

## 兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞系的建立

乔自林<sup>1,2</sup>, 冯玉萍<sup>1</sup>, 李明生<sup>1</sup>, 关伟军<sup>3</sup>, 冯若飞<sup>2</sup>, 王家敏<sup>2</sup>, 马忠仁<sup>1</sup>

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学/生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030; 3. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要:**通过物种体细胞培养和长期保存,可在细胞水平上保存珍贵的种质资源。采用组织块培养法培养耳缘组织原代细胞,并通过差速消化和差速贴壁法纯化成纤维细胞并用液氮保存,细胞复苏后进行了活力、形态、生长特性、微生物污染和染色体等检查。结果表明:保存了兰州大尾羊 27 个个体的耳缘细胞,保存的细胞平均复苏活力 97.6%,生长良好,形态呈成纤维型,生长曲线呈“S”型,最大增殖浓度  $3.01 \times 10^5$  个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,倍增时间为 26.1 h,细菌、真菌、病毒和支原体检查为阴性,染色体为  $2n=54$ ,二倍体占 88%。最终,成功培养并保存了兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞,使这一珍贵的种质资源在细胞水平上得以长期保存。

**关键词:**兰州大尾羊;耳缘成纤维细胞;细胞培养;冷冻保存

中图分类号:S826.89

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)10-0064-05

兰州大尾羊(Lanzhou fat-tailed sheep)属于中国绵羊品种中的长脂尾型,为我国 16 个著名地方绵羊品种之一,主要分布在甘肃省兰州市城关

区、安宁区、七里河区和西固区城市郊区,属城市郊区绵羊品种。近年来,兰州大尾羊的品种特征、特性混杂和退化,存栏数急剧减少,保种工作刻不容缓。兰州大尾羊存栏量从 1981 年的 1.2 万只,下降到 1986 年的 8 000 只<sup>[1-2]</sup>。1999 年,兰州大尾羊被国家列为濒临灭绝保护动物。2005 年马月辉<sup>[3]</sup>等研究表明该品种灭绝频率为 0.77,居我国北方地区 11 个绵羊品种之首,品种贡献率 10.52%,位居第三,保护潜力值 0.141 9,位居第一。2006 年 6 月,农业部依据《畜牧法》确定兰州

收稿日期:2012-07-12

基金项目:国家自然科技资源共享平台资助项目(2005DKA 21101-29);兰州市科技计划资助项目(2006-2-59)

第一作者简介:乔自林(1976-),男,甘肃省永靖县人,学士,高级实验师,从事动物细胞培养技术和动物细胞生物反应器的研究与教学工作。E-mail:qiaozilin@xbmu.edu.cn。

通讯作者:马忠仁(1962-),男,甘肃省临夏市人,博士,教授,从事动物医学工程研究。E-mail:670267497@qq.com。

## Study on Application of Paclobutrazol in Tissue Culture of Cassava

LI Ping<sup>1,2</sup>, LIU Lian-Jun<sup>3</sup>, PENG Jing-ru<sup>1,2</sup>, SHI Lan-rong<sup>1,2</sup>, LI Hui-min<sup>1,2</sup>, HUAN Qiu-wei<sup>1,2</sup>, HUAN Qiang<sup>1,2</sup>

(1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Research Institute for Subtropical Crops, Nanning, Guangxi 530001; 2. Guangxi Cassava Research Institute, Nanning, Guangxi 530001; 3. South Subtropical Agricultural Scientific Research Institute in Guangxi, Longzhou, Guangxi 532415)

**Abstract:** Taking the axillary of “GR911” cassava as explant, seedling of the sterile cultivation as materials, the effects on proliferation, rooting, healthy seedling and transplanting survival rate of tissue culture by different concentrations paclobutrazol (0, 1, 2, 3, 4, and 5 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) and 6-BA and NAA combination treatments were researched. The results showed that: proliferation coefficient was 3.24 of paclobutrazol 3 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> additional 6-BA 0.2 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, more than the contrast 2.18 times; The transplant survival rate for 87.64% when tissue culture seedling height reach to 5~6 cm and rooting more than six with paclobutrazol 4 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, could promote the breeding of seedling, and increase the survival rate of transplanting.

