



云纹石斑鱼心脏细胞系的建立与鉴定

刘肖峰¹ 陈松林^{2,3*} 沙珍霞² 吴娅红² 于洋^{2,4} 王娜² 修旺珊²

1 中国海洋大学 海洋生命学院, 青岛 266003; 2 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛 266071; 3 海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266071; 4 大连海洋大学 水产与生命学院, 大连 116023

*通讯作者, chensl@ysfri.ac.cn

摘要 鱼类细胞系在鱼类病毒学及功能基因组学方面发挥着重要作用。云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)是一种具有重要养殖价值的海水鱼类, 尚未见细胞系建立的报道。本研究以云纹石斑鱼的心脏组织为材料, 建立了云纹石斑鱼心脏细胞系(epinephelus moara heart cell line, EMH)。细胞系所用的培养基是在L15基本培养基中添加了HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 抗生素, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), β -巯基乙醇(2-Mercaptoethanol, 2-ME)和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的完全培养液。EMH细胞已传至20多代, 由成纤维样细胞和上皮样细胞组成。本研究检测了温度及FBS浓度对EMH细胞生长的影响。EMH细胞在18~30℃能正常生长, 其最适生长温度为30℃, 在36℃时不能正常生长。FBS浓度在10%~20%细胞均能快速生长, 最适FBS浓度为15%。染色体分析表明, 具有正常二倍体染色体数目($2n=48$)的细胞所占的比例为62%。用脂质体法将含增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因的质粒载体pEGFP-N3转入EMH细胞后, EGFP成功表达。EMH细胞系的建立将为病毒的分离、鉴定和功能基因的研究奠定基础。

关键词 云纹石斑鱼, 细胞系, 核型, 增强绿色荧光蛋白(EGFP)

Establishment, Characterization of a New Cell Line From Heart of Kelp Bass (*Epinephelus moara*)

LIU Xiao-Feng¹ CHEN Song-Lin^{2,3*} SHA Zhen-Xia² WU Ya-Hong² YU Yang^{2,4} WANG Na²
XIU Wang-Shan²

1 College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China; 3 Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, National Laboratory for Ocean Science and Technology, Qingdao 266071, China; 4 College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

*Corresponding author, chensl@ysfri.ac.cn

Abstract Cell lines provide an important *in vitro* system for investigations in virology and functional genomics in fish. A new heart cell line, epinephelus moara heart cell line (EMH), was established from Kelp Bass (*Epinephelus moara*). The cell line was maintained in Leibovitz's L15 medium supplemented with HEPES, antibiotics, 2-Mercaptoethanol (2-ME), fetal bovine serum (FBS) and basic fibroblast growth factor (bFGF). The cultured EMH cells, fibroblastic and epithelial in morphology, could be subcultured once every 4 or 5 days and had been subcultured for more than 20 passages. The suitable temperature for the cell growth

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2012AA10A402-2)、山东省泰山学者攀登计划专项和广东大农石斑鱼种质资源课题

收稿日期: 2015-03-20 接受日期: 2015-04-07

was 18~30 °C with the optimum growth at 30 °C and an unfavorable growth at 36 °C. The suitable FBS concentration for the cell growth was 10%~20% with the optimum concentration at 15%. Cytogenetic analysis revealed that 62% of the cells maintained a normal diploid chromosome number (2n=48) in the EMH cells at Passage 20. The fluorescent signals were observed in EMH cells after the cells were transfected with enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter plasmid. The EMH established here can be used as a useful tool for transgenic and genetic manipulation studies and may be potentially used for fish virus isolation, propagation and vaccine development.

Keywords *Epinephelus moara*, Cell line, Karyotype, Enhanced green fluorescent protein (EGFP)

