

郭侯, 刘长青, 陆涛峰, 等. 北京油鸡 cDNA 文库的构建及 *purH* 基因的表达 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (4): 93-99

北京油鸡 cDNA 文库的构建及 *purH* 基因的表达

郭侯^{1,2}, 刘长青^{1,3}, 陆涛峰¹, 佟春玲^{1,4}, 修晓娜¹, 关伟军^{1*}, 马月辉¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 蚌埠医学院检验系, 3. 蚌埠医学院生物科学系, 安徽 蚌埠 233030; 4. 内蒙古农业大学动物科学与医学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 利用 SMART 技术构建了北京油鸡肝脏全长 cDNA 文库, 构建的未扩增文库滴度为 1.96×10^6 pfu · mL⁻¹, 文库重组率为 92.8%, 插入片段长度为 1.23 kb, 扩增文库滴度为 1.64×10^{10} pfu · mL⁻¹。设计 *purH* 基因保守引物对该文库进行筛选, 克隆了北京油鸡 *purH* 基因 (GenBank 登录号: EU334506), 将 *purH* 基因完整开放阅读框定向插入 pEGFP-N3, 构建带有 GFP 报告基因重组表达载体 pEGFP-N3-*purH*, 将其导入北京油鸡体外培养细胞中。转染后 24、48 和 72 h, pEGFP-N3-*purH* 转染率为 10.3% ~ 53.2%, 绿色荧光均匀分布于细胞质与细胞核中。随表达量的增加, 绿色荧光在细胞核中聚集成团块状或颗粒状。结果表明, 构建的北京油鸡肝脏组织 cDNA 文库符合建库要求。

关键词: 北京油鸡; SMART cDNA 文库; *purH* 基因

中图分类号: Q344⁺.13; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030 (2010) 04-0093-07

Construction and characterization of a cDNA library from Beijing fatty chicken and expression analysis of *purH* gene

GUO Yu^{1,2}, LIU Chang-qing^{1,3}, LU Tao-feng¹, TONG Chun-ling^{1,4}, XIU Xiao-na¹,
GUAN Wei-jun^{1*}, MA Yue-hui¹

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

2. Department of Laboratory Medicine, 3. Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

4. College of Animal Sciences and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: A cDNA library from Beijing fatty chicken liver tissue was constructed according to the protocol of SMARTTM cDNA library construction kit. The titer of the initial library was 1.96×10^6 and 1.64×10^{10} pfu · mL⁻¹ respectively. The percentage of recombinants was 92.8% and average length of exogenous inserts was 1.23 kb. The full-length sequence of a *purH* gene (GenBank accession No: EU334506) was successfully amplified from the library using a pair of conserved primers. Full-length *purH* cDNA was inserted into the pEGFP-N3 vector and transfected into Beijing fatty chicken fibroblasts. The expression efficiency ranged from 10.3% to 53.2% in 24, 48 and 72 h after transformation, and green fluorescence was distributed throughout the cytoplasm and nucleus except in the cryptomere vesicle. A high quality cDNA library from Beijing fatty chicken was successfully constructed and provided a useful resource for the functional genomic research of Beijing fatty chicken.

Key words: Beijing fatty chicken; SMART cDNA library; *purH* gene

北京油鸡是我国十分重要的蛋肉两用鸡种, 具有肉质优良、风味独特鲜美等诸多优点, 2006 年被确定为 138 个国家畜禽遗传资源保护品种之一。随着生活水平的提高及营养和健康意识的增强, 消费者对畜禽肉质的要求也越来越高。因此改善和提高畜禽肉质风味研究是新时期育种学家所面临的严峻挑战^[1]。对北京油鸡、石歧杂鸡和黄羽鸡等我国重要鸡种肉质化学成分研究表明: 氨基酸、肌肉脂肪 (intramuscular fat, IMF) 和肌苷酸 (inosinic acid, IMP) 含量是影响鸡肉嫩度、多汁度与风味的主要因素, 目前已把肌苷酸含量作为衡量肉质鲜味的一个重要指标^[2-3]。

purH 是具有氨基咪唑氨甲酰核苷酸转甲酰基酶 (AICARTase) (EC 2.1.2.3) 和次黄嘌呤核苷酸环水解酶 (IMPCH) (EC 3.5.4.10) 催化活力的双功能酶, 催化嘌呤核苷酸 (肌苷酸) 合成的最后两

收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10Z198, 2007AA10Z170); 国家自然科学基金项目 (30671539); 安徽省省级自然科学基金项目 (KJ2009B255Z)

