

# 中华绒螯蟹血细胞原代培养条件的优化

洪宇航 杨筱珍 张金彪 梁攀 赵柳兰 成永旭\*

上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室  
上海市高校水产养殖学 E-研究院 上海 201306

**摘要:** 比较了几种常见血细胞培养基 (L-15、 $2 \times$  L-15、 $3 \times$  L-15、M199 和 RMPI-1640) 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血细胞原代培养中细胞形态以及存活率的影响, 以及在筛选获得的最佳培养基中添加不同比例胎牛血清 (FBS) (0%、5%、10% 和 15%), 进一步观察了血清对中华绒螯蟹血细胞培养效果的比较。结果表明,  $3 \times$  L-15 培养基培养效果较好, 所培养的细胞形态相对完整, 数量较多, 培养至 96 h 时血细胞存活率仍大于 60%; 而其他 4 种培养基效果较差, 培养 12 h 存活率均低于 50%, 且细胞形态结构变化明显。以  $3 \times$  L-15 培养基为基础, 添加不同比例胎牛血清后发现, 对细胞存活有显著影响, 存活率明显降低。因此, 不添加血清的  $3 \times$  L-15 培养基对中华绒螯蟹血细胞的生长较为适宜。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 血细胞; 原代培养

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2012)02-52-07

## The Optimization of Primary Hemocyte Culture in the Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*

HONG Yu-Hang YANG Xiao-Zhen ZHANG Jin-Biao LIANG Pan  
ZHAO Liu-Lan CHENG Yong-Xu\*

Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Division, E-Institute  
of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China

**Abstract:** In the present study, the effects of several frequently-used cell culture media (L-15,  $2 \times$  L-15,  $3 \times$  L-15, M199 and RMPI-1640) on cell morphology and viability of hemocytes from the mitten crab, *Eriocheir sinensis* were studied, in order to screen an optimum culture medium for crab hemocytes. Furthermore, different proportions of fetal bovine serum (FBS) (0%, 5%, 10%, and 15%) as a supplement were added into an optimum culture medium to research the effects of serum on hemocyte culture. The results showed that  $3 \times$  L-15 culture medium could support the best survival of hemocytes in *in vitro* culture. The hemocytes remained a maximum number and intact morphology relatively, and the viability of hemocytes after 96 h culture was more than 60% in  $3 \times$  L-15 medium. On the contrary, the other media did not support well of the hemocyte culture, with the viability decrease to lower than 50% and obvious cell morphology changes within 12 h. In addition, the supplement of FBS had adverse effect on cell morphology and viability. These results show that  $3 \times$  L-15 medium without FBS is adequate for *E. sinensis* primary hemocyte culture.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; Hemocyte; Primary culture

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 30700609, 30871927), 上海市中华绒螯蟹产业技术体系项目 (No. D2010100208), 上海高校创新团队 (第二期) 项目 (水产动物营养饲料与养殖环境);

\* 通讯作者, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn;

**第一作者介绍** 洪宇航, 男, 硕士; 研究方向: 水产动物营养与生理学; E-mail: hongyuhang1987@126.com。

收稿日期: 2011-10-24, 修回日期: 2012-01-04

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)属甲壳纲十足目,是我国水产养殖产业的主要养殖品种之一。随着养殖规模扩大,养殖年份增加,各类疾病,特别是一些病毒病的爆发对中华绒螯蟹养殖产业造成了巨大的影响<sup>[1]</sup>。血细胞在宿主免疫应答中起着重要作用,包括识别、吞噬、黑化、细胞毒性以及细胞间信息传递等<sup>[2]</sup>。通过血细胞的离体培养,可以进一步探究其造血和免疫机理,并为检测致病病毒在细胞内的感染与增殖和分离纯化致病病毒提供细胞工具。如血细胞培养可应用于中国对虾(*Penaeus chinensis*)白斑病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染<sup>[3]</sup>、加勒比刺龙虾(*Panulirus argus*) PaV1 病毒感染<sup>[4]</sup>和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)桃拉综合症病毒(Taura syndrome virus, TSV)感染<sup>[5]</sup>等研究中。

