西北农业学报 2005,14(6):1～6
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

莎能奶山羊皮肤成纤维细胞几种冷冻保存方法的研究

王 亮[1,3],刘婷婷[2],彭 涛[2],帅志强[2],张达江[3],朱 海[2],
陈 军[2],李卫华[2],汪汉卿[1*]
(1.中国科学院兰州化学物理研究所甘肃省天然药物重点实验室,兰州 730000;2.新疆金牛生物股份有限公司,
乌鲁木齐 830026;3.中国科学院新疆理化技术研究所,乌鲁木齐 830011)

摘 要:以莎能奶山羊皮肤组织为材料进行细胞培养,通过分离纯化建立了莎能奶山羊皮肤成纤维细胞系。纯化培养的成纤维细胞在冷冻保护剂和血清成分相同的条件下选用5种具有不同预冷平衡方式和预冷时间的方法进行冷冻保存,5个月后通过对成纤维细胞复苏后的活力对比分析,方法3(70% 细胞悬液+20%胎牛血清+10%DMSO;先在4 C 预冷平衡0.5 h,接着液氮罐口气态氮悬挂4 h,然后沉入液氮)冻存细胞解冻后胎盘蓝染色细胞活力分析,活细胞率为84.8%,培养48 h后细胞贴壁率为85.4%,明显高于其他几种方法。

关键词:莎能奶山羊;成纤维细胞;细胞培养;冷冻保存;活细胞率
中图分类号:S827,S852.22 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-1389(2005)06-0001-06

Analyses Research of Several Cryopreservation Methods for Skin Fibroblasts of Shaneng Milk Goat

WANG Liang[1,3], LIU Ting-ting[2], PENG Tao[2], SHUAI Zhi-qiang[2], ZHANG Da-jiang[3], ZHU Hai[2], CHEN Jun[2], LI Wei-hua[2] and WANG Han-qing[1*]
(1. Key Laboratory for Nature Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2. Xinjiang Goldcattle Bio. Inc., Urumqi Xinjiang 830026, China; 3. Xinjiang Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

Abstract: Through isolation and pure culture of Shaneng milk goat fibroblasts with skin tissue, fibroblast line was established. On conditions of the same cryoprotectant and FCS concentration Pure Shaneng milk goat fibroblasts cultured were cryopreservated in five cryopreservation methods with different pre-cool and balance ways and pre-cool time, through the contrast and analyses of cell vigor after five months cryopreservation, method 3 (70% cell suspension + 20%FCS + 10% DMSO; cryopreservation procedure: first fibroblasts were pre-cooled and balanced for half hour at 4 C, and second hanged in gaseous nitrogen in close to the mouth of nitrogen canister for 4 hours, and finally sunk into liquid nitrogen.) was the best cryopreservation method, it could maintain 84.8% of living cell rate through cell vigor test after cells were revived and stained by Trypan Blue and 85.4% of cell adherence rate after cells were revived and cultured for 48 hours, living cell rate and cell adherence rate of method 3 superior to other four methods.

Key words: Shaneng milk goat; Fibroblast; In vitro culture; Cryopreservation; Living cell rate

---

收稿日期:2005-07-28 **修回日期**:2005-08-21
基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30471242)。
作者简介:王亮(1966－),男,山东单县人,副研究员,博士,主要从事转基因动物研究。E-mail: wangliang-2004wl@163.com,电话:0991-3750767
* 通讯作者:汪汉卿,研究员,博士生导师,E-mail: hanqingwang@126.com

细胞核移植技术是哺乳动物胚胎工程的主要组成部分，是实现动物克隆的有效方法[1,2]，在畜牧业和转基因动物生产中有着广阔的应用前景。体细胞的体外培养是动物克隆中的重要一环，但由于哺乳动物体细胞在体外的生存期一般不超过一年，而且还可能因频繁传代而增加染色体的变异机率，因此在常规培养条件下细胞很难无限期保持原细胞的质量，但若采取适当的方法将细胞在超低温条件下保存，即可使其生命力固定在某一阶段而不衰老死亡，对动物克隆研究具有非常重要的价值[3~5]。成纤维细胞具有较强的分裂增殖能力，适应性强且性状稳定，是研究动物克隆最常用的细胞类型。目前国内对成纤维细胞超低温冷冻保存有较多的研究，对使用不同的冷冻保护剂和血清浓度的效果进行了大量的比较分析，一般认为10% DMSO和20%的血清浓度效果较好并被普遍使用[3~7]，但是在10% DMSO和20%的血清条件下，不同的预冷温度和不同的预冷平衡时间对复苏后细胞活力的影响还未见报道。本实验通过对莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的纯化培养，建立了莎能奶山羊皮肤成纤维细胞系，并以纯化后的成纤维细胞为材料，针对这一问题使用5种不同冷冻保存方法进行了实验研究，通过对5种冷冻保存方法的比较与分析，确定了一种比较理想的冷冻保存方法。

