藏獒皮肤成纤维细胞培养与生物学特性观察

石凡[1,2],杨永梅[3],于鸿浩[2,4],郭志林[1,2],郭松长[2],赵新全[2]

(1. 青海民族大学化学与生命科学学院,青海西宁 810007;
2. 中国科学院西北高原生物研究所,高原生物适应与进化重点实验室,青海西宁 810008;
3. 青海民族大学公共管理学院,青海西宁 810007;4. 榆林学院生命科学研究中心,陕西榆林 719000)

摘要:为了研究藏獒体细胞生物学特性和保存藏獒遗传资源,采用组织块法建立了 2 株藏獒成纤维细胞系,对体外培养的细胞形态、增殖能力和部分生物学特性进行了分析。结果表明,体外培养的藏獒细胞呈现典型的成纤维细胞形态,生长良好,增殖能力强,测定的细胞群体倍增时间为 46.1 h;经免疫荧光染色,细胞表达波形蛋白;F5 代细胞正常二倍体核型率为 91.4%,藏獒核型 2n=78,X 染色体为亚中着丝粒染色体,Y 染色体为端着丝粒染色体。本研究所建立的藏獒体细胞系为开展藏獒体细胞核移植研究提供了材料。

关键词:藏獒;细胞培养;成纤维细胞;免疫荧光染色

中图分类号:S823.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1671-7236(2014)03-0156-06

藏獒(Tibetan Mastiff)属食肉目(Carnivora)犬科(Canidae),是原产于青藏高原地区的古老犬种,也是中国唯一的一个大型犬种,属于国家二级保护动物。由于近几十年来藏獒被大量贩运到内地省份,甚至国外,加上当地生存环境恶化,青海、西藏等原产地优良藏獒数量剧减,正面临着种群资源流失的危险(郭宪等,2008)。国内约 20 年前才开始了对藏獒的认识与研究,主要研究集中在藏獒疾病防治、饲养管理、繁殖培育、品种鉴别等方面,少量研究涉及藏獒血液生理生化特征(李动等,2000)、种群遗传多样性(Li 等,2008)、选配选育(崔泰保等,2009)、精液保存(郑筱峰等,2010)等方面,而细胞、分子方面的研究较少。国外有研究报道应用动物体细胞克隆技术生产克隆狗获得成功(Jang 等,2008),国内尚未开展此项研究的报道。体细胞克隆技术已成为保护珍稀动物资源的新方法。目前在国内已建立了

收稿日期:2013-09-22

作者简介:石凡(1963—),女,辽宁人,学士,副教授,研究方向:细胞工程。

通信作者:郭志林,男,副教授,研究方向:动物胚胎工程。E-mail:gzl7511@hotmail.com

基金项目:中国科学院 2012 年"西部之光"人才培养计划项目"藏獒繁殖生物技术研究"(科发人教字[2012]179 号);财政部战略生物资源科技支撑专项"青藏高原羊模式动物及基地建设"(KSCXZ-YW-Z-0951)。

Study on Isolation, Identification and Enzyme-producing Conditions Optimized of Cellulolytic Bacteria in Ox Dung

GAO Yun-hang[1], ZHANG Xi-hong[1], WANG Wei[1], WANG Yan-qiu[2], MA Hong-xia[1], LOU Yu-jie[1]

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Sub-district Office of Changchun Jingyue National High-technology Industrial Development Zone, Changchun 130118, China)

Abstract: A strain of highly cellulolytic decomposing bacteria was obtained by the congo red flat plate straining and shake flasking method screened from the ox dung which named N12. It had been identified as *Bacillus* which belonged to *Bacillus pumilus* sp. by morphologic characteristics observation, physiology and biochemical experiment and also 16S rRNA genetic analyze. The conditions of producing cellulase on strain N12 were also been studied in this test. When the contents of carbon and nitrogen sources were 0.5% maizena and 1% yeast powder, and also the nitial pH was 3.0, the fermentation temperature was 42 ℃, at the same time the fermentation time was 54 h, it had the highest enzyme activity.

