現腫大細胞(Fig.11)。然而，CF-2cs 對 NNIV 則未出現任何 CPE 症狀。

九、CF-2cs 細胞超低溫冷凍保存:(實驗 9)

存放在液態氮內的細胞經急速解凍後接種至內含 L15-0/2 培養基之 T-25 角瓶內，置於 28°C 培養箱中培養。隔日觀察發現細胞附著率約為 85-90%，細胞外型正常。更換新鮮培養基後約在 3-4 天內長成單層。

十、他種魚類細胞株培養在 L15-0/2 的表現:(實驗 10)

細胞繼代後直接以酸鹼度 pH 7.0 之 L15-0/2 培養基培養 TO-2、GBC1、RGB、RSBF 及 RSS 等 5 種細胞，發現只有源自於玳瑁石斑腦部的 RGB(25 代)及銀紋笛

鯛吻的 RSS(20 代)細胞可附著及長滿單層。然 RSBF，TO-2 及 GCB1 等細胞株則在繼代 1-2 次因細胞無法附著而死亡(Fig.12)。

十一、海鱷血清的組成分析及黴漿菌檢測:(實驗 11)

Table 1 顯示海鱷血清不含低密度膽固醇，其所含類固醇，三酸甘油脂及高密度膽固醇的含量分別為胎牛血清的 2.6，1.75 及 8.35 倍。檢測兩批海鱷血清並沒有發現其為黴漿菌汙染 (Fig. 13)。

陸、討論

本研究發現海鱷血清可完全取代胎牛血清來培養 CF-2 細胞，且其仍保有接受三種魚類病毒的特性。

海鱷血清含有促進 CF-2 增生的因子，其促進細胞增生的效率約為 FBS 的 9.42 倍。然而，以 56°C，30 分鐘去補體處理後，其促進細胞增生能力約下降 25%。以生化分析儀分析及比較海鱷血清及胎牛血清，發現海鱷血清中的類固醇(Cholesterol)、三酸甘油酯(triglycerol) 及高密度膽固醇(HDL)含量分別為 FBS 的 2.6、1.75 及 8.35 倍，類似的結果亦可在 Fujiwara et al.(2009)的研究中發現(Table 2)。Fujiwara et al.(2009)將萃取的油脂添加到培養基中結果抑制了細胞的成長，故推論魚血清中的高油脂濃度會抑制中國倉鼠細胞細胞(CHO)的成長，故建議將魚血清以熱處理或降低魚血清濃度來培養 CHO 細胞。本研究亦發現類似結果，當海鱷血清以 56°C 30 分鐘去補體處理後，其促進 CF-2 單層成長的效率約減少 1/4 (Fig. 3)；細胞接種在含有 16%海鱷血清的培養基時，細胞會出現空泡，核周圍會出現黑點，進而導致細胞死亡，故 24 小時後的附著率只有 39.5% (Fig. 4)。然而一些不確定因素，細胞在 2-3 天後外型恢復正常，成長加速，最後增生的細胞數超越培養在 8%海鱷血清的實驗組細胞(Fig. 5)。推測可能和 CF-2 源自於海鱷，故其對自體血清的接受性較高有關。

雖然海鱷血清可完全取代胎牛血清來培養 CF-2，但其添加在 L15 培養基的濃度必須低於 8%，最適濃度為 2-4%。濃度高於 8%時，出現在 CF-2cs 細胞質的黑點會增加。Matsumoto et al.(1982)發現魚血清可誘發金魚腫瘤細胞分化黑色素。然而本實驗無法確定這些黑點就是黑色素，因為這些黑點會隨著細胞對培養基的適應而逐漸消失，若成長不好則黑點會持續存在。目前以添加 2%海鱷血清來維持細胞，約 5-6 天以 1 對 2 方式繼代細胞，當需要大量細胞時則以 4%海鱷血清來增生細胞。

Chou et al. (1989) 指出超低冷凍保存黑化(melanized)細胞株時須在冷凍培養基中添加適量魚血清，並推測在冷凍培養基中添加適量同源物種的血清對超低溫冷凍保存一些敏感性的細胞的特性有其優越性。故本研究試圖以海鱷血清取代

