

# 山羊转人乳铁蛋白基因成纤维细胞和乳腺上皮细胞单克隆的制备及扩大培养

张玉玲<sup>1</sup>, 刘凤军<sup>1</sup>, 张涌<sup>2\*</sup>

(1. 河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学生物工程研究所, 陕西杨凌 712100)

**摘要** [目的] 为探索单个转基因阳性细胞快速扩大培养成为细胞克隆的技术体系。[方法] 对转染人乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLF)基因乳腺特异性表达载体 pBLM-C<sub>1</sub> 的单个山羊胎儿成纤维细胞(Fetal Fibroblasts, FF)和乳腺上皮细胞(Mammary Gland Epithelial, MGE)细胞进行克隆。在96孔板中, 首先用3种浓度(V/V: 0、50%和100%)的适应性条件培养基对单个转染细胞进行细胞单克隆的制备, 进而把转染细胞单克隆与非转染细胞共培养进行扩大培养, neo基因被用于筛选基因, 以PCR方法鉴定转染细胞基因组DNA。并对单克隆细胞进行染色体核型分析。[结果] 与非适应性条件培养基相比, 100%适应性条件培养基能够显著提高细胞单克隆存活率; 与对照相比, 转染细胞单克隆与非转染细胞共培养, 显著提高了转染细胞单克隆扩大培养后的比率(FF: 53.33% vs. 10.00%; MGE: 33.33% vs. 6.67%), 且明显缩短了扩大培养汇合时间(20~30 d); PCR鉴定结果表明, 上述方法获得的克隆细胞整合有hLF目的基因; 核型分析表明, 大部分细胞克隆染色体正常。[结论] 该研究可为分离转基因细胞、理想载体的插入及诊断提供一种可靠的方法, 并能节省转基因动物生产的及费用时间。

**关键词** 细胞; 单克隆; 扩大培养; 转基因; 山羊

中图分类号 S821 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)31-15146-04

## Single Colony Preparation and Amplification Culture of Fetal Fibroblast and Mammary Gland Epithelial Cell of Human Lactoferrin Transgene from Goat

ZHANG Yu-ling et al (College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

**Abstract** [Objective] The aim was to explore technical system of making single transgenic positive cells become colony cells by amplification culture. [Method] Fetal fibroblasts and mammary gland epithelial cells of single goat fetus of pBLM-C<sub>1</sub> which specifically expressed human lactoferrin were cloned. Single cell colony of single transfection cell was prepared with 3 concentrations of 0, 50% and 100% conditioned culture media. Transfection cell and non-transfection cell were carried out amplification culture by con-culture, neo gene was as screened gene, genome DNA of transfection cell was detected by PCR method. Chromosome karyotype analysis of single colony cell was tested. [Result] Compared with non-conditioned culture medium, 100% conditioned culture medium could greatly increase survived rate of single colony cells. Compared with control, con-culture of transfection cell and non-transfection cell could greatly increase rate of transfection cell single colony after amplification culture (FF: 53.33% vs. 10.00%; MGE: 33.33% vs. 6.67%), confluence time of amplification culture was significantly decreased (20-30 d). The result of PCR showed that the colony cell obtained by above method contained hLF target gene. The result of karyotype analysis showed that most cloned cell chromosomes were normal. [Conclusion] The study provides a reliable method for separating transgenic cell, inserting and diagnosing ideal vector, and can save expense and time for transgenic animal production.