鱼类细胞培养研究起始于20世纪60年代。Wolf和Quimby(1962)建立了第一个鱼类细胞系,即虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系RTG-2。此后,随着鱼类细胞培养技术的不断成熟,越来越多的鱼类细胞系得以建立。截止到2011年,全世界已报道建立了283个鱼类细胞系(Lakra, Swaminathan, 2011)。1994年之前,报道的鱼类细胞系主要来自于淡水鱼类和洄游鱼类(Fryer, Lannan, 2011),近年来,为了分离、鉴定海水鱼类病毒和研究海水鱼类功能基因,越来越多的海水鱼类细胞系被建立(Chen et al., 2004, 2007; Sha et al., 2010; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2011; Ku et al., 2010)。对比活体鱼,细胞系作为实验材料有着许多的优点:第一,成本低,不需要养殖鱼类所需的大型养殖设备;第二,可以精确控制实验条件;另外,还可免受外界环境的干扰(张博,陈松林, 2011)。鱼类细胞系主要应用于鱼类病毒学(Ruiz et al., 2009)、毒理学(Oh et al., 2001)、免疫学(Clem et al., 1996)、生理学(Rode et al., 1997)和转基因研究(赵浩斌,陈尚萍, 1999)。云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*),隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*),为暖温性底层大型鱼类,主要分布在北太平洋西部从越南海域到中国的南海、东海,日本相模湾以南,朝鲜以南,韩国沿岸,为中国沿海的重要养殖鱼类(殷蕊等, 2013)。近年来,虹彩病毒和其他病毒性疾病的爆发使得石斑鱼的工厂化养殖遭受巨大的经济损失(Lü et al., 2005; Villena, 2003; Lei et al., 2012)。在云纹石斑鱼育苗过程中,病毒性疾病的爆发往往可导致全部鱼苗的死亡。目前,对于云纹石斑鱼致病性病毒,研究比较清楚的是淋巴囊肿病毒(*Lymphocystis disease virus*, LCDV),当感染LCDV后可导致鱼苗的死亡(张永嘉等, 1997)。鱼类细胞系在鱼类病毒学研究中发挥着重要的作

用。Fan等(2010)研究了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)鳍条细胞系对大菱鲆红体虹彩病毒(*Turbot reddish-body iridovirus*, TRBIV)的敏感性。Sha等(2010)用半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)胚胎干细胞系从病鱼组织中分离并鉴定了淋巴囊肿病毒。根据Lai等(2000)研究报道,同一种鱼不同组织的细胞系对同一种病毒的敏感性不同。而同一个细胞系,对不同的病毒敏感性也不同。所以不同鱼类细胞系的建立对病毒的研究十分必要。然而,至今仍然没有云纹石斑鱼细胞系的报道,云纹石斑鱼心脏细胞系的建立将为病毒的分离、鉴定、疫苗的研发及功能基因的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原代培养

本实验所用的云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)为一年龄,取自莱州明波水产有限公司。用浓度为70%的酒精给鱼体表消毒后,无菌取出心脏组织,在超净台内用PBS冲洗3遍。将组织放入添加了400 U/mL青霉素、400 µg/mL链霉素的L15培养基中剪成约1 mm³大小的小块。将组织小块用PBS冲洗3遍后,用0.25%的胰酶消化10 min,消化温度为25 °C。1 500 r/min离心5 min,弃上清,将所得沉淀用L15完全培养液悬浮后接种在25 cm²的细胞培养瓶中,放置于24 °C恒温培养箱中进行培养。L15完全培养基是在L15基本培养基中添加400 µg/mL链霉素、400 U/mL青霉素、20% FBS、50 mmol/L 2-ME、5 ng/mL bFGF。原代培养过程中,每2天更换一次培养基。

1.2 传代培养

当组织块周围的细胞不再外迁时,进行一次原瓶传代。在细胞长满培养瓶后,用胰酶消化法将细胞按1:2的比例进行传代。当细胞传到第5代后,

将完全培养液中青霉素、链霉素的浓度分别降低到200 U/mL、200 μ g/mL, FBS的浓度降低到15%。当细胞传到第10代后,将完全培养基中青霉素、链霉素的浓度分别降低到100 U/mL、100 μ g/mL,将FBS浓度降低到10%。细胞生长到一定数量后用冷冻液(含10%二甲基亚砷和20% FBS的L15培养基)对细胞进行冷冻保存,将细胞加入冷冻管后放入冻存盒中,然后放入-80 $^{\circ}$ C冰箱过夜,第2天将冻存管放入液氮罐永久保存。

1.3 不同温度对细胞生长的影响

将密度为 2.5×10^4 /mL的细胞接种于12孔板中,每孔接种1 mL,然后将12孔板分别放置于培养箱18、24、30和36 $^{\circ}$ C培养。在第1、3、5和7天,通过显微镜用血球记数板计下每孔细胞的数量,实验重复3次。

