

# 北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究

周向梅<sup>1,2</sup>, 马月辉<sup>1\*</sup>, 关伟军<sup>1</sup>, 文杰<sup>1</sup>, 李晗<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:** 采取组织块直接培养法, 对北京油鸡胚胎组织进行原代和继代培养, 成功地建立了成纤维细胞系。并对培养细胞进行了形态学、细胞生长动力学观察, 以及核型和乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶的同工酶分析。结果表明, 该细胞系的群体倍增时间(PDT)为 24 h; 细胞染色体中二倍体占主体, 为 76%~88%; 乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶同工酶电泳图谱与本室其它细胞系有明显差别; 细菌、真菌、病毒、支原体检测呈阴性。该细胞系的建立, 使北京油鸡这一国家重要种质资源在细胞水平上保存下来, 也为基因组文库和体细胞克隆等研究提供了理想的生物材料。

**关键词:** 北京油鸡; 成纤维细胞系; 细胞培养; 生物学特性

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0209-07

北京油鸡是我国所特有的一个优良地方鸡种, 原产地在北京城北侧安定门和德胜门外的近郊一带, 其肉质鲜美, 风味独特, 曾为明清两代皇宫御膳所用, 清史中有“太后非油鸡不食”的记载<sup>[1]</sup>。此鸡种已于 20 世纪 80 年代中期在原产地绝迹, 目前, 只有中国农业科学院畜牧研究所与北京市畜牧所联合保存的数量很少的北京油鸡资源<sup>[2]</sup>。因此, 保护这一鸡种基因资源, 维护生物多样性, 恢复其种群数量等任务已十分迫切。

随着高产专门化品种的培育与推广, 畜禽遗传资源多样性及其种质资源丧失程度日益加剧。1999 年调查结果表明, 我国 17 个地方品种已经灭绝, 严重濒危畜禽品种达 37 个。因此, 保护我国畜禽遗传资源多样性迫在眉睫。保护动物遗传资源可以通过活畜保种或者冷冻动物胚胎、精液或体细胞几种方式来完成<sup>[3]</sup>。随着近几年体细胞克隆技术的发展和成熟, 动物体细胞作为保存动物遗传资源的一种补充, 日渐受到人们的重视<sup>[4]</sup>。本研究从培养和冻存北京油鸡二倍体稳定细胞——成纤维细胞入手, 对该细胞系的生物学特性进行研究, 以期使这一稀有品种的遗传资源从细胞水平上长期保存下来, 同时也为构建基因组文库, 体细胞克隆, 基因遗传多样性

研究等提供理想的生物学材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM(Gibco), 胰蛋白酶(Amresco), PBS(自制), 0.9% NaCl(自制), 10% 胎牛血清(Hyclone), 青霉素, 链霉素(国产), DMSO(Sigma), 秋水仙素(Sigma), Giemsa 染料(Amresco), Hoechst 32588, Trypan blue(Sigma), Mycoplasma Detection Kit(Roche)。

### 1.2 北京油鸡 9 日龄鸡胚组织块培养

将 9 日龄北京油鸡鸡胚在无菌条件下从蛋里取出, 剪下腿部肌肉, PBS 洗涤 2~3 次后, 用眼科剪将肌肉组织剪碎, 成为 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块。将其贴于玻璃培养瓶中, 倒置放在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 4 h 后, 加入含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液, 倒置放在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱里, 过夜, 然后翻瓶, 进行培养。

### 1.3 传代

当培养的成纤维细胞 80%~90% 汇合后, 弃旧培养液, 加入适量的 0.9% NaCl 溶液, 使残留的原培养液中的血清去除。然后加入适量 0.25% 胰蛋白酶, 倒置于 37 °C 普通培养箱中预热 3 min, 再翻转培养瓶, 使胰蛋白酶溶液覆盖所有细胞表面, 当培养细胞在相差显微镜下回缩变圆时, 轻轻拍打, 使细胞脱离瓶壁, 立即加入含 10% 的 DMEM 培养基终止消化。根据细胞数量多少, 进行分瓶。置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中培养, 视细胞生长和代谢物情况换液<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2004-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(30100132); 基础性工作重大专项(2001DEA10006)

