动 物 学 研 究 2006，Feb. 27 (1)：41－47　　CN 53－1040/Q　ISSN 0254－5853
Zoological Research

牛胎儿成纤维细胞的组织块贴附法分离培养与电穿孔法基因转染

杨东山*，杜晨光，高　飞，旭日干
（内蒙古大学 实验动物研究中心，哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室，内蒙古 呼和浩特　010021）

摘要：为获得转基因克隆牛的供体细胞，采用组织块贴附培养的方法分离培养牛胎儿皮肤成纤维细胞，经2～3次传代纯化，绘制生长曲线，分别分析体外传代培养10代以内和20代以上细胞的核型特征。分别采用800、900、1 000 V/cm和1、5、10、15和20 ms的参数组合，将线性化的带有新霉素抗性和绿色荧光蛋白双重筛选标记的人胰岛素原乳腺特异表达载体pNEI电穿孔转入体外培养的牛胎儿成纤维细胞，经800 μg/mL G418筛选2周，继续以300 μg/mL G418扩大培养2～3代，取部分筛选后的细胞进行PCR检测结果表明，体外培养的牛胎儿成纤维细胞生长旺盛，体外传代20次后核型未发生改变；转染后24～48 h在荧光镜下检测各组均可观察到绿色荧光表达，筛选后各组克隆形成数以900 V/cm和5 ms组最多；PCR检测得到了预期条带，说明目的基因已经成功导入。分离得到的牛胎儿耳成纤维细胞有可能作为体细胞核移植的供体，进行转基因克隆研究。

关键词：牛胎儿成纤维细胞；分离培养；电穿孔；转基因
中图分类号：Q813；Q959.842　**文献标识码**：A　**文章编号**：0254－5853（2006）01－0041－07

In Vitro Culture of Bovine Fetal Fibroblast Cells Using Tissue Explant Attachment and Gene Transfection Through Electroporation

YANG Dong-shan*, DU Chen-guang, GAO Fei, BOU Shorgan
(Research Center for Laboratory Animal Science Inner Mongolian University, The Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Hohhot, Inner Mongolia 010021, *China)*

Abstract: The low efficiency and high cost of pronuclear microinjection technology has been the main barrier for transgenic animal production. The production of somatic cell clones by using cultured cells derived from different tissues sheds new lights on transgenic technologies. In order to prepare the nuclear donor cells for bovine transgenic cloning, bovine fetal fibroblast (BFFb) cells were isolated by attaching tissue explants from ear skin of a bovine fetal at 3－4 months gestation stage. The cells grew to confluence 7 days after attachment and were cryopreserved after purification and amplification for 2－3 passages. The cell growth curve was plotted, and the karyotype of the cells within the 10th passages and exceed the 20th passages was analyzed. The plasmid *pNEI*, which contained the *Neo*^{r} gene, the *EGFP* gene regulated by CMV promoter for expression in a non-tissue specific mode and the human pro-insulin gene regulated by bovine α-lactalbamin promoter for expression specifically in mammary gland, were linearized by digestion with *Xho* Ⅰ and purified with phenol chloroform extraction. BFFb cells at passage 3 were harvested at 70% confluence and suspended in HeBES buffer to 5×10^6 cell/ml. Two hundred microliters of the cell suspension were electroporated with 4 μg linearized *pNEI* vector in a 2-mm Gap cuvette for 1, 5, 10, 15 and 20 ms at 800, 900, 1 000 V/cm, respectively. Cells were checked 24－48 hours after electroporation under fluorescence microscopy for GFP expression, and G418 selection (800 μg/mL) was applied since then. After 2 weeks, selected colonies were counted and maintained in culture medium containing 300 μg/mL G418 for 2－3 passages before cryopreservation. A small part of the cells were analyzed by PCR for gene integration. The

* 收稿日期：2005－08－02；接受日期：2005－11－21
基金项目：内蒙古自治区自然科学基金项目（200208020404）和内蒙古科技计划项目（20020106）资助
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail：crestyds@yahoo.com.cn
第一作者简介：杨东山，男，博士，主要从事哺乳动物生殖生物学与生物技术研究。

data showed that the isolated BFFb cells grew actively, and maintained diploid karyotype even after 20th passages. Bright green fluorescence can be detected from 24 to 48 hours after electroporation, and more colonies were selected at the electroporation condition of 900 V/cm, 5 ms. PCR detection demonstrated that the foreign gene was integrated into the genome. The results indicated that the isolated BFFb cells might be competent for transgenic cloning.