**Key words:** GR911 cassava; paclobutrazol; seedling cultivation; proliferation; transplanting

大尾羊为 138 个国家级畜禽遗传资源保护品种之一。目前主产区兰州大尾羊大约有 200 只左右,而真正的纯种已所剩无几,原种数量急剧下降<sup>[4]</sup>。常见的畜禽遗传资源保护方法有传统的原位保护和利用现代生物技术的异位保护 2 种,可繁殖细胞(如配子、胚胎等)和其它遗传材料(如体细胞)的冷冻保存是目前研究最多、比较容易掌握、经济上可行的一种异位保存方法。兰州大尾羊成纤维细胞库的建立,不仅使畜禽遗传资源在细胞水平永久保存下来,而且为从分子水平研究其种质特性提供宝贵材料。兰州大尾羊研究主要集中于细胞遗传学和生化遗传学方面,如染色体核型带型<sup>[5]</sup>、同工酶<sup>[6-8]</sup>、DNA 多态性研究<sup>[9-10]</sup>等。吴薇华等 1979~1980 年<sup>[11]</sup>、夏吉鹏等人 2005 年<sup>[2]</sup>、西北民族大学 2009 年<sup>[4]</sup>调查了兰州大尾羊遗传资源状况,系统阐述了其生存的生态环境条件、饲养管理方式、生物学特性、繁殖性能以及种群遗传特征等,提出了相应的保种方案和利用方式。主要是建立纯种群和扩繁群方式,通过本品种选育从个体水平上保护这一优良地方品种,实行原位保存,而异位保存尚无报道。无角道赛特绵羊、特克塞尔绵羊和萨福克绵羊 3 个绵羊品种成纤维细胞库的建立及生物学特性已有报道<sup>[13]</sup>,有关兰州大尾羊成纤维细胞库的建立还未见报道。该研究通过组织块培养法培养了耳缘组织原代细胞,并经差速消化和差速贴壁纯化技术建立了成纤维细胞库。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

兰州大尾羊耳缘组织采自甘肃省永登县明鑫良种肉羊繁育场和临洮华加牧业公司。选择精神状态良好的兰州大尾羊 30 只,公母各半,用刀片刮去耳尖被毛,碘伏、酒精依次消毒后剪下距耳尖 1 cm 的组织,放入含 500 U 抗生素的灭菌生理盐水中,标记性别后 4 h 内带回实验室。

所用仪器有 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo)、CK40-32PH 型倒置相差显微镜(Olympus)、IX71 型荧光倒置相差显微镜(Olympus)、液氮罐(乐山东亚)等。所用试剂有 DMEM、胰蛋白酶(Gibco)、胎牛血清(兰州民海生产,添加比例为 10%)、DMSO(Thermo Fisher Scientific)、THIO 与 TSB(DIFCO)、Hoechst33258(Sigma)、鸡和豚鼠红细胞悬液(自制)、支原体琼脂肉汤培养基(自制)等。

### 1.2 方 法

1.2.1 原代培养 采用组织块培养法,将耳尖组织在无菌 PBS 中用眼科镊反复刮洗,并不断更换器皿和 PBS,剥去皮肤将软骨剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,每间隔 2 mm 均匀铺在细胞瓶的生长面,反转细胞瓶使生长面朝上加入培养液(含 10% 胎牛血清),放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,过夜后轻轻翻转细胞瓶,使组织块完全浸泡在培养液中,从培养的第 3 天起观察细胞的生长情况,培养液颜色变黄时换液。

1.2.2 传代培养 显微镜下观察有明显致密的细胞层时 1:2 比例进行传代培养,此后按 1:3 比例传代。传代时采用差速消化和差速贴壁法,纯化成纤维细胞<sup>[13-14]</sup>,扩大培养至 3~5 代冻存。

1.2.3 细胞冻存 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,再用冻存保护液(10% DMSO + 20% 胎牛血清 + 70% DMEM)将细胞密度调整至  $3.0 \times 10^6$  个·mL<sup>-1</sup>,分装到细胞冻存管中移到液氮中保存(-196℃)。

1.2.4 细胞鉴定 (1)细胞复苏。取液氮中保存的细胞,用止血钳轻轻夹住冻存管,放到 39℃ 水浴中搅动使其快速解冻,用培养液悬浮细胞后 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,再培养液重新悬浮计数后以  $2.0 \times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup> 接种培养。

(2)细胞活力检查。随机复苏 5 支不同个体的细胞,用台盼蓝染色检查细胞活力<sup>[15]</sup>,取平均值。

(3)细胞形态观察。在细胞培养过程中不定期观察记录细胞的形态状况,进行拍照记录。

(4)细胞生长曲线。细胞复苏培养待完全长成致密单层时,用胰蛋白酶消化细胞用培养液调整浓度至  $1.0 \times 10^4$  个·mL<sup>-1</sup>,以每孔 1 mL 接种到 24 孔培养板,置 37℃、5% CO<sub>2</sub>,每隔 24 h 取 3 孔细胞消化计数取平均值,以培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标绘制生长曲线并求得最大增殖浓度和倍增时间<sup>[16]</sup>。

