

克隆山羊成纤维细胞系的建立与生物学特性的研究

刘 通,王 恒,李运生,张运海

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室,安徽 合肥 230036)

摘要:为研究克隆黄淮白山羊耳部皮肤成纤维细胞(cGSF)的体外培养及其生物学特性。通过组织块接种培养法和胰蛋白酶消化法均可以获得原代 cGSF,但在接种培养 24 h 后,组织块法收获的细胞贴壁率和细胞量要明显高于胰酶消化法。就生长特征而言,cGSF 的生长曲线也呈现典型“S”型,到达指数增长期、平台期的时间分别为第 3,6 天,早于普通黄淮白山羊的皮肤成纤维细胞(GSF),后者分别为第 4,8 天。cGSF 原代(P0)、第 2 代(P2)、第 8 代(P8)细胞的染色体数目异常率均高于相同代数的 GSF。在相同转染条件下,cGSF 在转染 pEGFP-N1 后,再经 G418 筛选亦可形成克隆点,扩增获得阳性细胞系。总之,源自克隆山羊的体细胞体外生长、转基因后的生物学特征有别于普通动物分离得到的细胞系。因此,利用来自克隆动物的体细胞开展研究,选择分离培养、纯化、转基因方法时需要适当调整。

关键词:体细胞克隆;山羊;成纤维细胞;生物学特性

中图分类号:Q78;S826 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)05-0077-06

doi:10.7668/hbxb.2015.05.013

Establishment and Biological Characteristics of Fibroblast Cells Derived from Somatic Cloned Goat

LIU Tong, WANG Heng, LI Yun-sheng, ZHANG Yun-hai

(Anhui Provincial Lab for Animal Genetic Resource Conservation and Bio-breeding, College of
Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The present study aimed to establish ear skin fibroblasts(cGSF) from a cloned Huanghuai white goat and explore the biological characteristics of the established cGSF cell line. The results were as follows: Both explants adherence culture(A method) and trypsin digestion(B method) could result in the successful growth of primary fibroblasts. However, after 24 h in culture, adherence rate of cells harvested from A method was higher than that of B method. The amount of harvested cells using A method was also greater than using B method. As for the growing characteristics, the growth curve of cGSF cells was typical "S" type. For the time spent on reaching to the exponential growth phase(Day 3 Vs. Day 4) and the platform phase(Day 6 Vs. Day 8), cGSF was earlier than control(non-cloned goat fibroblast cells). We also found that rate of chromosomal abnormalities in cells from cloned goats was higher than those from non-cloned. In order to test feasibility of transfection using cGSF, pEGFP-N1 plasmid was subjected to be transfected with cultured cGSF, and we found that cGSF cells were more easier to form clones after G418 screen. Therefore, if cells from cloned animals are employed in transgenic research, appropriate readjustment in cell isolation, *in vitro* culture, transfection and positive cell screen and enrichment should be done accordingly. In all, cells *in vitro* derived from cloned goat show differences in biological characteristics from cell lines of non-cloned goat.

Key words: Somatic cloning; Goat; Fibroblast cells; Biological characteristics

畜禽遗传品种资源是畜牧业可持续发展的物质基础。当前,我国遗传资源保护的主要形式是活畜保种,但是,由于在人、财、物投入上的高要求,严重

影响了动物品种资源保护效益的最大化,因此,有必要探索借助以细胞工程为代表的,更高效、经济、安全的现代生物技术来丰富动物品种资源保护的手

收稿日期:2015-07-10

基金项目:国家“863”计划子课题(2011AA100307-04);国家科技重大专项(2014ZX08008-005)

作者简介:刘 通(1988-),男,浙江仙居人,硕士,主要从事动物细胞与胚胎工程研究。

通讯作者:张运海(1973-),男,安徽涡阳人,教授,博士,主要从事动物细胞与胚胎工程研究。

段。黄淮白山羊是广泛分布于黄淮流域的肉、皮兼用型山羊品种,具有性成熟早、生长发育快、四季发情、繁殖率高等特性。近十余年以来,由于大量引进山羊杂交,地方山羊品种的特异基因被稀释,黄淮白山羊也未能幸免,目前纯种的黄淮白山羊数量骤减^[1],急需保护。