Key words: BFFb; Isolation and culture; Electroporation; Gene transfer

长期以来，显微注射法的高成本和低效率制约着转基因动物研究的发展，体细胞核移植技术的出现为转基因动物的制作提供了新的思路。转基因克隆方法将基因转染及筛选的步骤提前到了体外细胞培养阶段，大大提高了基因转染及筛选的灵活性。自从首例体细胞克隆羊多莉诞生以来，各国研究者利用多种体细胞成功的进行了核移植实验（Wakayama et al，1998；Cibelli et al，1998；Kato et al，1998；Wells et al，1999；Shiga et al，1999；Kasinathan et al，2001；Ohkoshi et al，2003）。对于制作转基因克隆动物来说，一方面对细胞供体的生产性状等生理指标并没有单纯制作克隆动物那样要求严格；另一方面基因转染及体外筛选过程对细胞在体外的传代次数及基因组的稳定性要求较高。因此，在利用体细胞克隆技术生产转基因动物的研究中，胎儿成纤维细胞由于其取材方便、生长快、体外传代次数相对较高、转基因效率高等特点，成为用于生产转基因克隆动物的首选体细胞系。近年来，由胎儿成纤维细胞提供核供体相继产生了转基因克隆绵羊（Schieke et al，1997）、山羊（Baquisi et al，1999）、牛（Cibelli et al，1998）以及基因定点修饰的绵羊（McCeath et al，2000）和猪（Lai et al，2002）。

目前，有关由胎儿成纤维细胞产生转基因克隆牛的报道比较少，且大多是只用一个药物筛选标记，即新霉素抗性基因用于筛选，尽管理论上采用筛选后的细胞进行核移植得到的转基因克隆动物后代100%都是转基因动物，但事实并非如此。许多研究（Bondioli et al，2001；Lai et al，2002；Echelard et al，2002）表明，利用该方法培育的克隆动物后代中转基因阳性率从0到100%都存在。实际上表达抗生素抗性基因的转基因细胞可以通过分泌基因产物到培养液中或通过细胞间的直接接触而保护其邻近的非转基因细胞。由于这种旁侧效应（bystander effect），许多经药物筛选得到的细胞克隆都是转基因和非转基因细胞的混合体。因此，用经过药物筛选得到的转基因细胞进行核移植得到的动物并不都是转基因动物。本研究在以人胰岛素基因为目的基因的载体构建中，同时加入新霉素抗性基因和绿色荧光蛋白基因两个筛选标记，使用这一载体转染胎儿成纤维细胞后，可以在药物筛选的基础上，进一步通过绿色荧光蛋白标记筛选出转基因细胞用作核移植供体细胞，同时绿色荧光蛋白标记还可以在囊胚阶段进行第3次筛选，进一步保证出生的后代为转基因动物。

本文通过组织块贴壁培养的方法分离培养牛胎儿成纤维细胞，并采用电穿孔方法将带有新霉素抗性基因和绿色荧光蛋白基因双筛选标记的人胰岛素乳腺特异表达载体转入体外培养的牛胎儿成纤维细胞，以获得用于转基因克隆牛制作的核供体转基因细胞，为高效率、低成本的制作转基因克隆牛奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 活体材料 3~5月龄雌性牛胎儿取自呼和浩特西郊屠宰场，要求妊娠母牛健康状况良好，将胎儿连同子宫放入37℃灭菌生理盐水中，2 h内带回实验室。

1.1.2 转基因载体pNEI （如图1）。

1.1.3 PCR引物 根据质粒pNEI的序列，分别设计上游引物和下游引物，使得PCR产物跨过EGFP基因与人胰岛素原乳腺特异表达载体的交界处。引物由上海生工生物工程有限公司合成，预期产物为1 180 bp。引物序列：P1 5′-GACCACTACCAGCAGAACAC-3′，P2 5′-CCAGGAAGAGGATGACAAGA-3′。

1.1.4 试剂耗材 *Xho* Ⅰ购自大连宝生物公司；无内毒素型质粒大量提取试剂盒（Endofree Plasmid Maxi Kit，QIAGEN）、普通型质粒大量提取试剂盒及细胞总DNA提取试剂盒均购自上海华舜生物工程公司；GENETICIN® Selective Antibiotic（G418 Sulfate）、DMEM/F12购自GIBCO；无机盐类及D-PBS－为日本和光试剂；胰蛋白酶为Sigma产品；标准胎

