

# 藏羚羊成纤维细胞系的建立及其核型分析

刘坤 苏广华 段彪 魏著英 吴侠 李光鹏\*

内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021

**摘要:**藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)是我国特有的国家 I 级重点保护野生动物,生存在高海拔低氧环境下,具有高原生物的细胞遗传特性。实验采用组织块贴壁培养法进行原代培养,后经差异贴壁法联合消化排除法纯化,成功构建了藏羚羊成纤维细胞系,并对培养不同代次细胞的形态、生长动力学、染色体核型等进行了研究。结果表明,培养得到的藏羚羊细胞为典型的成纤维细胞,第 7、10、15 代细胞群体倍增时间分别为 26、48、50 h。细胞的生长均为“S”型。染色体中二倍体染色体( $2n = 60$ )占主体,所占比例为 65%~91%,包括性染色体 X、Y 在内均为端着丝粒类型,染色体组的总相对长度为 193.45,平均相对长度为 3.22,未发现随体、次缢痕等特殊标志性特征。

**关键词:**藏羚羊;生长曲线;染色体;核型

**中图分类号:**Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)01-16-09

## Culture of the Fibroblast Cells and Their Karyotype Analyses in *Pantholops hodgsonii*

LIU Kun SU Guang-Hua DUAN Biao WEI Zhu-Ying WU Xia LI Guang-Peng\*

The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education,  
Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

**Abstract:** *Pantholops hodgsonii* is a unique wild animal species in China, and it is listed as an Appendix species by CITES and as Category I by the Key Protected Wildlife List of China. Individuals of *P. hodgsonii* live in high altitude and low oxygen environment, with typical genetic characteristics of plateau animals. The *P. hodgsonii* fibroblast cells derived from a piece of ear margin tissue were successfully cultured and then purified by differential attachment in combination with digestion elimination methods. The morphology, dynamic growth, and karyotypes of the cultured cells at different passages were analyzed. The results showed that the cultured cells had typical characteristics of fibroblasts. The population doubling times (PDT) of passage 7, 10 and 15 were 26 h, 48 h, and 50 h, respectively. The growth curve of the cultured cells appeared “S” shape, and diploid cells ( $2n = 60$ ) were dominant (65% - 91%). All of the chromosomes were telocentric (including X and Y chromosomes). The total and average relative length of chromosome set was 193.45 and 3.22, respectively. No satellites and secondary constriction were observed in the present study.

**Key words:** *Pantholops hodgsonii*; Growth curve; Chromosome; Karyotype

**基金项目** 国家高新技术发展计划(863)项目(No. 2008AA10Z159),内蒙古大学生殖生物学及生物技术教育部创新团队项目;

\* 通讯作者, E-mail: guangpengli@yahoo.com;

**第一作者介绍** 刘坤,男,硕士研究生;研究方向:哺乳动物生殖生物技术;E-mail:87liukun@163.com。

**收稿日期:**2011-07-18, **修回日期:**2011-11-09

藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)隶属偶蹄目牛科藏羚羊属,是我国青藏高原特有的物种,是国家 I 级重点保护野生动物<sup>[1-4]</sup>。它主要分布在西藏和青海大部以及新疆南缘、四川西北部和甘南的部分地区<sup>[5]</sup>。在高海拔、严重缺氧的环境中,具有极强的运动能力和低氧耐受能力<sup>[6]</sup>。藏羚羊身体的组织细胞可能存在某些特异的遗传基因,为其适应高原环境提供相应保证。

随着气候及环境的变化,藏羚羊的生存环境变得严峻,数量呈下降趋势<sup>[7]</sup>。了解藏羚羊的独特遗传特征,保护、保存和挖掘其遗传资源,在细胞与基因水平上保护与利用其遗传资源,是现代生物技术参与保护珍稀野生动物的重要举措。随着藏羚羊全基因组序列的测序完成<sup>[8]</sup>,标志着对藏羚羊的了解与保护已进入了细胞、分子水平研究的新阶段。

目前,有关藏羚羊的研究主要集中在宏观生态学方面<sup>[9-11]</sup>,而对藏羚羊个体的细胞、分子水平的研究甚少。系统地对藏羚羊细胞进行培养,观察细胞的生物学特性以及核型分析等尚未见相关报道,仅中国科学院西北高原生物研究所在“藏羚羊种间克隆胚胎的构建”的成果鉴定中对藏羚羊细胞培养有研究(个人通讯)。为此,本文对藏羚羊体细胞培养、细胞生长曲线绘制、分裂时期测定、染色体核型制备与分析等进行了研究,在实现细胞水平上对濒危珍稀动物种质保护的同时,可为今后基因组及其转录组学水平上深入探讨藏羚羊优秀种质遗传资源提供必要的细胞遗传学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 实验使用的藏羚羊组织,来自青海省野生动物保护园区。

