

鱼类细胞培养 技术指南

SPERIKON
LIFE SCIENCE FOR A BETTER LIFE

—Leibovitz's L-15

手册说明

鱼类细胞培养是现代水产学、毒理学和发育生物学研究的重要技术平台，已发展出涵盖原代培养、传代培养、建系保存、冷冻复苏、诱导分化等在内的一整套流程。以下将对鱼类细胞培养的关键特性、培养基配置、操作流程、常见问题及解决方案

鱼类细胞培养的核心特性

1、温度适应性广

鱼类是变温动物，其体温会随着外界温度改变而改变，故鱼类细胞适应温度范围广，多数在15-28 °C，无需37°C恒温培养。

2、代谢效率慢

鱼类细胞代谢率仅为哺乳细胞的30-60%，对培养基环境要求低，耐受度好，换液周期长而不出现明显凋亡。

3、渗透压和pH适应性强

不同种类的鱼类细胞对渗透压和pH值要求不一样，但对其的宽容度较高。

淡水种 250-300 mOsm kg⁻¹、海水种 350-450 mOsm kg⁻¹ 均可自我调节；pH 7.0-7.8 区间生长差异不显著。

不同种类的细胞通用Leibovitz's L-15，可以稍加NaCl调节渗透压即可。

4、建系成功率高

许多鱼类细胞可自发永生，获得无限增殖能力，且核型仍基本稳定，建系成功率远高于哺乳动物类细胞。



5、贴壁效率低

绝大多数鱼类原代细胞或初次建系阶段贴壁能力较弱，建议包被培养瓶提高贴壁率。

包被方法：多聚赖氨酸（0.1mg/mL）或鱼皮胶原蛋白（50 μg/mL）处理培养皿30分钟。

培养基选择

在鱼类细胞培养的实验中，培养基就像是细胞的“口粮”，直接决定了细胞的存活、增殖效率乃至后续实验的可靠性。尤其是鱼类细胞相较于哺乳动物细胞，在培养环境上有其独特性，其中培养基的选择更是核心关键。

优先选择 Leibovitz’ s L-15 培养基的场景

- 1. 实验室无 CO₂ 培养箱，或需开展野外、流动实验室实验；
- 2. 培养冷水鱼细胞（如鲑鱼、虹鳟、鳕鱼），或同时培养多种温度需求的鱼类细胞；
- 3. 实验规模小、成本敏感度低，或需要长期培养（如细胞系冻存前扩繁、病毒持续感染实验）；
- 4. 新手操作：无需调整渗透压和 CO₂ 浓度，容错率高，减少实验失误。

- ✔ 无CO₂依赖，含高浓度氨基酸
- ✔ 可添加0.5-0.6% NaCl调节渗透压



优先选择改良型 MEM/DMEM 培养基的场景

- 1. 大规模培养（如原代细胞分离、疫苗生产），对成本敏感；
- 2. 培养温水鱼或热带鱼的成纤维样、上皮样细胞（如鲤、鲫、罗非鱼的 EPC、BF-2 细胞系）；
- 3. 开展跨物种对比实验（如鱼类与哺乳动物细胞的毒理学差异研究），需统一培养基基础配方；
- 4. 实验设备完善（有稳定 CO₂ 培养箱），且具备渗透压检测和调整能力。

- ⚠ 需补充10-20mM HEPES替代CO₂缓冲
- ⚠ 调整NaCl至渗透压匹配



扫码了解产品信息

完全培养基添加物

成分	浓度	功能
胎牛血清（FBS）	5-15%	提供生长因子（低温适应性血清更优）
胰岛素	5-10 μg/mL	促进细胞贴壁与增殖
两性霉素B	1-2.5 μg/mL	抑制水生真菌污染
庆大霉素	50 μg/mL	广谱抗菌
L-谷氨酰胺	2 mM	能量补充
生长因子EGF/bFGF	bFGF（5ng/mL）+ EGF（10ng/mL）	显著提高细胞增殖速度