作者简介: 郭侯, 博士, 讲师, E-mail: ily0720@126.com。* 通讯作者: 关伟军, 教授, 博导, 主要从事动物细胞分子生物学研究, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn。

步反应,对肌苷酸的合成具有关键作用^[4-5]。由于癌细胞主要利用核苷酸从头合成途径提供核苷酸^[6],可通过设计结构特异性强的药物来特异地抑制嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸合成的酶类,达到抑制肿瘤细胞目的。对嘌呤核苷酸关键限速酶 *purH* 的研究主要集中在病理、生理、免疫等领域^[7]。

本研究利用 SMART 技术构建了北京油鸡肝脏全长 cDNA 文库,再从文库中克隆分离了北京油鸡 *purH* 基因,以在北京油鸡成纤维细胞中进行表达,来确定 *purH* 在细胞中的分布及亚细胞定位,并获得阳性细胞株,为进一步的功能研究及其在转基因动物克隆中开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料 7 日龄北京油鸡鸡胚与 30 日龄北京油鸡种鸡取自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所种鸡养殖场。pEGFP-N3 载体购自 Clontech 公司, pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司, SMARTTM cDNA 文库试剂盒购自 Clontech 公司,噬菌体包装蛋白 Gigapack III Gold Packaging extract 购自 Stratagene 公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, QIA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司,鼠抗 GFP 抗体购自北京百威胜公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 取北京油鸡新鲜肝脏组织 100 mg,按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,利用紫外分光光度计及甲醛变性凝胶电泳对 RNA 进行质量检测。

1.2.2 北京油鸡 cDNA 文库的构建与检测 以北京油鸡总 RNA 为模板,利用 SMART 技术构建全长 cDNA 文库,试验流程按照试剂盒操作手册进行,对其中 cDNA 合成及 LD-PCR (long-distance PCR) 等部分步骤稍做改进。CHROMA SPIN-400 柱分离纯化的 cDNA 与 λ TriplEx2 载体连接时设置 3 个不同比例 (1:0.5、1:1、1:1.5)。按照手册中相关步骤分别测定未扩增和扩增文库滴度,并挑取噬菌斑,利用特异引物 LAMF/LAMR: 5'-cca ttg tgt tgg tac ccg g-3'/5'-ata cga ctc act ata ggg cga att-3'进行 PCR 扩增,检测插入片段的大小,计算重组率。

1.2.3 *purH* 基因的克隆及真核表达载体的构建 参照 GenBank 中 *purH* 基因相关序列,设计特异性引物 F1/R1: 5'-ctc gag atg gcc gcc cgg cag cag ctc gc-3'/5'-gga tcc gtg atg gaa cag ccg aag g-3',下划线部分分别为 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点。扩增出的 *purH* 基因编码区序列经 *Xho* I 与 *Bam*H I 双酶切后定向插入脱磷酸化处理的 pEGFP-N3 载体,构建融合表达载体 pEGFP-N3-*purH*。

1.2.4 外源基因表达靶细胞的培养 取北京油鸡 7 日龄胚胎,采用组织块体外贴壁培养法进行原代细胞培养、传代、冻存与复苏^[8-9],建立成纤维细胞系并进行细胞质量检测,为外源基因的表达提供靶细胞。

1.2.5 脂质体转染及 *purH* 基因的亚细胞定位 采用脂质体转染法^[10]将 pEGFP-N3-*purH* 转入北京油鸡成纤维细胞中以探讨脂质体和 DNA 量对转染效率的影响。转染 48 h 后,将细胞按 1:4 比例传代,细胞密度达约 70%~80% 更换 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 G418 全培养液进行筛选。约 10 d 后,对照组细胞大部死亡。观察细胞克隆的形成数及荧光表达强度。将 G418 培养液更换为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,继续筛选培养,约 3~4 周后,可见明显的抗性细胞集落。使用少量胰酶消化后细胞转移至含有细胞筛选培养液的 6 孔板中扩大培养,获得稳定表达 EGFP-*purH* 成纤维细胞株。

1.2.6 融合蛋白表达 Western blot 与 RT-PCR 检测 收集扩大培养单层阳性细胞,弃培养液,经胰蛋白酶消化后收集至 10 mL 离心管中,加入适量 NP-40 裂解液裂解细胞,Bradford 法测量细胞总蛋白浓度^[11]。SDS-PAGE 电泳后利用 Bio-Rad 公司半干转膜仪转移至 PVDF 膜,加入鼠抗 GFP 一抗溶液 (1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。再加入二抗溶液 (HRP 标记羊抗鼠 IgG 1:400),37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。DAB 显色后与蛋白标准品进行比对鉴定。从扩大培养的 pEGFP-N3-*purH* 阳性细胞中提取总 RNA,反转录 cDNA 进行 RT-PCR 扩增,检测外源基因表达及整合情况。