Key words: ox dung; cellulose decomposing bacteria; identification; conditions optimize

大熊猫(张明等,2006)、黑麂(方俊顺等,2007)、朱鹮(王金焕等,2012)等珍稀动物皮肤成纤维细胞系进行细胞生物学特性和遗传资源保护研究。本研究利用组织块法建立了 2 株藏獒皮肤成纤维细胞系,对其体外培养的培养条件、生长特性、冷冻复苏、波形蛋白表达、细胞核型进行了研究,为藏獒体细胞克隆研究提供了供体细胞。

1　材料与方法

1.1　试剂及仪器　PBS、DMEM、D/F-12、TCM199、胰蛋白酶和乙二胺四乙酸二钠混和溶液、胎牛血清、EGF、bFGF 均购自 Gibco 公司;二甲亚砜购自 Amerisco 公司;Giemsa 染料、台盼蓝染料均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

台式离心机购自 Eppendorf 公司;二氧化碳培养箱购自三洋公司;超净工作台购自东联哈尔公司;倒置荧光显微镜购自尼康公司。

1.2　皮肤组织的获取与处理　2 只 3 月龄藏獒(1 公 1 母)经耳部剪毛、清洗和消毒后,剪取皮肤组织约 0.5 cm^2,放入磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)溶液,4 ℃下 2 h 内运回实验室。用 PBS 溶液反复冲洗组织块 8～10 次,用手术刀片刮去组织表面毛根及部分表皮,用眼科剪刀去除软骨,将皮肤组织剪成约 1 mm^3 小碎块。组织块经 PBS 溶液反复洗涤 4 次,用细胞培养液(D/F-12 添加 20%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、40 μg/mL 表皮生长因子)离心洗涤 3 次,用 1 mL细胞培养液重新悬浮。

1.3　细胞培养　为了增加组织块贴壁能力,先用胎牛血清涂布 T25 细胞培养瓶(Corning)底部,然后用吸管将组织块转移至细胞培养瓶,用牙科探针将组织块摆放于瓶底部,每瓶 5～8 块。将培养瓶倒置放入 CO_2 培养箱培养 2～4 h 后,加入 3 mL 细胞培养液翻转培养瓶继续培养,每 3 d 更换 1 次细胞培养液,观察细胞生长情况。当细胞从组织块周围游离出来并向周围成片生长时进行传代,用 PBS 溶液洗涤 2 次,用牙科探针挑取组织块,加入 2 mL 0.25%胰蛋白酶和 0.04%乙二胺四乙酸二钠混和溶液于 37 ℃消化细胞 3 min,加入 2 mL 细胞培养液终止消化,于 1000 r/min 离心细胞,弃上清,用细胞培养液重新悬浮细胞,计数后以 5×10^4/mL 的密度接种于新培养瓶继续培养。经过5～7 d 生长后,细胞达到 85%～90%汇合,再次按1∶3或 1∶4 比例进行传代培养。

1.4　细胞冻存与复苏　生长中的细胞达到 85%～90%汇合时可以进行细胞冻存,经 PBS 洗涤,胰酶消化、离心后,在每一个 T25 培养瓶细胞沉淀物中加1 mL预冷至 4 ℃的细胞冻存液(D/F-12 添加 10%胎牛血清、10%二甲亚砜),移到细胞冻存管(Corning),放入细胞冻存盒(Nalgene)于 4 ℃平衡 0.5 h 后,转移到－80 ℃低温冰箱保存24 h后,将细胞冻存管投入液氮保存。复苏细胞时,将冻存管于 37 ℃水浴中快速摇动解冻细胞,移到 15 mL 离心管,加入 9 mL 细胞培养液混匀,离心沉淀细胞,加入 5 mL 细胞培养液重新悬浮细胞,移到 T25 细胞培养瓶培养,24 h 后换培养液去除漂浮的死亡细胞。

1.5　细胞生长曲线绘制　取 2 瓶生长至 85%汇合的 F4 代细胞用胰酶-EDTA 混合液消化,用细胞培养液将细胞稀释至 1×10^4/mL、3×10^4/mL 和 5×10^4/mL 3 种密度,分别加入 24 孔细胞培养板(NUNC)孔中,每孔 1 mL,第 1 列加 3 孔,共加 10 列。将培养板放入培养箱中,每 2 d 更换 1 次培养液。从第 1 列开始每天在固定时间取出培养板消化 3 个孔的细胞,稀释后用血球计数板进行细胞计数,取其平均值,以天数作为横坐标,以细胞数作为纵坐标,绘制细胞生长曲线。可用以下公式求得细胞群体倍增时间(population doubling time, PDT)。