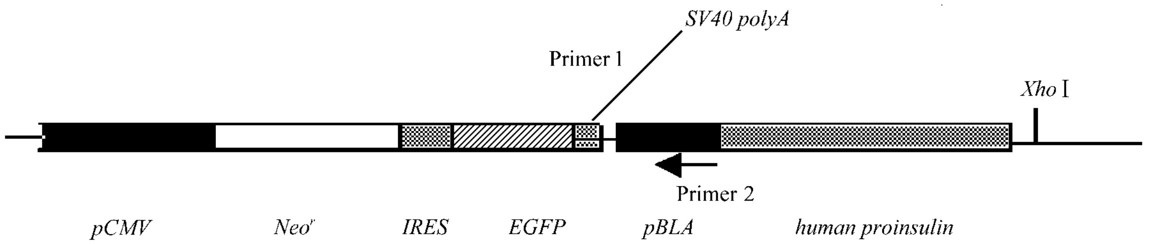

图 1　转基因载体 pNEI 结构示意图

Fig. 1　Map of the transgenic vector pNEI

牛血清为 TBD 产品，其余试剂为国产分析纯；细胞培养板、培养瓶为 Nunc 产品，其余玻璃器皿及耗材均为国产。

1.2　研究方法

1.2.1　**组织块贴附法分离和培养牛胎儿成纤维细胞**　将包有胎儿的子宫放入 37 ℃灭菌生理盐水中带回。用手术剪在 D-PBS 中剥除胎膜，将分离出的牛胎儿（体长约 10 cm）用 PBS 液洗两遍，用 70%的乙醇进行消毒，再用 PBS 洗两遍。将胎儿耳尖剪下放入三角瓶中剪碎，用含 10%血清的 DMEM 培养液洗两遍，转移到盛有培养液的 35 mm 培养皿中，将培养液吸干，放入培养箱中培养 5 h 让组织块贴壁。5 h 后加入培养液，在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养至第 7 天，观察细胞贴壁情况。去除组织块，0.05% Trpsin-EDTA（37 ℃，5 min）消化收集细胞，传代培养，大量扩增后冷冻保存。

1.2.2　**细胞冷冻**　用 0.05% Trpsin-EDTA，37 ℃处理 5 min 消化细胞，1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞，弃上清，加入适当体积培养液重悬细胞，每个冷冻管中放入约 1×10^5 细胞，加入冷冻液（DMEM + 10% DMSO + 20% FBS），冻存管置 4 ℃冰箱平衡 2 h，然后放入 −80 ℃冰箱，24 h 后投入液氮。

1.2.3　**细胞解冻复苏及培养**　从液氮罐中取出冻存管，投入 40 ℃的水浴中 1 ~ 2 min，使其完全溶解。用 5 ~ 8 mL 培养液，离心（1 000 r/min，5 min）洗涤两次，弃上清，加入培养液重悬细胞接种于六孔细胞培养板中，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养，生长至约 70%汇合后，传代扩大培养。

1.2.4　**牛胎儿成纤维细胞生长曲线的测定**　将牛胎儿成纤维细胞消化收集后，接种于 4 个六孔培养板中，每孔接种细胞 1×10^4，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养。每隔 3 天换液一次，每隔 24 h 消化收集 3 孔细胞，用血球计数板分别计数 3 个孔的细胞数，求平均值。连续计数 7 d，绘制生长曲线。

1.2.5　**牛胎儿成纤维细胞的核型分析**　采用空气干燥法制备中期相染色体，待细胞长至对数生长期时，用 0.1 μg/mL 秋水仙素的 DMEM 培养液培养 4 ~ 8 h，1 000 r/min，5 min 收集细胞。向细胞中逐滴加入 0.5 mL 预温（38 ℃）的 KCl（0.075 M），混匀并补加至 5 mL，37 ℃孵育 30 min，加入 1 mL 新配制固定液（甲醇∶冰醋酸 3∶1）预固定 3 min，低速离心（1 000 r/min）10 min，收集细胞。再缓缓加入固定液 5 ~ 8 mL，室温固定 20 min，低速离心 10 min，收集细胞，按此法固定 2 ~ 3 次。固定完毕，加适量固定剂调整细胞浓度，吸取细胞悬液于 30 cm 高度滴在 −20 ℃冰冻的载玻片上，用嘴吹散，空气自然干燥，Giemsa 染色 20 ~ 30 min，流水冲洗，自然干燥，油镜（×1 000）下观察拍照，分析核型。