1.4 FBS浓度对细胞生长的影响

将密度为 2.5×10^4 /mL的细胞接种在12孔板中,每孔接种1 mL,将细胞培养板放在24 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中培养。10 h后,所有活细胞完成贴壁,将原来的培养基去掉,换上FBS浓度为5%、10%、15%和20%的完全培养基。在第1、3、5和7天,通过显微镜用血球记数板计下每孔细胞的数量,实验重复3次。

1.5 染色体分析

取第20代的EMH细胞进行核型分析。细胞传代后第48小时,在培养基中加入秋水仙素,使终浓度为10 μ g/mL,然后置于24 $^{\circ}$ C培养箱中培养。培养6 h后,1 200 r/min离心5 min收集细胞,用4 mL 0.075 mol/L的KCl溶液在25 $^{\circ}$ C低渗30 min。加入0.8 mL的预冷的卡诺固定液预固定2 min。1 500 r/min离心10 min,弃上清后加入1 mL预冷的卡诺固定液25 $^{\circ}$ C固定30 min,重复固定3次。以30 cm的高度,用冷滴片法滴片,每个载玻片上滴加两滴细胞悬液;待载玻片干燥后,用浓度为5%的吉姆萨染液染色10 min;用蒸馏水缓慢地冲掉吉姆萨染液,待干燥后镜检。

1.6 pEGFP-N3转染

实验所用的质粒为pEGFP-N3(Clontech, 美国)。采用脂质体LipofectamineTM 2000(Invitrogen,

美国)进行质粒转染。将密度为 1×10^5 个/mL的细胞接种到12孔细胞培养板中,待细胞完全贴壁后,把12孔板中的培养基更换为新鲜的L15培养基。转染前,用不含抗生素和FBS的L15培养基将细胞冲洗两遍,以除去细胞表面残留的抗生素。换上500 μ L Opti-MEM (Invitrogen, 美国),同时,将2 μ g的pEGFP-N3质粒与6 μ L脂质体分别稀释到50 μ L的Opti-MEM中,室温静置5 min后混合脂质体和质粒的稀释液,轻轻混匀并在室温下静置20 min。将质粒-脂质体混合物加到待转染细胞的培养基中,轻轻摇动细胞培养板,使质粒-脂质体混合物能够均匀的分布在培养基中,4 h后更换为不含抗生素的L15完全培养基,24 h后观察荧光信号。

2 结果与分析

2.1 原代培养与传代培养

将剪成小块的心脏组织块和分离出的单细胞悬浮液置于培养瓶中培养。1 d后可发现有细胞贴壁,3 d后组织块周围开始有细胞迁出(图1A)。10 d后,组织块周围因细胞的不断迁出及分裂会形成局部单层细胞。当组织块周围细胞不再外迁时进行一次原瓶传代。当细胞长满培养瓶后,进行1:2传代,以后每隔4~5 d传代1次,至今细胞已传至20多代。细胞由成纤维样细胞与上皮样细胞组成(图1B, 1C)。冷冻保存的细胞经解冻复活,成活率达到70%以上。

2.2 不同温度对细胞生长的影响

温度在18~30 $^{\circ}$ C时,细胞的生长速度随着温度的升高而增加。但18 $^{\circ}$ C生长较慢,在30 $^{\circ}$ C时生长最快。但当温度达到36 $^{\circ}$ C时细胞不能正常生长(图2)。

2.3 FBS浓度对细胞生长的影响

在不同浓度的FBS培养基中细胞的增殖速度不同。当FBS浓度为5%时,细胞生长缓慢;当FBS浓度为10%时,细胞可以良好的生长;当FBS浓度为15%时,细胞达到最大生长速度(图3);当FBS浓度为20%时,细胞的生长速度接近于FBS浓度为15%时的细胞生长速度。