**1.1.2 主要试剂、仪器** PBS、DMEM/F12、秋水仙胺、青链霉素购自 Gibco 公司,胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、Giemsa 均购自 Sigma 公司,标准胎牛血清为 TBD 产品,其余无机盐均为国产分析纯。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Galaxy A, RXBiotech)、超净工作台(ZHICHENG, XHJH-

1112B)、倒置相差显微镜(NIKON BIOPHOT)、离心机(Eppendorf Centrifuge 5415R)。

### 1.2 方法

**1.2.1 耳源组织块的收集** 在征得有关部门的同意后,选取一只健康成年藏羚羊。用剪毛剪将耳尖部的毛除净,再用酒精及碘酒棉球反复擦拭消毒。之后,快速剪下耳尖约 1 cm<sup>2</sup> 组织块,经含青链霉素的 PBS 清洗后,用 75% 的酒精快速消毒 3~5 s,再用 PBS 洗涤,之后放入含有青链霉素的 PBS 离心管,在约 4℃ 条件下带回实验室。

**1.2.2 细胞的原代培养** 将藏羚羊耳组织块用无菌小镊子去除未剪净的耳毛,75% 酒精浸泡 30 s,再用 PBS 冲洗 3 次,用手术刀片剔除耳骨和结缔组织后,无需使用胰蛋白酶消化,直接将皮肤剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块,用 1 ml 移液器将组织块均匀分布在 100 mm 的培养皿中。培养皿倒置于 38.5℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中贴壁培养 2.5 h,再将培养皿正置并加入 10 ml 含有 20% 血清的 DMEM/F12 培养液,入 38.5℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,常规方法换液,每隔 3 天换液一次。在培养约 12 d 后,基本形成原代细胞。

**1.2.3 细胞传代** 当培养的原代细胞生长到汇合度达 70%~80% 时,弃去培养液,PBS 洗涤,加 1~2 ml 浓度为 0.05% 的胰蛋白酶,放入培养箱消化 2 min,待大部分细胞收缩变圆、即将脱壁时,加入含 10% 血清的 DMEM/F12 培养液终止消化。用移液器将细胞吹打呈游离的悬浮细胞,再移至离心管中,经 1 600 r/min 离心 5 min 后收集细胞,按照传代前与传代后 1:3 的细胞数目比例传入培养皿中,放回培养箱中继续培养。每隔 24 h 换液并继续培养,等汇合度再到 70%~80% 时,进行下一次传代。

**1.2.4 成纤维细胞的纯化** 由于成纤维细胞和上皮样细胞对胰蛋白酶的敏感度不同,成纤维细胞往往会先被消化起来,而上皮细胞因敏感度较差后消化起来。经过 3~5 次传代后,可得到纯化的成纤维细胞。

**1.2.5 细胞冻存** 在细胞传代时,要将一部分细胞进行冷冻保存。在冻存时,将离心后收集到

的细胞移到含有 10% DMSO 和 20% 血清的冻存液中,调整细胞密度为  $4 \times 10^5$  个/ml。将细胞悬液分装在冻存管中,密封,标记后放入细胞程序性降温盒,  $-80^\circ\text{C}$  过夜,次日转入液氮罐中保存。

**1.2.6 细胞复苏** 将冻存管从液氮罐中取出,迅速放入  $38^\circ\text{C}$  的水浴锅中,不停晃动约 1 min,细胞解冻。把解冻后细胞移入含有培养液的离心管中,  $1\ 600\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,弃上清后加入新鲜培养液,制成细胞悬液转入培养瓶中。将培养瓶置于  $38.5^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中, 24 h 后更换培养液。

**1.2.7 细胞生物学分析** 实验以藏羚羊第 7 代细胞作为对照,分别对第 7、10、15 代细胞进行以下实验分析。

**1.2.7.1 细胞活力测定** 采用台盼蓝拒染法<sup>[12]</sup>,对冻存前后的第 7、10、15 代细胞进行染色,计算细胞存活率。

**1.2.7.2 生长曲线绘制** 常规消化细胞,将第 7、10、15 代的细胞浓度调整到  $1 \times 10^4$  个/ml,接种于 24 孔板内。从接种时间起,每隔 24 h 计数 3 个孔内细胞数,取 3 个孔细胞数目的平均值,连续计数,绘制细胞生长曲线。