作者简介: 周向梅(1973-), 女, 宁夏人, 兽医师, 博士生, 研究方向为动物基础病理学

\* 通讯作者: 马月辉, 男, 吉林人, 博士, 研究员, 博导, 研究方向为动物遗传育种。Tel: 010-62813463, E-mail: Yuehui.ma@263.net

#### 1.4 冻存

对数生长期的细胞在冻存前 24 h 内更换新鲜完全培养液。按常规方法消化细胞,用全培养液终止反应,使成单细胞悬液。用血球计数板计算细胞总数后将细胞悬液收集于 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,收集细胞。根据细胞数量多少加入冻存液,使细胞密度达到 $(3\sim 5) \times 10^6/\text{mL}$ ,用吸管轻轻吹打使细胞重悬后,分装于无菌冻存管中,并标记上动物名称、日龄、编号、日期等。然后,将冻存管放入装有异丙醇的冷冻盒中,于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中过夜。次日放入液氮罐中分类保存<sup>[6]</sup>。

#### 1.5 活率计算

用血球计数板计数方法计算细胞冻存前和复苏后的活率。细胞经 Trypan 蓝染料染色,死亡细胞由于细胞膜破坏,这种染料可以进入,因此死亡细胞被染成蓝色,而健康活细胞胞体完整,细胞透明不着色。计数 1 000 个细胞,计算细胞存活率<sup>[6]</sup>。

#### 1.6 生长曲线

将终浓度为 $3.24 \times 10^4/\text{mL}$ 的北京油鸡成纤维细胞接种到 24 孔培养板上,常规培养条件下培养,连续 7 d 计数,每天计数 3 个孔,将计数结果输入计算机处理,求得生长曲线和倍增时间参数(population doubling time, PDT)<sup>[7]</sup>。

#### 1.7 染色体分析

按照常规方法进行染色体制片<sup>[8]</sup>,Gimesa 染色后油镜下观察并照相。对 50 个铺展完好的中期相统计染色体数目,计数 50~100 个分裂相好的染色体数目,并依照文献报道方法制备核型<sup>[9]</sup>。

#### 1.8 同工酶分析

按照 ATCC 的同工酶淀粉凝胶电泳技术<sup>[5]</sup>,并加以改进,首先收集细胞,用 PBS 清洗,以 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞重悬,制备酶的粗提液。回收上清液,等分,贮存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH 8.7),凝胶缓冲液由不连续系统组成:浓缩胶由 0.017 mol/L Tris-柠檬酸缓冲液(pH 6.8)制备,分离胶由 0.078 mol/L Tris-柠檬酸缓冲液(pH 8.9)制备。加样后,设置电压在 120 V,电泳 1 h 后,然后将电泳槽放进冰箱( $4\text{ }^\circ\text{C}$ )电泳,0.5 h 后,将电压调整为 220 V,电泳 3 h。电泳结束后,将浓缩胶割去,加入不同染色液对苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)或乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)同工酶进行染色<sup>[10]</sup>,拍照。

#### 1.9 细菌、真菌、支原体检测

1.9.1 细菌、真菌检测 所有的待检细胞在无抗生素培养液中培养,传代后 3 d 内进行检测。具体操作参见 Doyle 等<sup>[11]</sup>的检测方法。

1.9.2 病毒检测 日常培养中,在相差显微镜下注意观察有无蚀斑、空斑等病毒损伤情况;另外随机挑选细胞进行红细胞吸附试验<sup>[12]</sup>。

1.9.3 支原体检测 首先按照 ATCC 使用的 DNA 荧光染色法,将待检细胞用 Hoechst 33258 染色,在荧光显微镜下观察<sup>[5]</sup>。为了确证以上结果准确性,使用支原体 ELISA 检测试剂盒(Roche),对细胞培养中污染最常见的 4 种支原体(*M. arginini*, *M. hyorhinis*, *A. laidlawii*, *M. orale*)进行检测。

