

第3届全国博士后生命科学学术论坛(中国博士后科学基金会,中国农业大学,2005年)

体外培养山羊成纤维细胞系方法的建立

潘求真^{1,2} 田亮¹ 徐曙光¹ 韩红兵¹ 李佳¹ 李海¹ 孙书锋¹
连正兴¹ 杨宁¹ 李宁¹ 谭景和²

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100094; 2. 东北农业大学 生命科学学院,哈尔滨 150030)

摘要 用山羊组织块和0.25%的胰蛋白酶消化培养法获得正常传代细胞,对于出现的上皮样细胞和成纤维样细胞混合生长的问题,则根据两者贴壁紧实程度不同,用0.05%的胰酶-EDTA进行不同时间的消化,将其分离纯化。纯化的成纤维体细胞经数次传代培养后,进行冷冻-解冻检验表明仍具有正常的传代能力。各代体细胞的核型分析表明,在体外培养至20~30代成纤维细胞的细胞形态(为梭形细胞,高度汇合后呈火焰状)、细胞周期以及核型均为正常,符合体细胞克隆转基因的基本要求。

关键词 山羊;成纤维细胞;体外培养

中图分类号 Q 813.11; S 827

文章编号 1007-4333(2006)01-0029-06

文献标识码 A

A method established for goat fibroblast in vitro

Pan Qiuzhen^{1,2}, Tian Liang¹, Xu Shuguang¹, Han Hongbing¹, Li Jia¹, Li Hai¹, Sun Shufeng¹,
Lian Zhengxing¹, Yang Ning¹, Li Ning¹, Tan Jinghe²

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Life, Dongbei Agricultural University, Haerbin 150030, China)

Abstract Goat fibroblasts were cultured by tissue pieces, trypsin, respectively. Establish an ideal cellular culture methods. Especially, in the tissue pieces, first of all, we cut the tissue into 1 mm³ pieces, second dry the pieces by the centrifugation, third, add a little fetal bovine serum onto pieces, and then, paved the piece onto the culture plate in even, cultured for 60 - 90 min. in incubator, last, add the culture medium. The two method had a 100% of primary passagey fibroblast cells present rate and successful passage rate. Two methods had a differences between primary fibroblast cells present rate and time of can be passaged. Using different digested time to purified fibroblast cells with epithelial cells. Purified fibroblast cells still have normal capacity of passage after freeze-thawed. Karyotype analyze and cell cycle indicate that after 20 - 30 passage of in vitro culture no abnormal. It suit for the need of clone and transgenic chone.

Key words goat; fibroblast cell; in vitro culture

体细胞克隆羊“Dolly”出生以来^[1],克隆重组技术引起了广泛关注。鉴于体细胞材料在动物繁殖和人类疾病治疗领域的广泛应用前景,与体细胞克隆技术相关的体细胞培养也受到关注。由于动物胎儿成纤维细胞易分离、体外培养生长速度快、倍增代数多、染色体倍性稳定的特点,大多数克隆以胎儿成纤

维细胞为供体用于核移植,并已在绵羊^[1-4]、牛^[5-7]、山羊^[8]和猪^[9-10]取得了成功;还得到了克隆转基因绵羊^[4]和牛^[5]。本研究选择山羊胎儿和成年山羊皮肤成纤维细胞进行长期体外培养、冷冻保存、性别鉴定、细胞核型分析及培养方法进行了研究,为体细胞进行转基因核移植及乳腺生物反应器的研究及奠

收稿日期:2005-12-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170675)

作者简介:潘求真,博士后,副教授,主要从事胚胎工程与转基因研究,E-mail:panqiuzhen@163.com;

连正兴,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事动物分子遗传研究,E-mail:lianzhx@cau.edu.cn;

杨宁,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事动物遗传育种与繁殖,E-mail:nyang@cau.edu.cn

定基础。

1 材料与方法

1.1 药品

培养板、培养皿及细胞冻存管(Nunc)等。

胰蛋白酶、巯基乙醇、丙酮酸钠、葡萄糖、NaHCO₃、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、EDTA、NaCl (Sigma);DMEM、双抗(Gibco);胎牛血清(Hyclon)等。