**1.2.7.3 分裂相制备** 以  $1.65 \times 10^4$  个/ml 密度将第 7 代细胞接种于 4 个 35 mm 培养皿中,分别于第 1、2、3、4 天, PBS 洗涤, 甲醇固定, Giemsa 染色,观察其分裂相情况。

**1.2.8 染色体制备** 在细胞传代时,将一皿细胞以  $1.65 \times 10^4$  个/ml 的浓度接种于培养瓶中, 12 h 后换液。再培养 48 h 后,换成含有终浓度为  $0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$  秋水仙胺的培养液,继续培养 5 h。然后,吸除培养液,加入 0.05% 胰酶消化细胞。收集细胞悬液,经  $1\ 600\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,弃去上清。加  $0.075\ \text{mol}/\text{L}$  的氯化钾低渗液于室温下低渗 40 min,以  $1\ 600\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,弃去上清。

第一次固定,加入甲醇与冰乙酸的体积比为 3:1 的混合液 5 ml(现用现配)固定 30 min。以  $1\ 600\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,弃去上清液。再经第二、三次固定,方法同第一次。弃去上清液,留 0.5 ~ 1.0 ml 左右制成细胞悬液,用 100  $\mu\text{l}$

的移液器吸取细胞悬液,滴在冰冷洁净的载玻片上。滴与滴之间勿重叠,置于空气中至少干燥 24 h。再经 Giemsa 染色 20 min,流水冲洗,自然干燥后镜检。

**1.2.9 核型分析** 挑选形态清晰、分散度良好、收缩适中的染色体中期分裂相,在油镜下进行拍照,并统计染色体数目。取无相互重叠、数目完整的中期染色体,利用 ADOBE PHOTOSHOP 7.0 进行染色体剪贴,对同源染色体进行配对、测量、排队,并按 Levan 标准确定着丝粒类型<sup>[13]</sup>。

**1.2.10 数据统计** 实验细胞活率计数中的数据,经 3 次测量取平均值获得;生长曲线中各组数据,均通过 6 次计数取平均值获得;染色体相对长度经过 3 次测量,取平均值所得,并进行标准差计算。

## 2 结果

**2.1 细胞培养条件与细胞形态观察** 在  $38.5^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中通过原代、传代培养,获得了纯化的藏羚羊成纤维细胞,对不同代次细胞观察,细胞生长状态良好(图 1),为典型的梭型长条状或不规则多角形,边缘清晰。在相差显微镜下观察,细胞立体形态明显,细胞膜完整。经细胞冷冻、复苏后,细胞活力无明显改变(表 1)。

表 1 藏羚羊成纤维细胞存活率

Table 1 Survival rate of *Pantholops hodgsonii* fibroblast cells

	代数 Passages		
	第 7 代 Passage 7	第 10 代 Passage 10	第 15 代 Passage 15
冻存前活率 (%)	96.6	94.5	93.5
Survival rate before freezing			
复苏后活率 (%)	94.9	92.5	93.2
Survival rate after thawing			

**2.2 细胞生长曲线** 对藏羚羊第 7、10、15 代细胞进行连续 8 d 计数(表 2),根据该数据使用 EXCEL 软件绘制成细胞的生长曲线(图 2)。不同代次的细胞生长曲线均为“S”型,细胞倍增时间分别为 26、48、50 h,可见细胞在体外培养条件下,生长速度会随代次增加有所减慢。

