

## 五、重要養殖種類病害防治技術研發

### 臺灣重要養殖魚貝類之寄生蟲生態防治研究(II)

張錦宜、朱惠真、吳嘉哲  
水產養殖組

本研究成功培養石斑魚的初級鰓細胞，利用此鰓細胞，配合一新型細胞培養器 BelloCell-500<sup>®</sup>，完成石斑魚仿生人造鰓的建構。同時自點帶石斑收集到的卵圓鞭毛蟲，以無菌方法純化出孢囊體、營養體及浮游幼體等不同生活史時期的蟲體。研究結果顯示，將浮游幼體感染石斑人造仿生鰓，共同培養 2 日後，鰓細胞間出現卵圓鞭毛蟲營養體，表示卵圓鞭毛蟲體外培養成功，並可依此模式進行繼代與完全體外培養。

將點帶石斑的鰓剪下放在含有抗生素的 PBS 中靜置 5 分鐘，清洗 3 次後，移入細胞消化瓶中，以 0.25% 胰蛋白酶溶液消化，每隔 20 分鐘將解構之組織加入 15 ml 含有 10% FBS 的 L-15，再分別取 3 ml 置於 25 T 的細胞培養盤培養。細胞繼代至第 5 代後，先將細胞轉殖入 Recovery<sup>™</sup> cell culture freezing medium 中，再將細胞移置 -80°C 中 24 小時，最後置於液態氮桶中保存。本研究結果顯示，超低溫冷凍保存半年後的細胞解凍後仍可正常繼代 (圖 1)。

本試驗採用 BelloCell-500<sup>®</sup> 細胞培養器建構石斑魚仿生人造鰓。將上述石斑鰓初代細胞約  $1 \times 10^8$  cell (相當於在 6 個 T-150 細胞培養瓶培養到單層細胞滿載量) 接種於 BelloCell-500<sup>®</sup> 細胞培養器，添加細胞培養基 L-15 至 500 ml，在 28°C 的培養箱中，將機器設定為上升速率：

2 mm/sec、停滯 20 秒，下降速率：2 mm/sec，初期培養 3 小時後，再將機器改設定為上升速率：1 mm/sec、停滯 0 秒，下降速率：1 mm/sec、靜置 1 分鐘，進行長時間培養。每日以無菌操作採樣 1 個細胞培養載體，在倒立顯微鏡下觀察細胞生長與繁殖情形。連續培養一星期即可建構石斑魚仿生人造鰓，其外觀及顯微構造如圖 2 及 3。

卵圓鞭毛蟲之生活史包括浮游期及附著期，將收集到的無菌浮游幼體接種到建構完成之石斑魚仿生人造鰓，每日以顯微鏡觀察蟲體變化，48 小時後可觀察到出現卵圓鞭毛蟲營養體 (圖 4)，表示卵圓鞭毛蟲可利用石斑魚仿生人造鰓培養成功，並可依此模式進行繼代與完全體外培養。

本研究純化培養之點帶石斑鰓細胞，可在液態氮下冷凍保存 6 個月後活化、正常生長與繼代，未來可望培養為細胞株提供其他石斑魚的相關研究使用。至於本研究建立之卵圓鞭毛蟲無菌純化及體外培養技術，可確保後續研究計畫所需的試驗材料不虞匱乏，且毋須再感染及犧牲實驗動物，對未來朝向生態平衡、生物防治、疫苗開發及魚池管理模式來降低寄生蟲疫病風險的相關研究提供堅實的基礎，對臺灣水產養殖的永續發展將有莫大的助益。

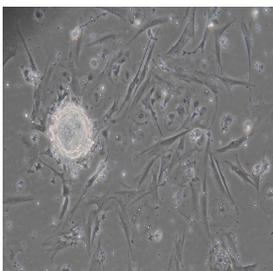


圖 1 冷凍保存後再活化的石斑鰓初代細胞



圖 2 石斑魚仿生人造鰓(左)與正常鰓(右)之外觀

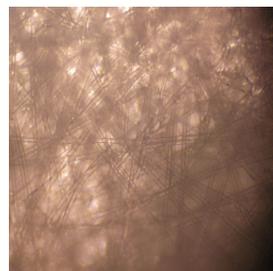


圖 3 石斑魚仿生人造鰓之顯微構造



圖 4 卵圓鞭毛蟲營養體在石斑魚仿生人造鰓細胞上的生長情形