相对于脊椎动物,细胞培养技术在甲壳动物虾蟹类中的运用起步较晚,技术尚不成熟。到目前为止,许多学者对不同虾蟹类的血细胞进行了探索性培养,以期获得连续细胞系,但均告失败<sup>[6]</sup>。究其原因,主要是目前为止还没有找到相应的最佳培养体系(培养基、各种添加物、温度和 pH 等培养条件)。近年来关于虾蟹类血细胞培养的报道不多,且都为原代培养。培养基和是否添加血清是细胞培养体系中最重要 2 个条件。本文选用的培养基是近年来报道常见的虾蟹类血细胞培养基:如 L-15 培养基,它已在斑节对虾(*P. monodon*)<sup>[7]</sup>、玉蟹(*Liocarcinus depurator*)、岸蟹(*Carcinus maenas*)<sup>[8]</sup>和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)<sup>[9]</sup>血细胞原代培养中取得过较好效果;2 × L-15 培养基,已在中国对虾<sup>[3]</sup>、加勒比刺龙虾<sup>[4]</sup>血细胞培养中有报道;而 3 × L-15 培养基在中国对虾<sup>[3]</sup>、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)<sup>[10]</sup>细胞培养中有所应用。M199 培养基已在日本对虾(*P. japonicus*)<sup>[11]</sup>血细胞培养得到应用,并取得较好的培养结果。在鱼类细胞培养中应用较多的培养基 RMPI-1640,在加勒比刺龙虾血细胞培养中效果却不佳<sup>[4]</sup>。由于不同种类甲壳动物血细胞培养对于培养基的要求差异较大,

因此,本实验也比较了 RMPI-1640 对中华绒螯蟹血细胞培养的效果。在已有的血细胞培养报道中,学者们通常将细胞形态和存活率作为细胞培养效果好坏的评判标准。在细胞形态方面,常指细胞出现变圆、破裂,甚至死亡等异常变化。我们也将以此 2 种指标作为评判细胞培养效果好坏的标准,观察中华绒螯蟹血细胞原代培养中培养基和血清添加物的选择,为更长时间稳定的传代培养、免疫机理的探究以及中华绒螯蟹疾病防治方面,提供资料和理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及养殖条件** 成年中华绒螯蟹采自崇明县水产技术推广站养殖场,体重约 120 ~ 150 g/只,雌雄不限,循环水系统中暂养 7 d 以上,24 h 充气泵增氧。暂养于 150 L 水族箱(75 cm × 45 cm × 55 cm),每箱 2 只蟹,箱底放置无毒 PVC 管作为遮蔽物。光照周期 12 h:12 h,每日 9:00 时和 18:00 时投喂人工配合饲料,投饵后 3 h 清理残饵和粪便,水温(20 ± 2)℃,pH 7.0 ~ 7.4,溶氧 > 5 mg/L,氨氮 < 0.5 mg/L,亚硝酸盐 < 0.15 mg/L。挑选肢体健全,活力良好的健康蟹供实验用。

**1.2 血细胞培养材料、条件与方法** L-15 干粉培养基购自 Gibico 公司。将 1 L 规格(13.7 g 干粉,配制 1 L L-15 液体培养基)的 L-15 干粉溶解于超纯水中,定容到 1 L 后混合均匀使其充分溶解。无菌环境下 22 μm 滤膜过滤除菌,分装至无菌瓶中 4℃ 存放待用。取同样 1 L 规格的 L-15 干粉分别溶解至 500 ml、333 ml 超纯水中,配置 2 × L-15 和 3 × L-15 培养基,方法同上。M199、RMPI-1640 液体培养基和胎牛血清均购自 Gibico 公司。以上培养基均不含血清。添加血清的培养基为以上培养基中培养效果最好的培养基,在其中分别添加 0%、5%、10% 和 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)<sup>[4]</sup>。

取健康中华绒螯蟹,用浸泡 75% 酒精的脱脂棉球擦拭体表。用 1 ml 无菌注射器从第五步足基膜处抽取 0.5 ml 血淋巴,与等体积抗凝剂(柠檬酸三钠 30 mmol/L,氯化钠 338 mmol/L,

葡萄糖 115 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, pH 7.0)<sup>[12]</sup>混合均匀。收集的血淋巴液 4℃ 条件下 1 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀的血细胞, 分别重悬浮于含有双抗(青霉素 100 IU/ml, 链霉素 100 μg/ml, 购自 Gibco 公司)的 L-15、2 × L-15、3 × L-15、M199 和 RMPI-1640 5 种培养基中, 缓慢吹打均匀, 调整细胞密度至  $5 \times 10^5$  个/ml, 接种至 96 孔培养板中(购自康宁公司), 每孔 200 μl。培养板放置于恒温培养箱中, 培养液 pH 7.0 ~ 7.4, 28℃ 恒温培养。其中, 测得每种培养基渗透压分别为: 288 mmol/L、605 mmol/L、888 mmol/L、248 mmol/L、277 mmol/L。添加血清的培养基, 实验方法同前述。