胎牛血清來保存 CF-2cs。鄭 (民 99)以含 40%胎牛血清，10% DMSO 及 50% L15 的冷凍培養基及「逐步冷凍，快速解凍」方式保存及解凍細胞獲得 75%以上存活率。本研究發現只將上述冷凍培養基的「胎牛血清」以「海鱷血清」代替但「濃度」不變，解凍後隔天觀察發現存活率為零。推測原因應為冷凍培養基中的海鱷血清的濃度過高，導致解凍後細胞死亡。經觀察細胞在不同海鱷血清濃度的附著率後，將冷凍培養基配方更改成 10% DMSO 及 90% L15-0/2，細胞解凍後附著及成長良好，2-3 天後長滿單層。

本研究採集的血清來自 6-8kg 的海鱷，魚隻宰殺後將之放置在特製的血液收集檯上(見圖)，冷藏保存在 4°C，隔夜離心取血清，超低溫冷凍在-80°C。每尾魚約可取得 50ml 的血液，製備成 20-25ml 的血清。某次業者宰殺 150 尾海鱷，離心後約取得 4400 ml 的血清。海鱷血清不含膠狀物可輕易的以濾紙過濾，以 Israel Beit Haemek LTD 生產的 EZ-PCR mycoplasma test kit 檢驗兩批海鱷血清都沒有發現黴菌。故知此血液收集流程為可行。和胎牛血清一樣，海鱷血清儲存在 4°C 時會出現沉澱物，然將之離心後取上清液仍具有促進細胞生長功能。但其也容易氧化，建議應將海鱷血清分裝並冷凍在-80°C，使用時再取出無菌過濾。

為了解海鱷血清在商業上的可利用性，本研究試圖以海鱷血清培養源自於其他魚類的細胞株發現除可應用在海鱷鰭細胞株外，還可應用在玳瑁石斑及銀紋笛鯛的初代細胞。至於海鱷血清無法培養 TO-2，GBC1 及 RSBF 等細胞株可能和這些細胞株長期培養在胎牛血清中有關。目前正嘗試以海鱷血清來建立魚類細胞初代細胞，進而培養出永久細胞株。

柒、結 論

本研究發現海鱷血清含有促進 CF-2 增生的因子，其促進細胞增生的效率約為 FBS 的 9.42 倍。海鱷血清可完全取代胎牛血清來培養 CF-2 細胞，其最適濃度為 2-4%。以海鱷血清培養的細胞(CF-2cs)對三種魚類病毒仍具感受性。

捌、參考資料

- 古鎮鈞、陸知慧 (民 97)。箱網養殖對海域衝擊之管理。載於澎湖的海水箱網養殖 (台大漁 推, 19, 143-159 頁)。台北市, 國立台灣大學漁業推廣委員會。
- 陸知慧、古鎮鈞 (民 100)。銀紋笛鯛 (*Lutjanus argentimaculatus*) 吻端細胞株的建立及部分特性鑑定。未發表資料。
- 騰育成 (民 97)。玳瑁石斑細胞株的建立及特性研究。國立澎湖科技大學海洋創意產業研究所碩士論文, 澎湖縣。
- 鄭兆廷 (民 99)。建立與探討一株對淋巴囊腫病毒具敏感性之海鱺鰭細胞株。國立澎湖科技大學海洋創意產業研究所碩士論文, 澎湖縣。
- 蔡美玲、張瑞璋、陳宏遠 (2009), 不同魚體大小之海鱺其肝臟脂肪蓄積及過氧化體增生劑活化受體 α mRNA 之表現。國立高雄海洋科技大學學報, 第 23 期, pp. 63-78。
- Benetti, D.D., O'Hanlon, B., Rivera, J.A., Welch, A.W., Maxey, C., Orhun, M.R. (2010). Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. *Aquaculture* 302:195-201.
- Chen, S.N., Chi, S.C., Uneo, Y. and Gou, G.H. (1983). A cell line derived from Tilapia ovary. *Fish Patho.* 18(1):13-18.
- Chou, S.C., Taylor, J.D. and Tchen, T.T. (1989). Isolation of melanized cell lines with stable phenotypes from a goldfish erythroderma cell line and cryopreservation of these cells by the use of autologous serum. *In Vitro Cellu. Develop.* 25(9): 813-820.
- Fryer, J.L. and Lannan, C.N. (1994) Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *J. Tisu. Cult. Meth.* 16: 87-94.
- Fujiwara, M., Tsukada, R., Tsujinaga, Y. and Takagi, M. (2007). Fetal calf serum-free culture of Chinese hamster ovary cells employing fish serum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 983-987.