体细胞核移植^[2]、诱导多功能性干细胞^[3]以及转基因等现代生物技术为畜牧业、医学以及生命科学基础研究等注入了新的活力。尤其对畜牧业而言,体细胞克隆技术为转基因家畜育种新材料创制、优秀个体扩繁、濒危品种资源拯救提供了一种崭新的技术手段^[4]。而细胞培养作为细胞工程的关键环节,近年来已日渐发展成熟,尤其是成纤维细胞的分离培养,操作简单易学,加之在动物机体内分布极为广泛,取材方便,不仅可用于畜禽资源保存^[5-6],而且在分子遗传学、细胞遗传学、生物医学等方面也有极其重要的用途^[1]。目前,关于利用克隆黄淮山羊体细胞为材料,分离培养成纤维细胞鲜有报道。因此,本研究拟采集黄淮白山羊克隆后代的耳部皮肤组织,尝试分离培养成纤维细胞,并对分离、培养、纯化方法、体外生长特性进行研究,同时尝试对此细胞系进行转染外源基因,以期为克隆黄淮白山羊遗传资源保护与利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 样本来源 将出生后 40 日龄左右的克隆黄淮白山羊,从合肥博大牧业科技开发有限责任公司良种山羊繁育基地带回安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室。

1.1.2 细胞培养主要试剂和耗材 除另作说明之外,本研究所使用的细胞培养耗材均为 Thermo Fisher 公司生产的 Nunc 系列产品,试剂为 Sigma-Aldrich 公司产品;DMEM 培养基、Trypsin-EDTA-4Na、DPBS 均购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司,G-418 购自 Amresco 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原代培养 用 75% 乙醇清洗克隆山羊耳部皮肤待取样部位,而后去毛,然后碘酒涂布消毒 <1 min,脱碘后迅速剪取大约 1 cm² 的组织块,立即放入 75% 乙醇中浸泡 30 s,再转入洁净工作台内的 DPBS 溶液中浸泡漂洗 2~3 遍,备用。

组织块法:在洁净工作台内,取部分组织块置于 1.5 mL 离心管中,剪成 1 mm³ 大小,用巴斯德吸管

或移液器将剪碎的组织块平分到直径 10 cm 细胞培养皿中,均匀涂布,并将皿倒置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中干涸培养 4~6 h 后取出,于洁净工作台内再补入 8 mL 左右含 10% FBS 的 DMEM 培养液。第 2 天补液至 10 mL,以后视细胞生长情况每隔 3~5 d 换液一次。

胰酶热消化法:在洁净工作台内,取部分组织块置于 1.5 mL 离心管中,用细剪刀将组织剪成 1 mm³ 大小,而后移入 15 mL 离心管中,再添加 2 倍体积 Trypsin-EDTA,轻轻敲打混匀后放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中,每隔 3~5 min 取出吹打混匀。约 15 min 后,当观察到组织块消散时,表示消化合适;再补加 6 倍体积含 10% FBS 的 DMEM 培养液灭活 Trypsin,充分混匀后取样进行细胞计数,调整细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL,接种 4 mL 到 10 cm 细胞培养皿中,补足培养液至 8 mL。第 2 天补液至 10 mL,以后每隔 3 d 换液一次,具体视细胞生长情况而定。

1.2.2 传代培养 当原代成纤维细胞生长达到 80%~85% 汇合度时,先吸弃原有培养液,而后用 3 mL 无钙、镁离子的 DPBS 溶液清洗 2 次,以尽可能消除旧培养液中血清残留;之后加 2 mL/皿经 37 ℃预热的 Trypsin-EDTA,并置于 37 ℃二氧化碳培养箱内 5 min,取出在显微镜下观察,若见 70%~80% 的细胞回缩变圆时,轻轻拍打皿底,使细胞彻底脱壁;而后立即加入 6~8 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化,混匀并计数,根据细胞浓度进行分皿传代培养。