1.2.7 数据统计与分析 转染 24、48 和 72 h 后用 Nikon C1-plus 激光扫描共聚焦显微镜观察各试验组细胞,计算转染效率。通过绿色荧光分布和亮度确定 *purH* 在细胞中的定位与表达量。使用蛋白质专家分析系统 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行特性预测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

抽提北京油鸡新鲜肝脏组织总 RNA, 经紫外分光光度计测定, A_{260}/A_{280} 值为 2.04, 含量为 $1.231 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。甲醛变性电泳显示 18S rRNA 和 28S rRNA 的条带清晰 (图 1 - A), 表示材料保存和提取过程未发生 RNA 降解。利用 LD-PCR 以 cDNA 第 1 链为模板合成 cDNA 第 2 条链, 其产物为 0.5 ~ 4.0 kb, 隐约可见若干 DNA 带 (图 1 - B), 这表明合成的 cDNA 符合建库要求。

2.2 北京油鸡 cDNA 文库的构建与滴度鉴定

采用 CHROMA SPIN 400 分离柱分级分离, 滤出引物和小片段的 cDNA (小于 0.5 kb) 等。分级分离片段大小不同等级共 15 个离心管, 结果显示第 4 ~ 7 管中存在所需 cDNA (图 2 - A)。在设定的 3 个连接反应中 (1:0.5、1:1、1:1.5), 双链 cDNA 与载体的连接最佳比例为 1:1.5 (表 1); 未扩增文库容量为 $1.96 \times 10^6 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 扩增文库容量为 $1.64 \times 10^{10} \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

从文库中随机挑取 125 个克隆, 进行菌液 PCR 分析, 估计文库的重组率和插入片段大小。菌液 PCR 的电泳 (图 2 - B) 结果表明: 重组率为 92.8% (116/125)。扩增片段平均长度为 1.23 kb, 1 ~ 2 kb 长度的占 63.8%, 0.5 ~ 1.0 kb 长度的占 36.2%。

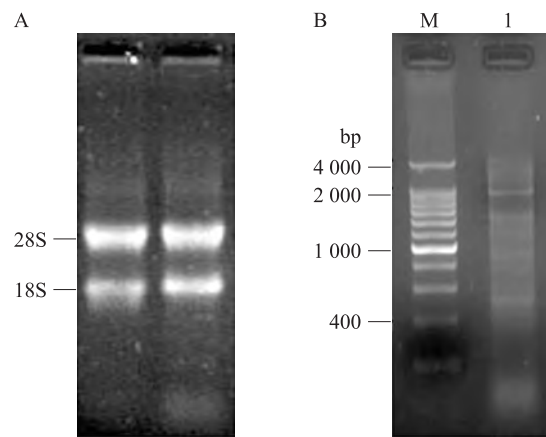


图 1 北京油鸡肝脏组织总 RNA (A) 及 cDNA 合成 LD-PCR 产物 (B) 电泳图

Fig. 1 Total RNA from liver of Beijing fatty chicken (A) and the products of LD-PCR (B)

M. DNA marker; 1. LD-PCR 22 个循环产物 The product of LD-PCR with 22 cycles

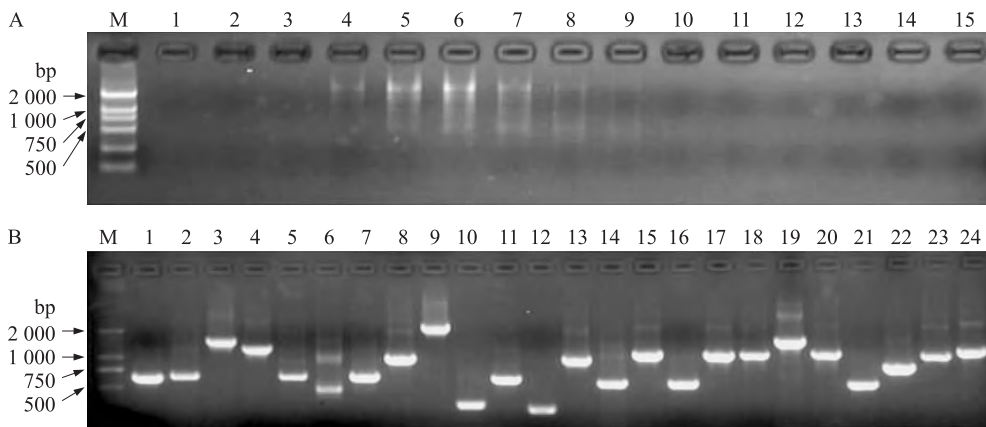


图 2 cDNA 文库的分离纯化检测 (A) 及重组克隆检测 (B)