- Fujiwara, M., Tsukada, R., Shioya, I. and Takagi, M. (2009). Effects of heat treatment and concentration of fish serum on cell growth in adhesion culture of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology* 59:135-141.
- Fujiwara, M., Aizu, Y. Shioya, I. and Takagi, M. (2010). Fetal calf serum-free suspension culture of Chinese hamster ovary cells employing fish serum. *J. Biosci. Bioeng.* 109: 307-309.
- Hayashi, S. and Ooshiro, Z. (1986). Primary culture of the cell hepathocytes in the serum-free medium. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52(9):1641-1651.
- Hahimoto, H., Toyohara, H., Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Ozato, K. and Wakamatsu, Y. (1997). Effects of carp serum on the growth of goldfish fin cells in early passage. *J. Fish. Biol.* 50,201- 207.
- Kocal, T., Quinn, B.A., Smith, J.R., Ferguson, H.W. and Hayes, M.A. (1987). Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *In Vitro Cellu. Develop. Biol.* 24(4): 304-308.
- Ku. C.C., Lu, C.H. and Wang, C.S. (2010). Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from the dorsal fin of red sea bream, *Pargus major* (Temminck & Schlege). *J. Fish Dis.* 33: 187-195.
- Lakra, W.S., Swaminathan, T.R. and Joy, K.P. (2010). Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiol. Biochem.* DOI 10.1007/s10695-010-9411-x.
- Matsumoto, J., Lynch, T.J., Grabowski, S.M., Taylor, J.D. and Tchen, T.T. (1982). Induction of melanized cells from a goldfish erythrophorma: isolation of pigment translocation variants. *Science* 217: 1149-1151.
- Part, P., Norrgren, L., Bergstrom, E. and Sjoberg, P. (1993). Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. *J. exp. Biol.* 175: 219-232.
- Rathore, G., Sood, N. and Swaminathan, R. (2001). Primary cell culture from fish gills and kidney using fish serum. *Indian J. Exp. Biol.* 39: 936–938.
- Rosa, J., Tiago, D.M., Dias, J. Cancela, M.L. and Laize (2010). Serum-specific

- stimulation of proliferation and mineralization of fish bone-derived cells. J. Appl. Ichthyl. 26:251-256.
- Salvo, L.M., Malucelli, C.M.I., Richartz, R.R.T.B. and Bacila, M. (2000). Primary culture of hepatic cells from *Metynnis roosevelti* (Pisces, Teleostei, Characidae). Braz. J. Vet. Res. Anim. 37(5): doi:10.1590/S1413-9596200000050004.
- Sawyer, E. and Sawyer, P.J. (1995a). Method for culturing insect cells in a medium containing fish serum. United states patents 5401653.
- Sawyer, E.S. and Sawyer, P.J. (1995b). Method for culturing mammalian cells in a medium containing fish serum. United States patents 5443984.
- Wen, C.M., Lee, C.W., Wang, C.S., Cheng, Y.H. and Huang, H.Y. (2008). Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. Aquaculture 278: 14-21.