1.2.3 细胞冻存 取长势良好,生长状态佳的细胞,在汇合度达到 >80% 时,进行冻存。首先,按照 DMEM: FBS: DMSO = 7: 2: 1 (体积比) 的比例配制冻存液;常规方法将细胞消化、洗涤、计数。然后,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,按照 1×10⁶/500 μL 的密度加入细胞冻存液重悬,并按 500 μL 分装至 2.0 mL 的冻存管内,冻存管预先标记好动物名称、性别、日龄、冻存编号、冻存日期与冻存操作人员等信息。然后,将冻存管放入装有异丙醇的冻存盒(Nalgen)中,放入 -80 ℃冰箱内。次日,将上述经过夜处理的冻存管放入液氮罐中分类保存,并做好信息登记。

1.2.4 细胞贴壁率统计 分别解冻通过组织块贴壁法和胰蛋白酶热消化法制备的冻存细胞各 2 管;考虑到初始冻存浓度均为 2×10⁶/mL (细胞浓度 I),待接种 6~8 h 后 >70%~80% 的细胞贴壁后,吸弃含尚未贴壁细胞的培养液,用无钙、镁离子的 PBS 洗涤后,消化、离心后用含 10% FBS 的 DMEM

培养液调整至接种时的体积,此时的细胞浓度记为细胞浓度Ⅱ。细胞的贴壁率^[7] = (细胞浓度Ⅱ/细胞浓度Ⅰ) × 100%。

1.2.5 细胞生长曲线 将培养至第5代(P5)的克隆黄淮白山羊和普通黄淮白山羊成纤维细胞,按照文献[8]进行生长曲线绘制:在同一时间消化、调整细胞浓度,并于同一时间按每孔 $2 \times 10^4/500 \mu\text{L}$ 接种至24孔细胞培养板,连续培养8 d(培养条件为 37°C , 5% CO_2 , 100% 湿度);从接种开始计时,每隔24 h 消化3孔,每孔计细胞总数,求其平均值。以培养天数(d)为横坐标,细胞总数目(个)为纵坐标,绘制出克隆山羊和普通山羊成纤维细胞的生长曲线图。

1.2.6 染色体数目检测 按照张运海^[9]报道的方法制备细胞中期分裂相。选取生长旺盛期的克隆黄淮白山羊 P0、P2、P8 细胞,及普通山羊的 P8 细胞来制备中期染色体标本。在5 mL 培养液中加入 $50 \mu\text{L}$ 的 $10 \mu\text{g/mL}$ 的秋水仙素(工作浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$),以抑制中期分裂的细胞,在 37°C , 5% CO_2 , 100% 湿度继续培养3.5~4.0 h,将细胞培养液转移到15 mL 离心管中,然后用DPBS(无钙、镁, 37°C 预热)洗涤培养瓶中的贴壁细胞,洗涤2遍。再加0.25% Trypsin-EDTA 消化3 min 左右,之后加入细胞培养液终止消化。用弯头吸管轻轻吹打细胞生长面,然后将细胞悬液转移到上述的15 mL 离心管中,再用DPBS 洗涤1遍并收集到离心管中, $1\,000 \text{ r/min}$ 离心10 min,弃上清,留大约0.5 mL。加入预热(37°C)的 0.075 mol/L KCl 溶液至5 mL,于 37°C 水浴低渗处理25 min;低渗结束后加入0.5 mL 固定液(甲醇:冰乙酸体积比 = 3:1,现用现配),短暂吸打混匀后,迅速离心($1\,000 \text{ r/min}$ 10 min),弃上清,留少许液体。加入4 mL 固定液,室温固定20 min,期间吹打混匀,固定后, $1\,000 \text{ r/min}$ 离心8 min,弃上清,留少许液体,重复2遍。以10~30 cm 高度滴加冰水($0\sim4^\circ\text{C}$)至预冷、倾斜 45° 左右的玻璃载玻片上,晾干后,在稀释好的吉姆萨染液中染色15 min,用流水在无细胞的载玻片一面洗净染液。将载玻片立在吸水纸上干燥,待干燥后用中性树胶封片。观察片子的时候选用油镜观察,每个试验组随机选取20个铺展完好的中期相统计染色体数目。

1.2.7 作为转基因供体细胞的特性 选择在6 cm 培养皿内生长状态良好,汇合度达70%左右的P4克隆黄淮白山羊和普通山羊成纤维细胞,于同一时间转染外源基因 PEGFP-N1 质粒,转染前30 min,将细胞培养液换成无血清培养液(DMEM), $2 \mu\text{g}$ 质粒