1.2.6　**pNEI 载体的线性化及提纯**　采用去除内毒素的质粒提取试剂盒提取质粒 pNEI，在 pNEI 中只有一个 *Xho* Ⅰ 位点，质粒经 *Xho* Ⅰ 过夜酶切线性化，经电泳检测确定反应完全。经酚、氯仿抽提纯化或经质粒大量提取试剂盒纯化，最后用 TE 溶解，将终浓度调至 1 μg/μL。

1.2.7　**牛胎儿成纤维细胞的准备和电转**　将冷冻保存的牛胎儿成纤维细胞解冻后传代培养，至 70% ~ 80% 汇合。胰蛋白酶消化收集细胞，用 HeBS 液（140 mmol/L NaCl，5 mmol/L KCl，0.75 mmol/L Na_2HPO_4，6 mmol/L Glucose，25 mmol/L Hepes）重悬、计数，调整细胞密度至 5×10^6/mL，每次取 200 μL 加入电击杯，加入提纯的线性 pNEI DNA 4 μg，轻轻敲击杯底混合，置于电击槽中，设置相应的参数组合进行电击，电击后室温静置 2 min，然后将其加入到含 2 mL 培养液的六孔细胞培养板中，置 CO_2 培养箱培养。

1.2.8 **转基因牛胎儿成纤维细胞的筛选和纯化** 转染的细胞在培养 48 h 后，加入含有 800 μg/mL G418 的全培养液进行筛选，每两天更换一次培养液，两个星期后，观察每孔中细胞克隆的形成数及荧光表达。将筛选出的细胞传代，G418 的浓度降到 300 μg/mL 继续培养扩增，冷冻保存备用。

1.2.9 **转基因牛胎儿成纤维细胞的 PCR 检测** 取部分筛选出的细胞,根据组织细胞 DNA 提取试剂盒说明提取细胞 DNA。取 1 μL DNA 进行 PCR 反应，扩增条件为 :94 ℃预变性 3 min 后 ;95 ℃1 min,56 ℃1 min,72 ℃40 s,30 个循环 ;最后 72 ℃延伸 10 min。产物用 0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

2 结 果

2.1 牛胎儿成纤维细胞组织块贴附法分离培养结果

接种第 2 天，组织块边缘开始游离出单细胞，大多数为上皮样细胞及一些颗粒物质，只有少部分已开始游离出个别成纤维细胞；第 3 天组织块周围仍有大量上皮样细胞，但大部分组织已游离出成纤维细胞；第 4 天上皮样细胞比例减少，成纤维细胞已占多数，成梭状延伸；第 6 天成纤维细胞生长旺盛，已基本铺满瓶底，但组织块间仍有间隙；第 7 天后组织块间隙消失，细胞汇合连生，密密的铺满瓶底。体外传代培养 20 代以上（40 d 以上），细胞生长缓慢，成片状铺于皿底，很难长至密集汇合（图 2）。

2.2 传代细胞生长曲线

通过绘制的生长曲线（图 3）可知，牛胎儿成纤维细胞体外培养时，零到第 1 天为生长潜伏期，第2天开始进入对数生长期，第6到第7天进入平台期，指数期倍增时间约为 12 h。