Fig. 2 cDNA size fractionation by CHROMA SPIN -400 (A) and recombinant clones screening (B)

A. 1 ~ 15 为回收管号; B. 1 ~ 24 为文库中随机挑选出来的克隆; M. DNA 标准品 (DL 2000)

A. 1 - 15. Tube serial number; B. 1 - 24. PCR products for clones selected randomly; M. DNA marker (DL 2000)

表 1 构建北京油鸡 SMART cDNA 文库的滴度及质量检测

Table 1 Characterization of the primary and amplified cDNA libraries of Beijing fatty chicken

原始文库编号 No. of primary libraries	cDNA 与载体比例 Ligation ratio of cDNA to vector	原始文库滴度/ ($10^6 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) Titer of primary libraries	原始文库重组率/% Recombination efficiency of primary libraries	扩增文库滴度/ ($10^{10} \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) Titer of amplified libraries	扩增文库重组率/% Recombination efficiency of amplified libraries
1	1:0.5	0.86	92.2	—	—
2	1:1	1.28	93.4	1.22	90.4
3	1:1.5	1.96	92.4	1.64	92.8

2.3 北京油鸡 *purH* 基因真核表达载体的构建

在 GenBank/EMBL/DBJ 数据库进行同源性检索, 北京油鸡 *purH* 基因与小家鼠、人类和犬分别具有 83%、82% 和 80% 的同源性, 编码 593 个氨基酸, 估计相对分子质量为 64.4×10^3 , 等电点为 8.17, 经 SignalP 3.0 分析不存在信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)。将 *purH* 基因完整开放阅读框定向插入 pEGFP-N3, 构建重组表达载体 pEGFP-N3-*purH* (图 3-A), 重组质粒利用 *Xho* I 与 *Bam*H I 双酶切检测, 可见 4.7 kb 与 1.8 kb 两条带 (图 3-B)。

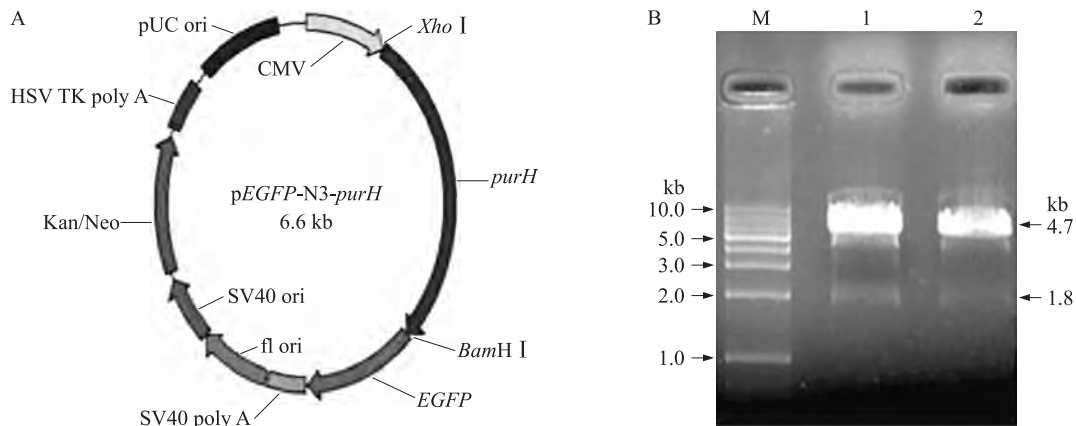


图 3 重组真核表达载体 pEGFP-N3-*purH* 的构建及鉴定

Fig. 3 Construction and identification of recombinant vector pEGFP-N3-*purH*

A. 重组真核表达载体 pEGFP-N3-*purH* 的构建结构图; B. 重组载体 pEGFP-N3-*purH* 的双酶切鉴定: M. 1 kb DNA ladder, 1, 2. 真核表达载体 pEGFP-N3-*purH* *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。

A. The construction of recombinant vector pEGFP-N3-*purH*; B. pEGFP-N3-*purH* was identified by double restricted digestion: M. 1 kb DNA ladder, 1, 2. pEGFP-N3-*purH* was double digested by *Xho* I and *Bam*H I.