$$PDT = t\times\frac{\lg 2}{\lg N_t - \lg N_0}$$

式中,t 代表培养时间;N_0 代表首次计数获得的细胞数;N_t 代表培养 t 时间后的细胞计数。

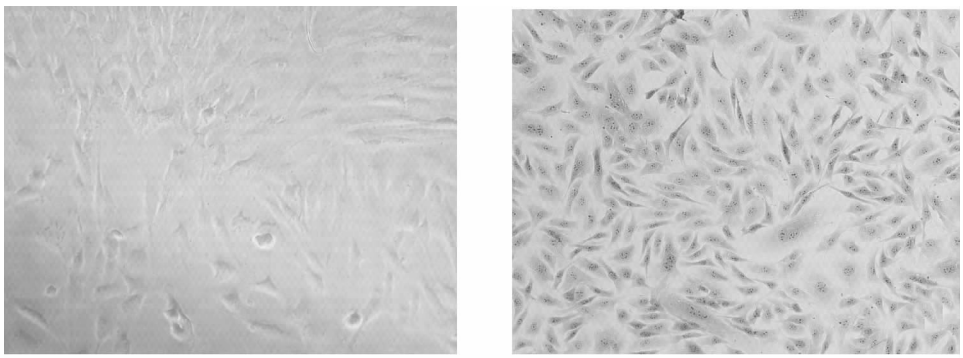
1.6　细胞波形蛋白免疫荧光分析　参考 Bonifacino 等(2007)方法,稍作修改。将细胞悬液按每孔 4 mL的量加入预先放置盖玻片(NUNC)的 6 孔板内,培养到细胞至 50%～70%汇合。吸出培养基,每孔加入含 2%甲醛的 PBS,室温孵育 10 min,吸出甲醛,PBS 洗涤 2 次。在盖玻片上,加 2 mL 含 10% FBS 的 PBS,放置 10～20 min。用含 0.2%～0.5% Triton-X100 和 10% FBS 的 PBS 稀释一抗(monoclonal anti-vimentin antibody produced in mouse, 1 mg/mL, Sigma-ALDRICH Inc.)于 1.5 mL 离心管中,稀释比例为 1∶1000。用高速离心机最大速度离心抗体稀释液和对照组溶液,从沉淀物中吸出抗体溶液。加一抗 25 μL,用镊子取出盖玻片,再将其置于 25 μL 的一抗溶液内,细胞面向下。室温于湿盒内孵育 1 h。取出盖玻片,细胞面朝上,加入含 10% FBS 的 PBS,放置 5 min 后吸出溶液,重复 2 次以上。用含 0.2%～0.5% Triton-X100 和 10%

FBS 的 PBS 溶液稀释二抗(fluorescein(FITC)-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG(H+L),9.0 mg/mL,Sigma-ALDRICH Inc.),稀释比例为 1∶100,混匀后离心除去沉淀。在盖玻片上加一滴二抗 25 μL,将盖玻片置于二抗溶液内,盖上培养皿盖,避光存放,室温孵育 1 h。取出盖玻片,细胞面朝上,放入培养板,加入含 10% FBS 的 PBS,放置 5 min,再吸出溶液;重复 2 次以上。滴加含 0.2% Triton-X100 和 10 μg/mL PI(prodipium iodide)的 PBS 孵育 2 min,用 PBS 洗涤 3 次。用抗荧光淬灭封片剂(fluoromount-GTM, Southern Biotech, Birmingham USA)封片后,在荧光显微镜下观察。FITC 用 492 nm 激发光,PI 用 535 nm 激发光。通过与对照组比较,确定非特异染色区域。

1.7 细胞核型分析 参考 Freshney 等(2008)方法,稍作修改。将 5 mL F5 代细胞悬液以 3×10^4/mL 密度接种在 T25 培养瓶中培养 3~5 d 后,加入秋水仙素使其终浓度为 0.3 μg/mL,作用 4 h。用胰酶消化细胞,离心后,加入 0.075 mol/L KCl 混悬细胞,37 ℃静置 13 min。加入冰冷的醋酸甲醇,混合后离心,弃上清,边振荡边加入醋酸甲醇,冰上静置 10 min。离心细胞,弃上清,加入 0.1~0.2 mL 醋酸甲醇,振荡混悬细胞。用吸管将细胞悬液从 30 cm处滴到凉的玻片上,倾斜玻片让液滴铺展开。火焰干燥玻片后,用相差显微镜观察,如细胞均匀铺展,制作更多的玻片。在玻片上加数滴纯 Giemsa 染液,染色 4 min,流水冲洗,干燥。在玻片上滴加 1 滴二甲苯,盖上盖玻片,在油镜下观察分散良好的染色体并拍照。用 Photoshop 软件剪切单个染色体,成对排列后,用尼康显微镜(Nikon Eclipse Ti)图像处理软件(NIS-Elements BR 3.00, SP1)进行染色体数据测量。