1 材料与方法

1.1 材料

羊腹股沟皮肤组织块：3岁龄和5岁龄日产奶量达3 kg的两只莎能奶山羊；DMEM/F12(1∶1)(GIBCO)、胎牛血清(GIBCO)、胎盘蓝(上海申工)、0.25% Trypsin(GIBCO)、Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA·4Na)(GIBCO)、0.9%生理盐水(上海申工)、DMSO(GIBCO)、双抗(P/S，GIBCO)；1.8 mL离心管(Eppendorf)、25 mL细胞培养瓶(Fisher)、24孔培养板(Fisher)、1.8 mL冻存管(Corning)、血球细胞记数器(上海申工)。

1.2 方法

1.2.1 莎能奶山羊皮肤成纤维细胞组织块培养 将两只健康的3岁龄和5岁龄莎能奶山羊取样处剃毛、消毒，无菌取腹股沟皮肤组织1～2 cm^3，将皮肤块置入含300 IU/mL双抗的DMEM/F12基本培养液中，4 h内带回实验室。在无菌操作台内，用75%的酒精消毒2～3 min，再用含200 IU/mL双抗的0.9%生理盐水洗涤3～4次后，剪去皮下脂肪和基膜，移入300 IU/mL双抗的DMEM/F12基本培养液中，用眼科剪剪成1～3 mm^3大小的组织块并置入25mL培养瓶中，然后在38℃，用1 mL 0.25% Trypsin消化40 min，40 min后，加入3 mL完全培养基(DMEM/F12+20%胎牛血清+100IU/mL双抗)终止消化并将培养瓶直接放入38℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养，细胞培养3～5 d后，观察组织块周围是否游离出成纤维细胞，并更换1/3的DMEM/F12+20%胎牛血清+100IU/mL双抗的培养液，然后继续培养，此后每3到4 d更换一次培养液。当细胞贴壁生长铺满瓶底时，用Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA、4Na)消化传代培养[8~13]。

将莎能奶山羊腹股沟皮肤组织块，在无菌操作台内，用75%的酒精消毒2～3 min，再用含200 IU/mL双抗的0.9%生理盐水洗涤3～4次后，剪去皮下脂肪和基膜后，用眼科剪和眼科镊将其剪成1 mm^3大小的组织块，将其直接贴于25 mL组织培养瓶中，在38℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中，用DMEM/F12+20%胎牛血清+100 IU/mL双抗的完全培养液培养，细胞培养3～5 d后，观察组织块周围是否游离出成纤维细胞，并更换1/3的DMEM/F12+20%FCS+100IU/mL双抗的培养液，然后继续培养，此后每3～4 d更换一次培养液。当细胞贴壁生长铺满瓶底时，用Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA、4Na)消化传代培养[8~13]。

1.2.2 成纤维细胞的分离和纯化培养 两种方法均能获得良好的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞混合物，将原代培养的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞混合物用Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA、4Na)消化传代，25 mL组织培养瓶中每瓶加入300～400 μL Trypsin-EDTA，以刚好覆盖瓶底为佳，消化2～3 min后，用移液枪吹打和收集对EDTA-胰蛋白酶的敏感性强而且最先收缩浮起的成纤维细胞，1000 r/min、离心5 min洗涤和收集细胞后，置入DMEM/F12+20%胎牛血清+100IU/mL双抗培养液中，于38℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中传代培养。经过2～3代纯化培养，既可得到纯化莎能奶山羊皮肤成纤维细胞。