溶于 $250 \mu\text{L}$ opti-MEM,室温放置5 min,定义为Ⅰ液; $5 \mu\text{L}$ LipofectamineTM 2000 溶于 $250 \mu\text{L}$ opti-MEM,室温放置5 min,定义为Ⅱ液。将Ⅰ、Ⅱ液混合共孵育20 min,再加到待转染细胞所在细胞培养皿中。转染4~6 h后更换培养液为含10% FBS 的DMEM 培养液,并于转染24 h后倒置荧光显微镜下观察GFP 表达并拍照,按照1:10的比例传代并用含有 $500 \mu\text{g/mL}$ 的G-418 的培养液筛选,观察细胞转染后克隆集落形成。

2 结果与分析

2.1 形态学观察

组织块接种培养法(A法)接种4 h左右细胞即出现贴壁,到第7天(接种当天记为第0天)左右组织块周边便有单细胞游离贴壁生长,第9天组织块周边可见有大量的细胞爬出(图1箭头所示),而胰蛋白酶热消化法(B法)处理,则在48 h即能观察到有爬出细胞,并贴壁生长。上述2种方式开始出现细胞游离贴壁生长时,并非全是成纤维样的细胞,而是上皮样细胞与成纤维样细胞共存:上皮细胞呈鹅卵石、扁平多角形生长,而随着培养的延续,成纤维样细胞逐渐占据优势,呈不规则的梭形、放射状或漩涡状生长,在第15天时两者共同铺满10 cm 培养皿皿底。

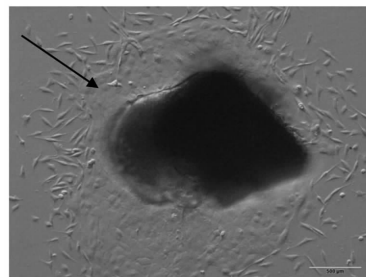


图1 克隆山羊原代成纤维细胞

Fig.1 Primary fibroblast cells of clone goat

2.2 成纤维细胞的纯化

如图2箭头所示,原代细胞和代次低的细胞是上皮细胞和成纤维细胞的混合物。通过对克隆羊成纤维细胞的消化、传代发现,成纤维细胞和上皮样细胞对胰蛋白酶的耐受性不同,成纤维细胞先脱壁,而上皮样细胞贴壁牢靠,脱壁要慢。再次接种后成纤维细胞的贴壁也较快,多数细胞能在1 h内完成贴附,而上皮细胞在短时间内不能贴壁,轻轻晃动,便可浮起。根据这一特征采用多次差别消化方法,如图3箭头所示,经过2~3次代传代获得了纯化的克隆羊成纤维细胞(cGSF)。

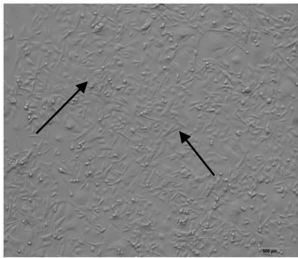


图2 成纤维细胞和上皮细胞的混合物
Fig.2 Mixture of fibroblast and epithelium

2.3 组织贴壁法和胰酶消化法得到的细胞量和传代细胞贴壁率

A法和B法都建立起cGSF细胞系。在长满的情况下,细胞计数显示A法得到的细胞数量多于B

表1 不同培养方式下的细胞浓度

Tab.1 Cellular concentration under different culture methods

原代培养方式 Method of primary culture	细胞浓度 I Cell concentration I	细胞浓度 II Cell concentration II
贴壁培养 I Adherent culture method I	2	1.44
贴壁培养 I Adherent culture method I	2	1.46
消化培养 II Digestion culture method II	2	1.24
消化培养 II Digestion culture method II	2	1.38

表2 不同培养方式下的贴壁率

Tab.2 Cellular adhesion rate

under different culture methods

%

原代培养方式 Method of primary culture	贴壁率 Cellular adhesion rate
贴壁培养 I Adherent culture method I	72.5 ± 0.5a
消化培养 II Digestion culture method II	63.0 ± 2.0b

注:同列数据不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Values within a column present significantly different($P < 0.05$).