**Key words** Cell; Single colony; Amplification culture; Transgene; Goat

利用转基因技术, 人们可以在动物体内导入新基因来提高繁殖效率、表达医药蛋白、制作遗传病动物模型、研究动物新陈代谢和基因表达机制。在10多年前, 人们用DNA注射到原核的显微注射技术来生产转基因动物<sup>[1]</sup>, 但由于显微注射法获得的胚胎会由于DNA污染、附加体质粒(Episomal Plasmid)存在及产生嵌合体等因素而产生较高比率的假阳性<sup>[2-3]</sup>, 致使转化效率低、投入高、周期长, 限制了该项技术的应用。与显微注射法相比, 核移植技术(Nuclear Transfer, NT)以转基因细胞为供体细胞, 可以精确定位基因、生产基因导入及敲除动物。应用该项技术, 已经获得了多种转基因动物<sup>[4-6]</sup>。转基因克隆一个重要环节是转染阳性细胞克隆的分离及扩大培养, 需要很长时间, 并且可能会引起体细胞衰老及污染, 这意味着一个高效的单细胞克隆分离方案是成功生产转基因克隆动物的基础。即供体细胞克隆的分离对提高转基因胚胎的生产效率至关重要。胎儿成纤维细胞或乳腺上皮细胞为供体细胞, 其本身在体外的存活代数有限, 且整个转染、筛选等过程都对细胞产生影响, 在得到G418筛

选出的阳性细胞克隆后, 仅有极少数的克隆能大量扩增。在以往关于转基因克隆的报道中, 缺乏转基因供体细胞制作过程, 特别是转基因细胞单克隆的分离及扩大培养的细节内容<sup>[4,6-8]</sup>。

据此, 笔者收集2~3代生长旺期细胞培养液, 作为适应性条件培养基, 用以扩大培养单个转基因细胞, 结合与非转染细胞共培养, 旨在提高克隆存活率及克隆扩大培养存活率, 缩短转基因细胞克隆的分离及扩大培养时间, 建立一个从单个转染阳性细胞快速扩大培养细胞克隆的技术体系。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 含有人乳铁蛋白基因(长约2 569 bp)的载体pBLM-C<sub>1</sub>为西北农林科技大学生物工程研究所构建。DNA提取试剂盒购自TIANGEN公司, 细胞培养试剂购自Gibco公司, 脂质体LIPOFECTAMINE2000和G418均购自Invitrogen公司。PCR引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。其他试剂除特殊注明外均购自Sigma公司(St. Louis, MO, USA)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养。** 胎儿成纤维细胞来源于杨凌科元公司妊娠50 d的莎能奶山羊流产胎儿组织, 乳腺细胞来源于西安屠宰场泌乳期奶山羊乳腺组织。消毒后, 用剪刀从皮肤剪一块组织, 放入PBS中, 带回实验室。用无菌的生理盐水洗3遍,

**基金项目** 河南科技大学博士启动基金项目。

**作者简介** 张玉玲(1977-), 女, 蒙古族, 内蒙赤峰人, 博士, 讲师, 从事动物胚胎工程和转基因研究。\*通讯作者。

**收稿日期** 2009-08-17

放入 70% 的酒精浸泡 5 min, 再用生理盐水洗 3 遍, 之后用剪刀剪成碎块, 组织块用含青霉素 (300 IU/ml)、链霉素 (3 000 IU/ml) 的 Hanks 液洗涤多次, 洗去乳迹和血污, 再去除脂肪和结缔组织。用眼科剪和镊子分离、剥净脂肪组织和结缔组织。将组织剪成大小为 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 均匀放置在培养皿 (Nunc, 15 × 60 mm) 中, 每小块组织间距约 0.5 cm。然后将培养皿倒置, 在 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养 40 min 左右, 使组织块贴附于培养皿表面。然后再加入微量培养液, 以刚刚漫过组织块为好, 继续在培养箱中培养。培养液为 DMEM/F12 (Gibico, USA) + 10% (V/V) FBS (乳腺细胞培养液另外添加 5 μg/ml 氢化可的松、5 μg/ml ITS 和 10 ng/ml EGF)。24 h 后, 加入约 2 ml 的培养基继续培养, 以后每 3 d 全量换液。原代培养的细胞多为上皮样细胞和成纤维样细胞的混合体, 该试验通过传代时 2 种细胞对胰蛋白酶的耐受性不同、再次贴壁难易差别及细胞不同时期增殖活性的差异, 进行 2 或 3 次细胞传代, 即可获得纯化成纤维细胞和乳腺上皮细胞。