(5)微生物污染检测。①细菌、真菌检测:试验所培养的细胞均在无抗生素的培养液中培养,培养过程中通过观察培养液的外观颜色以及借助显微镜观察培养液中是否有活动的颗粒物来判断污染情况。冻存前取每个个体的细胞培养液 2 mL 分别加到 THIO 和 TSB 培养基中各 1 mL,培养 14 d 观察培养基中是否有污染发生。②病毒检测:运用细胞培养法对复苏培养一代的细胞

检查非血吸附病毒和血吸附病毒。③支原体检测:对复苏后培养一代的细胞运用培养法及 DNA 荧光染色法检查支原体<sup>[17]</sup>。

1.2.5 染色体核型分析 利用文献所述方法<sup>[18-19]</sup>,统计 50 个铺展完好的中期相染色体数目。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学观察

兰州大尾羊耳缘组织块培养第 3 天可见部分

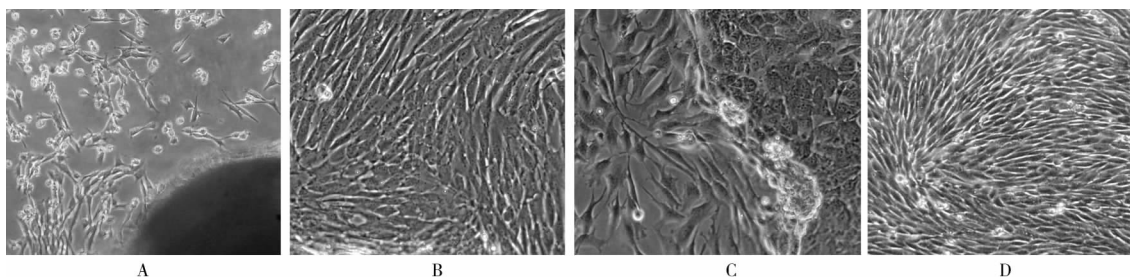


图 1 兰州大尾羊耳缘纤维细胞

Fig. 1 Fibroblast cell culture of marginal ear in Lanzhou fat-tailed sheep

A. 原代第 3 天 (40×); B. 原代第 7 天 (100×); C. 成纤维细胞和上皮样细胞混合生长 (100×); D.  $F_5$  成纤维细胞 72 h (40×)

A. Primary, 3 d (40×); B. Primary, 7 d (100×); C. The mixed fibroblast and epithelial cell (100×); D.  $F_5$  fibroblast cultured for 72 h (40×)

### 2.3 生长曲线

兰州大尾羊耳缘细胞生长曲线呈“S”型(见图 2),最大增殖浓度为  $3.01 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,细胞倍增时间为 26.1 h。

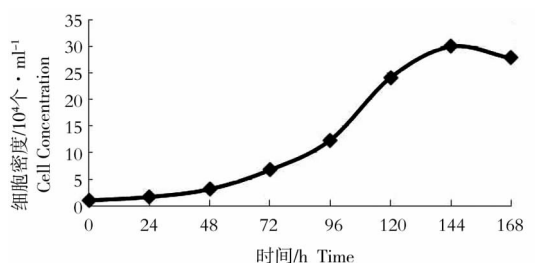


图 2 兰州大尾羊耳缘成纤维细胞( $F_5$ )生长曲线

Fig. 2 The growth curve of  $F_5$  fibroblast cells derived from marginal ear in Lanzhou fat-tailed sheep

### 2.4 微生物污染检测

2.4.1 细菌、真菌检测 培养的原代细胞用显微镜观察发现,其中有 3 个个体的细胞被细菌污染或存在活动颗粒物而弃之(见图 3),其余培养基检查结果均为阴性。

2.4.2 病毒检测 在细胞培养过程中,显微镜下没有出现细胞的病变,利用指示细胞(Vero 和牛肾原代细)接种培养的,也未出现细胞病变现象;

组织块附近有少量细胞长出,7 d 时有明显致密的单层细胞,细胞以长梭形成纤维样细胞为主,也可见有扁平的上皮样细胞群,纯化培养至五代时镜下均为长梭形细胞,且 72 h 可长成致密单层(见图 1)。