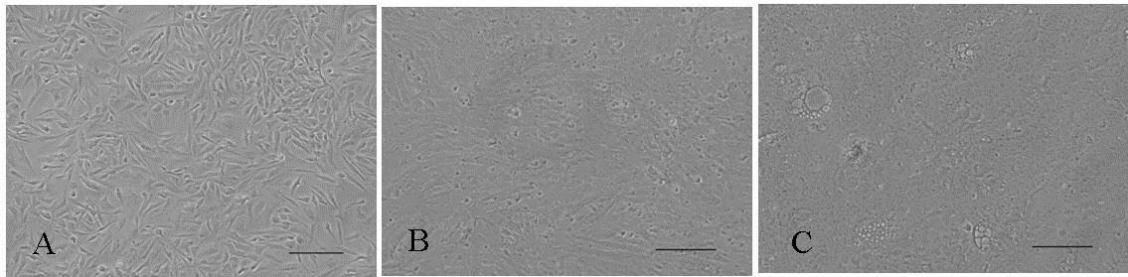


Fig. 1. 培養於 L15-10/0 之 CF-2，外型為纖維狀(A)，長滿後細胞間的輪廓不明顯(B)。當細胞超過 5-7 天未繼代，細胞質出現空泡，核周圍出現黑點(C)。尺規= 100 μ m。