**1.3 血细胞形态和存活率的观察** 培养的细胞在接种后 24 h 更换 1/2 培养液, 以后每 2 d 换液一次。在 Motica AE21 倒置显微镜下从 0 h 起至 96 h 每隔 12 h 观察一次, 观察细胞贴壁、生长状况、形态结构以及出现脱落、变圆、破裂的情况, 换液前用显微镜自带成像系统拍照。台盼蓝排斥法测定细胞存活率<sup>[13]</sup>。

**1.4 数据分析** 采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析, 用 Levene 法进行方差齐性检验, 不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或者平方根处理, 采用 ANOVA 对实验结果进行方差分析, 采用 Tukey's 法进行多重比较, 取  $P < 0.05$  为差异显著, 在 EXCEL 上绘制相关图表。

## 2 结果

**2.1 不同培养基对中华绒螯蟹血细胞形态和存活率的影响** 中华绒螯蟹血细胞分为 3 类, 分别为大颗粒细胞 (granulocytes, G)、半颗粒细胞 (semigranulocytes, SG) 和透明细胞 (hyalinocytes, H)。其中, 大颗粒细胞数量最多, 半颗粒次之, 透明细胞数量最少。大颗粒细胞多呈椭圆形或梭形, 其胞浆内分布有许多大颗粒以及少量小颗粒物质; 半颗粒细胞多呈椭圆形或月牙形, 其胞浆内分布有少量大颗粒以及大量的小颗粒物质; 而透明细胞多为近圆形或椭圆形, 其内几乎不含有任何颗粒物质。各培养基中血细胞均在接种 12 h 内贴壁。在不

同培养基条件下, 3 × L-15 组与其他 4 组血细胞形态差异明显。3 × L-15 培养基条件下细胞数量最多, 形态完整, 而其余 4 种培养基条件下细胞数量相对较少, 细胞形态出现变化, 如变圆、破裂和细胞颗粒散逸等。其中, 以 M199 组最为明显 (图 1a, b), 然后依次为 RMPI-1640、L-15 和 2 × L-15 组。虽然在 3 × L-15 培养基条件下细胞形态最为完整, 但接种 12 h 后已经观察到少数细胞开始出现破裂和脱粒, 且破裂现象有随着时间推移而越来越明显的趋势, 96 h 后, 细胞明显变圆、萎缩、破裂, 以致出现大量细胞碎片和散逸的颗粒 (图 1a, c)。

不同培养基对中华绒螯蟹血细胞存活率有显著影响。如图 2 所示, 3 × L-15 培养基在 12 h 时细胞存活率最高, 可达  $88.71\% \pm 3.37\%$ , 显著高于其余 4 种培养基 ( $P < 0.05$ )。然后依次是 2 × L-15、L-15 和 RMPI-1640。M199 效果最差, 存活率仅有  $12.48\% \pm 5.97\%$ 。除 3 × L-15 培养基外, 其余培养基在 12 h 内血细胞存活率均低于 50%。对 3 × L-15 培养基血细胞进行延长时间的观察后发现, 血细胞在培养过程中未出现增殖, 且有随培养时间增加血细胞存活率逐渐降低的趋势 (图 1d)。如图 3 所示, 在 3 × L-15 培养基条件下, 48 h 细胞存活率仍高于 80%, 但 96 h 后细胞存活率下降至  $62.41\% \pm 15.76\%$ , 5 d 后细胞存活率低于 50%, 仅有  $46.26\% \pm 14.71\%$ 。

**2.2 添加不同比例胎牛血清对中华绒螯蟹血细胞形态和存活率的影响** 在 3 × L-15 培养基中添加不同比例胎牛血清分别培养中华绒螯蟹血细胞。镜检观察, 各添加血清组细胞贴壁后较不添加组易脱落、成团, 更早出现细胞破裂、颗粒散逸的现象, 细胞碎片增多, 且随着比例增加, 情况越明显 (图 1c)。如图 4 所示, 各添加血清组细胞存活率下降。其中, 在 48 h、72 h 均显著低于不添加组 ( $P < 0.05$ )。最初血细胞存活率随着血清比例增加而降低, 但添加 15% 血清组在 24 h 后存活率则要高于 5% 和 10% 组。其中, 5% 和 10% 组 72 h 存活率都已低于 50%, 仅有  $39.21\% \pm 14.24\%$  与  $38.23\% \pm 9.70\%$ 。