**1.2.2 细胞转染。**转染前使用含血清不含抗生素的正常生长培养基 D/F12 进行细胞铺板, 在加入脂质体/pBLM-C<sub>1</sub> 复合物前移去生长培养基, 替换为 0.5 ml 无血清无抗生素 DMEM 培养基, 将包裹好的脂质体/DNA 溶液小心滴加到 24 孔培养板中, 轻轻摇动培养板, 混匀。将培养板置于 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中保温 6~12 h 后, 弃培养液, 换为含 10% FBS 的培养基 D/F12 继续培养。48 h 后, 将培养液换成含 400 μg/ml G418 的 D/F12 筛选 10~14 d, 存活下来的细胞被消化后, 以新鲜或适应性条件培养液稀释至 100 cells/ml。然后, 在 24 孔板的每个孔中接种 10 μl 细胞悬液, 选择含 1 个细胞的孔进行分组试验。

适应性条件培养液 (D/F12) 的制作: 在 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中接种第 2~3 代非转染细胞, 待生长至 80% 时换液, 继续培养 36 h 后, 收集到的细胞培养液即为适应性条件培养液。

**1.2.3 转染阳性细胞单克隆的分离与扩大培养。**G418 筛选后, 分离获得的阳性细胞单个转移到 96 孔板中 (1 个/孔), 按培养液成分不同分 3 组: 非适应性条件培养液培养 (新鲜 DMEM/F12) 组、50% (V/V) 适应性条件培养液组、100% 适应性条件培养液组。

为了克服细胞密度低对细胞克隆增殖的不利影响, 把单个转染细胞获得的细胞单克隆 (1 个/孔) 与非转染的同种细胞混合共培养以促进细胞的生长活力。在 24 孔板中接种转染细胞单克隆 (1 个/孔), 每种细胞各选 30 个孔, 每孔细胞中再加入约 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml 非转染的同种细胞 500 μl 进行共培养, 汇合后, 消化并转移至 60 mm 的细胞培养皿中继续培养至汇合, 然后以 400 μg/ml G418 筛选 10~14 d (去除非转染细胞)。以适应性条件培养液 (无共培养细胞) 培养单个转染细胞克隆为对照组。对照组同样接种于 24 孔板中 (每组接种 30 个孔), 在含 400 μg/ml G418 的 DMEM/F12 中培养至汇合, 再传至 60 mm 细胞培养皿中继续培养至汇合。

**1.2.4 DNA 提取及 PCR 检测。**从 60 mm 培养皿中传代单克隆转至 6 孔培养板培养, 待细胞汇合至 90% 以上时提取基

因组 DNA (提取方法按照试剂盒说明书进行), 进行 PCR 检测, 为了避免假阳性出现, PCR 的引物设计包含乳球蛋白的 5' 调控序列的 5' 端和乳铁蛋白 cDNA 的 3' 端。引物序列为:

上游引物 5' CAGACCGCAGACATGAAACT 3'; 下游引物 5' AATCCCCACCTTCAGCAG 3'。50 μl 反应体系中加入: 10 × PCR Buffer 缓冲液 5 μl, dNTP (5 mmol/L) 1 μl, 引物各 1 μl, 模板约 100 ng, Taq 酶 0.5 μl (5 U/μl), dd H<sub>2</sub>O 补加至 50 μl。