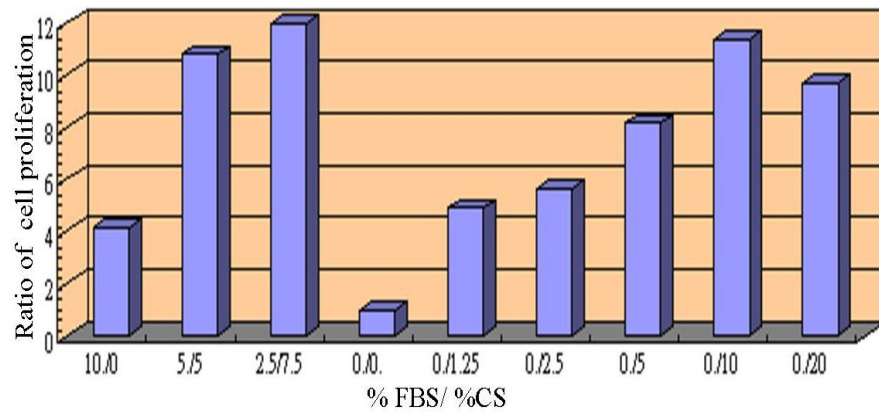


Fig.2. L15 添加不同比例之 FBS/CS 對 CF-2 細胞成長的影響: FBS:胎牛血清，CS:海鰻血清。

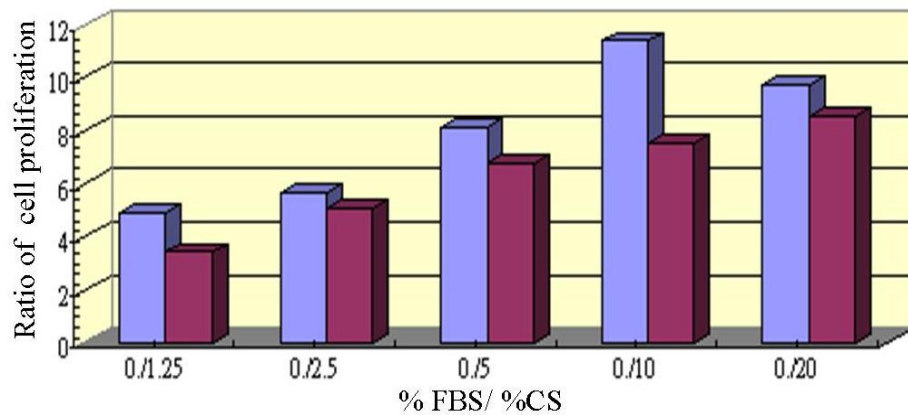


Fig.3. 去補體海鰻血清對 CF-2 成長的影響: FBS:胎牛血清，CS:海鰻血清。

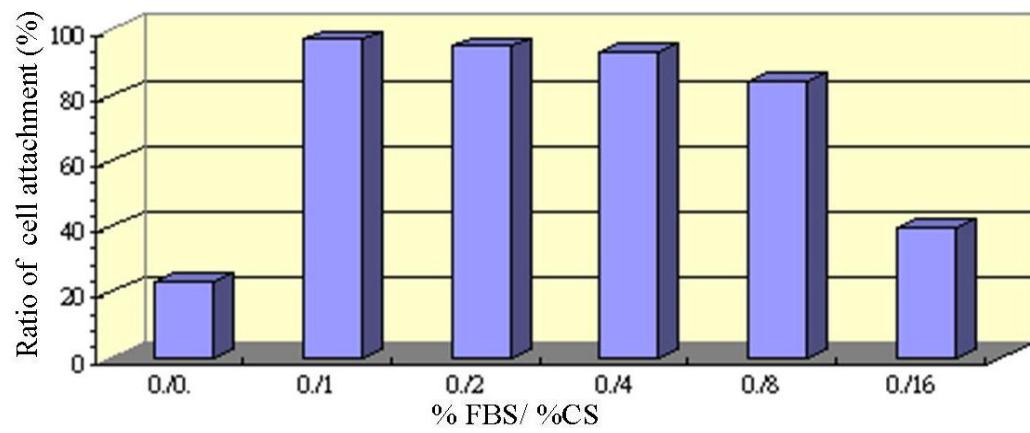


Fig.4. 海蠟血清濃度對 CF-2 附著率之影響

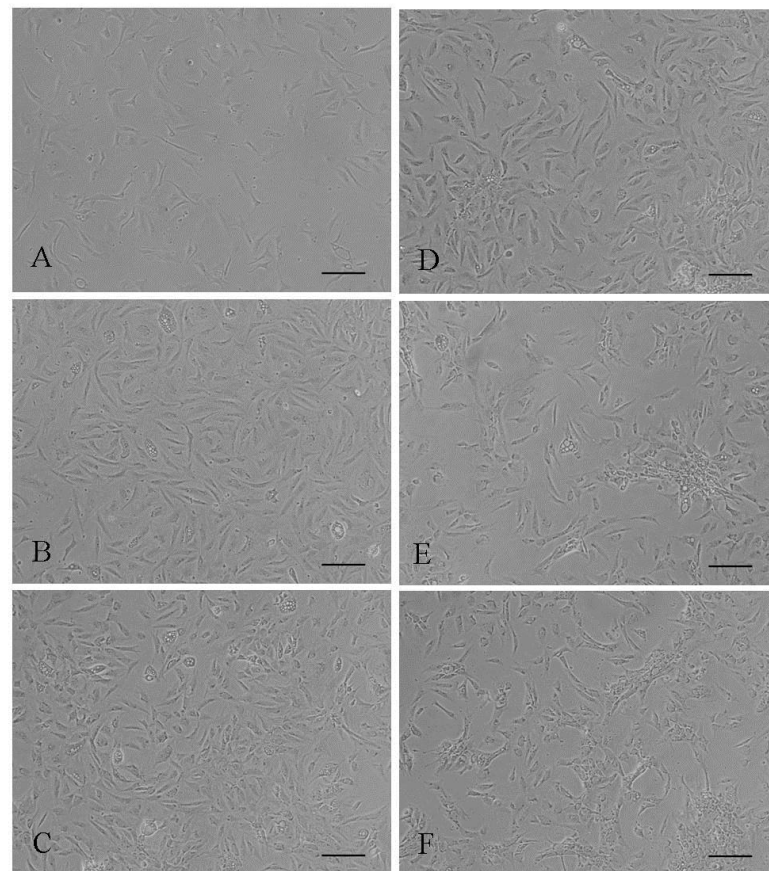


Fig.5. CF-2 接種在 A:L15-0/0, B:L15-0/1, C:L15-0/2, D:L15-0/4, E:L15-0/8 及 L15-0/16 等培養基 24 小時後之細胞。細胞附著及伸展能力隨海蠟血清濃度增加而減緩。尺規= 100 μ m。