1.2 采样

1)成年个体采样方法:选择健康的成年崂山奶山羊母羊,保定后对耳部进行彻底消毒、用手术法获取耳部组织,放入含双抗的D-Hanks液中,常温下带回实验室进行原代培养。

2)胎儿个体采样方法:选择健康、发情周期正常的崂山奶山羊母羊(2岁左右),每日进行发情观察,本交配种,确定妊娠后用手术法获取胎儿。剖腹手术取出妊娠25~40d的胎儿,用含双抗的D-Hanks液漂洗2遍,放入含双抗的D-Hanks液中,常温下带回实验室进行原代培养。

1.3 原代培养

将样品放入新配制的含双抗的D-Hanks液中浸泡10~15min,并清洗组织块4~5次。

1)成年上皮成纤维细胞的组织块培养法:将清洗干净无菌的耳部组织块放入青霉素小瓶中,用灭菌剪刀剪碎组织块至1mm³左右。加入少量血清,用吸管将剪碎的组织块移入培养瓶中,均匀平铺于培养瓶的底部。将培养瓶倒置,放到37.5℃培养箱内(5%CO₂)60~90min,使组织块牢固地贴附于培养皿的底面,然后将培养瓶翻转,加入含15%胎牛血清的DMEM(含100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素)培养液,在培养液中继续培养。

2)胎儿成纤维细胞的组织块培养法:将获得的胎儿用含双抗的D-Hanks液洗涤3次,去除胎儿头、四肢及内脏后,剩余组织块放入青霉素小瓶中。以后操作同上。

3)成年上皮成纤维细胞的消化培养法:将清洗干净的无菌耳部组织块放入青霉素瓶中,剪成1mm³的组织碎块,加入0.25%胰蛋白酶溶液,在37℃下每隔5min搅拌1次,消化120min。用100目筛网过滤、离心、收集消化下来的细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养液将细胞稀释为1×10⁶个/mL,在直径为100mm的培养皿中加入10mL细胞悬液,然后放入37.5℃、5%CO₂、相对饱和湿度的

CO₂培养箱中进行培养。待细胞生长汇合至80%~90%时,将一部分细胞冷冻保存,一部分按照1:2或1:3比例进行传代培养。

4)胎儿成纤维细胞的消化培养法:将获得的胎儿用含双抗的D-Hanks液洗涤3次,去除头、四肢及内脏,剩余部分放入青霉素瓶中,剪成1mm³的组织碎块,然后加入0.25%胰蛋白酶溶液,在37℃下每隔5min搅拌1次,消化30min。以后操作同上。

1.4 传代培养

当原代细胞生长至80%~90%汇合时,进行常规细胞传代培养。先弃去培养液,贴壁细胞用D-Hanks液洗涤2遍,弃去D-Hanks液;加入0.05%(质量分数)trypsin+0.02%(质量分数)EDTA进行消化;在室温下放置2~4min,弃去消化液;再放入37.5℃培养箱中继续消化3~5min,加入含10%胎牛血清的DMEM(也称完全培养液)2mL终止消化;用吸管轻轻吹打细胞,使细胞充分分散,然后移入5mL离心管中,2000r/min,离心6min,弃上清液后,再用完全培养液重新悬浮细胞,并轻轻吹打使细胞充分分散,转入新的培养瓶中,37.5℃、5%(体积分数)CO₂继续培养;一般2~3d传代1次。

由于成纤维细胞对消化液比上皮细胞敏感,所以通过控制消化时间可以使成纤维细胞游离,而上皮细胞仍贴在瓶壁上,经过3~5次传代,就可得到纯化的成纤维细胞。

1.5 细胞的冷冻与解冻

1)常规方法冷冻细胞。将长至80%~90%汇合的纯化的成纤维细胞消化,吸入5mL离心管,2000r/min,离心6min沉淀细胞,弃上清液;用冻存液悬浮细胞,使细胞充分分散,转移至冻存管中(细胞密度为:5×10⁶/mL);在4℃放置1h,-20℃放置6h,放入液氮罐口停止25~30min,其后每25~30min向下放一次,每次下降3~5cm,共约6~8次,到达液氮表面时放置45~60min后直接投进液氮中(从液氮罐口到液氮表面的时间必须大于3h)。