2 结果与分析

2.1 藏獒皮肤成纤维细胞体外培养生长情况及形态特征 用组织块法建立了 2 株藏獒皮肤成纤维细胞系,组织块经贴壁培养 5~7 d,周围可见梭形或铺路石样多边形细胞游出并向四周生长,随着培养时间延长至 12~15 d,组织块周围出现大片细胞生长区,大多数组织块周围的细胞生长区以梭形细胞为主,少量细胞生长区呈现梭形细胞和多边形细胞混合生长。组织块培养 14~16 d 时进行传代培养,传代后细胞生长迅速,呈现栅栏状或漩涡状生长,于 4~5 d 生长至 90%汇合(图 1),需再次进行传代培养。体外培养的藏獒皮肤成纤维细胞冻存和复苏后,经台盼兰染料排除试验测定,细胞存活率达 88.7%,可正常生长,形态和传代时间未见明显变化。体外培养的藏獒皮肤成纤维细胞经 15 次传代培养后,细胞生长速度明显减慢,培养中大量细胞脱壁。



A B

图 1 体外培养的藏獒体细胞(100×)

注:A,藏獒细胞相差显微镜图片;B,Giemsa 染色。

2.2 细胞生长曲线特点 F4 代藏獒皮肤成纤维细胞生长曲线见图 2。由图 2 可知,体外培养细胞经过 1 d 的潜伏期后开始快速增殖,存在着明显的对数生长期(3~7 d),约在第 7 天达到平台期,平台期以后逐渐进入衰退期。当以较低细胞密度(1×10^4/mL)接种培养时,潜伏期延长(1~3 d),对数生长期曲线较平缓,约在第 9 天达到平台期。3 组培养细胞达到平台期时的细胞密度分别为 4.5×10^5/mL、5.2×10^5/mL、8.6×10^5/mL。计算所得的 PDT 分别为 46.1、39.4、48.5 h,属于哺乳动物体细胞正常 PDT 范围。

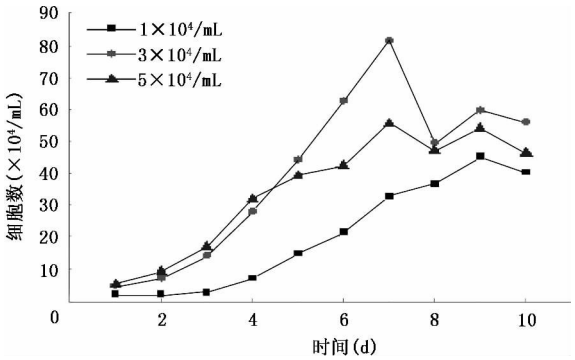


图 2　不同初始密度下的藏獒细胞生长曲线

2.3　藏獒体细胞波形蛋白免疫荧光分析结果　用波形蛋白单克隆抗体进行免疫荧光染色，与对照相比呈现明显的阳性结果，被绿色荧光标记的波形蛋白主要分布在细胞核周围区域(图 3)。

2.4　细胞核型分析　F5 代藏獒体细胞正常的染色体核型比率为 91.4%。由图 4 可知，藏獒染色体 2n=78，全部常染色体均为端着丝粒染色体，X 染色体较大，为亚中着丝粒染色体，Y 染色体为端着丝粒染色体。