反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 30 个循环, 最后 72 °C 保持 10 min, 4 °C 结束。取 2 μl PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.5 染色体核型分析。**将扩大培养后的单克隆细胞取一部分接种至 35 mm 培养皿, 培养至指数生长期, 加 20 μl (10 μg/ml) 秋水仙素 (终浓度为 0.1 μg/ml), 作用 2~4 h; 收集细胞于 15 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心 7 min, 弃上清液。用 0.075 mol/L KCl 溶液在 37 °C 水浴中低渗 30 min; 再加入等体积 4 °C 预冷的固定液 (冰醋酸: 甲醇 = 1:3) 混匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入上述固定液 5 ml 并轻轻悬浮细胞, 4 °C 固定 30 min 或过夜均可; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 再用 100 μl 固定液重新悬浮细胞, 取 30 μl 细胞悬液滴于 -20 °C 载玻片上, 并立即在酒精灯火焰上烤干; 用 Giemsa: PBS (pH 值 7.2) = 1:9 染色 10 min 后, 用自来水冲洗掉染液, 空气中自然干燥; 在 ×1 000 油镜下, 对伸展完好的中期染色体计数; 对典型的中期染色体拍照, 并进行核型分析。

**1.2.6 试验数据的统计分析。**所有试验重复 3 次以上, 试验数据用 X<sup>2</sup> 进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 适应性条件培养液对转染细胞单克隆生长的影响** 为检测适应性培养液对转染细胞单克隆生长的影响, 在 96 孔板中接种单个转染细胞 (1 个/孔), 2 种细胞各接种 90 个孔。其中胎儿成纤维细胞 83 孔 (含有 1 个转染细胞), 按培养液的成分随机分为 3 组: 27 个用非适应性条件培养液培养 (新鲜 DMEM/F12), 28 个用 50% (V/V) 适应性条件培养液培养, 28 个用 100% 适应性条件培养液培养。培养 20 d 后, 对各组存活克隆率进行统计分析。由表 1 可知, 100% 组获得了 21.43% (6/28) 的存活克隆率, 显著高于 0% (非适应性条件培养) 组 (1/27, 3.70%) ( $P < 0.05$ ), 比 50% 组 (3/28, 10.71%) 的存活率也有所提高, 但两者间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。50% 组的存活克隆率高于 0% (非适应性条件培养) 组, 但两者间无明显差异。乳腺上皮细胞 69 孔含 1 个转染细胞, 按同样方法分为 3 组 (0:24 孔; 50%:23 孔; 100%:22 孔)。培养 20 d 后, 对各组存活克隆率进行统计分析。结果 (图 1) 发现, 随着适应性条件培养液比例的增加, MGE 的存活克隆率呈上升趋势 (图 1), 0、50% 和 100% 组的克隆存活率依次为 0 (0/24)、4.35% (1/23) 和 13.64% (3/22), 但三者间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。上述结果表明, 100% 适应性条件培养液能够提高转染细胞形成克隆的比例 (存活率), 故后续试验用这种方法进行转基因细胞单克隆的分离与扩增。

表1 适应性条件培养液对转基因细胞克隆生长的影响

Table 1 Effect of conditioned culture medium on colony growth of transgenic cell

| 细胞类型<br>Cell types        | 适应性条件培养液浓度//%<br>Concentration of conditioned culture medium | 接种孔数//个<br>Number of inoculation hole | 存活克隆数<br>Number of survived colonies | 存活克隆率//%<br>Rate of survived colonies |
|---------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 成纤维细胞<br>Fetal fibroblast | 0  | 27                                    | 1                                    | 3.70 a                                |
|                           | 50   | 28                                    | 3                                    | 10.71 ab                              |
|                           | 100  | 28                                    | 6                                    | 21.43 b                               |
| 乳腺上皮细胞<br>MGEC            | 0  | 24                                    | 0                                    | 0 a                                   |
|                           | 50   | 23                                    | 1                                    | 4.35 ab                               |
|                           | 100  | 22                                    | 3                                    | 13.64 ab                              |

注: 同列不同字母表示差异达 0.05 显著水平 ( $P < 0.05$ ); 存活克隆数为 20 d 时的调查结果; 存活克隆率 = 存活克隆数/接种孔数。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; The number of survived colonies is the investigation results after 20 days; Rate of survived colonies = number of survived colonies/ number of inoculation hole.