2)细胞的解冻。将冻存管从液氮中取出,迅速放入38~40℃水浴中融化;吸出细胞悬液放入5mL离心试管中,加含双抗的D-Hanks液充分混合,2000r/min,离心6min沉淀细胞,弃上清液;再用D-Hanks液充分悬浮细胞并离心1次;用含10%(体积分数)胎牛血清的DMEM培养液(含100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素)充分悬浮细胞,接种于培养瓶中(接种密度为10⁶/mL左右)放入37.5℃、

5%CO₂、相对饱和湿度的 CO₂ 培养箱中进行培养。

1.6 细胞染色体分析

1) 处理。取 100 mm 培养皿培养的指数生长期的细胞, 加 100 μL (10 μg/mL) 秋水仙素, 终质量浓度为 0.1 μg/mL, 作用 7~8 h;

2) 低渗。收集细胞于 10 mL 离心管中, 1 500 r/min, 4 离心 10 min, 弃上清液, 用 6 mL 0.075 mmol/L KCl 溶液在 37 水浴中低渗 20 min;

3) 预固定。低渗结束后, 加入 3 mL 4 预冷的固定液 (V_{冰醋酸}:V_{甲醇}=1:3) 混匀, 1 500 r/min, 4 离心 10 min, 弃上清液;

4) 固定。加入上述固定液 5 mL, 轻轻悬浮细胞, 室温固定 30 min 或 4 固定 60 min 或 4 过夜均可;

5) 制片。1 500 r/min 4 离心 10 min, 弃上清液, 用 500 μL 固定液重新悬浮细胞, 用吸管轻轻吹打, 将细胞分散均匀, 吸取细胞悬液, 在 50 cm 高处滴 1 滴细胞悬液于 -20 冰浴的载玻片上 (载玻片倾斜 45°, 细胞悬液落在载玻片的上 1/3 处), 顺势吹散开, 载玻片背面立即在酒精灯上过 2~3 次, 使细胞固定在载玻片上, 室温下空气干燥;

6) 染色。用稀释的 Giemsa 染液 (Giemsa 母液 PBS 0.1 mol/L (pH7.2) = 1:9) 染色 30 min, 小心地用自来水冲去染液, 用灭菌水轻轻冲洗几次, 空气中自然干燥;

7) 镜检。挑选染色体分散良好、长度适中、着丝点和染色单体清晰的玻片烘干, 用二甲苯透明、阿拉伯胶封片, 在 1 000 倍油镜下, 对伸展完好的中期染色体相计数;

8) 后期处理。对典型的中期染色体拍照, 进行核型分析, 统计染色体数量, 进行用 t 检验分析。

1.7 胎儿细胞系的性别鉴定

1) 细胞基因组的提取。在细胞第一次传代消化时, 取少量细胞, 离心、弃消化液, 再加 D-Hanks 液洗涤离心细胞 3 次, 加 30 μL 灭菌双蒸水重悬细胞, 置液氮中 5 min, 解冻后加矿物油 30 μL, 置 95 水浴 5 min, 待冷却后加 1 μL 蛋白酶 K (质量浓度 10 mg/mL), 置 55 水浴 90 min, 然后置 95 水浴 10 min 灭活蛋白酶 K。

2) 对照。对照基因组样品分别取自成年公羊和母羊的耳部组织, 常规方法进行提取。

3) PCR 反应。参照人和牛 Sry 基因, 设计 1 对引物: Sry-1: 5'-CGAAA GGTGGCTCTA GA GAA-3

和 Sry-2: 5'-ATAGCTAGTAGTCTCTGTGCCT-3。

在 50 μL 反应体系中, 加入引物 Sry-1 和 Sry-2 各 1 μL, 10 ×buffer 反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL, Tag 酶 3 μL (10 IU), 然后再加入上述提取的 DNA 样 30 μL, 用灭菌 Mill-Q 超纯水补足至 50 μL, 用 30 μL 石蜡油覆盖, 离心混匀后进行 PCR 扩增。