2.4 染色体分析

当EMH细胞传到第20代时,对细胞进行了核

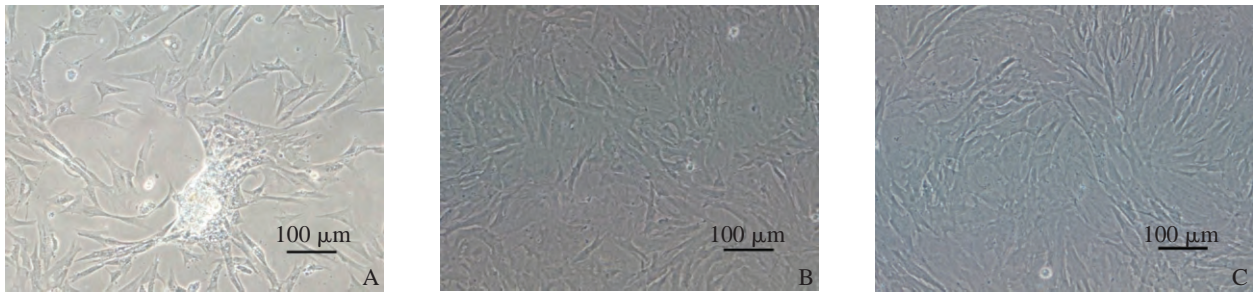


图1 体外培养的云纹石斑鱼心脏(EMH)细胞

Figure 1 *In vitro* cultured *Epinephelus moara* heart (EMH) cells

A: 原代第3天的EMH细胞; B: 第15代的EMH细胞; C: 第21代的EMH细胞

A: Primary cultured EMH cells at day 3; B: Subcultured EMH cells at passage 15; C: Subcultured EMH cells at passage 21

型分析,在统计的100个细胞的核型中,染色体数目从24条到93条不等,染色体数目出现非整倍性,但48条正常二倍体染色体数目出现的频率最高,其所占比例为62%(图4)。

2.5 外源基因转染

通过脂质体 Lipofectamine™ 2000 可成功的将 pEGFP-N3 质粒载体转入 EMH 细胞,转染 24 h 后出现荧光信号,48 h 后可观察到较强的荧光信号(图5)。表明 pEGFP-N3 质粒载体上的 CMV 启动子可以在 EMH 细胞内成功启动外源绿色荧光蛋白基因的表达。

3 讨论

本研究首次建立了云纹石斑鱼心脏细胞系,将其命名为 EMH。实验选用的培养基为 L15 培养基,在培养基中添加了缓冲剂 HEPES 以稳定培养基的 pH 范围。HEPES 为 H⁺ 缓冲剂,另外,L15 培养

基也不含碳酸氢盐,故不需要向培养瓶中补充 CO₂ 来调节培养基的 pH 值,使用普通培养瓶密封培养即可,这样即降低了细胞染菌的几率,又可以降低培养成本。根据 Lakra 等(2011)统计,超过半数的鱼类细胞培养选用了 L15 培养基。表明 L15 培养基适合于大多数鱼类细胞的培养。

EMH 细胞已传至 20 多代,由成纤维样和上皮样细胞组成。原代细胞由多种类型细胞组成,随着传代的进行一些类型的细胞不发生分裂或分裂较慢,而另一些类型的细胞会分裂较快,细胞的形态也会发生改变并变得比较均一。

EMH 细胞的生长速度在 18~30 °C 随温度的升高而增加。EMH 细胞的生长速度与石斑鱼适宜的生长温度(22~30 °C)相关,在石斑鱼适宜的生长温度范围内随温度的升高而增加。18 °C 时细胞的生长速度最慢,30 °C 时细胞的生长速度最快为其最适生长温度,当温度超 36 °C 时细胞将不能正常生长。在已报道的两个石斑鱼细胞系中,当温度为