2.4 细胞生长特性

将传至P5的克隆山羊和普通山羊成纤维细

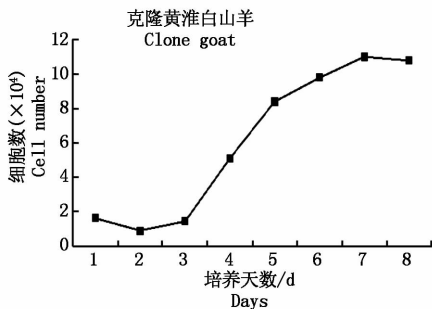


图4 克隆山羊和普通山羊成纤维细胞生长曲线图

Fig.4 Growth curve of clone goat and goat fibroblast cells

表3 克隆山羊与普通山羊的核型异常率

Tab.3 Fibroblasts karyotype abnormality rate of clone goat and goat

核型类别 Karyotype	克隆 Clone goat P0	克隆 Clone goat P2	克隆 Clone goat P8	普通 Goat P8
正常 Normal karyotype	12	7	9	13
异常 Abnormal karyotype	8	13	11	7
异常率/% Abnormality rate	40.0	65.0	55.0	35.0

法,而且A法所获细胞生长相对旺盛,能迅速地延伸成片。传代培养后,比较细胞贴壁率,结果表明,A法得到的细胞贴壁率高于B法(表1,2)。

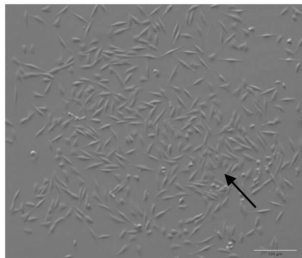


图3 纯化的克隆羊成纤维细胞
Fig.3 Purified fibroblast of clone goat

胞,在24孔板中连续培养8d,克隆羊成纤维细胞的群体倍增时间是24h,第3~5天为对数期;而普通山羊成纤维细胞群体倍增时间是16h,第4~6天为对数期。两者生长曲线都呈“S”型(图4)。

2.5 细胞遗传特性分析

通过对P0、P2、P8的cGSF细胞,及普通山羊的第8代细胞染色体标本的统计,每个试验组随机选取的20个中期相分析,统计结果表明克隆山羊的核型异常率高于普通山羊(表3)。克隆山羊有正常的中期相,60条染色体(图5)。

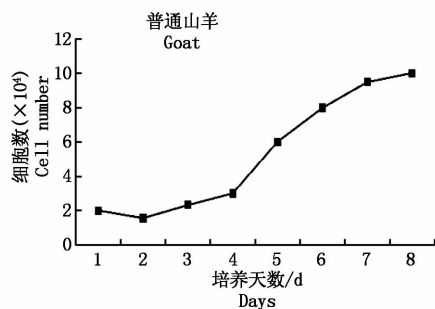




图 5 正常克隆山羊成纤维细胞
染色体核分裂相(1 000 ×),30 对

Fig. 5 Normal representative metaphase spread
of clone goat fibroblast cells(1 000 ×),30 pair

2.6 转基因可行性

通过对 P4 克隆山羊和普通山羊成纤维细胞于同一时间转染外源报告基因 pEGFP-N1,发现两者都被成功转染(图 6,7),但是源于克隆山羊的成纤维细胞,经 G418 处理筛选 10 d,即可形成类似单克隆增殖的稳定细胞系(图8),而源于普通非克隆山

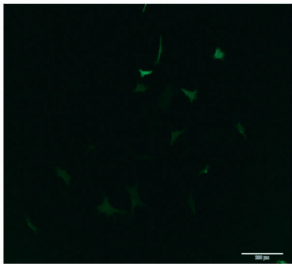


图 6 克隆山羊成纤维细胞系转染(pEGFP-N1)24 h 后
Fig. 6 Fibroblast cells of clone goats
expressing EGFP,24 h after transfection