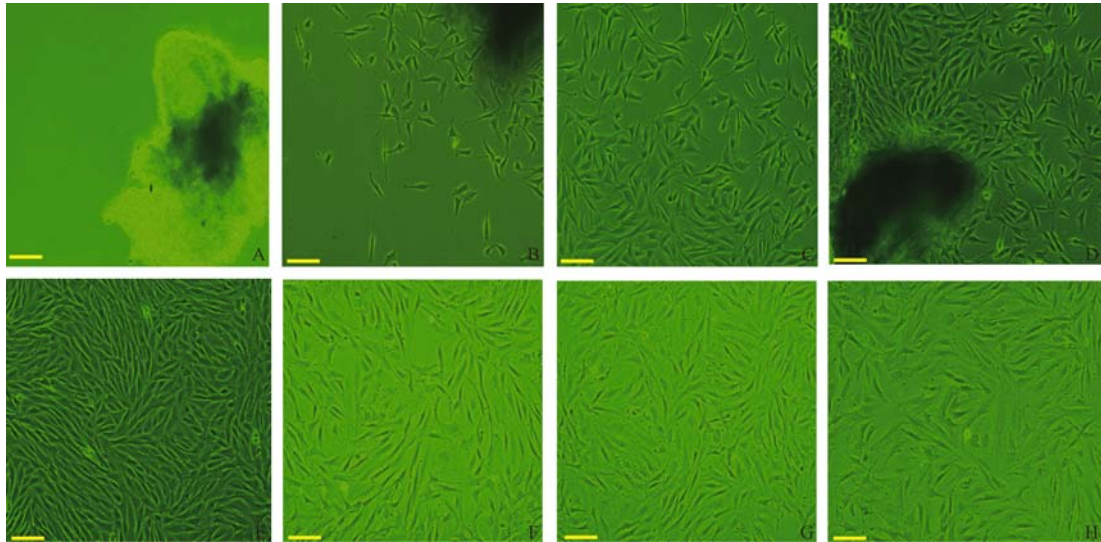


图 1 藏羚羊不同代次细胞(×100)

Fig. 1 Different passages of *Pantholops hodgsonii* cells

A. 贴壁第 2 天; B. 贴壁第 5 天; C. 贴壁第 8 天; D. 贴壁第 10 天; E. 原代细胞; F. 第 7 代细胞; G. 第 10 代细胞; H. 第 15 代细胞。标尺 = 100 μm

A, B, C and D: 2, 5, 8 and 10 days after adhering to dish, respectively; E: The primary cells; F, G, and H: The passage 7, 10 and 15 cells, respectively. Bar = 100 μm

表 2 藏羚羊成纤维细胞计数结果(10<sup>4</sup>/ml)

Table 2 Counting of daily growing fibroblast cells at different passages in *Pantholops hodgsonii*

	培养天数 Days of culture(d)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
第 7 代 Passage 7	1.00	2.92	5.67	8.54	13.33	21.38	23.46	24.63	24.33
第 10 代 Passage 10	1.00	2.88	4.67	8.08	11.17	16.50	19.29	22.88	23.46
第 15 代 Passage 15	1.00	2.29	4.00	7.17	10.92	12.58	15.88	20.71	20.25

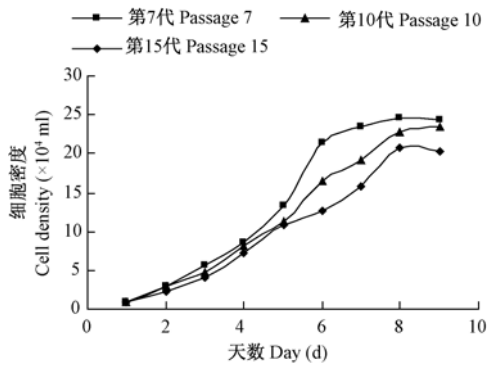


图 2 藏羚羊细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of the fibroblast cells in *Pantholops hodgsonii*

2.3 分裂相情况与秋水仙胺处理时间的确定  
对培养 12、24、48、72 h 的第 7 代细胞进行固

定并染色,发现细胞培养 24 h 后即有分裂相出现(图 3)。由于细胞中期分裂相存在时间短暂且染色后与未分裂细胞差异不显著,故图 3 中以黑色箭头指示细胞后末期分裂相。

通过分裂相的制备,明确了细胞的适应期低于 24 h,且在 48 h 分裂相开始明显增加。细胞生长曲线更清晰地表明,在 48 h 细胞会进入指数生长期。经过以上细胞生长状况的分析,确定了加入秋水仙胺的合适时间,即细胞接种培养 60 h 后。

2.4 细胞染色体数目分析 分别制备第 7、10、15 代细胞的核型(图 4),参照已发表计数方法<sup>[14-15]</sup>,每代取 100 个分裂相进行统计(表 3)。结果表明,不同代次藏羚羊细胞的主体染