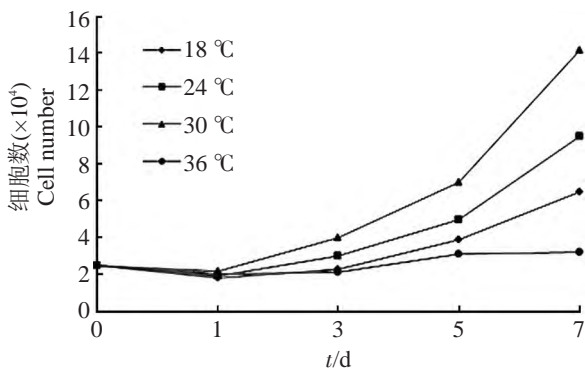


图2 不同温度对 EMH 细胞生长的影响

Figure 2 Effect of different temperature on growth of EMH cells

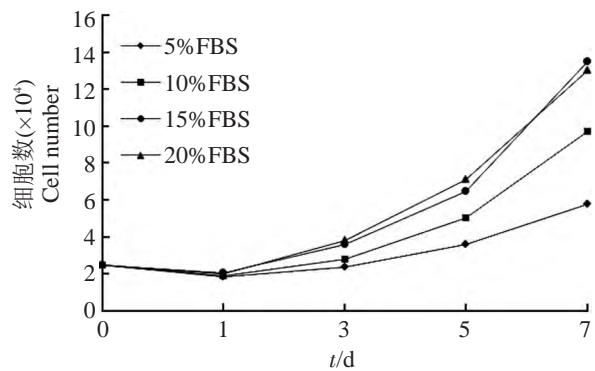


图3 不同 FBS 浓度对 EMH 细胞生长的影响

Figure 3 Effect of different FBS concentration on growth of EMH cells

30 °C时,细胞的生长速度就会降低(Lei et al., 2012; Zhou et al., 2007)。过高的温度可能会降低细胞内酶的活性从而影响细胞的增殖。细胞系最适生长温度与鱼本身适宜的生长温度密切相关。另外,细胞系最适生长温度还与原代培养所选择的温度相关(Zheng et al., 2012)。因此,启动原代培养时温度的选择最好控制在适宜鱼生长的温度范围内。

在一定范围内,细胞的生长速度随FBS浓度的升高而明显增加,EMH细胞生长的最适FBS浓度为15%,当超过这一值后,FBS浓度继续增加并不能进一步促进细胞的生长。一些研究报道过高的FBS浓度会对细胞的生长产生抑制(Wang et al., 2010; Zhang et al., 2011)。FBS中含有多种生长因子和营养成分,能促进细胞的生长;但FBS浓度过高时,培养基中营养成分的比例也会发生较大的改变,会不利于细胞的生长。

云纹石斑鱼二倍体染色体数目为48条,与石斑鱼标准二倍体核型具有相同的染色体数目。由于传代,细胞内发生了染色体变异,来自同一个鱼种的不同细胞系,其模式染色体数目可能会存在差异(Lai et al., 2000, 2001)。通过核型分析,发现EMH细胞的染色体数目出现了异倍性,但仍有62%的细胞具有正常的二倍体染色体数目,这一比例接近于其他鱼类细胞系中的报道(Sha et al., 2010; Wang et al., 2010; 樊廷俊等, 2010; Fan et al., 2010)。端粒位于染色体末端,可防止染色体降解和染色体末端融合,随着细胞传代次数的增加端粒会逐渐缩短,端粒的缺失会增加传代细胞染色体的变异。万荣等(2007)研究发现,体外培养的细胞传到第6代时,就出现了染色体变异。随着细胞传代次数的增加,染色体的变异会不断增多。

以pEGFP-N3质粒为载体,通过脂质体转染法,成功将EGFP基因转入EMH细胞,并获得高效表达。pEGFP-N3质粒的成功转染为EMH细胞用于研究外源功能基因奠定基础。Sha等(2010)成功的将pEGFP-N1质粒转入半滑舌鳎胚胎细胞系并获得表达;Ku等(2010)成功的将pEGFP-C3质粒转入真鲷(*Pagrus major*)鳍条细胞系并获得表达。pEGFP-N3、pEGFP-N1和pEGFP-C3质粒都含有相同的CMV启动子。这些研究结果表明CMV启动子能在不同的鱼类细胞中成功的启动外源基因的表达。