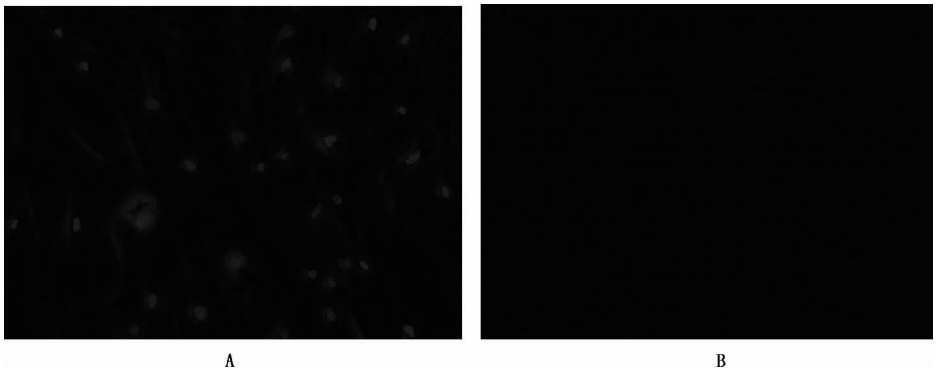


图 3　藏獒体细胞波形蛋白免疫荧光染色(200×)

注：A，波形蛋白免疫荧光染色，PI 标记的核呈现红色荧光，波形蛋白结合 FITC 后呈现绿色荧光；B，对照组。

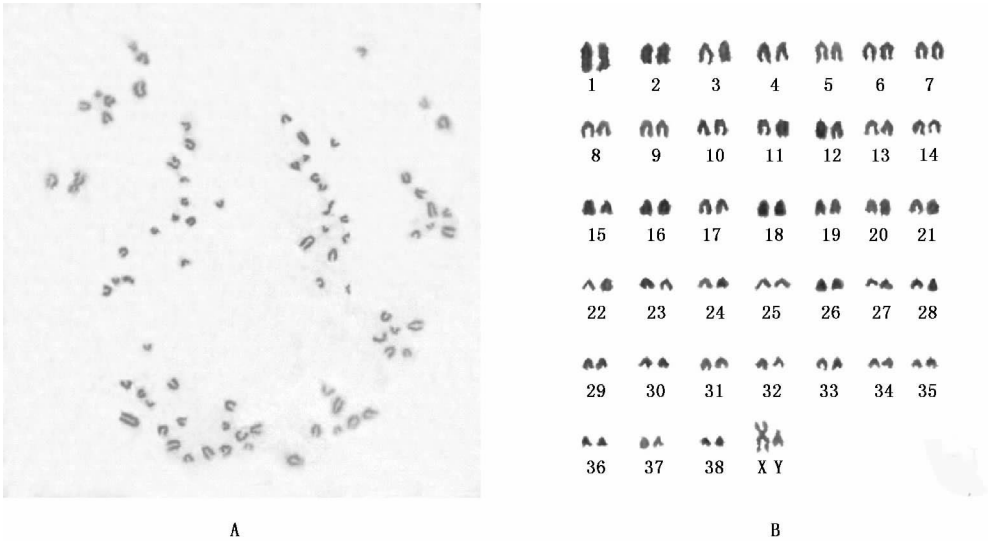


图 4　藏獒染色体核型

注：A，Giemsa 染色；B，染色体核型。

3 讨论

目前，国外已有报道成功地克隆了狗(Jang 等，2008)和灰狼(Kim 等，2007)，而国内尚未开展这方面的研究。已有报道进行了德国牧羊犬(宁小檬等，2012)、比格犬(钟泉等，2010)等犬类成纤维细胞培养，但藏獒体细胞培养相关报道极少。本研究用组织块培养法成功建立了 2 株藏獒成纤维细胞，这 2 株细胞生长良好、增殖能力强，体外传代培养后冷冻保存了各代细胞 40 多管(2 mL 冻存管)，在细胞水平保存了藏獒遗传资源，也为后期的藏獒体细胞核移植提供了供体细胞。

组织块培养是常用的动物体细胞原代培养方法，由于避免了长时间酶消化对细胞表面的破坏作用，所以组织块培养法能较好地保留来源组织的特征。供体细胞对体细胞核移植的生产效率有重要影响(Poehland 等，2007)，本研究用组织块法建立的藏獒成纤维细胞保持了较好的细胞活力，有利于提高藏獒体细胞核移植生产效率。体外培养的藏獒成纤维细胞生长特性及形态特点与已报道的犬类成纤维细胞相类似(宁小檬等，2012)。本研究利用多边形上皮样细胞胰酶消化需时较长和传代后贴壁较慢的特点，通过控制胰酶消化时间，在传代后 15 min 从培养瓶吸去培养液并更换新培养液，经 3～5 次传代处理得到了较纯的梭形成纤维细胞群体。