扩增参数: 95 5 min; 然后 94 45 s, 55 45 s, 72 45 s 进行 40 个循环; 72 7 min; 最后延伸 1 h。

参照上述《分子克隆实验指南》提取细胞基因组 (其中不进行酚仿提取)。

反应条件: 在 50 μL 反应体系中, 加入引物 Sry-1 和 Sry-2 各 1 μL, 10 ×buffer 反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL, Tag 酶 3 μL (10 IU), 然后加入上述提取的 DNA 样 30 μL, 用灭菌的 Mill-Q 超纯水补足至 50 μL, 离心混匀后进行 PCR 扩增。

扩增参数同上。

4) PCR 产物的鉴定。取扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 同时加 100 bp Ladder 作为 DNA 分子 Marker。

1.8 统计分析

所有的试验处理经过仔细观察、记录后, 利用 SAS 软件的 GLM 和 ANOVA 过程进行统计分析处理, 做 t 检验。

2 结果与分析

1) 采样是在开放的环境下进行的, 尽管十分注意各环节的无菌操作工作, 依旧会有细菌污染。故实验中观察了青霉素和链霉素对细胞发育的影响, 筛选出合理的添加剂量 (图 1)。

在所设定双抗浓度条件下均没有出现污染情

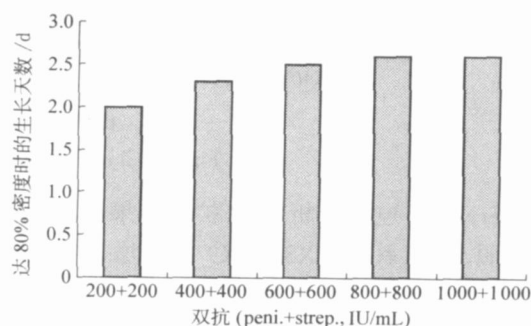


图 1 不同双抗浓度对成纤维细胞发育的影响

Fig. 1 Influence of different dose of penicillin and streptomycin sulfate on fibroblast cell growth

况。在双抗含量由 200 IU/mL 增至 600 IU/mL 时几乎呈直线上升趋势,这一结果表明:由于双抗浓度的加大,制约了细胞的生长,而且自 800 IU/mL 后细胞明显变小并生长速度减缓。因此采样时宜用含 200 U/mL 青霉素和 200 μ g/mL 链霉素的 D-Hanks 溶液清洗及浸泡处理样品。

样品分别在常温和 4℃ 带回实验室,经原代培养未见有明显的差异,说明样品对温度要求不十分严格。

2) 原代培养用消化培养法第 2 天就可见细胞贴

壁生长,而组织块培养法 3~5 d 才见到成纤维细胞从组织块周围游离出来,形成生长晕,经过传代培养后,就可以获得纯化的成纤维细胞(图 2)。

3) 用常规冻存方法冻存细胞中,DMSO 和乙二醇的冻存率分别为 70%~80% 和 60%~75%。DMSO 的冻存效果较好,且细胞复苏后 10~15 h 可见细胞贴壁。

4) 经染色体核型分析中,用秋水仙素处理的时间以 7~8 h 适宜,低渗时间以 18~22 min 效果较好。图 3 为 X4、X6 和 X7 第 10 代的核型分析。