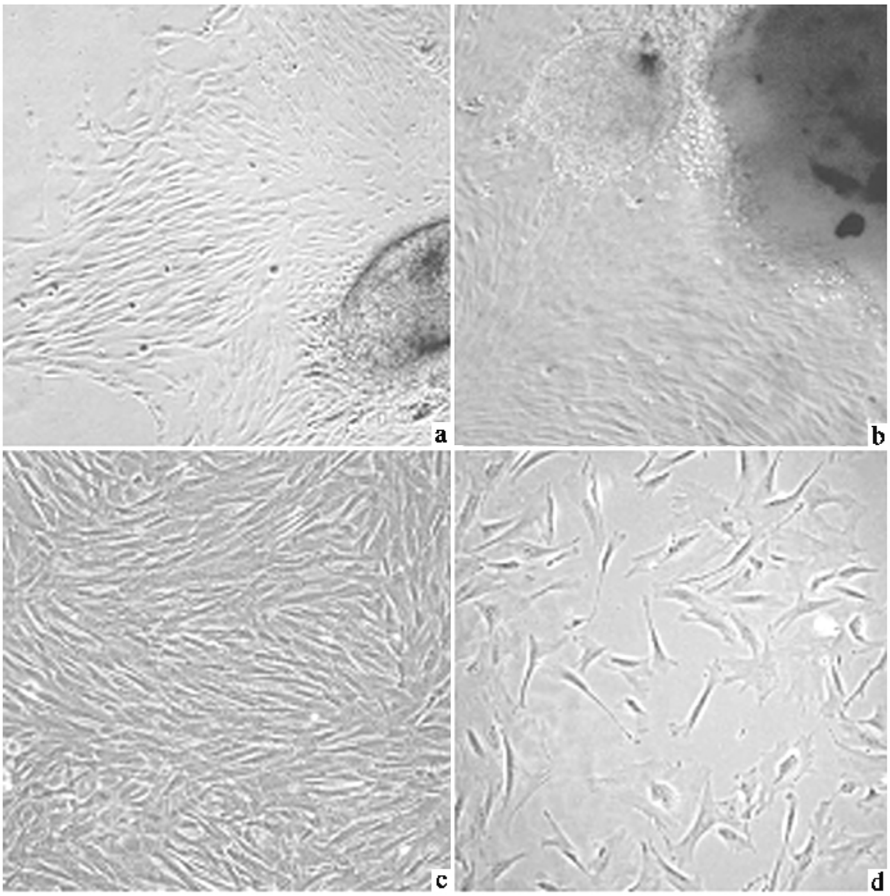

图 2 组织块贴附法分离培养的牛胎儿成纤维细胞

Fig. 2 BFFB cells cultured *in vitro*

a：培养第 4 天，(×100)；b：培养第 7 天（×200)；c：分离纯化的细胞（×200)；d：培养 40 天（20 代）以上（×200)。

a：Tissue explant cultured for 4 days，×100；b：Tissue explant cultured for 7 days，×200；c：Purified BFFFB cells，×200；d：s subcultured for more than 20 passages，×200.

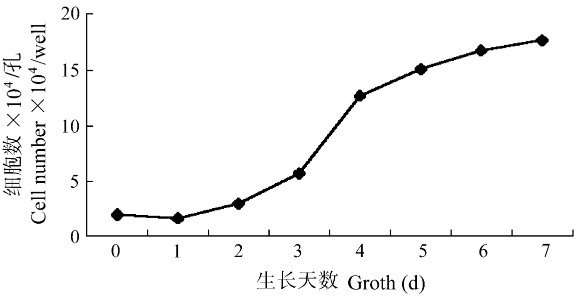

图 3　组织块贴附法培养的牛胎儿成纤维细胞生长曲线

Fig. 3　Growth curve of bovine fetal fibroblast cells cultured *in vitro*

2.3　牛胎儿成纤维细胞核型分析

对体外培养 10 代以内和 20 代以上细胞中期相进行染色体分析，核型均正常，为 2n = 60，XX，与所取雌性牛胎儿相吻合（图 4）。

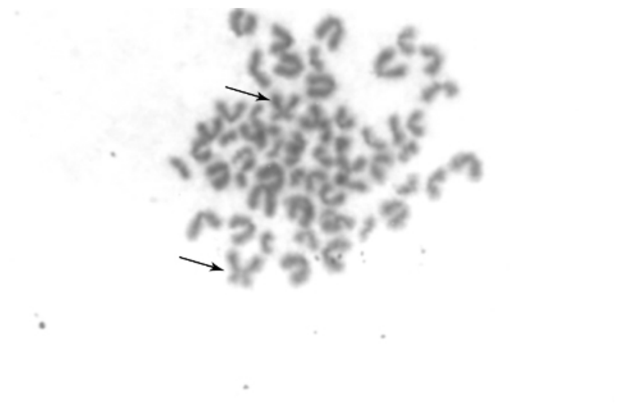

图 4　牛胎儿成纤维细胞的中期染色体(油镜，×1 000，箭头示 X 染色体，核型为 2n = 60，XX)

Fig. 4　Metaphase chromosomes of bovine fetal fibroblast cells cultured *in vitro*（black arrows show the X chromosomes，2n = 60，XX. oil，×1 000）

2.4　牛胎儿成纤维细胞电转条件的优化

分别采用 800、900、1 000 V/cm 和 1、5、10、15、20 ms 的参数组合电击转染体外培养的牛胎儿成纤维细胞，转染后在六孔板中培养，48 h 后加入 800 μg/mL G418 筛选，两星期后计每孔中细胞克隆形成数，结果 900 V/cm 和 5 ms 为最佳条件参数组合（图 5）。