操作流程

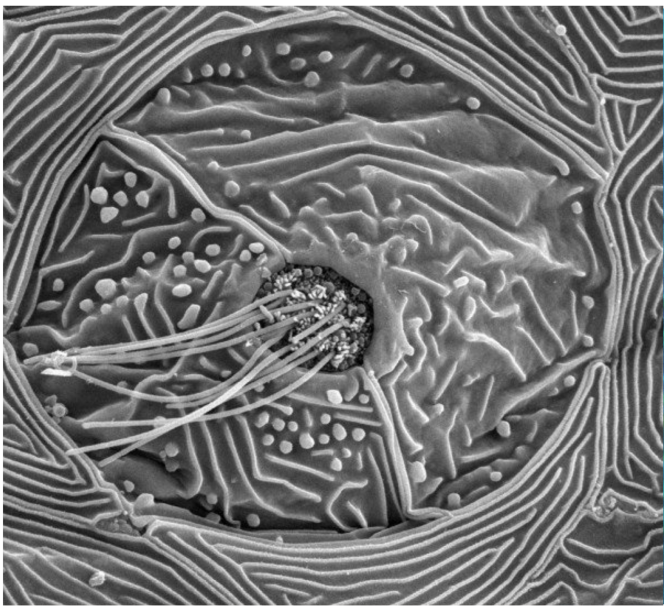
1.原代细胞提取

优先选取健康无病害的幼鱼或成鱼，目标组织需满足分裂活跃的特性——胚胎组织分化程度低、增殖能力强，肾脏、肝脏、鳃等成体组织细胞代谢旺盛，均为原代细胞提取的理想材料。

标准化消毒流程

无菌环境是原代细胞提取的关键前提，操作需严格遵循以下步骤：

- 体表预处理：用 75% 酒精充分擦拭鱼体表面，杀灭体表附着的微生物；
- 无菌解剖：在超净工作台内，使用无菌器械快速分离目标组织；
- 组织清洗：将取出的组织放入含双抗（青霉素 - 链霉素）的 PBS 缓冲液中，反复冲洗 3 次，彻底去除组织表面的血液、黏液及杂质。



小贴士

- 1.消化时间是关键！组织块越大，消化时间可适当延长，但避免过度消化损伤细胞。
- 2.鱼类细胞对温度敏感，培养箱温度波动需控制在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内。

2.组织消化

- 剪碎处理：将无菌获取的目标组织置于无菌培养皿中，用眼科剪剪至 1mm^3 左右的细小组织块；
- 酶解反应：加入 0.1%~0.2% 胶原酶 I 型 溶液，使组织块完全浸没；
- 振荡消化：置于 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 振荡消化 2~4 小时，消化时间需根据鱼体最适生存温度灵活调整（冷水鱼可适当降低温度、延长时间）；
- 过滤纯化：采用 200 目筛网 过滤酶解混合液，彻底去除未消化的组织碎片；
- 离心重悬：1000r/min 离心 5~10 分钟，弃去上清液，用完全培养基重悬细胞沉淀，完成细胞悬液制备。

3.接种与培养

- 温度设置：根据鱼的种类精准调控，冷水鱼（如鲑鱼、鳕鱼）适宜温度为 18°C ，温水鱼（如鲫鱼、罗非鱼）适宜温度为 26°C ；
- 培养基选择：多数鱼类细胞无需 CO_2 培养箱，Leibovitz' s L-15 培养基为首选，该培养基无需 CO_2 缓冲体系，能维持稳定渗透压；若使用 MEM/DMEM 培养基，则需置于 5% CO_2 培养箱 中培养，维持培养基 pH 稳定；
- 接种操作：将制备好的细胞悬液接种至培养瓶 / 皿中，置于对应温度的培养箱中静置培养，24~48 小时后观察细胞贴壁情况。