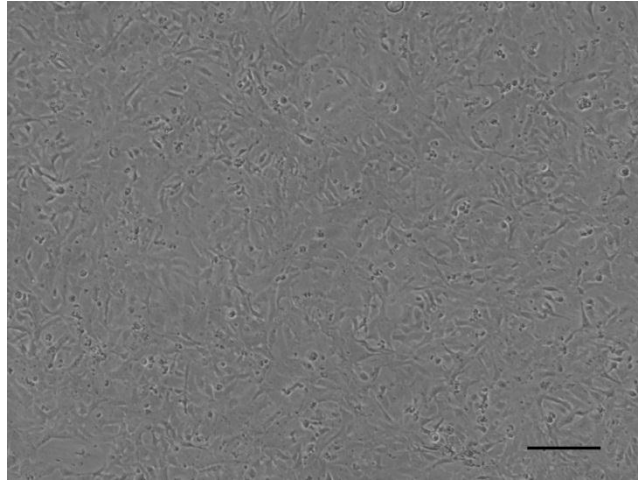


Fig.6. CF-2cs (第 12 代)的像位差顯微照片，尺規= 100 μ m

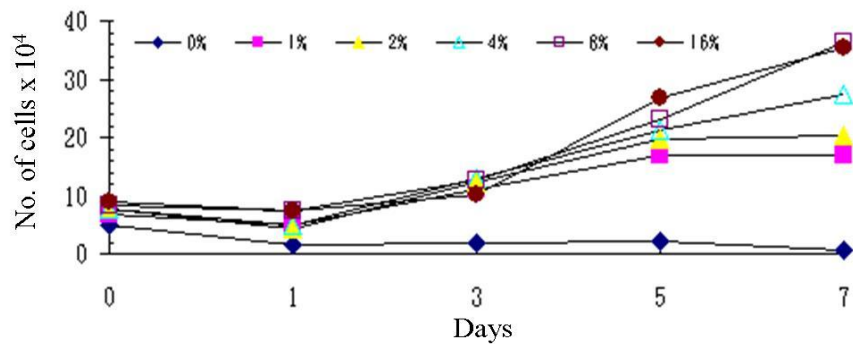


Fig.7. 海鱧血清濃度對 CF-2cs 細胞在 28°C 下成長的影響。實驗為四重複。

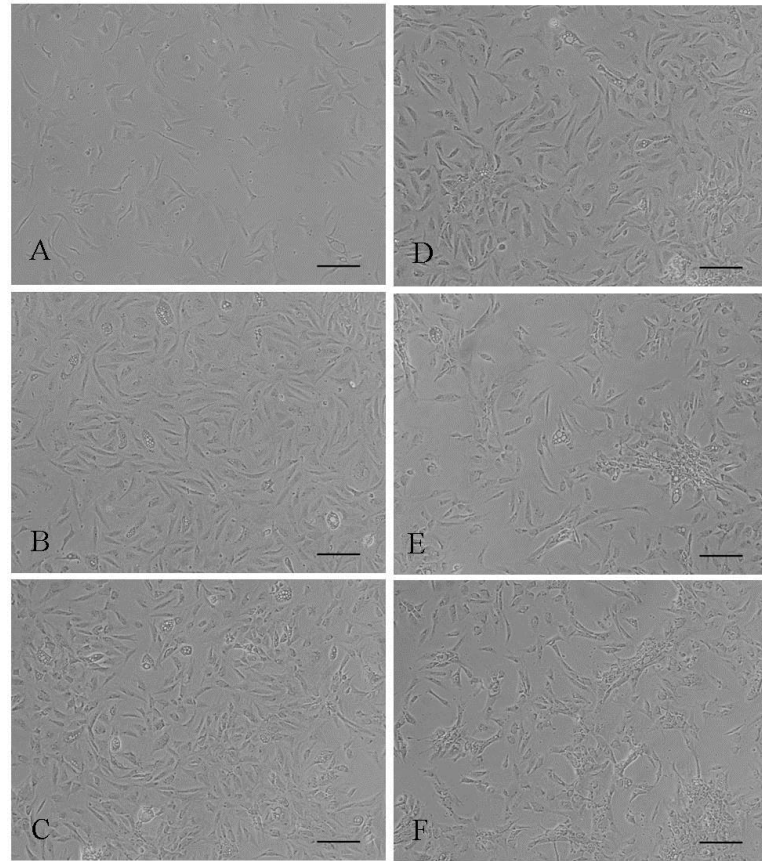


Fig 8. CF-2cs (第 6 代) 在 6 種海蠔血清濃度 A:L15-0/0, B: L15-0/1, C:L15-0/2, D:L15-0/4, E:L15-0/8; D:L15-0/16 生長 3 天的外貌。出現在細胞質的黑點隨血清濃度增加而增加。尺標 = 100 μ m