## 2 结果

### 2.1 北京油鸡成纤维细胞形态学观察

组织块贴附 1~2 d 后便可见大量细胞从组织块周围游出生长,上皮样细胞与成纤维样细胞混杂生长,随后细胞迅速向外扩散,2~3 d 后即可铺满瓶底。细胞经传代之后,成纤维细胞生长逐渐占优势,经 2~3 次传代,即可排除上皮型细胞。细胞呈典型的梭形,中央有卵圆形核,细胞多发生黏连生长,呈网状分布,细胞界限不甚清晰。原代细胞及传代后细胞见图 1, 2。

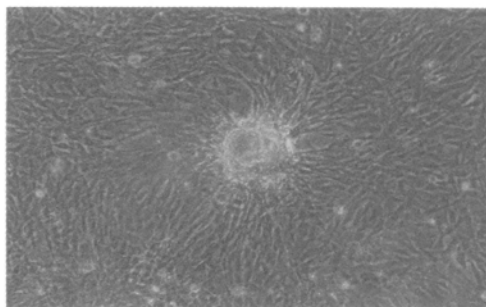


图 1 北京油鸡 9 日胚组织块直接培养的原代细胞

Fig. 1 Primary explant culture from Beijing fatty chicken embryo

### 2.2 北京油鸡成纤维细胞冻存前及复苏后细胞活率

北京油鸡成纤维细胞冻存前细胞活率平均达到 95.4%,复苏后平均达到 93.0%,细胞在冻存前和复苏后均有较高的存活率,达到 90% 以上。表明细胞在生长时健康状况良好,培养条件适宜;另外,冻存对其存活率影响不大,说明冻存的各项条件对细

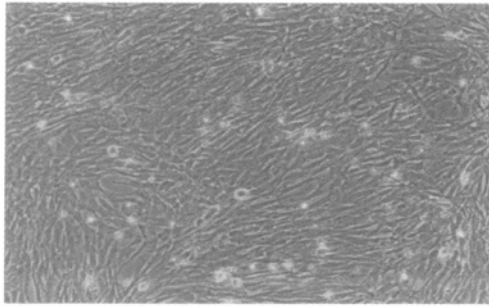


图2 北京油鸡9日胚组织传代后细胞  
Fig. 2 Fibroblast cell subcultured after two passages from Beijing fatty chicken embryo

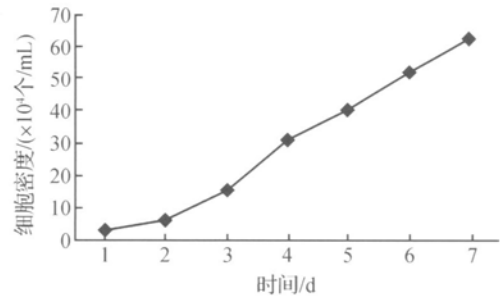


图3 北京油鸡鸡胚成纤维细胞生长曲线  
Fig. 3 The Growth curve of Beijing fatty chicken embryo fibroblast cell

胞损伤不大。

### 2.3 北京油鸡成纤维细胞生长的动态观察

北京油鸡细胞接种密度为  $3.24 \times 10^4$  / mL, 每周换液3次。细胞从接种后第2天呈指数增殖。其倍增时间约为24 h, 北京油鸡成纤维细胞生长曲线见图3。

### 2.4 北京油鸡成纤维细胞染色体观察

家禽典型染色体核型由80对左右染色体组成, 这些染色体分为2组: 几对可以分辨的大染色体和数量多一些小染色体, 这些小染色体在染色体中期相制片上只能看到以点状分布。大染色体与小染