2.5　转基因牛胎儿成纤维细胞的检测和 PCR 鉴定

转染后经 G418 筛选两周，收集细胞传代扩大后取部分细胞提取基因组 DNA 进行 PCR 检测，得到了预期的条带（图 6）。荧光镜观察细胞可见强绿色荧光表达（图 7）。

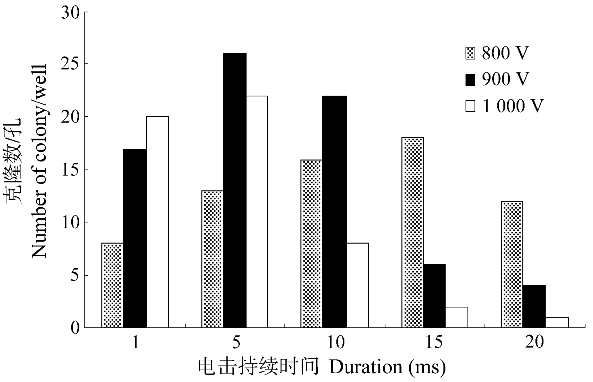

图 5　不同电击参数组合对筛选后克隆形成数的影响

Fig. 5　Effect of electroporation parameters on the cell colony formation after G418 selection

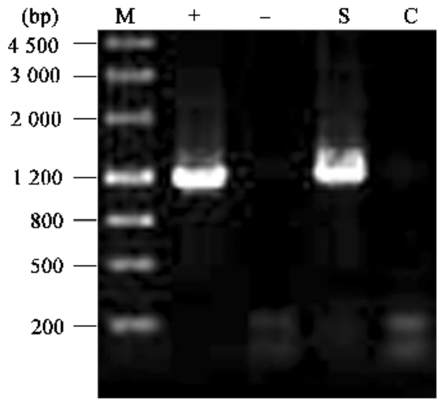

图 6　转基因牛胎儿成纤维细胞的 PCR 鉴定

Fig. 6　Identification of specific gene in the transfected bovine fetal fibroblast cells by PCR

M：DNA 分子量标准（DNA molecular weight marker）；+：阳性对照质粒 pNEI［Positive control（Plasmid pNEI as template）］；-：空白对照［Zero control（no template）］；S：转基因细胞 DNA 为模板［Sample（Transgenic cell DNA as template）］；C：未转基因细胞 DNA 为模板［Negative control（Non transgenic cell DNA as template）］。

3　讨　论

目前用于成纤维细胞分离培养的方法有两种：消化法和组织块贴附法。消化法一般是将组织块用胰蛋白酶消化处理，分离出单细胞进行培养。由于酶的消化作用与温度、组织块大小、酶浓度等因素有关，消化时间过长或酶浓度过大都会使细胞受损而影响生长，而消化时间过短或酶浓度过低则达不到分散细胞的目的，而且用此法获得的细胞参差不齐，有些样品消化后细胞很少，以至不能很好地传代。相对而言，组织块贴附法简便易行，得到的细胞均质性好，便于选择，而且可以避免酶消化对细胞造成的损伤。