1.2.3 纯化培养后的成纤维细胞冷冻保存 当

纯化后传代培养的成纤维细胞贴壁生长达90%左右，倒去培养液，用0.9%生理盐水清洗1～2次，每个25 mL组织培养瓶加入300μL Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA、4Na)消化3～5 min，在显微镜下观察细胞的收缩情况，DMEM/F12＋20%胎牛血清＋100IU/mL双抗完全培养液终止消化后，用移液枪将细胞轻轻吹打下来，1000 r/min、离心5 min，弃上清液后并收集细胞，重悬于DMEM/F12＋20%胎牛血清＋100IU/mL双抗完全培养液，经过两次离心和收集细胞，将得到的细胞按细胞悬液：胎牛血清：DMSO＝7：2：1的比例配制成细胞冷冻保存悬液，加入到1.8 mL冻存管(Corning)中，标记上动物的名称、性别、年龄、冻存编号、冻存日期等，然后将冻存管分类冻存。几种不同的冻存方法为：方法1：先4 ℃预冷平衡6 h，接着液氮口气态氮悬挂16 h，然后沉入液氮。方法2：样品次序在4 ℃、4 h、－4 ℃、2 h和－20 ℃、16 h进行预冷平衡，后沉入液氮。方法3：先在4 ℃预冷平衡0.5 h、接着液氮罐口气态氮悬挂4 h，然后沉入液氮。方法4：4 ℃ 0.5 h、－20 ℃ 1 h、－70 ℃到－80 ℃ 48 h预冷平衡，然后投入液氮长期保存。方法5：将样品不经过预冷平衡直接投入液氮。

1.2.4　*冷冻保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的解冻和复苏培养*　液氮冷冻保存5个月后，从5种方法保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞每种方法各取3管，快速置入38 ℃水浴锅解冻，不停的晃动小管2～4 min，待冻存管内冻存物全部融化后，按1：2比例迅速加入DMEM/F12＋20%胎牛血清＋100IU/mL双抗完全培养液，1000 r/min、离心5 min，弃上清液，将细胞重悬于DMEM/F12＋20%胎牛血清＋100IU/mL双抗完全培养液中。取出9μL的细胞悬液，用1μL 0.4%胎盘蓝染色，血细胞记数器记数死亡和细胞总数，统计细胞存活率。另外从5种方法保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞每种方法再各取5管细胞，进行解冻和复苏，调整细胞接种浓度为1×10^5个/mL，每个25 mL的培养瓶接种3 mL细胞悬液，于38 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养，48 h后，吸除培养液，0.9%生理盐水清洗1～2次，消化已贴壁细胞并记数，计算贴壁率。

1.2.5　*莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的生长曲线的绘制*　选取1管最佳冷冻保存方法保存的细胞，将细胞解冻和复苏后以4×10^4个/mL的密度接种于1个24孔板(Falcon)，每孔加入0.4 mL培养基(DMEM/F12＋20%FBS＋100IU/mL双抗)，38 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养。每天同一时间用Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/mL EDTA、4Na)随机消化3孔细胞，血球计数板进行计数，连续进行8 d，取其平均数绘制莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的生长曲线。

2　结果与讨论

2.1　莎能奶山羊皮肤组织块培养与成纤维细胞的分离和纯化

两种组织块培养方法均能获得良好的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞原代培养物，组织块贴壁后5～10 d，便可见大量细胞从组织块周围生长。从山羊皮肤组织块培养而来的成纤维细胞，通常混杂有大量的上皮细胞，由于成纤维细胞和上皮细胞对EDTA-胰蛋白酶消化作用所具有的敏感性不同，在用EDTA-胰蛋白酶消化进行传代培养的过程中，成纤维细胞较上皮细胞先收缩、变圆和浮起[11]，因此经过1～2代的传代培养，既可得到纯化培养的莎能奶山羊皮肤组织成纤维细胞(图1，图2)。

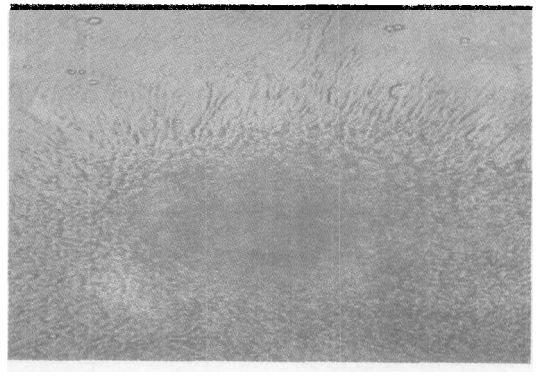

图1　莎能奶山羊原代皮肤组织块培养物(×200)

Fig. 1　Primary culture of skin tissue pieces of shaneng milk goat(×200)

2.2　冷冻保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的解冻和复苏培养

液氮罐冷冻保存5个月后，从5种方法保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞每种方法各取3管，解冻和复苏后取平均数统计细胞存活率(表1)，另外从5种方法保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞每种方法再各取5管细胞进行培养并详细观察和分析记录培养48 h后的细胞贴壁情况(表2)。