### 2.2 复苏活率

冻存的兰州大尾羊耳缘细胞复苏活率最低为 93.2%,最高为 100%,平均为 97.6%。

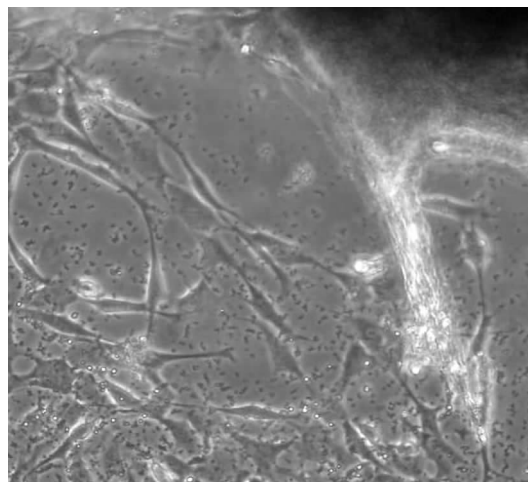


图 3 耳缘原代细胞中活动的颗粒物

Fig. 3 The active particles in the primary culture derived from marginal ear in Lanzhou fat-tailed sheep

红细胞吸附试验为阴性。

2.4.3 支原体检测 接种到肉汤培养液,培养 14 d 没有出现任何菌落,利用 Hoechst33258 对细胞进行染色,只有细胞核出现蓝色荧光,其它部位看不到荧光(见图 4),表明保存的细胞没有被支原体污染。

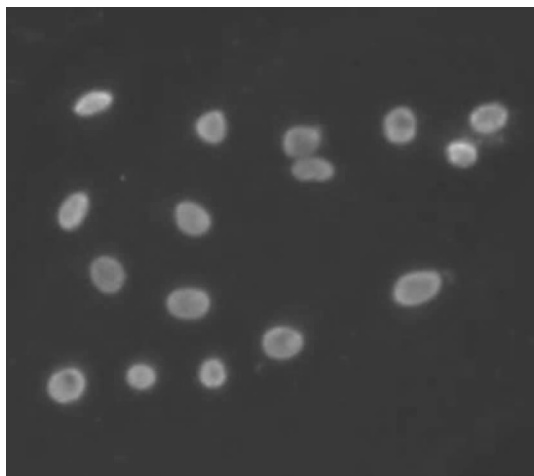


图4 兰州大尾羊耳缘细胞 DNA 荧光染色图  
Fig. 4 Nucleus of fibroblast stained by Hoechst 33258 in Lanzhou fat-tailed sheep ear cells



图5 兰州大尾羊耳缘成纤维细胞染色体核型(A♂, B♀)  
Fig. 5 Karyotype analysis of metaphase chromosomes of fibroblast derived from marginal ear in Lanzhou fat-tailed sheep(A♂, B♀)

耳缘组织成纤维细胞具有较强的分裂增殖能力,容易培养且操作方法简单,采样期间的污染控制是培养成败的关键,培养的细胞一旦发生污染只能被淘汰。耳尖皮肤覆有被毛,毛梢和毛根部位通常寄居大量微生物,要用新刀片将被毛彻底刮净(不能将表皮刮破),再用碘伏、酒精消毒,剪下的组织保存在 500 U 抗生素中的灭菌生理盐水中 4 h 内带回实验室时 90% 的样本能做到无菌控制,超过 6 h 样本细胞生长不理想。样本保存在 200 U 抗生素中只有 40% 做到无菌,保存在 1 000 U 抗生素中不会有污染发生,但细胞不能正常生长。

## 2.5 染色体核型分析

兰州大尾羊耳缘细胞( $F_5$ )的染色体数为  $2n=54$ ,二倍体率为 88%,占主体。染色体核型见图 5。

## 3 结论与讨论

畜禽种质资源是以物种为单元的遗传多样性资源,是关系到畜牧业可持续发展和生物多样性以及人类社会可持续发展的重要物质基础,也是生态系统的有机组成。动物的成纤维细胞经过传代培养或克隆培养,遗传特性与其来源的成纤维细胞保存高度一致性<sup>[20]</sup>,构建畜禽种质资源成纤维细胞库,可实现对遗传资源的永久保存。兰州大尾羊是我国特有的绵羊优良地方品种,但已濒临灭绝,开展保护工作已刻不容缓,通过培养保存其耳缘细胞,使其遗传资源得以永久保存,一旦灭绝,利用克隆技术可使其在地球上重现。

用组织块法保存了兰州大尾羊 27 个个体的耳缘细胞,保存的细胞平均复苏活力 97.6%,生长良好,形态呈成纤维型,生长曲线呈“S”型,最大增殖浓度  $3.01 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,倍增时间为 26.1 h,细菌、真菌、病毒和支原体检查为阴性,染色体为  $2n=54$ ,二倍体占 88%。