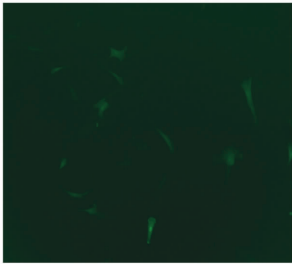
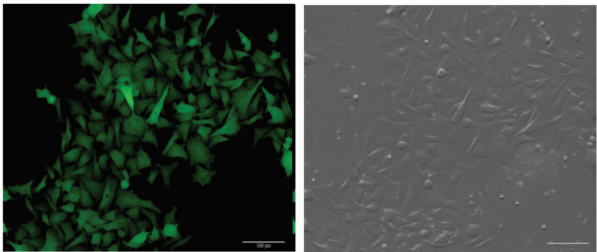


图 7 普通非克隆山羊成纤维细胞系转染(pEGFP-N1)24 h 后
Fig. 7 Fibroblast cells of normal non-clone goats
expressing EGFP,24 h after transfection



左. 荧光;右. 明视野。图 8 同。

Left. Fluorescent field;Right. Bright field. The same as Fig. 8.

图 8 筛选 10 d 后的克隆山羊转 EGFP 细胞

Fig. 8 The transfected fibroblast cells expressing EGFP
from clone goat after 10 days screen using G418

羊的成纤维细胞系,利用 G418 处理筛选,在第 10 d,未见类似单克隆增殖的稳定细胞系(图 9)。

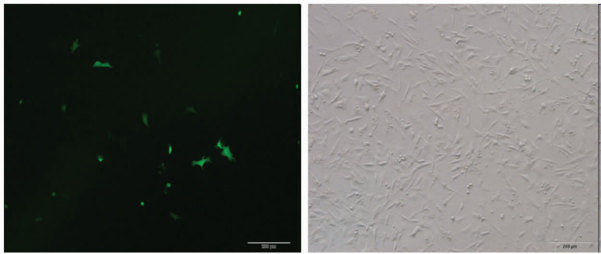


图 9 筛选 10 d 后的普通非克隆山羊细胞

Fig. 9 The transfected fibroblast cells expressing EGFP
from non-clone goat 10 days after screen using G418

3 讨论

本研究成功获得黄淮白山羊克隆后代的耳皮肤成纤维细胞系,进一步对其生物学特性进行研究,发现该细胞系的群体倍增时间比普通山羊成纤维多 8 h,生长曲线呈“S”型,但出现对数期和平台期的时间早于普通山羊的成纤维细胞系。经抽样计数细胞核染色体数,发现来自克隆山羊的成纤维细胞系细胞倍性异常率高于普通山羊成纤维细胞系。此外,克隆山羊成纤维细胞转染外源基因比普通山羊更易形成细胞集落(Clony)的稳定增殖细胞系。结果提示,在选择对克隆动物皮肤成纤维细胞系建系方法时需要慎重。如果将克隆动物成纤维细胞作为转基因供体细胞时需要考虑 2 个因素:一是克隆山羊的成纤维细胞核型异常率显著高于普通的山羊;二是克隆山羊成纤维细胞转染外源基因比普通山羊更易形成类似单克隆的稳定增值的细胞系,比较容易获得大量转基因细胞。

常规动物细胞原代培养主要有 2 种方法。一是组织块贴壁培养法,二是分离单细胞接种培养法即胰蛋白酶消化法。组织块贴壁培养法简单方便,细胞均质性好,长出的细胞整齐而便于选择,对细胞造成的伤害小,成本低廉且成功率高。目前,组织块贴壁培养法培养动物成纤维细胞较为流行^[10]。而胰蛋白酶消化培养法适于培养大量组织,得到的细胞生长旺盛,能迅速地延伸成片而长成单层,建系效率高,但操作烦琐,且易造成污染。胰蛋白酶浓度和消化时间不易把握,容易对细胞造成较大伤害,进而影响原代细胞存活和贴壁。对于克隆山羊原代细胞分离培养,本研究结果表明,组织块贴壁法细胞爬出时间较胰蛋白酶消化法推迟 5 d,但是前者所得细胞量、传代时细胞贴壁率都高于后者。这与本研究从普通山羊分离成纤维细胞结果一致,即不论是克隆山羊还是普通山羊在分离原代成纤维细胞时,胰蛋