色体临界点, 不同的作者所得出的结论不同<sup>[13,14]</sup>, 依据国际家禽核型标准会议<sup>[9]</sup>描述的核型, 将家禽染色体定为8对大染色体和性染色体Z、W, 小染色体有30对。本试验对显微镜下分散良好的中期分裂相细胞拍照, 见图4A、4B; 从图中看出, 小染色体数目不易辨别, 但大染色体结果与上述结论基本一致。依照Guelph会议对家禽8对大染色体和性染色体的核型制作标准, 制备这9对染色体的核型, 见图5A、5B。从图中看出, 公鸡(♂)性染色体为ZZ, 母鸡(♀)为ZW, Z、W染色体均为中部着丝点染色体, 易于辨认, W染色体相当于7、8号染色体大小, 呈异固缩状态(heteropycnosis)。



图4 北京油鸡9日胚成纤维细胞染色体中期分裂相

A. 母鸡 B. 公鸡

Fig. 4 Metaphase spreads of Beijing fatty chicken 9-day-old embryo fibroblast cells

A. Female B. Male

本试验中, 因小染色体数目不易辨别, 因此在计数50个细胞染色体数目时, 只对其是否为整二倍体进行计算, 结果见表1。

从表1看出, 细胞染色体中二倍体占主体。但

同时也可看出, 随着传代数增加, 细胞染色体有发生改变的趋势, 超二倍体出现的频率增大, 到第4代时, 超二倍体所占比例达到20%, 由于需要保存的是二倍体细胞, 所以细胞冻存应当尽量在培养代数

早期进行。

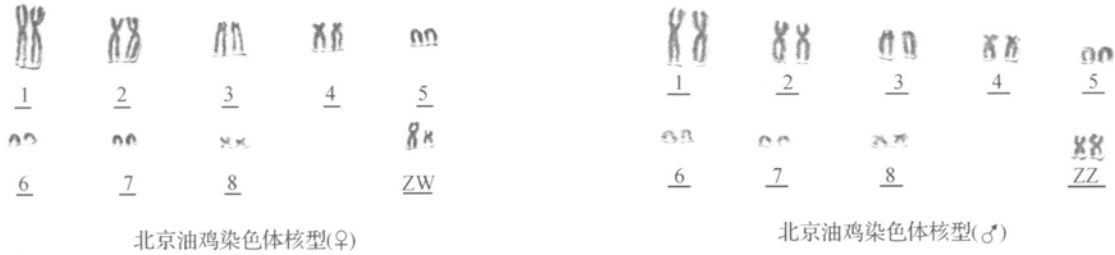


图5 北京油鸡9日胚成纤维细胞染色体核型

A. 母鸡 B. 公鸡

Fig. 5 Karyotypes for first 9 pairs of chromosomes of Beijing fatty chicken fibroblast cells

A. Female B. Male

表1 北京油鸡鸡胚成纤维细胞染色体数目

Table 1 Beijing Fatty Chicken embryo fibroblast cells chromosome number

代次 Passage	染色体数目是否为整二倍体的细胞数/个 Chromosome distribution			细胞总数/个 Total cell numbers	2n的百分数 Percentage of diploid/ %
	亚二倍体 Sub-diploid	二倍体 Diploid	超二倍体 Super-diploid		
	2	1	44		
3	0	43	7	50	86
4	2	38	10	50	76

2.5 北京油鸡成纤维细胞同工酶分析

由于同工酶在种与种之间,甚至种内之间存在多态性<sup>[15,16]</sup>,因此,通过色谱或电泳得到的同工酶图谱是区别种间细胞系的一个极好的方法,目前在世界主要的培养物中心(如 ATCC, ECACC, DSMZ 以及 Riken),都把这种方法作为细胞系质量控制中进行确认和种间污染的标准方法,来对细胞系的交叉污染进行检测<sup>[17]</sup>。但是,这种方法需要的试剂比较昂贵,并且不易买到,结合实际情况,参考聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[10]</sup>,笔者对 ATCC 使用的淀粉凝胶电