从表1不同冷冻保存方法解冻复苏后细胞存

活率的比较结果来看，方法3和方法4细胞存活率最高，和其它方法相比差异非常显著，其中方法3细胞存活率最高，为84.8%。另外从细胞复苏培养后48 h贴壁率情况来看，方法3和方法4细胞的贴壁率最好，分别为85.4%和83.8%，与任芳丽等的用其它的冷冻保存方法所得到的最佳结果基本一致[9]。配对试验检验分析结果显示：方法3和方法1、方法2、方法5效果差异极其显著($P<0.01$)，方法3和方法4：效果差异不明显($P>0.05$)，但方法3在冷冻保存操作上较方法4简便。

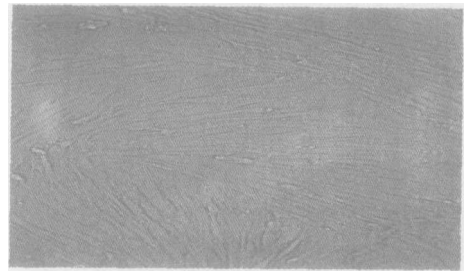

图2 纯化后传代培养的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞(×200)

Fig. 2 Subculture of pure Shaneng milk goat skin fibroblasts

表1 不同冷冻保存方法解冻复苏后细胞存活率的比较

Table 1 Survival rate comparison of cells with different cryop reservation methods after defrosting and revival

检测项目 Tested items	方法1 Method 1	方法2 Method 2	方法3 Method 3	方法4 Method 4	方法5 Method 5
冻存后细胞总数 Total cell numbers	6.25×10^5	5.69×10^5	7.25×10^5	7.15×10^5	6.85×10^5
胎盘蓝染液着色细胞 Cell numbers stained by Trypan Blue	2.0×10^5	2.1×10^5	1.1×10^5	1.5×10^5	5.69×10^5
存活率/% Survival rate	68.0%	63.1%	84.8%	79.0%	17.4%

表2 不同冷冻保存方法细胞复苏培养48 h细胞贴壁率分析

Table 2 Analyses of cell adherence rates after cells were revived and cultured for 48 h with different cryopreservation methods

解冻 Defrost	方法1/% Method 1	方法2/% Method 2	方法3/% Method 3	方法4/% Method 4	方法5/% Method 5
1	25	20	86 85	15	
2	28	25	85	88	10
3	30	15	88	82	16
4	35	20	85	84	15
5	20	30	83	80	20
平均贴壁率 Average adherence rates of cells	27.6	22	85.4	83.8	15.2

2.3 莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的生长曲线

从方法3取1管冷冻保存的莎能奶山羊皮肤成纤维细胞，进行解冻和复苏，调整细胞接种浓度为4×10^4个/mL，接种1个24孔板，每孔培养液体积为0.4 mL，每天定时用Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1mmol/L EDTA、4Na)随机消化收集3孔成纤维细胞，血球法数板计数，取其平均数，连续计数8 d（表3），以培养天数为横坐标，细胞数为纵坐标绘制了莎能奶山羊皮肤成纤维细胞生长曲线图(图3)。生长曲线显示培养的细胞具有正常的分裂增殖特性，没有转化倾向，反映细胞冷冻保存方法正确，生长条件适合。由生长曲线图可以看出，莎能奶山羊皮肤成纤维细胞接种1～2 d为滞留期，之后为对数生长期，细胞培养第6～8 d为平台期。

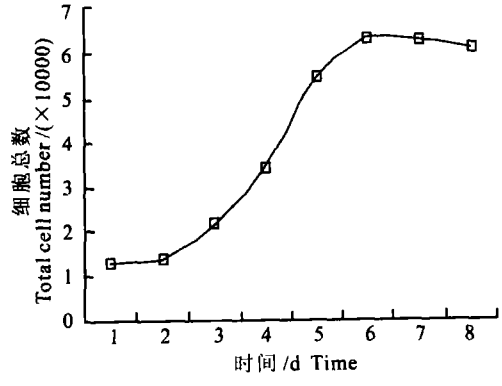

图3 莎能奶山羊皮肤成纤维细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of Shaneng milk goat skin fibroblasts

表 3　莎能奶山羊皮肤成纤维细胞总数

Table 3　Total cell numbers of Shaneng milk goat skin fibroblasts

时间 Time/d	1	2	3	4	5	6	7	8
细胞数 Cell numbers/($\times 10^4$)	1.29	1.38	2.16	3.42	5.45	6.34	6.31	6.11