目前,养殖石斑鱼在苗种期病害非常严重,其中病毒病特别突出。海水鱼类细胞系在病毒的分

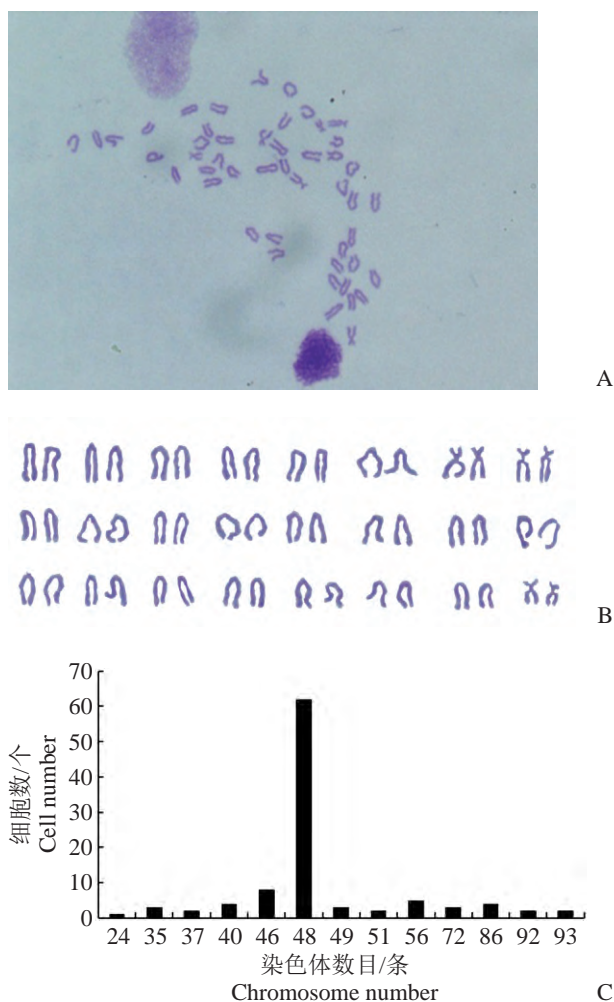


图4 第20代EMH细胞染色体分析

Figure 4 Chromosome analysis of EMH cells at passage 20
A: EMH细胞中期染色体形态; B: 染色体核型; C: 染色体数目分布

A: Photomicrographs of Metaphase chromosomes; B: Diploid karyotype; C: Chromosome number distribution

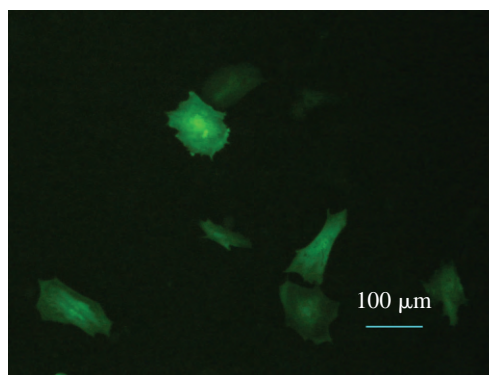


图5 EGFP在EMH细胞中的表达

Figure 5 Expression of EGFP in EMH cells transfected with pEGFPN3

离与扩增,基因功能分析及毒理学研究中发挥着重要作用。云纹石斑鱼心脏细胞系的建立将为石斑鱼病毒的分离、鉴定、疫苗的研发及功能基因的研究奠定基础。

4 结论

本研究以云纹石斑鱼心脏组织为材料,以胰酶消化法启动原代培养,建立了云纹石斑鱼心脏细胞系EMH,EMH细胞已传至20多代。对该细胞系生长特性进行测定发现,细胞的最适生长温度为30℃,细胞生长的最适FBS浓度为15%;通过对第20代的EMH细胞进行染色体分析发现,有62%的细胞具有正常二倍体染色体数目;采用脂质体转染法,成功地将pEGFP-N3质粒转入EMH细胞,增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因在EMH细胞中获得高效表达。云纹石斑鱼心脏细胞系的建立将为外源功能基因的研究以及病毒的分离、鉴定和疫苗的研制提供良好的实验材料。

参考文献

樊廷俊,孙爱,杨秀霞,等. 2010. 大黄鱼鳍细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, (12), 64-70. (Fan T J, Sun A, Yang X X, et al. 2010. Establishment and identification of a continuous fin cell line from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* and cytotoxic effects of monocrotophos to the fin cells[J]. Periodical of Ocean University of China, (12), 64-70.)

万荣,丁健,周振明,等. 2007. 成年鲁西牛肌内前脂肪细胞的分离培养[J]. 农业生物技术学报, 15(3): 419-423. (Wan R, Ding J, Zhou Z M, et al. 2010. Isolation and *in vitro* culture of intramuscular preadipocyte from Luxi adult yellow cattle [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 15(3): 419-423.)