泳方法进行改进,得到了北京油鸡9日胚胎成纤维细胞系(NBLCHE 2/2)的乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的电泳图谱,并与矮马耳缘组织成纤维细胞系(DPEM 2/2)、皮埃蒙特牛耳缘组织成纤维细胞系(PEM 2/2)以及蒙古羊耳缘组织成纤维细胞系(MSHEM 2/2)这2种酶的电泳图谱进行比较,结果见图6。从图中看出,北京油鸡鸡胚成纤维细胞系LDH有2条区带,其泳动率LDH-2 > LDH-1,MDH有2条区带,国内外未见这方面报道。同时,该细胞系与本实验室其它几种细胞系同工酶图谱均有明显差异。



图6 北京油鸡9日胚胎成纤维细胞系与其它几种动物成纤维细胞系乳酸脱氢酶(A)、苹果酸脱氢酶(B)的带型比较

Fig. 6 The banding patterns of the isozyme of LDH (A) and MDH (B) for the Beijing fatty chicken embryo fibroblast cell line compared with those of other animal ear marginal tissue fibroblast cell lines

A 1. 北京油鸡9日胚胎成纤维细胞系; 2. 皮尔蒙特牛耳缘组织成纤维细胞系; 3. 蒙古羊耳缘组织成纤维细胞系; 4. 矮马耳缘组织成纤维细胞系

B 1. 皮埃蒙特牛耳缘组织成纤维细胞系; 2. 矮马耳缘组织成纤维细胞系; 3. 北京油鸡9日胚胎成纤维细胞系

A 1. Beijing fatty chicken; 2. Mongolian sheep; 3. Piemontese; 4. Debao pony

B 1. Piemontese; 2. Debao pony; 3. Beijing fatty chicken

## 2.6 北京油鸡鸡胚成纤维细胞系微生物污染的检测

2.6.1 细菌、真菌污染检测 接种单层细胞的液体培养基和阴性对照, 未出现混浊或其它变化, 培养基清亮透明, 而阳性对照可见明显的混浊或沉淀, 均表明有微生物生长。

2.6.2 病毒检测 日常相差显微镜观察, 未见有病毒造成的细胞损伤现象。红细胞吸附试验结果为阴性。

2.6.3 支原体检测 有许多方法可用于检测支原体污染, 并且效率有高低<sup>[18, 19]</sup>, 但是, 通过对支原体 DNA 荧光染色来直接观察仍然是最常用的方法, 如 ATCC 就是采用 Hoechst 33258 这种荧光染料对细胞进行染色来检测是否有支原体污染, 不过, 在试验中发现, 这种方法得到的结果很不容易解释, 有时易与细胞碎片混淆, 要求必须具备丰富的经验和专业知识<sup>[20]</sup>。由于这个原因, 本研究使用了支原体 ELISA 检测试剂盒, 以确认荧光染色结果的准确性。这种试剂盒中包括 4 种细胞培养中常见污染的支原体阳性对照, 从结果来看, 本试验所建立的北京油鸡成纤维细胞系支原体检测呈阴性, 与前一种方法得到的结果一致( 荧光染色结果见图 7)。

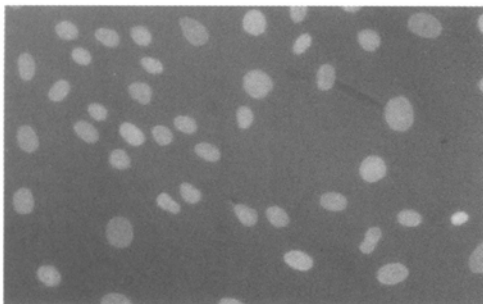


图 7 北京油鸡鸡胚成纤维细胞系用荧光染料 Hoechst 33258 染色, 支原体检测结果为阴性

Fig. 7 Detection of negative Mycoplasma contamination for Beijing fatty chicken embryo fibroblasts stained with Hoechst 33258