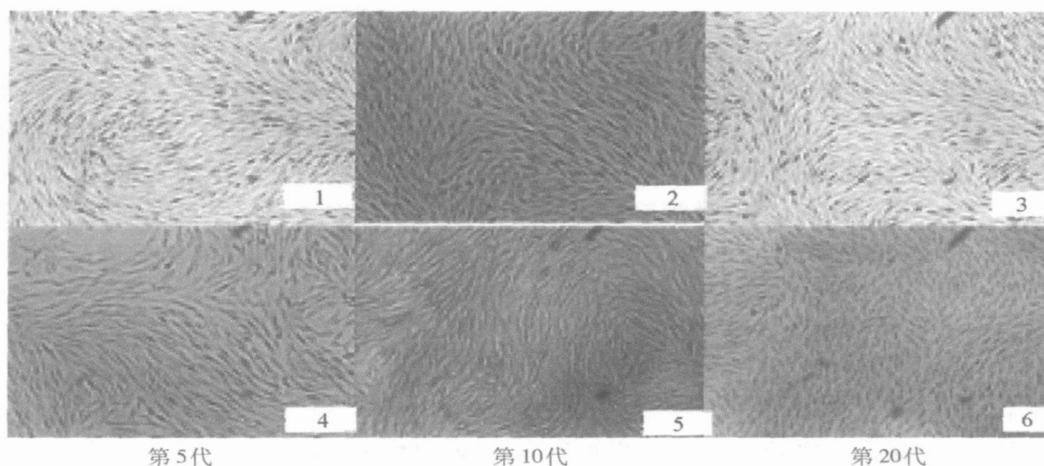


图 2 体外培养的山羊成纤维细胞培养第 5 代、10 代、20 代
(1、2、3 是胎儿细胞;4、5、6 为是成年山羊细胞)

Fig. 2 Goat fibroblast cells cultured *in vitro* cells at passage 5, 10 and 20

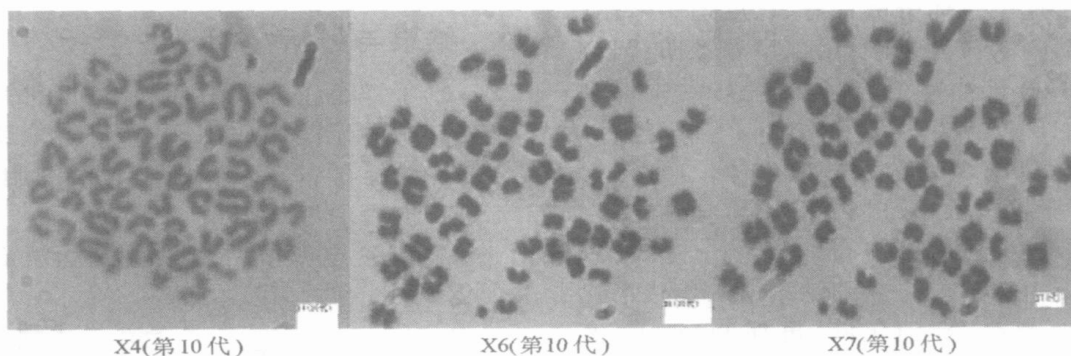


图 3 山羊胎儿成纤维细胞染色体的核型分析

Fig. 3 Chromosome karyotype of fetal fibroblast of goat

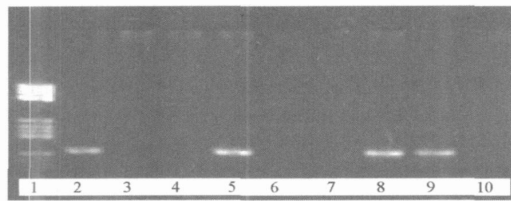
5) Sry-PCR 电泳分析 PCR 扩增结果显示(图 4)阳性对照,细胞系 X5、X8 和 X9 各扩增出 1 条 200 bp 片段,而在阴性对照和细胞系 X4、X6 和 X7 中无任何条带。因此前者为雄性,后者为雌性。

6) 山羊成纤维细胞系第 5、15 和 20 代的染色体倍数的分析(表 1)可知,细胞系在传代培养过程中,

染色体倍性并未发生明显变化,二倍体细胞的比例在 68%~90%,细胞系各代差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