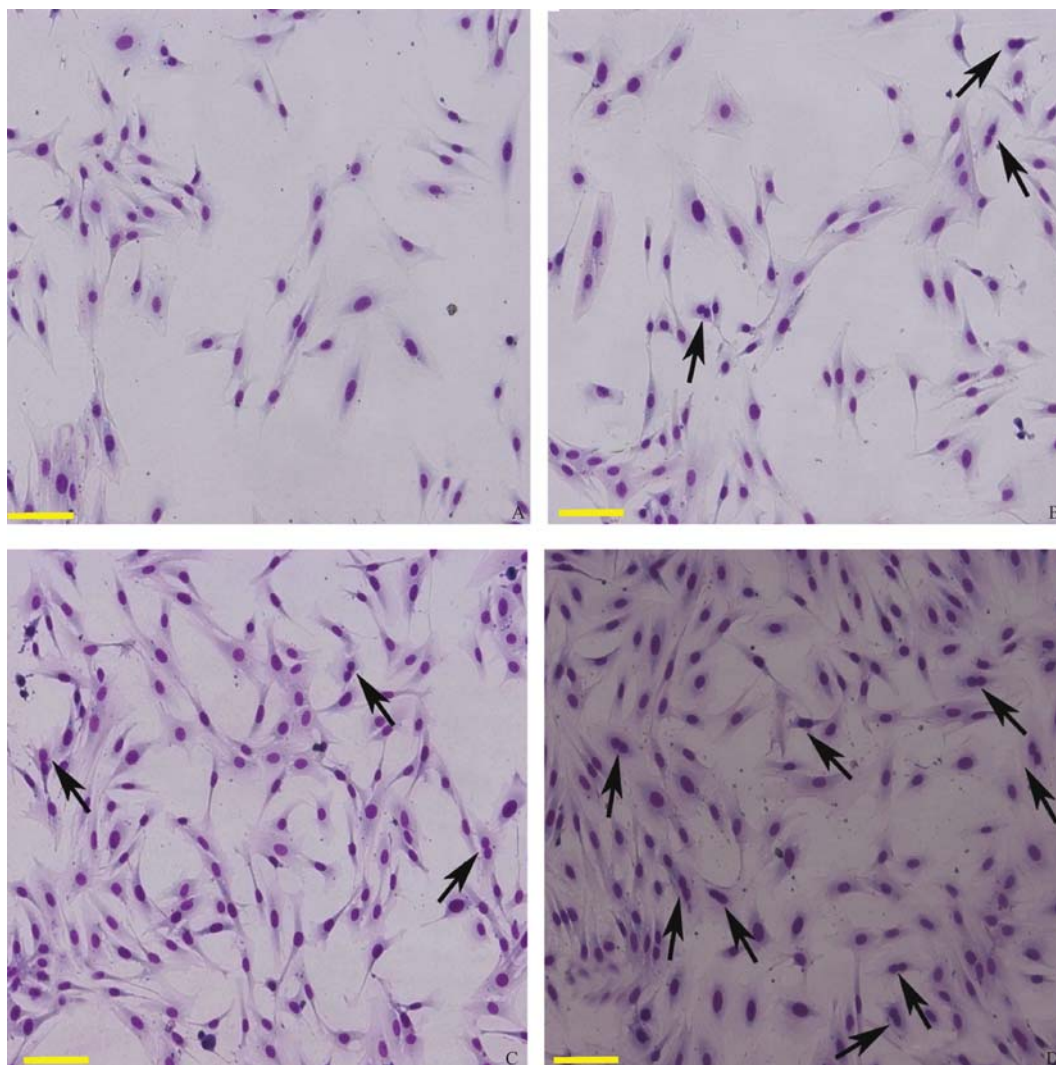


图 3 藏羚羊成纤维细胞的分裂相 (×100)

Fig. 3 Dividing phases of fibroblast cells in *Pantholops hodgsonii*

A. 解冻后 12 h; B. 解冻后 24 h; C. 解冻后 48 h; D. 解冻后 72 h; 箭头示细胞后末期分裂相。标尺 = 100 μm

A. 12 h after thawing; B. 24 h after thawing; C. 48 h after thawing; D. 72 h after thawing; Arrow indicates dividing phase between anaphase and telophase. Bar = 100 μm

染色体数目皆为 60, 分别占所测中期分裂相细胞的 91%、70%、65%。伴随代次增加, 染色体数

目变异相应增加, 表明体外培养系统会对细胞的染色体倍性产生一定影响。

表 3 藏羚羊培养细胞的染色体倍性分析

Table 3 Diploidy analysis of fibroblast cells in *Pantholops hodgsonii*

代数 Passage	分裂相数 No. mitotic phases	染色体数目及分布 The distribution of chromosome number			染色体数 60 的频率 (%) The frequency of 60
		< 60	60	> 60	
第 7 代 Passage 7	100	4	91	5	91
第 10 代 Passage 10	100	21	70	9	70
第 15 代 Passage 15	100	28	65	7	65