2.4 *purH* 在转染细胞中表达

利用组织块体外贴壁培养法成功构建北京油鸡胚胎成纤维细胞系 (BJEM 2/2), 共计冻存个体数 22 个, 冻存细胞达 151 支, 平均每支细胞含量为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 并根据 ATCC 细胞质量标准对其进行质量测定, 为外源基因在细胞中的表达提供高质量的靶细胞 (图 4-A、B、C)。重组表达载体 pEGFP-N3-*purH* 转染 12 h 后可见淡绿色荧光细胞; 48~72 h 左右阳性细胞最多, 荧光强度明显增强, 多为明亮的绿色荧光, 转染率为 10.3%~53.2% (图 4-D、E)。转染 pEGFP-N3 阳性对照组与 pEGFP-N3-*purH* 组的细胞活率分别为 96.8% 和 95.3%, 与未转染的对照组 (97.4%) 无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.5 EGFP-purH 的亚细胞定位及单克隆阳性细胞株的建立与鉴定

转染 48 h 后, G418 抗性筛选与克隆集落扩大培养, 得到表达 EGFP-*purH* 融合蛋白基因的北京油鸡成纤维细胞株 (图 4-F)。观察绿色荧光在细胞中分布确定外源基因的定位, 结果发现, pEGFP-N3 对照组中, 绿色荧光均匀分布于整个细胞, 呈现弥散分布, 说明有绿色荧光蛋白 GFP 表达 (图 5-A); 而转染融合基因 pEGFP-N3-*purH* 细胞中, 转染 24 h 后, 开始出现绿色荧光, 均匀分布于整个细胞中; 转染 48 h 后, 细胞核内绿色荧光明显增强, 而细胞质中荧光较弱, 说明 EGFP-*purH* 在北京油鸡细胞中均有分布 (图 5-B、C、D), 但表达量高时, 细胞核中含量会明显增多, 在细胞核中聚集成团块状或颗粒状 (图 5-E、F)。

北京油鸡细胞自身不表达 GFP, 而构建的真核融合表达载体 pEGFP-N3-*purH* 带有 GFP 基因, 根据 GFP 序列设计特异性引物, 提取阳性细胞总 RNA, 反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 716 bp 扩增片段, 与预期片段大小正好相符, 从 mRNA 转录水平上证实了荧光蛋白基因已整合至北京油鸡成纤维细胞基因组中, 并能够正常的表达, 而且 pEGFP-N3-*purH* 转染组 *purH* 基因表达量明显高于对照组 (图 6-A)。利用 GFP 单克隆抗体 Western blot 检测融合蛋白表达结果显示, 在北京油鸡成纤维细胞中表达的 EGFP-*purH* 融合蛋白能够特异性结合 GFP 单克隆抗体, 融合蛋白在相对分子质量 92×10^3 处具有明显的条带, 而转染 pEGFP-N3 的阳性对照组的 GFP 蛋白在 29×10^3 处显带 (图 6-B)。