3　讨论

山羊、绵羊和牛的成纤维细胞的纯化培养有不少成功的报道，有人以秦川牛皮肤成纤维细胞为材料，测试了 TCM199、DMEM、DMEM/F12 和 F12 基本培养液对成纤维细胞生长的影响，发现在低糖的 TCM199、DMEM、1∶1 的 DMEM/F12 培养液中成纤维细胞均能比较好生长[17]。山羊、绵羊和牛的成纤维细胞的培养一般有组织块培养法[6,9,17~19,21]和细胞悬液接种培养法两种[20~22]，两种培养方法均能得到良好的原代成纤维细胞培养物，一般来讲，组织块培养法操作简便，但在培养过程中组织块贴壁较为困难，生长形成单层细胞所需的时间相对较长；细胞悬液接种培养法，细胞较易贴壁，形成单层细胞所需的时间相对较短，但细胞悬液接种培养法操作相对复杂，最佳的消化时间和消化强度需要在实验中确定。根据以上经验，笔者在实验中采用 DMEM/F12 为基本培养液，先将莎能奶山羊皮肤组织用眼科剪剪成 1～3 mm^3 大小的组织块，然后在 38 C，用 Trypsin 消化组织块40 min，当充分的完全培养液终止消化后，便得到了在完全培养液中含有大量游离成纤维细胞和组织块的混合的培养接种物，该方法兼有上述两种种方法的特点，在实验中得到了满意的结果。

成纤维细胞的分离和纯化，从目前的成功的报道来看，都是利用成纤维细胞和上皮细胞对 EDTA-胰蛋白酶消化作用所具有的敏感性不同来达到成纤维细胞的分离和纯化培养的目地[6,9]，本实验也是利用同样方法，培养和建立了莎能奶山羊皮肤成纤维细胞系。笔者认为，当培养的成纤维细胞80%～90%汇合后，弃去旧的培养液，用生理盐水清洗，可除去残留的原培养液中的血清，增强 Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1 mmol/mL EDTA・4Na)作用能力。Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin，1 mmol/mL EDTA・4Na)的用量一般刚好使瓶底部细胞浸润为佳。当成纤维细胞收缩变圆时，迅速加入含血清的完全培养基终止消化，轻轻吹打，可使大部分成纤维细胞脱离瓶壁[8]。

同时实验中笔者也发现消化莎能奶山羊皮肤组织细胞时用 Trypsin-EDTA 消化和仅用 Trypsin 消化，细胞收缩　脱离瓶壁所需时间不同，EDTA-胰蛋白酶消化需 2～4 min 即可完成，而仅用胰蛋白酶消化则需5～8 min 左右。本实验选用EDTA-胰蛋白酶消化细胞，节约了实验的时间，同时又能使成纤维细胞和上皮细胞得到极好分离，使实验达到了完全分离和纯化培养成纤维细胞的目地。

哺乳动物细胞冷冻保存方法中，普遍采用 DMSO、甘油和乙二醇作为冷冻保护剂，选择冷冻保护剂及冷冻方法一般着重考虑是否有利于细胞在最短时间里脱水，减少细胞内大冰晶的形成[8,11~16]，国内不少研究已对不同的冷冻保护剂对细胞的冷冻保护效果进行了评价，总的认为 10%或 20%DMSO 作为冷冻保护剂添加 20%胎牛血清实验效果较好[6~7,9]。目前尽管国内对细胞超低温冷冻保存有较多的研究，对使用不同的冷冻保护剂和血清浓度的效果进行了比较分析，但是在的冷冻保护剂和血清相同的条件下，不同的不同预冷平衡方式和预冷时间对细胞的冻保护效果的评价还未见报道。因此选择细胞悬液：胎牛血清：DMSO＝7：2：1 的比例配制成细胞冷冻保存悬液，选用 5 种具有不同预冷平衡方式和预冷时间的方法进行冷冻保存冷实验，评价 5 种方法对莎能奶山羊皮肤成纤维细胞冷冻保护效果的影响，最终发现方法 3(70% 细胞悬液＋20%胎牛血清＋10%DMSO；先在4 C 预冷平衡0.5 h，接着液氮罐口气态氮悬挂 4 h，然后沉入液氮)为最佳冷冻保存方法。我们认为在冷冻保存程序上，先在－4 C进行 0.5 h 的预冷平衡，接着液氮罐口气态氮中悬挂 4 h，可以让细胞内的水分有足够的时间外渗，但又不完全脱干，减少形成大冰晶机率，降低了在冻存时大冰晶对细胞的损伤，保障了细胞在液氮中长期储存。