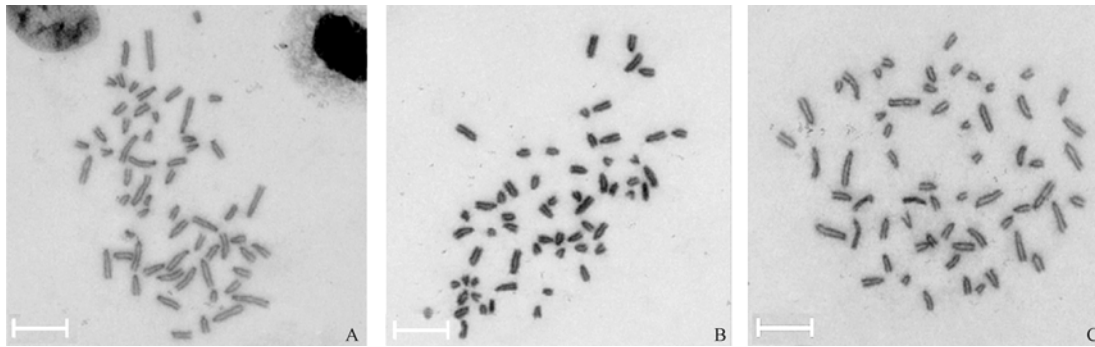


图 4 藏羚羊不同代次细胞中期染色体(×1 000)

Fig. 4 Metaphase chromosomes of fibroblast cells at different passages in *Pantholops hodgsonii*

A. 第 7 代细胞染色体; B. 第 10 代细胞染色体; C. 第 15 代细胞染色体。标尺 = 10 μm

A. Mitotic chromosomes from a passage 7 cell; B. mitotic chromosomes from a passage 10 cell;

C. Mitotic chromosomes from a passage 15 cell. Bar = 10 μm

**2.5 核型分析** 经不同代次细胞染色体数目统计,明确了藏羚羊细胞二倍体染色体数目为 60。从中选取分散度良好、染色体清晰的正常细胞染色体进行核型分析。对染色体相对长度进行测量,同源染色体按测量结果、着色程度进行配对,最后按从大到小顺序排列,性染色体置于最后(图 5)。测量结果表明,染色体组总相

对长度为 193.45,平均相对长度为 3.22,未发现存在随体、次缢痕等特殊标志性特征。参照 Levan 等<sup>[13]</sup>的命名法,以着丝点位置为判断依据,对藏羚羊的染色体进行了分类,藏羚羊的 60 条染色体(包括性染色体在内)均为端着丝粒类型(表 4)。

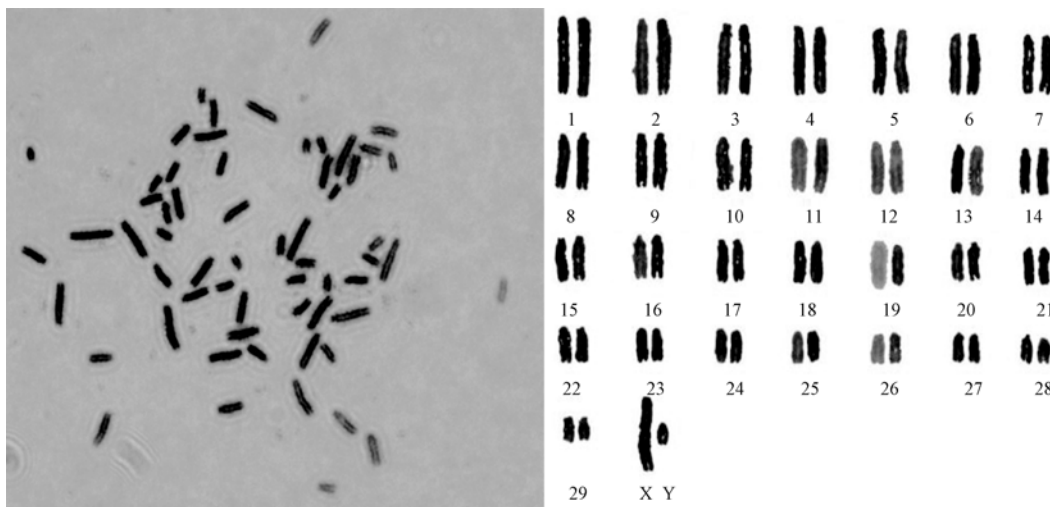


图 5 藏羚羊的核型图(×1 000)

Fig. 5 Chromosomal karyotype of cultured fibroblast cells in *Pantholops hodgsonii*