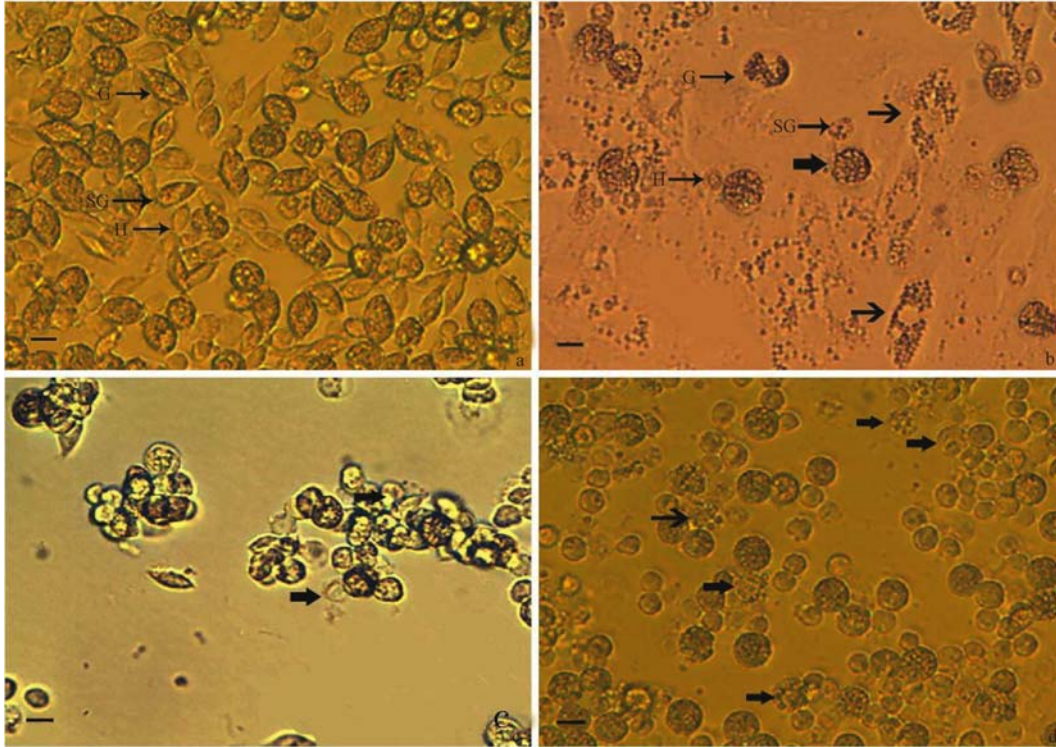


图 1 不同培养条件和不同培养时间下中华绒螯蟹血细胞形态

Fig. 1 Hemocytes in different media and at different culture times

a:培养 12 h 时 3 × L-15 培养基内血细胞形态; b:培养 12 h 时 M199 培养基内血细胞形态; c:培养 12 h 时添加 15% FBS 组血细胞形态; d:培养 96 h 时 3 × L-15 培养基内血细胞形态; 黑色粗箭头表示开始出现破裂的细胞,细箭头表示颗粒散逸的细胞; 标尺 = 10 μm。

a: Morphology of hemocyte cultured with 3 × L-15 medium for 12 hours; b: Morphology of hemocytes cultured with M199 medium for 12 hours; c: Morphology of hemocytes cultured with 15% FBS for 12 hours; d: Morphology of hemocytes cultured with 3 × L-15 medium for 96 hours; Note the cell rupture indicated by black thick arrow and cell degranulation indicated by black thin arrow; Bar = 10 μm.

G:大颗粒细胞; SG:半颗粒细胞; H:透明细胞。G:Granulocytes; SG:Semigranulocytes; H:Hyalinocytes.