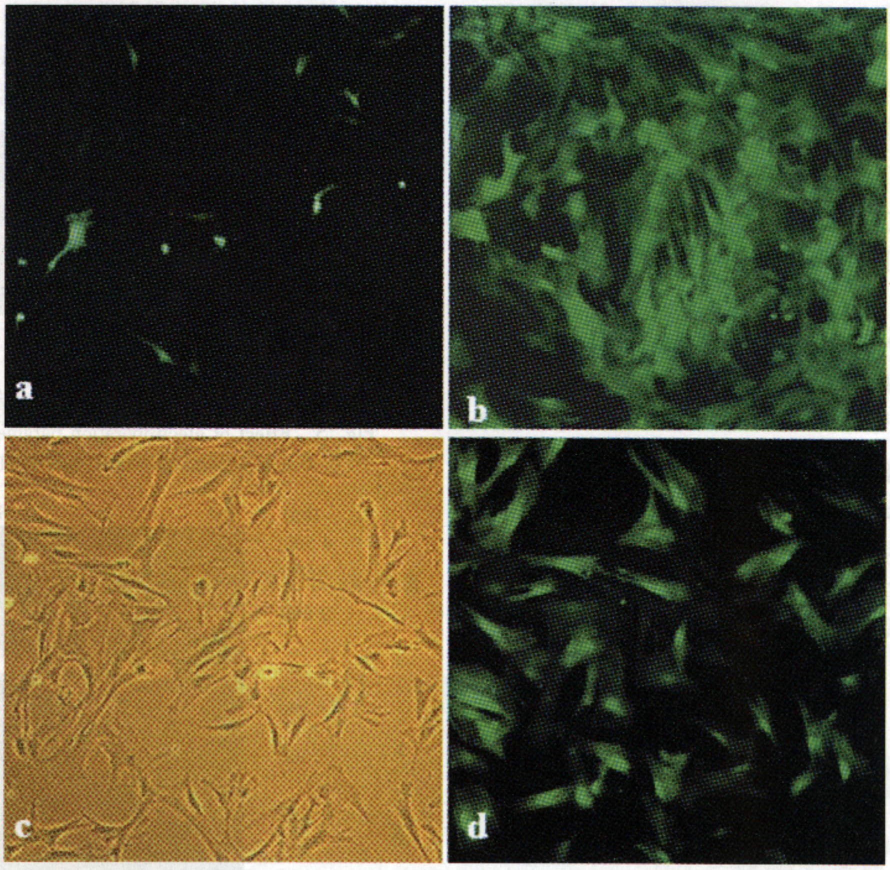

图 7 转基因牛胎儿成纤维细胞中绿色荧光蛋白的表达

Fig. 7 Transgenic bovine fetal fibroblast cells expressing EGFP

a：电击转染后培养 48 h（暗视野，荧光镜 × 200）；b：筛选 2 周后（暗视野，荧光镜 × 200）；c：冷冻解冻后的转基因牛胎儿成纤维细胞（相差 × 200）；d：冷冻解冻后的转基因牛胎儿成纤维细胞（暗视野，荧光镜 × 200）。

a：BFFBs 48 hours after electroporation（fluorescent microscope × 200）；b：Transgenic BFFBs after 2 weeks selection（fluorescent microscope，× 200）；c：Transgenic BFFBs after freezing and thawing（contrast microscope，× 200）；d：Transgenic BFFBs after freezing and thawing（fluorescent microscope，× 200）.

牛胎儿成纤维细胞在体外培养时呈贴附型生长，原代细胞主要由形状不等的梭状细胞组成，细胞足伸展较短，绝大多数是成纤维细胞，但其中也含有极少量其他类型的细胞（如上皮细胞等），这些细胞容易区分，并且随着细胞在体外传代次数的增加而逐步被淘汰。根据成纤维细胞对消化液比上皮细胞更敏感的特性，通过控制适宜的消化时间可以使成纤维细胞脱壁，而上皮细胞仍保持贴壁，经过 3 ~ 5 次传代纯化后，就可以得到比较纯的成纤维细胞。

成纤维细胞在体外培养存活时间取决于动物种类，长期反复传代，细胞可逐渐失去二倍体性，进入衰退期（SiTu & Wu，1997）。对于体细胞转基因克隆来说，从细胞转染到获得阳性克隆至少需要 15 ~ 20 d（相当于 8 ~ 10 代），再加上原代细胞培养及纯化，到转基因细胞核移植时，细胞在体外培养至少已经历了 13 ~ 15 代，远比大多数体细胞核移植所用的供体细胞在体外的传代次数多。本研究对不同传代次数的牛胎儿成纤维细胞核型分析表明，牛胎儿成纤维细胞体外培养 10 代以内和 20 代以上均可保持二倍体核型，这说明牛胎儿成纤维细胞可以作为转基因克隆的核供体细胞来源。

电穿孔技术在 20 世纪 80 年代初期开始用于将 DNA 导入多种动物细胞，理论上电穿孔法可以转染各种细胞。Baum et al（1994）用电穿孔法对 19 株细胞进行了转染，结果所有细胞都得到了转染。较之传统的磷酸钙和脂质体转染，电穿孔法具有使用方便、操作简便、转染效率高等诸多优点，特别是对那些其他方法难以奏效的细胞具有明显优势。采用电穿孔的方法，DNA 浓度对转化率的影响不像

化学转化方法那样明显，一般来说，DNA 浓度在 1 ~ 40 μg/mL 的范围内都可以获得较好的转染效率。此外电穿孔法最重要的优点，是该方法得到的转基因细胞中外源基因通常以单拷贝形式整合（Boggs et al，1986），这对于转基因动物外源基因的高效表达非常重要。