### 3 讨论

**3.1 藏羚羊体细胞培养方法** 组织块贴壁培养法,是目前细胞建系最常用的方法。它操作

简便、细胞损伤小,且生长出的细胞整齐有序。本实验采用该方法对藏羚羊组织块进行贴壁培养,获得了较好的成纤维细胞。

实验中发现,使用组织块贴壁培养法最为

表 4 藏羚羊细胞染色体的相对长度及类型

Table 4 The relative length and type of chromosomes in *Pantholops hodgsonii*

染色体号 Chromosome No.	相对长度 Relative length	染色体类型 Chromosome type	染色体号 Chromosome No.	相对长度 Relative length	染色体类型 Chromosome type
1	5.31 ± 0.02	T	17	2.84 ± 0.02	T
2	5.16 ± 0.02	T	18	2.82 ± 0.03	T
3	4.80 ± 0.03	T	19	2.69 ± 0.01	T
4	4.62 ± 0.03	T	20	2.54 ± 0.02	T
5	4.47 ± 0.03	T	21	2.52 ± 0.02	T
6	4.19 ± 0.02	T	22	2.39 ± 0.02	T
7	4.04 ± 0.01	T	23	2.32 ± 0.02	T
8	3.86 ± 0.03	T	24	2.27 ± 0.01	T
9	3.72 ± 0.03	T	25	2.17 ± 0.01	T
10	3.67 ± 0.01	T	26	2.05 ± 0.01	T
11	3.60 ± 0.02	T	27	1.98 ± 0.02	T
12	3.57 ± 0.01	T	28	1.83 ± 0.02	T
13	3.30 ± 0.03	T	29	1.64 ± 0.03	T
14	3.16 ± 0.02	T	X	5.09 ± 0.01	T
15	2.98 ± 0.02	T	Y	1.52 ± 0.04	T
16	2.91 ± 0.02	T			

各个染色体计数的数目  $n = 3$ 。The number of each chromosome counting  $n = 3$ 。

重要的就是贴壁时间的确定。若时间过长,就会使组织损伤;时间太短,组织又不会贴稳,加培养液时会漂浮。所以,恰当的贴壁时间是组织块贴壁培养的关键。另外,组织块的大小、密度也十分重要。组织块以  $1 \text{ mm}^3$  大小,每两个组织块间隔  $1 \sim 2 \text{ cm}$  左右,贴壁  $2.5 \text{ h}$  为好。

**3.2 细胞生物学特征** 藏羚羊成纤维细胞在体外的生长速度,随细胞培养代次的增加而延长,细胞的适应期也随之变长。此外,在细胞的传代培养过程中,细胞的二倍染色体数目会出现下降,细胞遗传稳定性有所改变。但从细胞形态而言,未有明显变化,细胞的状态稳定。该现象的产生,推测可能由于细胞本身端粒酶长度的缩短<sup>[16-17]</sup>,或者是体外培养环境对细胞的DNA造成的损伤<sup>[18-19]</sup>,也可能由于细胞脱离高海拔低氧机体后的环境不适应造成,确切原因需进一步分析。

**3.3 影响核型制作的因素** 秋水仙胺的使用浓度、处理时间、低渗液的浓度和处理时间以及

滴片时温差等均可对染色体的相对长度、臂比值等产生影响<sup>[20]</sup>。对于藏羚羊的核型制备,有以下几点需要注意。①秋水仙胺的作用剂量与作用时间会直接影响中期细胞数目和染色体形态结构<sup>[21]</sup>。过长时间或过高浓度的秋水仙胺处理,会导致染色体过度收缩,甚至结构变形;而低浓度或短时间的处理,又会导致分裂中期的细胞数目太少。②低渗时间的影响。低渗的目的是为了使细胞极大程度地膨胀,进而使其内染色体也发生分散。若低渗时间过长,细胞会涨破使其内的染色体丢失;时间不足,又不能得到分散度好的染色体。③固定和滴片也是核型分散成功的保证。黄燕等<sup>[22]</sup>曾发现预固定是十分重要的,若省去,会使细胞结成团块。而本实验并未进行预固定处理,也没有发现对结果有明显影响。④适当的滴片高度也是染色体分散良好的重要条件<sup>[23]</sup>。