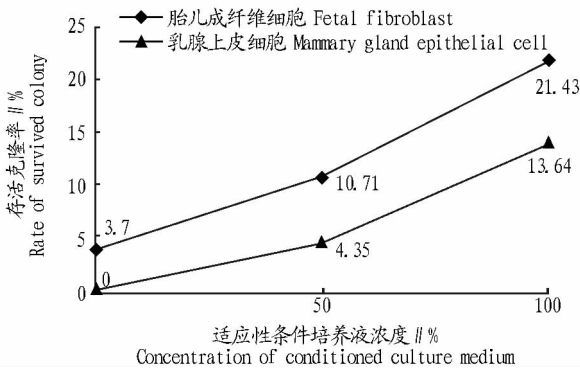


图1 适应性条件培养液对转基因细胞克隆生长的影响

Fig. 1 Effect of conditioned culture medium on colony growth of transgenic cell

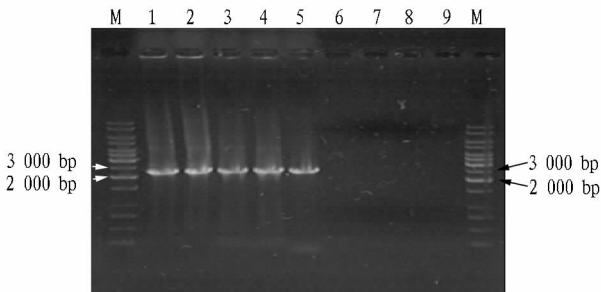
表2 共培养对转基因细胞单克隆扩大培养的影响

Table 2 Effect of co-culture on amplification culture of single transgenic cell

| 细胞类型<br>Cell type | 培养方法<br>Culture method | 样本数//孔<br>Number of samples | 扩大培养克隆率//%<br>Amplification culture colony rate | 汇合时间//d<br>Confluence time |
|-------------------|------------------------|-----------------------------|---|----------------------------|
| 胎儿成纤维细胞 FF        | 共培养组                   | 30                          | 53.33 (16/30) A                                 | 18 ~ 21                    |
|                   | 对照组                    | 30                          | 10.00 (3/30) B                                  | 40 ~ 49                    |
| 乳腺上皮细胞 MGEC       | 共培养组                   | 30                          | 33.33 (10/30) A                                 | 20 ~ 22                    |
|                   | 对照组                    | 30                          | 6.67 (2/30) B                                   | 42 ~ 49                    |

注: 同列不同字母表示差异达 0.01 显著水平 ( $P < 0.01$ )。

Note: Different letters in the same column indicate extremely significant difference at 0.01 level.



注: M 为 DNA 对照; 1 为 hLF cDNA; 2、3 为转染后的成纤维细胞株; 4、5 为转染后的乳腺上皮细胞株; 6、7 为非转染成纤维细胞株; 8、9 为非转染乳腺上皮细胞株。

Note: M. DNA control; 1. hLF cDNA; 2-3. Fetal fibroblast strain with transfection; 4-5. Mammary gland epithelial cell strain with transfection; 6-7. Fetal fibroblast strain with non-transfection; 8-9. Mammary gland epithelial cell strain with non-transfection.

图2 转染细胞 PCR 电泳结果

Fig. 2 PCR result of transfection cells

2.4 染色体核型分析 为了筛选染色体核型正常的细胞株用于后面的核移植, 笔者对上述试验中来源于单个转染细胞扩大培养后存活的细胞克隆(胎儿成纤维细胞 5 个; 乳腺上

2.2 共培养对转基因细胞单克隆扩大培养的影响 表 2 表明, 每种细胞共培养组的扩大培养克隆率极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 胎儿成纤维细胞和乳腺上皮细胞的扩大培养克隆率分别高达 53.33% 和 33.33%。共培养组汇合时间也明显被缩短 (20 ~ 30 d)。