体外分离培养的动物体细胞受到分离培养方法、培养环境等诸多因素的影响，随着群体染色体非整倍性的改变其增殖能力变化较大。测定细胞生长曲线能较好地反映出细胞的增殖能力，依此也可评估细胞的健康状况。本研究测定了藏獒成纤维细胞生长曲线，平台期密度最高值达到 8.6×10^5/mL，最短 PDT 为 39.4 h，表明细胞增殖能力强、生长速度较快。波形蛋白(vimentin)是细胞中一种重要的细胞骨架成分，在皮肤组织中波形蛋白在成纤维细胞大量表达，可作为分离培养的成纤维细胞鉴定标志之一(Xu 等，2010)。对所建立的藏獒成纤维细胞进行了波形蛋白表达研究，证实藏獒细胞呈现波形蛋白表达阳性，结合细胞形态特征可初步判定细胞群体属于成纤维细胞类型。

体外培养的动物体细胞与活体组织生活环境不同，随着传代次数的增加容易发生染色体变异。体细胞染色体的整倍性也关系到体细胞克隆胚胎和动物的发育能力(Jang 等，2004)。对藏獒成纤维细胞进行了染色体整倍性研究，根据染色体整倍性状况来判定其能否作为藏獒体细胞核移植研究的供体细胞。同时，藏獒染色体核型研究对青海地区藏獒的分类、进化和遗传繁育有重要参考价值。以前的研究多是以外周血细胞为材料进行藏獒染色体核型分析，为了进一步研究青海地区藏獒体外培养细胞的染色体组型特征，试验对所建立的 F5 代藏獒体细胞进行了细胞遗传学分析。从统计数据显示，F5 代藏獒体细胞正常的染色体核型比率为 91.4%，出现了一定比例的非整倍性染色体组型和四倍体，有必要进行培养条件的优化来阻止其随着传代次数增加而发生较严重的染色体变异。染色体核型分析结果证实藏獒染色体 2n=78，全部常染色体均为端着丝粒染色体，X 染色体较大，为亚中着丝粒染色体，Y 染色体为端着丝粒染色体，与已报道的用外周血细胞进行的染色体核型分析结果相一致(张昱等，2003；张亚君等，2009)。根据图像软件测量结果，对常染色体进行了排序，显示了藏獒染色体组型的基本特征。然而，藏獒染色体标本中存在着一些不易观测的微小染色体，用目前的方法进行准确配对存在着一定的困难，还需应用染色体显带、荧光标记染色体和分子探针技术进行进一步研究。

本研究建立了藏獒成纤维细胞株，冷冻保存了约 40 多管(2 mL 冻存管)传代细胞，对其体外培养条件、生长曲线、波形蛋白表达、染色体核型进行了研究。藏獒皮肤成纤维细胞系的建立，可以保存优秀藏獒种质资源，为以后开展藏獒分子生物学、细胞生物学研究提供了良好的材料，也为今后的藏獒体细胞克隆研究奠定了基础。用所建立的藏獒成纤维细胞作为供体细胞、用藏狗去核卵细胞作为受体胞质进行藏獒体细胞核移植研究，将所生产的藏獒克隆胚胎移植到藏狗受体输卵管中生产藏獒克隆后代，可以提高藏獒繁殖效率，快速扩繁优秀藏獒种群。这也是国内继藏獒精液保存技术应用于藏獒繁殖之后建立的另一项重要的藏獒辅助生殖技术，该项技术将有力地推动藏獒繁殖生物技术的发展和应用。同时，本研究所建立的藏獒体细胞培养技术体系能为犬类体细胞培养和建系提供参考。

参 考 文 献

1 方俊顺，陶勇，章美玲，等. 黑麂耳成纤维细胞培养及异种重构胚构建[J]. 农业生物技术学报，2007，15(2)：228～232.

2 王金焕，苏榕，苏伟婷，等. 朱鹮细胞系的建立及其生物学特性观察[J]. 动物学研究，2012，33(6)：591～596.

3 宁小檬，邱桂斌，李祥瑞. 德国牧羊犬成纤维细胞培养及其生长特性研究[J]. 中国畜牧兽医，2012，39(4)：119～121.

4 张亚君，张惠萍. 藏獒染色体核型分析[J]. 青海畜牧兽医杂志，

2009，39(4)：14～15.