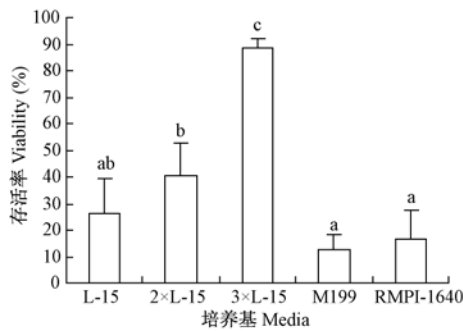


图 2 不同培养基条件下 12 h 中华绒螯蟹血细胞存活率

Fig. 2 Viability of hemocytes of *Eriocheir sinensis* cultured in different media after 12 h

柱体上不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

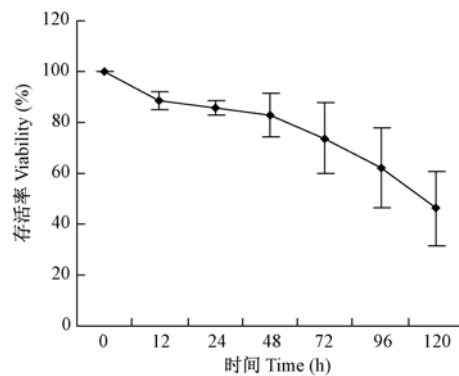


图 3 3 × L-15 条件下中华绒螯蟹血细胞的存活率

Fig. 3 Viability of hemocytes of *Eriocheir sinensis* cultured in 3 × L-15 medium

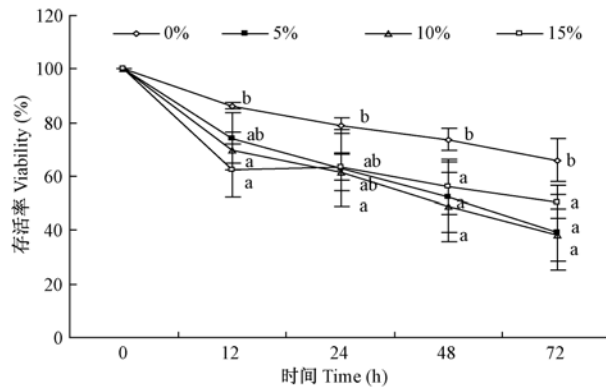


图4 添加不同比例胎牛血清条件下中华绒螯蟹血细胞存活率

Fig. 4 Viability of hemocytes cultured with different concentrations of FBS

折线图上不同字母表示组间差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

培养基是根据细胞生长需要按一定配方制成的干粉或液体,其主要成分是氨基酸、维生素、碳水化合物和其他辅助物质。它的酸碱度、渗透压与活体内细胞外液相似<sup>[14]</sup>。不同培养基其营养成分含量各异,适宜培养的目的细胞也不同。本实验用到的 L-15、M199、RPMI-1640 培养基最初设计为一些脊椎动物细胞的培养基,后来为许多学者引用到研究无脊椎动物血细胞或其他组织细胞原代培养<sup>[15-17]</sup>。在已有的报道中,L-15 被多数人认为是甲壳动物细胞培养的最佳基础培养基。在此基础上配制而成的 2 × L-15 和 3 × L-15 培养基经一些学者研究证实,也具有很好的培养效果,且有大量研究显示,2 × L-15 能提供甲壳动物血细胞相对较佳的培养效果<sup>[4,8-9,15-16]</sup>。但根据以往学者的研究结果,这几种培养基在同种甲壳动物血细胞培养中效果差异较大。如 Li 等<sup>[4]</sup> 分别比较了 L-15 培养基、以 2 × L-15 为基础的改良型培养基、RPMI-1640 培养基对加勒比刺龙虾血细胞整体和分离培养的效果。其中,以 2 × L-15 为基础的改良型培养基其培养效果显著优于其余 2 种。不仅如此,使用相同培养基培养不同种甲壳动物血细胞,其培养效果也有明显差异。如 Chen 等使用 L-15 培养基培养斑节对虾血细