白酶消化法爬出细胞时间要比组织块法早很多,且细胞均一,但最后得到的量少于组织块法。此外,我们发现,克隆山羊成纤维细胞系和普通山羊的成纤维细胞系生物学特性不尽相同,其原因可能是克隆山羊成纤维细胞系是取自一只意外死亡的克隆黄淮白山羊,其身体器官和构造在后续进行的解剖学检查中发现有异常:和正常羊羔相比,其心脏过大,肺部有充血肿块。推测其在体细胞重编程或后期的胚胎发育可能有异常,导致后来分化的组织,即得到的特化细胞系在基因水平也有异常的突变,最终导致在细胞水平上的一些生物学特性发生了相应的改变。

利用克隆动物的体细胞作为供体细胞,进行核移植获得后代是再克隆技术。再克隆技术是继克隆技术之后的第2代克隆技术。孙国杰等^[11]研究认为,转基因克隆胚胎早期发育能力下降,可能是由于供体细胞的基因转染和药物筛选过程导致的,而再克隆对其早期胚胎的发育能力没有负面影响。利用再克隆技术可以实现对珍贵转基因动物的资源保存,可以快速扩大转基因动物的群体,且能保持外源基因稳定传递。目前在很多物种上已取得成功,成勇等^[12]利用成年转特异性表达人促红细胞生成素(rhEPO)基因山羊的成纤维细胞和卵巢颗粒细胞再克隆得到rhEPO转基因山羊,Park等^[13]用转hGM-CSF基因的山羊胎儿成纤维细胞系再克隆得到hGM-CSF转基因猪,Kuroiwa等^[14]应用转入源化抗体基因的牛胎儿成纤维细胞系再克隆得到含人源化抗体的转基因牛。Ahn等^[15]将死后的转基因动物耳源成纤维细胞分离,并利用再克隆技术将转 α -1,3-半乳糖基转移酶基因的克隆猪“成功复活”。

本研究以EGFP为报告基因,尝试评价克隆山羊的成纤维细胞系用于转基因的可行性,发现其在转染后易于形成克隆点,便于阳性细胞系的快速筛选。因此,在后续的试验中考虑用cGSF作为供体细胞开展转基因、再克隆等试验,观察cGSF与普通山羊成纤维细胞相比,作为供体细胞时,早期胚胎发育阶段有无差异,体细胞积累的变异对个体发育、繁殖和健康的影响,为以后转基因山羊再克隆奠定基础。

参考文献:

[1] 赵本领,包玉亭,霍福新,等.黄淮山羊品种资源调查报告[J].中国畜禽种业,2008,1:64-66.

- [2] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(5): 456-461.
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [4] 豆兴堂. 羊成纤维细胞建系研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2014(12): 54-58.
- [5] 万发春, 刘晓牧, 宋恩亮, 等. 用于保种的蒙山牛耳成纤维细胞的培养研究[J]. *华北农学报*, 2009, 24(S2): 109-112.
- [6] 关伟军, 马月辉. 濒危禽畜品种细胞库的构建与鉴定[J]. *中国农业科技导报*, 2003, 5(5): 66-70.
- [7] 王光雷, 谭蓉芳, 郭中敏, 等. 不同方法处理的培养瓶对细胞贴壁率的影响[J]. *中国兽医科技*, 1993, 6(6): 23-24.
- [8] 周向梅, 马月辉, 关伟军, 等. 北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 03(3): 209-215.
- [9] 张云海. 利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [10] Shen W, Yang Z T, Li L. The parameter of gene targeting and characteristic analysis of goat fetal fibroblasts[J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2004, 10: 21-27.
- [11] 孙国杰, 李荣, 戴蕴平, 等. 转基因和再克隆对克隆胚胎细胞凋亡的影响[J]. *自然科学进展*, 2009, 3(3): 266-271.
- [12] 成勇, 王玉阁, 罗金平, 等. 由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊[J]. *生物工程学报*, 2002, 1(1): 79-83.
- [13] Park K W, Choi K M, Hong S P, *et al.* Production of transgenic recloned piglets harboring the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene from porcine fetal fibroblasts by nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 2008, 70(9): 1431-1438.
- [14] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Sathiyaseelan T, *et al.* Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(2): 173-181.
- [15] Ahn K S, Kim Y J, Kim M, *et al.* Resurrection of an α -1, 3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(5): 933-939.