## 3 讨论

本研究从北京油鸡鸡胚组织中分离、培养并建成了成纤维细胞系。经形态学观察, 在原代培养及早期传代培养时, 上皮细胞和成纤维细胞同时出现, 混杂生长, 混杂生长细胞分区成片。由于上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶耐受性不同, 在消化培养细胞时, 常是成纤维细胞先脱壁, 而且传代后贴壁

快, 附着快。而另外大部分上皮细胞在短时间内不能附着或附着不稳定, 稍振动即浮起, 需要生长基质如胶原或其它细胞外基质成分等的支持<sup>[21, 22]</sup>, 因此, 利用这个差别, 经酶消化法和反复贴壁法处理 2~3 代后, 能够完全纯化成纤维细胞。其次, 对该细胞系生物学特性检测结果表明, 北京油鸡成纤维细胞系生长较快, 传代培养第 2 天进入指数生长期, 到第 6 天生长进入平稳状态, 倍增时间为接种后 24 h。

细胞中大染色体数目为 9 对, 小染色体数目在 26~30, 其中二倍体细胞占主体, 染色体没有异常表现, 说明该细胞系为稳定二倍体细胞系。

细胞系交叉污染不易觉察, 而且, 细胞的交叉污染不象支原体污染那样倍受各个实验室的重视。然而, 当实验室在交换细胞系时, 经常有名称简化或误拼, 以及冻存管上没有历史记录这种情况, 有的实验室细胞被培养、冻存、使用多年而没有对其种源加以确认<sup>[22]</sup>。这对于建立细胞系, 或将细胞作为材料进行生物学研究或生产, 都将蒙受很大损失。所以, 这一问题已日渐受到科学界的重视。对污染的检测手段在不断发展, 从最初的核型分析, 发展到后来的种属特异性抗原免疫荧光技术, 以及同工酶谱检测。20 世纪 70 年代以后, 随着分子生物学的飞速发展, 又涌现出 DNA 指纹分析, PCR 方法等<sup>[6]</sup>。但是在细胞系鉴定的质量控制以及种间污染检测中, 同工酶多态性生化分析被认为是标准方法, 在世界几个重要的生物资源中心如 ATCC, ECACC, DSMZ 等, 常规使用这种方法来对细胞的种间污染进行检测<sup>[23]</sup>。本试验对北京油鸡鸡胚成纤维细胞系的 LDH、MDH 同工酶谱进行了检测, 从结果来看, LDH 有 2 条区带, 这与 Lindsay 用琼脂胶电泳分离成年鸡的心肌组织结果一致<sup>[24]</sup>。但与刘如笋等报道的结果不一致<sup>[25]</sup>, 他们用薄层等电聚焦电泳对中国原鸡心肌、肝脏、血浆 LDH 同工酶进行分析, 表明 3 种组织均有 5 条区带。这可能是因为家鸡 LDH 同工酶的等电点偏高一些, 且集中于一个较狭窄的中性 pH 范围内, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳较难将各个区带分离开<sup>[25, 26]</sup>。另外, LDH 基因的表达受到遗传基因和代谢物的双重控制, 同一个体的不同器官或组织, 或幼年和成年时期, 以及品系之间, LDH 同工酶活性差别明显。因此, 培养细胞 LDH 同工酶是否与其器官组织的相同, 还需要进一步研究。动物的 MDH 是二聚体酶, 分为由 A、B 基因编码的  $\alpha$ -MDH (细胞溶质型) 和由 C、D 基因编码的

m-MDH(线粒体型)2种类型<sup>[27]</sup>。前者迁移速率比后者快,从试验结果来看,北京油鸡鸡胚成纤维细胞系MDH有1条偏向阳极的主带,这与鸡胚早、中期发育过程中(1~16日龄)MDH同工酶的表现是一致的<sup>[28]</sup>,由此表明细胞在体外培养中MDH酶的活性与源组织相似。所以,分析北京油鸡鸡胚组织成纤维细胞系LDH、MDH同工酶,为日后检测该细胞系的种属来源确定了具体的指标,是该细胞系的一项重要生物学特性。