1) 取样时防污染。由于采样是在开放的环境下进行的,除要求各环节进行常规消毒灭菌之外,还需



1. 为 100 Ladder; 2. 为阳性对照; 3. 为阴性对照;
4~10. 为胎儿细胞系

1. 为 100 Ladder; 2. 为阳性对照; 3. 为阴性对照;
4~10. 为胎儿细胞系

图 4 Sry-PCR 法扩增产物电泳分析

Fig. 4 Amplification products of Sry-PCR

加入抗菌素。本试验用 200 U/mL 青霉素加 200 μ g/mL 链霉素处理样品较为理想。

表 1 山羊 X4、X6、X7 细胞系不同代数染色体倍性的分析

Table 1 Chromosomal analysis of X4, X6 and X7 cells at different passages

细胞系	细胞代数	分裂相染色体标本数	不同染色体倍性的细胞数/ %		
			> 2n	2n	< 2n
X4	5	42	2(4.76)	37(88.10)	3(7.14)
	15	38	4(10.53)	32(84.21)	2(10.53)
	20	40	3(7.50)	30(75.00)	7(17.50)
X6	5	32	2(6.25)	27(84.38)	3(9.38)
	15	28	1(3.57)	22(78.57)	5(17.86)
	20	48	4(8.33)	37(77.08)	7(14.58)
X7	5	52	1(1.92)	47(90.38)	4(7.69)
	15	39	1(2.56)	36(92.31)	2(5.13)
	20	45	2(4.44)	38(84.44)	5(11.11)

注:经 T 检验, $P > 0.05$, 差异不显著。

2) 培养方法。消化培养法中酶的消化效果与温度、组织块大小、酶的浓度等因素有关。由于所取的组织块较小, 因此要控制消化时间和消化液的浓度, 消化时间过长或酶液的浓度过大都会使细胞受损害; 反之则达不到分散目的, 而且细胞大小参差不齐, 细胞数量少以至于不能很好地传代。

成年组织常要消化 2 h 以上, 消化时间延长对细胞的伤害较大, 降低了有活力细胞的产率。对胎儿组织用消化法 30~40 min 即可获得大量的解离细胞; 第 3 天就可以进行细胞传代。其主要原因是胎儿细胞生长发育正处于旺盛期, 结缔组织少, 以上说明胎儿细胞更容易操作。

相对而言, 组织块培养法更简单易行, 同时又避免了高浓度消化液对细胞的伤害, 并且细胞均质性好。但不足之处是原代培养所用时间较长。

3) 培养液血清用量。由于血清中含有使细胞吸

附及增殖生长所需的生长因子, 因此在原代培养时用较高浓度的血清是非常有益的, 按照一般细胞培养方法, 一般在原代培养时用 15% (体积分数) 的血清, 而在传代培养时, 用常规血清量 (10% 的血清) 进行培养。

4) 细胞纯化方法。本研究获得的原代细胞多为梭形, 细胞足伸展较短, 绝大多数是成纤维细胞, 也含有极少量其他类型的细胞, 如上皮细胞等。

成纤维细胞对消化液比上皮细胞更为敏感, 通过控制适宜的消化时间可以使成纤维细胞脱壁, 而上皮细胞仍贴附在瓶壁上, 经过 3~5 次传代, 高度汇合的细胞呈火焰放射状生长, 有明显的方向性, 是典型的成纤维细胞 (图 2); 而上皮细胞呈多角形。在消化后成纤维细胞和上皮细胞伪足都慢慢缩回变为圆形细胞, 只是成纤维细胞的伪足缩回速度快。因此, 经过几次传代, 就可得到纯化的成纤维细胞。

5) 细胞冻存方法。用常规冻存方法冻存细胞, DMSO 和乙二醇的冻存效果分别为 70%~80% 和 60%~75%。前者效果较好, 其原因可能是当 DMSO 和乙二醇与细胞内的水进行交换时, 由于 DMSO 的羰基与水形成氢键的能力比乙二醇的羟基与水形成氢键的能力弱, 用乙二醇为防冻剂时, 细胞内残存的水较多, 在冻融过程中细胞内形成的冰晶比 DMSO 为防冻剂形成的冰晶多, 因此用乙二醇的冻存效果比 DMSO 的冻存效果差。

另外, 常规冻存法极简便, 在没有程序冷冻仪的情况下, 是比较理想的细胞冻存方法。

细胞冻存效果与细胞在冻存液中的分散程度密切相关, 细胞分散得越均匀, 则冻存效果越好; 细胞复苏后 10~15 h 可见细胞贴壁; 次日更换培养液, 2~3 d 长满培养瓶。

6) 经染色体核型分析。进行细胞染色体核型分析时, 当山羊的成纤维细胞用终浓度为 0.1 μ g/mL 秋水仙素处理时间为 7~8 h、低渗时间为 18~22 min。在配制磷酸盐缓冲液时, 用钠盐取代钾盐可以得到同样效果, 同时降低了成本。