目前细胞长期冻存的方法，普遍仍然认为液氮保存是最为安全的方法，解冻时要遵循快融的原则，本实验选择38 C 的恒温水浴锅来解冻，时间一般控制在 3～5 min，让冻存管内细胞快速度过－5 C 的冰晶形成期，减少冰晶对细胞膜和细胞器的损害[8,14~16]，但由于解冻时人为的因素占的比

例很大，故有待于将这一操作程序化。

从实验的结果来看，在冷冻保护剂和血清浓度一样的条件下，使用不同的预冷温度和不同的预冷平衡时间对复苏后细胞活力的影响是非常大的，而把握细胞快速渡过冰晶形成期是冻存细胞的关键所在。另一个要注意的问题是以往的经典冻存方法遵循慢冻快融的原则[1]，但是却忽略了二甲基亚砜在常温下对细胞的毒性影响，本实验采取了将DMSO提前4℃预冷，降低二甲基亚砜对细胞的毒性损害，取得了较好的效果。

参考文献：

[1] Robl J M, Stice S L. Prospect for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation[J]. Theriogenology, 1989, 31(1):75～85.

[2] Marx J I. Cloning in sheep and cattle embryos [J]. Science, 1988,239:463～464.

[3] 王英丽，余 鸿，张 健，等. 不同种类细胞培养和冻存方法的改进[J]. 实用肿瘤学杂志，1998, 12(1): 12～13.

[4] 关伟军，马月辉，丁 鸿，等. 小尾寒羊耳组织成纤维细胞系的建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报，2005，36(5):511～516.

[5] 刘 亚，章孝荣，张运海，等. 牛、羊成纤维细胞的冷冻与冷藏保存[J]. 中国兽医学报，2004，24(2):197～198.

[6] 王新庄，张 琦，丁向彬，等. 蓝白花肉牛皮肤成纤维细胞分离培养及冷冻保存的研究[J]，动物技术通信，2004，9(1): 744～750.

[7] 王 超，李向臣，安志兴，等，山羊胎儿成纤维细胞的冷冻保存和体外培养[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2004，32(4):55～58.

[8] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，2001:9～35,78～111.

[9] 任芳丽，李 煜，张 涌. 牛成纤维细胞体外培养与冻存[J]. 黄牛杂志，2002,28(1):8～10.

[10] Willadsen S M. Nuclear transplantation is sheep embryos [J]. Nature, 1986,227:298～300.

[11] Prather R S, Barnes F L, Simes M I, *et al*. Nuclear transfer in the bovine embryo: session of donorun-cleian drecipientoocytes[J]. Biol Rprod, 1987,37:859～866.

[12] Stice S L, Robl J M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbt embryos[J]. BoilReprod, 1988, 39:657～664.

[13] Prather R S, Simes M M, First N L. Nuclear transplantation in early pig embryos[J]. Biol Reprod, 1989, 41:414～418.

[14] 薛庆善主编. 体外培养的原理与技术[M]. 北京：科学出版社，2001. 87～108.

[15] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州：华南理工大学出版社，2001. 78～122.

[16] 司图政强，吴正军. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版社，1996. 67～71.

[17] 昝林森，秦粉菊. 不同基本培养液对秦川牛皮肤成纤维细胞生长的影响[J]. 动物技术通信，2004，9(1):765～768.

[18] 郭继彤，安志兴，李 煜，等. 成年耳细胞克隆山羊(*Capra hircus*)[J]. 中国科学(C辑)，2002，32(1):77～83.

[19] 施巧婷，王旭光，王力虎，等. 不同类型的供体细胞及不同供体细胞处理方法对山羊体细胞核移植效率的影响[J]. 动物技术通信. 2004, 9(1):548～554.

[20] 杨素芳，石德顺，冯贵雪，等. 供体细胞培养处理方法对水牛核移植效果的影响[J]. 中国兽医学报，2004，24(6):612～616.

[21] 李桂芳，李 岩，赵宗胜，等. 绵羊耳成纤维细胞的体外培养[J]. 中国草食动物，2003，23(4):5～7.

[22] 徐小明，窦忠英，华进联，等. 牛胎儿成纤维细胞分离与体外培养[J]. 中国畜牧杂志 2004，40(10):18～21.