综上所述,本实验室建立的北京油鸡鸡胚成纤维细胞系性质稳定,增殖较快。该细胞系的建立,使北京油鸡这一国家重要种质的遗传资源在细胞水平上得以保存下来,也为相关遗传学研究提供了有效的理论依据和理想的生物材料。

#### 参考文献:

- [1] 刘华贵,徐淑芳. 北京油鸡及其开发利用[J]. 家畜生态, 2001, 22(4): 50~52.
- [2] 《中国家禽品种志》编写组. 中国家禽品种志[M]. 上海: 上海科学出版社, 1988. 30.
- [3] Pizzi F, Pallante B, Gandini G. Cryopreservation techniques for pig genetic resources conservation [A]. In: Pig genetic resources in Europe. Characterization and Conservation [M]. 2001. 101~110.
- [4] 吴常信. 动物遗传资源保存的理论与技术——21世纪动物农业可持续发展的种质基础[J]. 云南大学学报, 1999, 21, 7~10.
- [5] Freshney R I. Culture of animal cells: A manual of basic technique [M]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 149~175.
- [6] Nigel Jenkins. Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols [M]. New Jersey: Humana Press Inc, 1999. 132, 138.
- [7] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1994. 11~13, 82~87, 121~128.
- [8] Yunis J J. Human chromosome methodology [M]. New York: Academic Press, 1974. 59~61.
- [9] LadjalrMoha mmedi K, Bitgood J J, Tixier-Boichard M, et al. International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK): Standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. Cytogenet Cell Genet, 1999, 86: 271~276.
- [10] 何忠效,张树政. 电泳 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 35~39, 288~289, 296~298.
- [11] Doyle A, Hay R, Kirsop B E. Animal cells, living resources for biotechnology [M]. Cambridge, U K, Cambridge University Press. 1990. 81~100.
- [12] Freshney R I. Animal cell culture: a practical approach [M]. Oxford University Press, 1992. 119~122.
- [13] Joydeep D, Asha K. Chromosomal profile of dwarf chicken [J]. Indian J Poult Sci, 2000, 35 (2): 152~155.
- [14] Valerie F. The chicken as a model to study microchromosomes in birds: a review [J]. Genet Sel Evol, 1998, 30: 209~219.
- [15] O'Brien S J, Kleiner G, Olson R, et al. Enzyme polymorphisms as genetic signatures in human cells cultures [J]. Science, 1977, 195: 1345~1348.
- [16] Nims R W, Shoemaker A P, Bauternschub M A, et al. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 1998, 34: 35~39.
- [17] Drexler H G, Dirks W G, MacLeod R A F. False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations [J]. Leukemia, 1999, 13: 1601~1607.
- [18] Barile M E, Rottem S. Mycoplasmas in cell culture [A]. In: Kahane L, Adoni A. Rapid diagnosis of mycoplasmas [M]. New York: Plenum Press, 1993. 155~193.
- [19] Uphoff C C, Drexler H G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 2002, 38: 79~85.
- [20] Garner C M, Hubbard L M, Chakraborti P R. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods [J]. British Journal of Biomedical Science, 2000, 57: 295~301.
- [21] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 432~444.
- [22] Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34: 1~8.
- [23] Parodi B, Aresu O, Bini D, et al. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method [J]. BioTechniques, 2002, 32(2): 432~440.
- [24] Lindsay T D. Isozymic patterns and properties of lactate dehydrogenase from developing tissues of the chicken [J]. J Exp Zool, 1963, 152(1): 75~90.
- [25] 刘如笋,俞清. 原鸡不同组织乳酸脱氢酶同工酶研究 [J]. 动物学杂志, 1997, 32(1): 27~29.
- [26] 王明力,陈凤英. 鸡形目4种鸟乳酸脱氢酶同工酶研

- 究[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(4): 68~ 70. [28] 马建岗, 邱 怀. MDH 和 G6PD 同工酶在家鸡个体发育中的表现特征[J]. 西北农业学报, 1995, 4(1): 61~ 65.
- [27] Makepeace U T. Heterogeneity of tissue dehydrogenase [J]. Arch Biochem Bioph, 1960, 90: 234~ 238.