2.3 转染细胞 PCR 检测结果 图 2 显示了转染细胞经 PCR 检测的结果, 2 ~ 5 号泳道均有大小介于 2 000 ~ 3 000 bp 的条带, 与该试验所转染的载体 pBLM-C<sub>1</sub> 中的人乳铁蛋白基因 (2 569 bp) 片段大小相同, 说明携带目的蛋白的载体成功转入山羊胎儿成纤维细胞和乳腺上皮细胞中。

皮细胞 3 个) 进行核型分析。胎儿成纤维细胞 3 个表现为正常核型 ( $2n = 58 + XY$ ) (图 3A), 乳腺上皮细胞 2 个表现为正常核型 (图 3B)。染色体核型异常的细胞克隆均表现为染色体丢失。

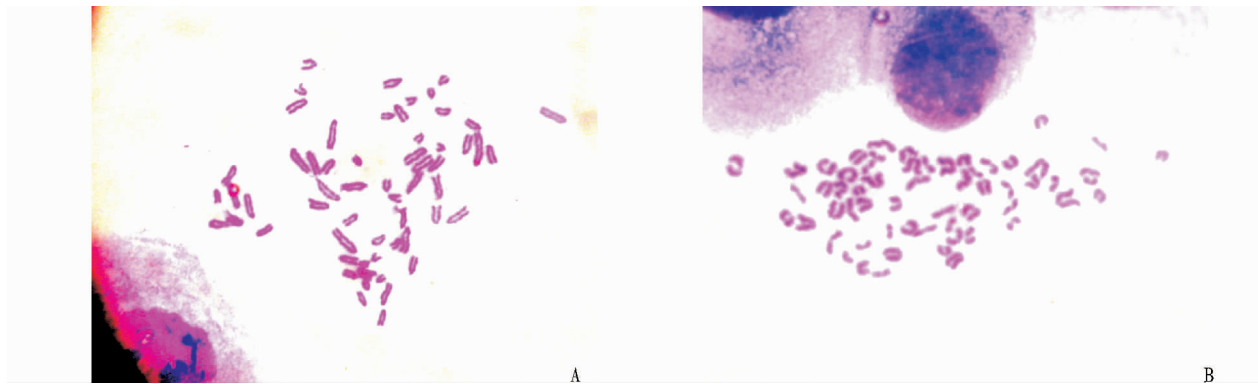
### 3 讨论

在转基因克隆过程中, 供体细胞的精心培养能预防胚胎发育时期基因的异常表达<sup>[9-11]</sup>。但以往研究缺乏关于转基因供体细胞制作过程特别是转基因细胞单克隆的分离及扩大培养的报道。该研究建立了一个细胞转染、筛选、分离纯化、扩大培养及检测的技术体系。在该研究中, 1 个转染细胞通过约 3 周生长就能扩增至  $10^6$  个, 而且这些细胞全部都能够用于核供体生产转基因克隆胚胎, 并能保证得到的所有转基因克隆胚胎的外源基因都来源于最初的 1 个转基因细胞。

生长因子和细胞活素对于哺乳动物细胞生长是必须的<sup>[12]</sup>。细胞分泌且生长所必须的生长因子有表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF)、血小板衍生生长因子 (Platelet-derived growth factor)、碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子- $\beta$  (Transforming

growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)等<sup>[12-13]</sup>。该研究用从非转染细胞培养中获得的适应性条件培养液来提高上述因子的作用。结果这种方法培养转染细胞单克隆的效率明显高于非适应性条

件培养液,表明适应性条件培养液能够促进单个细胞充分生长,这可能是由于非转染细胞分泌的某些因子的自分泌作用引起的。



注:A为胎儿成纤维细胞;B为乳腺上皮细胞。

Note: A. Fetal fibroblast; B. Mammary gland epithelial cell.