鱼类细胞培养的操作方式与哺乳动物的细胞类似，其传代、冻存与复苏详见SPERIKON细胞基础培养手册。

步骤	关键试剂	核心参数
提取	75% 酒精、PBS（双抗）	漂洗 3 次
消化	0.1%-0.2% 胶原酶 I 型	$25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ，2-4h
培养	L-15/MEM/DMEM	18°C （冷水鱼）/ 26°C （温水鱼）

鱼类细胞培养常见问题及解决方案

1. 细胞生长缓慢

可能原因	解决方案
温度不适宜	调整培养温度至细胞最适范围（如冷水鱼细胞移至 18℃培养箱）
血清质量差或浓度不足	更换优质 FBS（建议选择SPERIKON胎牛血清），将血清浓度提高至 15%~20%
培养基渗透压异常	检测培养基渗透压（目标 250~350 mOsm/kg），通过添加 NaCl 或无菌水调整
细胞传代密度过低	降低传代比例（如从 1:4 调整为 1:2），保证接种密度充足
培养基营养耗尽	缩短换液周期，或添加谷氨酰胺、非必需氨基酸以及生长因子

2. 细胞污染（鱼类细胞常见污染类型）

■ 原生组织污染：

原代或早期传代培养中，与目标细胞共存的非目标细胞（成纤维、内皮、血细胞等）持续增殖，形成“过度生长”或“混栖”现象；
支原体、细菌、真菌等微生物随组织块带入，成为隐性污染源；
鲤科、鲑科等鱼类组织本身可携带支原体，在培养早期即潜伏，后期爆发。

■ 针对性处理方案：

1、成纤维/内皮过度生长

差速消化：0.05 % 胰酶 37 ° C 2 – 3 min，先倒去含成纤维上清，再消化 5 min 收获目标上皮样细胞。
差速贴壁：将消化后细胞悬液接种于未包被瓶，30 min 时成纤维优先贴壁，取上清移至胶原包被瓶可富集上皮细胞。
血清梯度：换用 2 % FBS 低血清培养 48 h，抑制成纤维增殖，再恢复 10 % FBS。

2、支原体（含鱼类污染源）

使用支原体清除剂处理一周，停药后培养 2 周复检；41 °C 热休克 18 h 可辅助杀灭，但需先做梯度（39 – 41 °C）预实验，防止目标细胞脱落。
无效或反复污染 → 丢弃，重新取材。

3、细菌/真菌

青霉素-链霉素+ 两性霉素B连续 5 – 7 d；真菌污染优先使用两性霉素B；严重浑浊污染的细胞，可以先 0.22 μm 过滤清除游离菌体，再给药。（无效或反复污染 → 丢弃，重新取材）



3.细胞形态异常（贴壁不牢、变圆、聚集）

异常现象	可能原因	解决方案
细胞贴壁不牢 易脱落	胰酶消化过度 培养基中血清浓度不足 培养瓶涂层不佳	1. 缩短胰酶消化时间，加入血清及时终止； 2. 提高血清浓度至 20%，或添加纤连蛋白（10 μg/mL）促进贴壁； 3. 使用预涂层培养瓶（如胶原蛋白涂层）
细胞变圆 无光泽	温度过高或过低 渗透压异常 污染初期	1. 检查培养箱温度，调整至最适范围； 2. 检测培养基渗透压，必要时重新配制； 3. 排查是否存在隐性污染（如支原体）
细胞聚集生长 无法分散	传代时吹打不充分 培养基中钙离子浓度过高	1. 传代时用移液管反复吹打，确保细胞分散均匀； 2. 降低培养基中钙离子浓度，或添加 EDTA（0.02%）辅助分散
细胞形态变大、扁平 增殖能力下降	传代次数过多 培养条件不稳定	1. 限制传代次数（一般不超过 30 代），及时冻存原代细胞； 2. 保持培养温度、渗透压、血清质量稳定
细胞出现空泡 凋亡小体	培养基营养缺乏 毒素积累 污染	1. 及时更换新鲜培养基，去除凋亡细胞； 2. 检测培养基是否存在毒素（如内毒素超标）； 3. 排查污染并处理