## 参考文献:

- [1] 《中国羊品种志》编写组. 中国羊品种志[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989:54-55.
- [2] 夏吉鹏,张永升,孟圣杰,等. 濒危物种兰州大尾羊调研分析[EB/OL]. 2006-05-05. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn>.
- [3] 马月辉. 边际多样性方法及其在绵羊品种中的应用[J]. 生

- 物多样性,2005,13(1):70-74.
- [4] 徐红伟,臧荣鑫,杨具田,等.兰州大尾羊遗传资源保存与开发利用[J].中国畜牧兽医,2009,36(8):88-90.
- [5] 门正明,刘霞,马海明,等.兰州大尾羊染色体分析[J].甘肃农业大学学报,2002,37(2):156-160.
- [6] 马海明,门正明,韩建林.兰州大尾羊血清淀粉酶酯酶及苹果酸脱氢酶同工酶的研究[J].甘肃农业大学学报,2002,37(4):442-446.
- [7] 马海明,门正明,黄生强,等.兰州大尾羊血液蛋白多肽性研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2004,30(4):351-354.
- [8] 臧荣鑫,杨具田,徐红伟,等.兰州大尾羊血液蛋白(酶)多态性的研究[J].中兽医医药杂志,2010(2):21-23.
- [9] 朗侠,吕潇潇.兰州大尾羊微卫星 DNA 多态性研究[J].中国畜牧杂志,2011,47(1):14-17.
- [10] 李栋元,李景云,杨具田,等.兰州大尾羊 mtDNA D-loop 和 Cytb 区序列分析与多态性研究[J].中兽医医药杂志,2011(5):14-17.
- [11] 丁绍殿,吴筱华,李性明.兰州大尾羊调查报告[J].中国畜牧杂志,1986(1):20-21.
- [12] 周雪雁.7个羊品种成纤维细胞库的构建及其生物学特性研究[D].太谷:山西农业大学,2005:36-51.
- [13] 沈翠英,肖忠明.原代培养的二倍体上皮细胞和成纤维细胞的纯化[J].细胞生物学杂志,1989,11(4):173-174.
- [14] 刘永清,孙浩.鸡胚成纤维细胞原代培养与纯化的初探[J].猪与禽,2008,28(1):72-74.
- [15] 李玲,李雪峰.细胞生物学实验[M].长沙:湖南科学技术出版社,2003:17-19.
- [16] 严泉剑,郭金龙,刘恩靖,等.绘制细胞生长曲线及细胞群体倍增时间的简化计算[J].前卫医药杂志,2000,17(4):228-229.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010年版三部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:89-113.
- [18] Yunis J J. Human chromosome methodology[M]. New York:Academic Press,1974:59-61.
- [19] Franklin Eldridge,Blazak William F. Horse, ass and mule chromosomes[J]. Journal of Heredity,1976,67:361-367.
- [20] 李天达,刘丑生,王志刚,等.马头山羊成纤维细胞系的建立与生物学特性分析[J].生物工程学报,2008,24(12):2056-2060.

## Establishment of Lanzhou Fat-tailed Sheep Marginal Ear Fibroblast

QIAO Zi-lin<sup>1,2</sup>, FENG Yu-ping<sup>1</sup>, LI Ming-sheng<sup>1</sup>, GUAN Wei-jun<sup>3</sup>, FENG Ruo-fei<sup>2</sup>,  
WANG Jia-min<sup>2</sup>, MA Zhong-ren<sup>1</sup>

(1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou, Gansu 730030; 2. Northwest University for Nationalities/Key Laboratory of Bioengineering and Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, Lanzhou, Gansu 730030; 3. Animal Science Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

**Abstract:** It can preserve rare resources at cell level through culturing and preserving cells of the species. The marginal ear primary cells were cultured by tissue pieces method. And the primary cells were purified and preserved with liquid nitrogen. Observations on dynamic growth, morphology, growth characteristic, microbial contamination and analysis of karyotype were carried out. The results showed that the cells from 27 sheep were preserved. The ear cells were fibroblast and grew well; the vitality was 97.6%; the growth curve showed 'S' type; the maximum proliferation concentration was  $3.01 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; the population doubling time(PDT) was 26.1 h; the tests for bacteria, fungi, virus and mycoplasma were all negative; and the chromosomes were 54 and diploid cells were dominant for 88%. These showed that the cell line was established successfully, which making the important genetic resource preserved in cell level for long term.

**Key words:** Lanzhou fat-tailed sheep; marginal ear fibroblast; culture; frozen preservation

(该文作者还有令世鑫,单位为西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室)