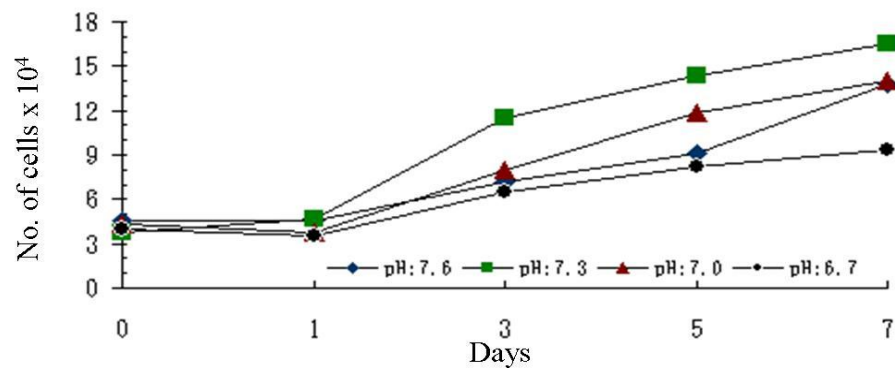


Fig 9. L15-0/2 在 4 種酸鹼度下對 CF-2cs 成長的影響。實驗為四重複。

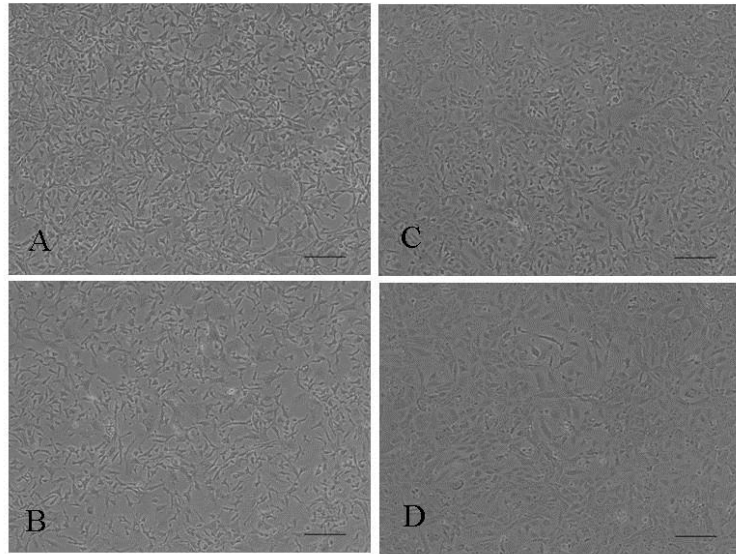


Fig 10. CF-2cs 在 pH A: 7.6 , B: 7.3 , C: 7.0 及 D: 6.7 L15-0/2 培養基 5 天後的外部型態。
細胞隨 pH 增加細胞外型變得瘦長。尺標 = 100 μ m。