图3 山羊细胞核型分析

Fig. 3 Chromosome karyotype of goat

转基因克隆供体细胞要求来源于1个转基因阳性细胞,才能保证所获得的克隆胚具有相同的目的基因及所获活体外源基因表达水平的一致性。然而接种细胞密度低又极大地限制了细胞克隆的生长,这也间接限制了转基因克隆的应用。该研究为克服细胞密度低对细胞克隆增殖的不利影响,将单个转染细胞与非转染的同种细胞混合共培养以促进细胞的生长活力。结果发现,与非转染细胞共培养的单个转染细胞的扩大培养克隆率被显著提高,汇合时间(60 mm 培养皿)也明显被缩短(20~30 d)。

在体细胞克隆中,维持体细胞的染色体倍性非常重要。尤其是在基因转染过程中,要对细胞进行较长时间的药物抗性筛选,所以在培养过程中防止细胞过早老化对阳性克隆的筛选意义不言而喻。体外培养的细胞随培养时间延长或由于培养条件的不适(如转染、药物筛选等)而易发生染色体数量的减少或增多,形成异倍体细胞系。染色体异倍性供体细胞的增加将直接导致克隆效率下降或者就不能用于核移植<sup>[8]</sup>。因此对培养细胞特别是晚期传代细胞的染色体核型进行分析十分必要。该试验在2~3代培养细胞生长旺期收集培养液形成适应性条件培养液,过滤冻存,以备培养后期用以增加培养液中生长因子及细胞分泌的某些化学信息的含量。该试验共对8个细胞克隆进行了染色体核型分析,其中3个胎儿成纤维细胞克隆和2个乳腺上皮细胞克隆核型为30对,与实际结果相吻合。另外3个克隆表现为染色体丢失。从试验结果来看,有限的染色体异倍化似乎主要是由于染色体数量减少所致,其原因尚不清楚,有待进一步研究。

#### 4 结论

100%适应性条件培养液能够显著提高转染细胞形成克隆的比例(存活率);转染细胞单克隆与非转染细胞共培养,显著提高了扩大培养后的克隆率,汇合时间也明显被缩短,在约20 d把单个转染阳性细胞扩增至汇合(60 mm 培养皿);

PCR 鉴定结果表明,该方法获得的克隆细胞整合有 *hLF* 目的基因;核型分析表明,大部分细胞克隆染色体数目正常。该研究结果可为分离转基因细胞、理想载体的插入及诊断提供一种可靠的方法,并能降低转基因动物生产的费用及时间。

#### 参考文献

- [1] PURSEL V G, PINKERT C A, MILLER K F, et al. Genetic engineering of livestock [J]. *Science*, 1989, 244: 1281 - 1288.
- [2] KRISHER R L, GIBBONS J R, CANSECO R S, et al. Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos [J]. *Transgenic Res*, 1994, 3: 226 - 231.
- [3] PAGE R L, CANSECO R S, RUSSELL C G, et al. Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection [J]. *Transgenic Res*, 1995, 4: 12 - 17.
- [4] KUROIWA Y, KASINATHAN P, CHOI Y J, et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin [J]. *Nat Biotech*, 2002, 20: 889 - 894.
- [5] POLEJAEVA I A, CAMPBELL K H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis [J]. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 117 - 126.
- [6] KUROIWA Y, KASINATHAN P, MATSUSHITA H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin - micro and prion protein in cattle [J]. *Nat Genet*, 2004, 36: 775 - 780.
- [7] CIBELLI J B, STICE S L, GOLUEKE P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280: 1256 - 1258.
- [8] OBACK B, WELLS D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen [J]. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4: 147 - 168.
- [9] FARIN P W, CROSIER A E, FARIN C E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle [J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 151 - 170.
- [10] YOUNG L E, FERNANDES K, MCEVOY T G, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture [J]. *Nat Genet*, 2001, 27: 153 - 154.
- [11] BERTOLINI M, BEAM S W, SHIM H, et al. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63: 318 - 328.
- [12] TAKEHARA K. Growth regulation of skin fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 2000, 24: 70 - 77.
- [13] RUBIN J S, OSADA H, FINCH P W, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 802 - 806.