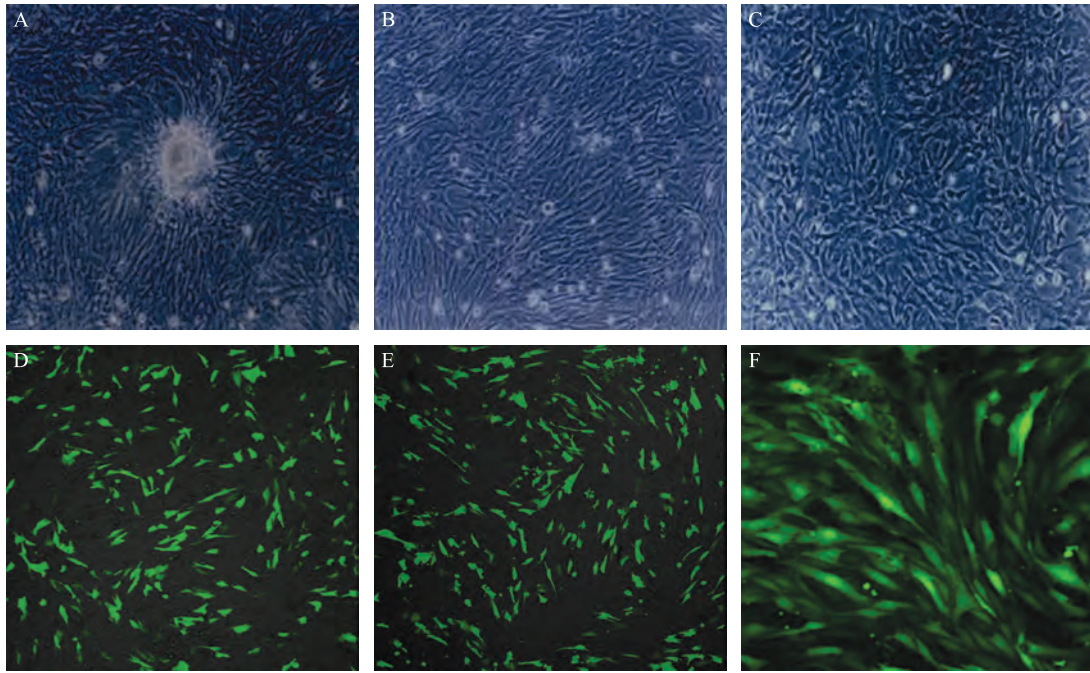


图4 北京油鸡成纤维细胞的培养与 pEGFP-N3-purH 融合表达 ($\times 100$)

Fig. 4 Culture of Beijing fatty chicken fibroblasts and expression of recombinant pEGFP-N3-purH

A. 北京油鸡原代细胞; B. 北京油鸡继代细胞; C. 北京油鸡复苏后细胞; D, E. 分别为 pEGFP-N3-purH 与 pEGFP-N3 转染 48 h 的细胞; F. pEGFP-N3-purH 阳性细胞株集落

A. Primary cells from Beijing fatty chicken; B. Fibroblasts before freezing; C. Fibroblasts after recovery for 12 h; D, E. The expression of pEGFP-N3-purH and pEGFP-N3 after transfection 48 h; F. pEGFP-N3-purH cell line colony

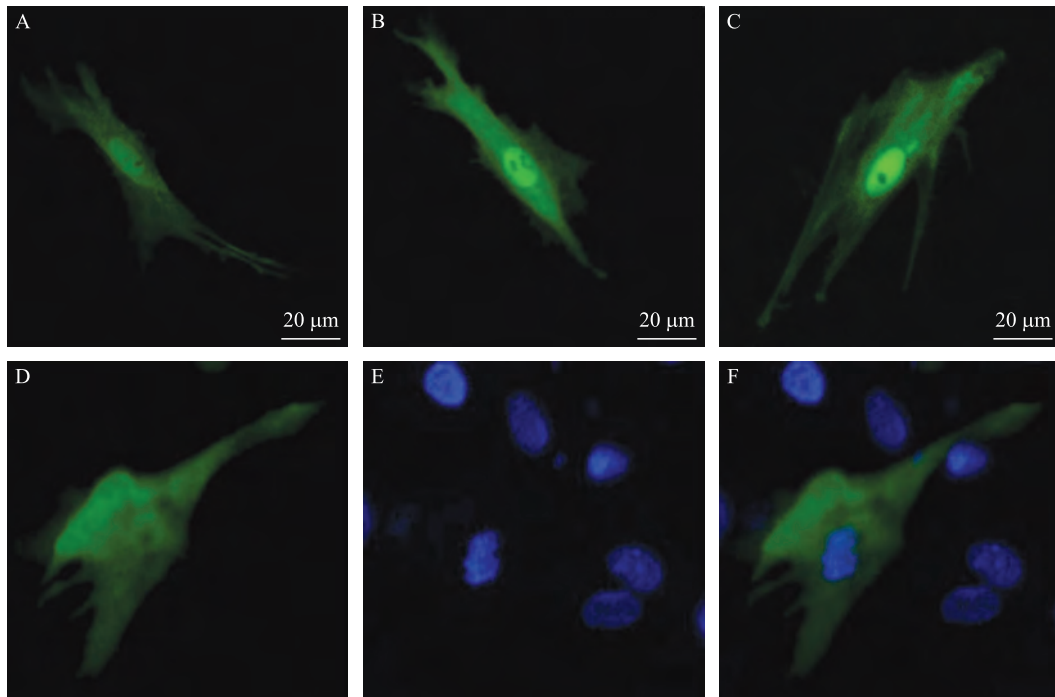


图5 EGFP-purH 融合蛋白在转染细胞中的分布

Fig. 5 The subcellular location of EGFP-purH fusion protein in Beijing fatty chicken fibroblasts

A. pEGFP-N3 在细胞中均匀分布; B~D. EGFP-purH 在细胞核与细胞质中均有分布, 但多位于细胞核内 (488 nm 激发); E. 用 DAPI 对转染融合基因细胞进行细胞核染色 (405 nm 激发); F. 为 D、E 两个图片在共聚焦显微镜的结合图