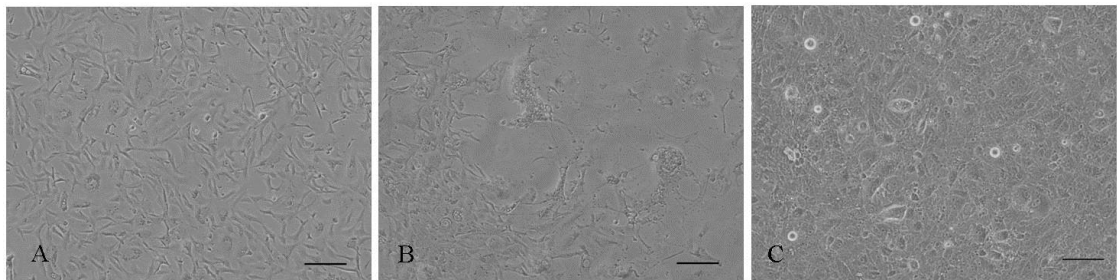


Fig. 11. CF-2cs(第 5 代)可接受三種魚類病毒。
A:RSIV , B:HCRV , 及 C: LCDV。尺標 = 100 μ m

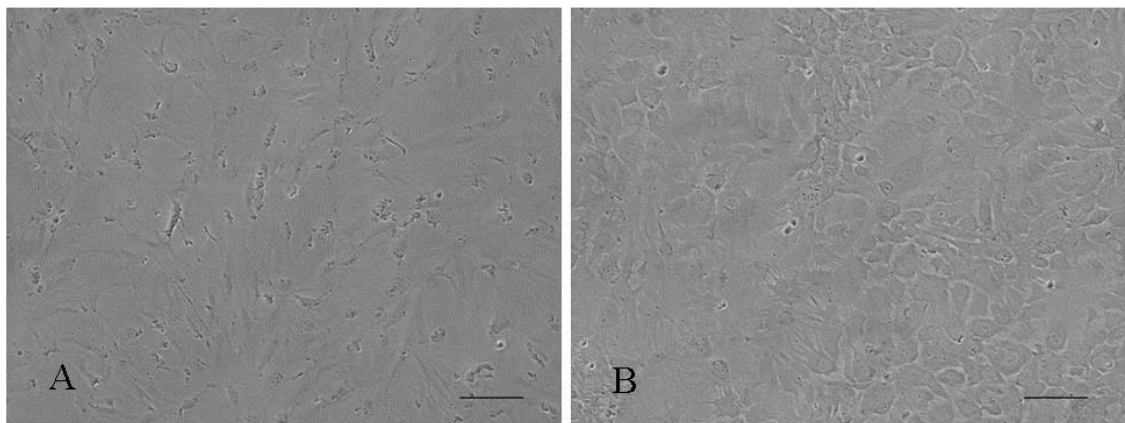


Fig.12. 玳瑁石斑(25 代)及銀紋笛鯛(20 代)初代細胞培養在 L15-0/2 環境下的外部型態。

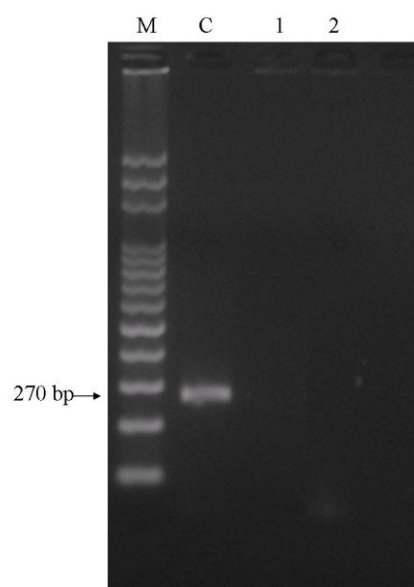


Fig. 13. EZ-PCR Mycoplasma Test Kit 進行海鱷血清黴漿菌汙染檢測。Lane 1-2, 海鱷血清分別取自 2011-08-10 及 2011-11-04。M: DNA molecular marker (100-bp ladder), C: 正對照組: 270 bp band。

Table 1 海鱷及胎牛血清中的脂肪濃度								
項目	海鱷(n=4)	胎牛(n=2)	大海鱷#	小海鱷#	青甘參*	嘉臘*	胎牛*	單位
CHOL	98.6	37.8	138.4	124.4	209	150	31	mg/dL
TG	130.05	74.4	182.6	218.6	75.5	59	1.5	mg/dL
HDL	71.81	8.6						mg/dL
LDL	1.6	21.4						mg/dL
#蔡美玲等, 2009 ; * Fujiwara et al., 2009 ;								

評語

1. 此研究將海鱷血清應用於魚類的細胞培養並可取代胎牛血清，頗為應用價值。
2. 此研究有詳細的觀察，但若能再測試對其他哺乳類細胞的培養，應可增加其利用價值。
3. 海鱷血清內對細胞生長有貢獻的因子應可繼續探討。