## Establishment and Characteristics of a Beijing Fatty Chicken Embryo Fibroblast Cell Line

ZHOU Xiang-mei<sup>1,2</sup>, MA Yue-hui<sup>1\*</sup>, GUAN Wei-jun<sup>1</sup>, WEN Jie<sup>1</sup>, LI Han<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A Beijing fatty chicken embryo fibroblast cell line (NBLCHE2/2) was successfully established using the primary explant technique. Observations on morphology, dynamic growth and analysis of karyotype, isoenzymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase were carried out. The results showed that population doubling time of cells was 24 h; diploid cells were dominant of 76%~ 88%. The banding patterns of the isoenzymes of the two kinds of enzymes had significant difference between the Beijing fatty chicken embryo fibroblast cell line and other cell lines in our laboratory; tests for microbial contamination of bacteria, fungi and yeasts, virus and mycoplasma were negative. The newly established cell line make the Beijing Fatty Chicken, a national important genetic resource preserved in cell level, as well as will provide an ideal experimental material for the genetic studies on the Beijing local chicken.

**Key words:** Beijing fatty chicken; fibroblast cell line; cell culture; biological characteristics

\* Corresponding author

## 中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学分会暨 中国免疫学会兽医免疫分会第六次学术研讨会通知

中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第 6 次学术研讨会将于 2005 年 5 月 21 日在山东济南与中国畜牧兽医学会 2005 年学术年会同期举行。

### 一、研讨会主要内容:

1. 邀请国内知名专家作专题发言; 2. 会员学术交流; 3. 评选优秀论文, 对入选的优秀论文进行奖励。

### 二、征文的具体要求:

1. 征文范围: 2002 年以来的最新畜牧兽医生物技术和兽医免疫研究论文和成果, 年会欢迎和鼓励未发表过的论文参加此次征文活动。

### 2. 征文内容:

①动物重要疫病、人畜共患病、外来病等的分子流行病学、致病机理、免疫机理、免疫病理、新型疫苗及诊断技术研究; ②兽医免疫学和生物技术新方法、新理论的研究与应用; ③动物生物技术。

3. 论文要求: 文稿必须用计算机输入排版, 可提交全文或大摘要。全文不超过 5000 字(含标点、空格), 大摘要不超过 1000 字。全文附中英文摘要、关键词和参考文献。论文格式请参照《中国预防兽医学报》。

### 4. 论文版面费(含评审费):

研讨会将编印、出版论文集。每篇论文需交版面费 300 元, 提交大摘要的版面费 100 元。版面费应与稿件同时寄到中国农科院哈尔滨兽医研究所。

5. 论文投递: 论文截止日期为 2005 年 3 月 20 日。论文作者请将论文通过电子邮件发送, 或将软盘及打印稿寄到以下地址(信件以寄出的邮戳为准, 逾期不予受理)。论文文稿和软盘无论录用与否一律不退, 请保留备份。

地址: 哈尔滨市南岗区马端街 427 号中国农科院哈尔滨兽医研究所科研处

邮编: 150001 联系人: 赵丽丹 张 晶 电话: 0451- 82725786 转 248 传真: 0451- 82762510 E-mail: zld@ hvri. ac.

cn 或 zj@ hvri. ac. cn

开户名称: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

开户行: 哈尔滨商业银行科技支行 帐号: 884010305809016

(下转 P229)