A. The subcellular location of pEGFP-N3; B-D. The location of EGFP-purH excitation at 488 nm; E. Nuclei stained with DAPI (excited at 405 nm); F. The overlay images produced by merging all three signals

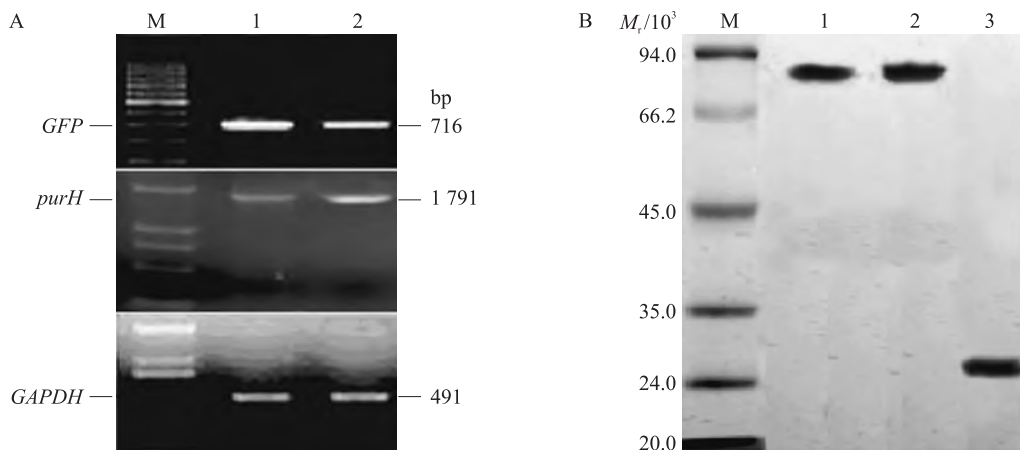


图6 pEGFP-N3-purH 成纤维细胞株的 RT-PCR 产物检测 (A) 与重组融合蛋白表达的 Western blot 鉴定 (B)

Fig. 6 Detection of the expression of *purH* gene in transfected positive cells by RT-PCR (A) and Western blot (B)

A: M. DNA 标准品, 1. pEGFP-N3 转染阳性对照组, 2. pEGFP-N3-purH 转染组;

B: M. 蛋白标准品, 1~2. EGFP-purH 融合蛋白, 3. pEGFP-N3 的阳性对照组

A: M. DNA marker, 1. Fibroblasts transfected by pEGFP-N3, 2. Fibroblasts transfected by pEGFP-N3-purH;

B: M. Protein marker, 1-2. Western blot of the EGFP-purH, 3. Western blot of the pEGFP-N3

3 讨论

3.1 北京油鸡 cDNA 文库的构建

构建 cDNA 文库是目前进行功能基因组学研究最基本最重要的手段之一。在特定组织细胞中, 不同分化时期的细胞基因表达种类和强度也不尽相同, 所以 cDNA 文库具有组织细胞特异性。目前在构建全长 cDNA 文库的众多方法中, 最关键的问题仍然是如何最大程度地获得 5' 端序列。SMART 技术巧妙地利用了反转录酶模板转换特性, 更好地保护了 mRNA 的 5' 端序列, 提高了全长 cDNA 在文库中的比例。

DNA 文库的质量直接影响文库的使用价值, 它具体反映在两个方面: 一是文库的代表性, 它是体现文库质量的最重要指标, 可用文库的库容量来衡量。一般来说, 原始文库的库容量不低于 1.7×10^5 个独立克隆才能确保 99% 低丰度 mRNA 出现在文库中^[12]。插入片段长度是反映文库质量另一个重要指标, 插入片段长度不低于 1.0 kb 才能确保 cDNA 片段的完整性^[13]。本文所构建的北京油鸡 cDNA 文库滴度为 1.96×10^6 pfu · mL⁻¹, 插入片段长度大约为 1.23 kb, 文库重组率为 92.8%, 各项主要指标均达到或超过上述文库构建标准。

3.2 EGFP-purH 在细胞中的表达

试验过程中, 生长增殖速度快的对数期细胞转染效率更高, 在进行细胞转染试验中应选用生长状态良好的细胞, 可能由于细胞正处于生长旺盛时期, 蛋白质合成较为活跃, 因而荧光蛋白表达量也较高。通过对比发现, 对数生长期转染细胞的生长和增殖状态与对照组比较没有明显差异, 说明在一定范围内转染细胞不受外源基因蛋白的影响。另外, 研究发现荧光蛋白基因转染人成纤维细胞和某些肿瘤细胞时也发现, GFP 表达对细胞的倍增时间没有明显影响^[14], 与本研究结果一致。细胞核作为储存、复制和转录遗传信息的场所, 控制着整个细胞的生命活动, 本研究利用构建融合表达载体在北京油鸡成纤维细胞中的表达 EGFP-purH, 确定 *purH* 在细胞核与细胞质均有分布, 但当表达量高时, 主要分布于细胞核内, 为进一步深入研究 *purH* 基因的功能提供了线索和思路。