殷蕊,殷禄阁,宫春光. 2013. 云纹石斑鱼的苗种生产技术开发现状和主要问题[J]. 河北渔业, (5), 57-59. (Yin X, Yin L G, Gong C G. 2013. Trial on optimal stocking density of salmon in circulating system[J]. Hebei Fisheries, (5), 57-59.)

张博,陈松林. 2011. 近10年鱼类细胞培养研究进展及应用展望[J]. 海洋科学, 35(7): 113-121. (Zhang B, Chen S L. 2011. Decades of researching progresses of fish cell culture and its application prospects[J]. Marine Science, 35(7): 113-121.)

张永嘉,郭青,吴泽阳. 1997. 云纹石斑鱼淋巴囊肿病变过程的超微研究[J]. 海洋与湖沼, 28(4): 406-410. (Zhang Y J, Guo Q, Wu Z Y. 1997. Ultrastructural histopathological study on lymphocystis of kelp bass, *Epinephelus moara*[J]. Oceanology et Limnologia Sinica, 28(4): 406-410.)

赵浩斌,陈尚萍. 1999. 转基因鱼的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 7(3): 301-306. (Chen H B, Chen S L. Advances in transgenic fish research[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 7(3): 301-306.)

Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. 2004. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation[J]. Diseases of aquatic organisms, 60(3), 241-246.

Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, et al. 2007. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*)[J]. Marine Biotechnology, 9(1), 82-91.

Clem L W, Bly J E, Wilson M, et al. 1996. Fish immunology: The utility of immortalized lymphoid cells-a mini review [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 54 (1), 137-144.

Fan T J, Ren B X, Geng X F, et al. 2010. Establishment of a turbot fin cell line and its susceptibility to turbot reddish body iridovirus[J]. Cytotechnology, 62(3): 217-223.

Fryer J L, Lannan C N. 2011. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes[J]. Journal of Tissue Culture Methods, 16(2): 87-94.

Ku C C, Lu C H, Wang C S. 2010. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from the dorsal fin of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel)[J]. Journal of Fish Diseases, 33(3), 187-196.

Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 37 (1), 1-20.

Lai Y S, Murali S, Chiu H C, et al. Propagation of *Yellow grouper nervous necrosis virus* (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara*(Temminck & Schlegel), brain tissue[J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(5): 299-309.

Lai Y S, Murali S, Ju H Y, et al. 2000. Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara*(Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus[J]. Journal of Fish Diseases, 23(6): 379-388.

Lei X Y, Chen Z Y, He L B, et al. 2012. Characterization and

- virus susceptibility of a skin cell line from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4): 1175-1182.
- Lü L, Zhou S Y, Chen C, et al. 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Virology*, 339(1): 81-100.
- Oh Y B, Lee J S, Park E H. 2001. Fish cell line as an *in vitro* test system for analyzing chromosome aberrations[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(1), 6-11.
- Rode M, Berg T, GjØen T. 1997. Effect of temperature on endocytosis and intracellular transport in the cell line SHK-1 derived from salmon head kidney[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(4), 531-537.
- Ruiz S, Schyth B D, Encinas P, et al. 2009. New tools to study RNA interference to fish viruses: Fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral *Hemorrhagic septicemia virus*[J]. *Antiviral research*, 82(3), 148-156.
- Sha Z, Ren G, Wang X, et al. 2010. Development and characterization of a cell line from the embryos of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 29(2), 81-87.
- Villena A J. 2003. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(1): 111-140.
- Wolf K, Quimby M C. 1962. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. *Science*, 135(3508), 1065-1066.
- Wang X L, Wang N, Sha Z X, et al. 2010. Establishment, characterization of a new cell line from heart of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 1181-1189.
- Zhang B, Wang X, Sha Z, et al. 2011. Establishment and characterization of a testicular cell line from the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 7(4), 452.
- Zheng Y, Wang N, Xie M S, et al. 2012. Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6): 1635-1643.
- Zhou G Z, Li Z Q, Yuan X P, et al. 2007. Establishment, characterization, and virus susceptibility of a new marine cell line from red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. *Marine Biotechnology*, 9(3): 370-376.

(责任编辑 王雅兰)