5 张明，候蓉，郑鸿培，等. 大熊猫皮肤成纤维细胞在不同培养液中的生物学特性研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版)，2006，27(3)：35～39.

6 张昱，袁宁，王文青，等. 藏獒(Tibetan Mastiff)的核型研究[J]. 青海医学院学报，2003，18(4)：225～226.

7 李动，李才让，尼玛才让，等. 果洛藏獒血清蛋白质指标的研究[J]. 畜牧与兽医，2000，32(1)：11～12.

8 郑筱峰，刘栋，武彩红，等. 甘油浓度和平衡时间对藏獒精液冷冻效果的影响[J]. 江苏农业科学，2010，(5)：296～297.

9 钟泉，闫福华，李艳芬. 两种培养液对 Beagle 犬牙龈成纤维细胞生物学活性的影响[J]. 医学研究杂志，2010，39(8)：42～45.

10 郭宪，催泰保. 藏獒品种资源保护与开发利用[J]. 家畜生态学报，2008，29(5)：102～106.

11 崔泰保，郭宪，鄢珣. 河曲藏獒犬品种保护与选育研究[J]. 家畜生态学报，2009，30(2)：22～25.

12 Bonifacino J S，Dasso M，Harford J B，et al. 章静波，方瑾，王海杰，等译. 精编细胞生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，2007.

13 Freshney R I. 章静波，徐存栓，译. 动物细胞培养——基本技术指南[M]. 北京：科学出版社，2008.

14 Jang G，Park E S，Cho J K，et al. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells[J]. Theriogenology，2004，62：512～521.

15 Jang G，Hong S G，Oh H J，et al. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog[J]. Theriogenology，2008，69：556～563.

16 Kim M K，Jang G，Oh H J，et al. Endangered wolves cloned from adult somatic cells[J]. Cloning Stem Cells，2007，9：130～137.

17 Li Q F，Liu Z S，Li Y X，et al. Origin and phylogenetic analysis of Tibetan Mastiff based on the mitochondrial DNA sequence[J]. J Genet Genomics，2008，35：335～340.

18 Poehland R，Al-Rostum F，Becher F，et al. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic nuclear transfer in the case of bovines[J]. Journal of reproduction and development，2007，53(4)：737～748.

19 Xu H X，Yi Y，Li L，et al. Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and-3 with increased expression of vimentin[J]. Photodermatol Photoimmunol Ph，2010，26：198～204.

Culture and Biological Characteristics Observation of Skin Fibroblast Cells from Tibetan Mastiff

SHI Fan[1,2]，YANG Yong-mei[3]，YU Hong-hao[2,4]，GUO Zhi-lin[1,2]，GUO Song-chang[2]，ZHAO Xin-quan[2]

(1. Academy of Chemistry and Life Science，Qinghai University for Nationality，Xining 810007，China；2. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota，Northwest Institute of Plateau Biology，Chinese Academy of Sciences，Xining 810008，China；3. Academy of Public Management，Qinghai University for Nationality，Xining 810007，China；4. Research Centre of Life Science，Yulin University，Yulin 719000，China)

Abstract：In order to study biological characteristics of Tibetan Mastiff somatic cells and preserve genetic resource，two fibroblast cell strains from Tibetan Mastiff were established by tissue culture. *In vitro* culture cell morphology，hyperplasia ability and some biological characteristics were researched. Tibetan Mastiff cells *in vitro* culture appeared typical morphology of fibroblast cells，grew well and had strong hyperplasia ability. Population doubling time of the cells was 46.1 h. Vimentin expression in the cells was confirmed by immunofluorescence staining. The rate of F5 cells with normal diploidy (2n＝78) was 91.4%. Moreover，longer X chromosome belonged to submetacentric chromosome，but Y chromosome did telocentric chromosome. Tibetan Mastiff cell strains eslablished in the study offered the materials for the Tibetan Mastiff somatic cell nuclear transfer research.

Key words：Tibetan Mastiff；cell culture；fibroblast cell；immunofluorescence staining

书　讯

2011 年合订本(每册 128 元)，并有少量 2004、2005 年合订本(每册 70 元)，1999、2000、2001、2002、2003 年合订本(每册 40 元)。如有订购者，请汇款到：100193 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所《中国畜牧兽医》编辑部收。