3.3 北京油鸡成纤维细胞 pEGFP-N3-purH 阳性细胞株的建立及鉴定

部分细胞荧光强度很弱, 可能与转入细胞外源基因拷贝量较少有关, 也可能是少量细胞没有荧光但在 G418 抗性筛选过程中一直存活, 究其原因可能是因为荧光蛋白基因在细胞中被随机切开, 不能表达, 但抗性基因没有被破坏, 能正常表达, 使其具有抗药性却不表达荧光。由于我们采用的脂质体转染方式为瞬时转染, 能观察到绿色荧光, 并不能确定其是否已经整合至细胞染色体上, 必须进行克隆化细

胞培养。本研究挑取 GFP 转染稳定、表达效率高的细胞, 采用有限稀释法进行稀释培养与药物抗性筛选, 可见多个明显的抗性细胞集落, 再对细胞集落进行扩大培养, 可获得稳定表达 pEGFP-N3-*purH* 成纤维细胞株, 经 RT-PCR 与 Western blot 证实目的基因已整合至细胞基因组中, 并获得正常的表达。成纤维细胞由于培养方便、生长速度快、转基因效率高和易形成单克隆等特点, 在转基因动物克隆过程中已逐渐成为当前提供核供体的优势细胞。但同时成纤维细胞也存在单克隆培养时, 细胞密度低, 不容易生长和存活, 较肿瘤细胞和转化无限细胞系形成克隆慢等缺点。本研究通过采用对数生长期培养细胞进行有限稀释, 进行抗性筛选, 初步建立以绿色荧光蛋白为报告基因的转基因成纤维细胞体外克隆化培养及筛选模式。

参考文献:

- [1] Rege J E O, Gibson J P. Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation [J]. *Ecological Economics*, 2003, 45: 319-330
- [2] 陈国宏, 侯水生, 吴信生. 中国部分地方鸡肌肉肌苷酸含量研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31 (3): 211-215
- [3] 陈继兰, 赵桂苹, 郑麦青, 等. 快速与慢速肉鸡脂肪生长与肌苷酸含量的比较 [J]. *中国家禽*, 2002, 24 (8): 16-18
- [4] Akira T, Komatsu M, Nango R, et al. Molecular cloning and expression of a rat cDNA encoding 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase [J]. *Gene*, 1997, 197: 289-293
- [5] Rayl A E, Moroson B A, Beardsley G P. The human *purH* gene product, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase cloning, sequencing, expression, purification, kinetic analysis, and domain mapping [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (4): 2225-2233
- [6] Jancso M A, Sculaccio S A, Thiemann O H. Identification of sugarcane genes involved in the purine synthesis pathway [J]. *Genet Mol Biol*, 2001, 24 (1/4): 251-255
- [7] Bullock K G, Beardsley G P, Anderson K S. The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ATIC (5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase) a surprising lack of substrate channeling [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (25): 22168-22174
- [8] Liu C Q, Guo Y, Guan W J, et al. Establishment and biological characteristic research of Luxi cattle fibroblast cell bank [J]. *Tissue Cell*, 2008, 40: 417-424
- [9] Freshney R I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* [M]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000: 149-175
- [10] Masuda H, Takenaka Y, Yamaguchi A, et al. A novel yellowish-green fluorescent protein from the marine copepod, *Chiridius poppei*, and its use as a reporter protein in HeLa cells [J]. *Gene*, 2006, 372: 18-25
- [11] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation [J]. *Meth Mol Biol*, 1994, 32 (1): 9-15
- [12] 刘学东, 张子栋, 郑冬, 等. 东北马鹿鹿茸软骨组织 cDNA 文库构建及 IGF2 基因克隆与结构分析 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41 (9): 2806-2812
- [13] 李易, 黄薇, 张新, 等. 恒河猴大脑前额叶 cDNA 文库的构建 [J]. *动物学研究*, 2006, 27 (3): 325-330
- [14] 黄倩, 李川源. 绿色荧光蛋白质粒 DNA 作为活细胞标记基因的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23 (3): 264-266

责任编辑: 周广礼