尽管经过基因转染后 Neo^r 基因的表达可以使细胞耐受 G418 的毒性，但是，G418 的长期作用仍然可能对细胞造成不利影响。Ogura et al（2000）和 Zakhartchenko et al（2001）报道，非转基因细胞比经过药物筛选得到的转基因细胞克隆的效率高。这种差别很可能就是由于基因转染和药物筛选的过程引起的。但是由于这些研究是以体外筛选后分离出的单克隆细胞为研究对象的，因此，这种差别也可能与细胞之间的个体差异有关。因为，转染后经 G418 筛选得到的不同的细胞克隆在用于核移植时发育潜能差别很大（Dai et al，2002）。转染后短期筛选即可得到足够数量的转基因细胞群，而要想得到单克隆细胞，需要延长体外培养及药物作用的时间使得单克隆细胞能够生长增殖到所需的数量。Chen SH et al（2002）认为，用转基因的细胞群进行转基因克隆可以避免将研究集中于少数几个发育潜能未知的细胞克隆而导致灾难性后果，而且短期筛选得到的转基因细胞群的细胞比转染后长期药物筛选得到的单克隆细胞更适合于核移植；他们还认为与使用单克隆细胞相比，这种策略可以增加后代中基因插入位点的可能性，从而有可能筛选出高表达的转基因系。因此，对于不以基因打靶为目的的转基因动物制作来说，采用短期药物筛选后得到的基因，随机整合的转基因细胞群比采用长期药物筛选后的单克隆细胞更有可能避免风险，提高成功率。但是短期筛选的细胞群中非转基因细胞的比率大大高于长期筛选得到的单克隆细胞，导致转基因克隆动物后代中非转基因动物比率难以预测。本研究在新霉素抗性基因的基础上加入第二个标记基因——绿色荧光蛋白基因，这样在经过 G418 短期筛选富集后，得到的转基因细胞群中虽然仍有较多的非转基因细胞，但是在进行核移植时我们只需再选择表达绿色荧光的细胞作核供体即可排除非转基因细胞用于核移植。因此，采用这一策略不需经体外长期筛选即可选出转基因细胞，避免了长期药物筛选对细胞的不良影响，也可避免使用单克隆细胞导致的风险。

参考文献：

Baquisi A，Behboodi E，Melican DT. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nat Biotechnol*, **17**：456－461.

Baum C，Folster P，Hegewisch-Becker S. 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines [J]. *Bio Techniques*,（6）：1058－1062.

Boggs SS，Gregg RG，Borenstein N，Smithies O. 1986. Efficient transformation and frequent single-site，single-copy insertion of DNA can be obtained in mouse erythroleukemia cells transformed by electroporation [J]. *Exp Hematol*, **14**：988－994.

Bondioli K，Ramsoondar J，Williams B，Costa C，Fodor W. 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar [J]. *Mol Reprod Dev*, **60**：189－195.

Chen SH，Vaught TD，Monahan JA，Boone J，Emslie E，Jobst PM，Lambornshley AE，Schnieke A，Robertson L，Colman A，Dai YF，Polejaeva IA，Ayares DL. 2002. Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. [J]. *Biol Reprod*, **67**：1488－1492.

Cibelli JB，Stice SL，Golueke PJ. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, **280**：1256－1258.

Dai Y，Vaught TD，Boone J. 2002. Targeted disruption of the alpha 1，3-galactosyl transferase gene in cloned pigs [J]. *Nat Biotechnol*, **20**（3）：251－255.

Echelard Y，Destrempes MM，Koster JA. 2002. Production of recombinant human serum albumin in the milk of transgenic cows [J]. *Therio*, **57**：779.

Lai L，Kolber-Simonds D，Park KW. 2002. Production of alpha-1，3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. *Science*, **295**：1089－1092.

McCeath KJ，Howcroft J，Campbell KHS. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells [J]. *Nature*, **405**：1066－1069.

Ogura A，Inoue K，Ogonuki N. 2000. Production of male cloned mice from fresh，cultured and cryopreserved immature sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, **62**：1579－1584.

Schieke AS，Kind AJ，Ritchie WA. 1997. Human factor Ⅸ transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [J]. *Science*, **278**：2130－2133.

SiTu ZQ，Wu JZ. 1997. Cell Culture [M]. Xi'an：World Publishing Corporation.［司徒镇强，吴军正. 1997. 细胞培养. 西安：世界图书出版社.］

Walker SK，Hartwich KM，Seamark RF. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation：Concepts and challenges [J]. *Therio*, **45**：111－120.

Zakhartchenko V，Mueller S，Alberio R. 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts [J]. *Mol Reprod Dev*, **60**：362－369.