7) 性别鉴定。对培养的胎儿细胞进行性别鉴定的方法有多种, 主要包括: 染色体核型分析法、X-连接酶分析法、H-Y 抗原检测法、Sry-PCR 法等。

Sry 是位于雄性 Y 染色体性别决定区的 1 个基因^[15-16], 在动物中高度保守。Sry 基因的表达决定了胚胎沿雄性方向分化^[17]。特异性扩增 Sry 基因的核心序列就可以对动物胚胎或细胞进行性别鉴

定。由于此法简便、快速、准确,因此 Sry-PCR 法已成功地用于牛的早期胚胎鉴定^[18]。本研究根据人和牛 Sry 基因同源序列所设计的 1 对引物,可有效地扩增出阳性对照公羊 Sry 基因的特异性片段,而在阴性对照母羊无任何扩增带。此时有扩增带的细胞系为雄性,而无带的为雌性。用本研究室所设计的引物测定已知性别的组织或培养的细胞,准确率为 100%;结合核型分析技术对测定的胎儿性别进行确证,准确率为 100%。

8) 细胞体外的长期培养。对于体细胞转基因克隆来说,从细胞的转染到阳性克隆的获得,至少需要 15~20 d,再加上原代细胞的培养及细胞纯化,到转基因体细胞克隆时,细胞已在体外培养至少达 13~15 代,远比大多数体细胞克隆所用的体细胞的代数要高。因此本研究同时对细胞进行体外长期培养长达 35 代,并进行染色体分析,表明二倍体细胞在细胞群体中所占的比率仍在 75%以上。因此,如果我们选择出良好的个体细胞系,使培养体细胞突破 30 代是非常有可能的,而且细胞的形态、发育周期及核型等不发生任何异常变化。

另外,本研究提取细胞基因组的方法简便、快速,能够很快地用于 PCR 扩增反应获得鉴定结果,为及早地转染目的基因以及保存和扩增性别已知的胎儿成纤维细胞系提供可靠方法。

在体细胞克隆中要保证体细胞的染色体倍性,尤其是在基因转染过程中要对细胞进行较长时间的药物抗性筛选,所以防止细胞过早老化对阳性克隆的筛选意义十分重要。另外,为了减少细胞培养过程中染色体的丢失、防止细胞过早老化,在原代培养时,应随时收集原代培养液作为适应性条件培养液,备后期添加之用,以补充培养液中的生长因子和细胞分泌物;同时,换液时应采取部分换液法,即每次只换培养液总体积的 1/3~1/4。

参 考 文 献

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385: 810-813
- [2] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line[J]. *Nature*, 1996, 380: 64-66
- [3] Wells D N, Misica P M, Day T A, et al. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro-matured cytoplasts[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57: 385-393
- [4] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1997, 278: 2130-2133
- [5] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280: 1256-1258
- [6] Zakhartchenko V, Durcova Hills G, Stojkovic M, et al. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. *J Reprod Fertil*, 1999, 115: 325-331
- [7] Vigon X, LeBourhis D, Chesne P, et al. Development of bovinenuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts[J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 216(abstract)
- [8] Baquisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 456-461
- [9] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloned by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289: 1188-1190
- [10] Betthausen J, Forsberg E, Monica A, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1055-1059
- [11] 贾士儒. 生物反应工程原理[M]. 北京:高等教育出版社, 1990
- [12] 俞新大,张富国,李建萍,等. 细胞工程[M]. 北京:科学普及出版社, 1988
- [13] 张静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1990
- [14] 司徒镇,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996
- [15] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al. A gene from the sex-determining region encodes: a protein with homology to a conserved DNA-binding motif[J]. *Nature*, 1990, 346: 240-244
- [16] Gubbay J, Collignon J, Koopman P, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of novel family of embryonically expressed genes[J]. *Nature*, 1990, 346: 245-250
- [17] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry[J]. *Nature*, 1991, 351: 117-121
- [18] 曾溢滔; 张美兰; 陈美珏,等. 应用 PCR 法扩增牛 SR Y 序列进行奶牛胚胎性别鉴定[J]. *中国科学(B 辑)*, 1993, 23: 371-376