胞,其存活最长达 4 d<sup>[18]</sup>,而 Walton 等<sup>[8]</sup>、魏静等<sup>[9]</sup>通过 L-15 培养基分别培养玉蟹、克氏原螯虾血细胞,则可维持 15 d 和 14 d 以上。有关 3 × L-15 应用的文献较少,仅见于锯缘青蟹肝胰腺细胞的培养<sup>[10]</sup>,但其良好的培养效果值得在血细胞培养中尝试。因此,本研究在 L-15 的基础上配制了 2 × L-15、3 × L-15 培养基,并比较了三者与 RPMI-1640 和 M199 在中华绒螯蟹血细胞原代培养的效果差异。通过实验证明,3 × L-15 培养基能提供中华绒螯蟹血细胞更好的培养效果,96 h 存活率达到 60% 以上。由于不同培养基各种营养物质含量差异复杂,没有相关研究表明哪些营养物质是影响培养基对甲壳动物细胞血细胞培养的决定性因素。但 L-15 中葡萄糖和谷氨酰胺的含量,要高于 M199 和 RPMI-1640。这可能是 L-15 优于另外两者的原因之一<sup>[4]</sup>。并且也有学者通过研究指出,更高的氨基酸含量是 L-15 能提供细胞更好存活的原因<sup>[7]</sup>。葡萄糖、谷氨酰胺以及氨基酸含量高于 2 × L-15 和 L-15 的 3 × L-15 培养基,其培养效果也明显更佳,这从一方面论证了上述的猜测。但这是否为影响血细胞培养的决定性营养因素,还需要进一步研究证实。不同种类血细胞贴壁时间从 2 ~ 12 h 不等<sup>[19]</sup>。因此,本研究设置观察时间从接种后 12 h 开始。经观察,此时各组绝大部分细胞均已贴壁,但测得的细胞

存活率除  $3 \times L-15$  组外,其余 4 组均低于 50%,且多数细胞脱粒裂解,所以,除  $3 \times L-15$  组外其余各组不做进一步培养观察。

胎牛血清常被用作甲壳动物和软体动物细胞培养的营养添加物<sup>[18,20]</sup>。很多报道认为,胎牛血清含有细胞生长所含的一些必需营养因子,强调了添加血清的必要性,其常用添加量为 5% ~ 15%。笔者利用分别添加不同比例胎牛血清的  $3 \times L-15$  对中华绒螯蟹血细胞进行原代培养,结果表明,添加胎牛血清后细胞存活率明显下降,证实胎牛血清对中华绒螯蟹血细胞原代培养并没有促进作用,这一结论与 Li 等<sup>[4]</sup>和 Sashikumar 等<sup>[10]</sup>的结论基本相符。Luedeman<sup>[21]</sup>和 Frerichs<sup>[22]</sup>也认为血清对甲壳动物细胞有一定的毒性作用,不宜添加。本实验发现虽然血清添加 15% 组在 24 h 后细胞存活率高于 5% 组和 10% 组,但其存活率仍显著低于 0% 组。且有研究证实,胎牛血清添加量超过 15% 会抑制细胞贴壁和生长<sup>[23]</sup>。本研究结果说明,添加胎牛血清对中华绒螯蟹血细胞培养具有不良效果,且与添加量没有一定的比例关系。甲壳动物血细胞中,半颗粒细胞与颗粒细胞对异源物质很敏感,容易裂解产生细胞毒性<sup>[4]</sup>。而实验结果显示,添加血清后中华绒螯蟹血细胞贴壁后易脱落,细胞成团,较未添加组更早出现细胞破裂,大颗粒细胞数量减少,有大量散逸的细胞碎片和颗粒。因此,推测胎牛血清会造成大颗粒细胞的裂解死亡,产生大量细胞碎片和胞溶物质,从而影响其他细胞的正常生长,使细胞整体的存活率降低。

除了培养基和血清,影响血细胞培养的因素还有很多,主要的有温度、pH、渗透压等。其中,温度普遍在 22 ~ 28℃ 范围,主要是根据不同动物生存的最佳温度来确定<sup>[23]</sup>;pH 则根据所培养动物体液的 pH 来决定,从已有的报道来看,甲壳动物血细胞培养液的 pH 宜在 7.0 ~ 7.4<sup>[24]</sup>;培养液的渗透压要尽量与细胞的渗透压一致,但由于中华绒螯蟹为变渗动物,随环境变化渗透压变化剧烈,因此,寻找最适渗透压较为困难。近期本课题组已开展渗透压对甲壳动

物血细胞培养影响的研究,初步测得  $3 \times L-15$  培养基的渗透压为 888 mmol/L。张瑞新等人通过研究渗透压对中华绒螯蟹生精细胞体外培养的影响,初步确定中华绒螯蟹生精细胞体外培养的适宜渗透压范围为 900 ~ 1 000 mmol/L<sup>[25]</sup>,与本文的结论较为接近。而有关培养基对中华绒螯蟹血细胞离体培养影响差异的原因,还有待于进一步的研究来阐明。本研究参考多位学者关于虾蟹类血细胞原代培养的结果,根据中华绒螯蟹的生活环境,初步确定实验温度 28℃,pH 7.0 ~ 7.4,但是否是最佳的培养条件还有待进一步研究和探索。我们将根据已有的成果,继续研究中华绒螯蟹血细胞培养的最佳温度、pH 和渗透压等相关培养条件,以及培养基营养成分差异、外源添加物等对血细胞培养的影响,以期建立中华绒螯蟹血细胞的最佳培养体系。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 沈锦玉,钱冬,刘问,等. 中华绒螯蟹病毒病原的初步研究. 华中农业大学学报,2000,19(5): 487 - 489.
- [ 2 ] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 2000,191(1/3): 45 - 52.
- [ 3 ] Jiang Y S, Zhan W B, Wang S B, et al. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. Aquaculture, 2006,253(1/4): 114 - 119.
- [ 4 ] Li C W, Shields J D. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 94(1): 48 - 55.
- [ 5 ] George S K, Kaizer K N, Betz Y M, et al. Multiplication of Taura syndrome virus in primary hemocyte culture of shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Virological Methods, 2011, 172(1/2): 54 - 59.
- [ 6 ] 冯书营,黄捷,张士瑾. 对虾细胞培养的研究现状. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 64 - 68.
- [ 7 ] Jose S, Mohandas A, Philip R, et al. Primary hemocyte culture of *Penaeus monodon* as an *in vitro* model for white spot syndrome virus titration, viral and immune related gene expression and cytotoxicity assays. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 105(3): 312 - 321.
- [ 8 ] Walton A, Smith V J. Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. Fish & Shellfish

- Immunology, 1999, 9(3): 181 - 194.
- [ 9 ] 魏静, 陆承平, 黄捷, 等. 克氏原螯虾的血淋巴细胞原代培养. 畜牧与兽医, 1999, 31(5): 11 - 12.
- [ 10 ] Sashikumar A, Desai P V. Development of primary cell culture from *Scylla serrata*: Primary cell cultures from *Scylla serrata*. Cytotechnology, 2008, 56(3): 161 - 169.
- [ 11 ] 王宏伟, 王安利, 王维娜, 等. 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 血细胞的培养. 河北大学学报: 自然科学版, 2002, 22(2): 154 - 156.
- [ 12 ] Le Moullac G, Le Groumellec M, Ansquer D, et al. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7(4): 227 - 234.
- [ 13 ] Mascotti K, McCullough J, Burger S R. HPC viability measurement; trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. Transfusion, 2000, 40(6): 693 - 696.
- [ 14 ] 张秀丽, 刘庆慧. 对虾原代细胞培养研究现状. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5130 - 5131.
- [ 15 ] Luedeman R A, Lightner D V. Development of an *in vitro* primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 1992, 101(3/4): 205 - 211.
- [ 16 ] Nadala E C, Lu Y A, Loh P C. Primary culture of lymphoid, nerve, and ovary cells from *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993, 29(8): 620 - 622.
- [ 17 ] Tong S L, Miao H Z. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues. Aquaculture, 1996, 147(3/4): 151 - 157.
- [ 18 ] Chen S N, Wang C S. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses. Methods Cell Science, 1999, 21(4): 199 - 206.
- [ 19 ] George S K, Dhar A K. An improved method of cell culture system from eye stalk, hepatopancreas, muscle, ovary, and hemocytes of *Penaeus vannamei*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2010, 46(9): 801 - 810.
- [ 20 ] Sano T. A novel tissue organized in the primary hemolymph culture of *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 1998, 164(1/4): 289 - 296.
- [ 21 ] Luedeman R A. Development of an *in Vitro* Primary Cell Cultures from the Penaeid Shrimp *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* and Evaluation of a Potential Application. Tucson, AZ: The University of Arizona, 1990: 67 - 68.
- [ 22 ] Frerichs G N. *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 1996, 143(3/4): 227 - 232.
- [ 23 ] 金刚, 程文, 代建国, 等. 海洋节肢动物细胞及组织培养研究进展. 海洋科学, 2007, 31(11): 91 - 96.
- [ 24 ] 罗鹏, 邱德全. 凡纳滨对虾血淋巴、类淋巴细胞培养. 海洋通报, 2005, 24(1): 27 - 30.
- [ 25 ] 张瑞新, 穆淑梅, 康现江, 等. 渗透压对中华绒螯蟹生精细胞体外培养的影响. 河北大学学报: 自然科学版, 2009, 29(2): 193 - 198.