本实验最终确定了制备藏羚羊细胞核型的最优条件,即用  $0.05 \mu\text{g/ml}$  终浓度的秋水仙胺

处理培养细胞 5 h,低渗 40 min,1.5 m 滴片,可得到数量多、分散度好的细胞中期染色体。

**3.4 染色体数目与核型** 对藏羚羊染色体长度的测定计算,我们参照了李瑜等<sup>[24]</sup>的方法,并将数据依据 Levan 等<sup>[13]</sup>的命名原则进行分析,确定了藏羚羊的 60 条染色体(包括性染色体 X/Y)均为端着丝粒类型,因而无须计算着丝点指数和臂比。参考其形态、着色情况,对染色体进行了配对、排列,发现 X 染色体较大,与第 2 对染色体大小接近,Y 染色体则为最小的端着丝粒染色体,与牛(*Bos taurus*)和山羊(*Capra hircus*)的染色体类似,与绵羊(*Ovis aries*)的区别较大<sup>[25]</sup>。

不同的细胞处理方法和细胞培养条件,会对细胞染色体的形态、大小和着色等方面产生各种影响。为此,实验对多个中期染色体分裂相进行了观察、分析、比对,以克服实验条件和方法带来的误差。再者,因目前未见关于藏羚羊核型分析或染色体特征的相关文献,本文中仅以现有的牛<sup>[26]</sup>、山羊<sup>[27-28]</sup>、绵羊<sup>[29]</sup>等哺乳动物的染色体作为参考进行分析,得出以上结论。

本研究对藏羚羊体细胞的体外培养、细胞的生物学特性,以及染色体核型分型进行了初步研究,旨在为濒危野生动物——藏羚羊建立详尽的细胞学数据,以期在细胞水平实现对其种质资源的保护,而有关藏羚羊在特有环境下获得的基因方面的遗传特征更有待深入探讨。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Schaller G B. Wildlife of the Tibetan Steppe. Chicago: University of Chicago Press,1998: 41 - 48.
- [ 2 ] 武永华. 雌性藏羚羊迁徙对青藏高原降水时空分布的适应性分析. 兽类学报,2007,27(3): 298 - 307.
- [ 3 ] 曹俊虎,徐世晓,赵新全,等. 藏羚羊冷季对干物质的消化效率. 兽类学报,2007,27(2): 206 - 208.
- [ 4 ] 雷润华,蒋志刚,胡志昂,等. 原羚属分类地位研究兼论中国羚羊的分类. 动物分类学报,2004,29(4): 622 - 627.
- [ 5 ] 连新明,张同作,曹伊凡,等. 夏季雌性藏羚羊昼间行为时间分配及活动节律. 兽类学报,2007,27(1): 53 - 57.
- [ 6 ] 常荣,杨应忠,马祁生,等. 藏羚羊和藏系绵羊左心室收缩功能的比较研究. 中国病理生理杂志,2010,26(8): 1498 - 1502.
- [ 7 ] Fox J L, Bårdsen B J. Density of Tibetan antelope, Tibetan wild ass and Tibetan gazelle in relation to human presence across the Chang Tang Nature Reserve of Tibet, China. Acta Zoologica Sinica,2005,51(4): 586 - 597.
- [ 8 ] 青海医学院学报刊讯. 世界首部藏羚羊全基因组序列图谱宣告绘制完成. 青海医学院学报,2009,30(4): 217.
- [ 9 ] 曹伊凡,苏建平,连新明,等. 可可西里自然保护区藏羚羊的食性分析. 兽类学报,2008,28(1): 14 - 19.
- [ 10 ] Li Z Q, Jiang Z G. Group size effect on vigilance: evidence from Tibetan gazelle in Upper Buha River, Qinghai-Tibet Plateau. Behavioural Processes,2008,78(1): 25 - 28.
- [ 11 ] 裘丽,冯祚建. 青藏公路沿线白昼交通运输等人类活动对藏羚羊迁徙的影响. 动物学报,2004,50(4): 669 - 674.
- [ 12 ] 王清,李娟,谷景立,等. Bortezomib 增强三氧化二砷抑制 KM3 细胞生长和促凋亡机制的研究. 中国病理生理杂志,2010,26(2): 297 - 301.
- [ 13 ] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Heredita,1964,52(2): 201 - 220.
- [ 14 ] 陈广文,董自梅,田士瑞,等. 河北 3 产地日本三角涡虫的染色体变异与核型多样性分析. 动物学杂志,2010,45(6): 85 - 91.
- [ 15 ] 舒璇,蔡晓闯,刘锋,等. 鲢形目 3 种鱼的染色体组型分析. 动物学杂志,2010,45(2): 101 - 106.
- [ 16 ] 郑秀娟,游晓青,林玲,等. 体外培养的神经干细胞的端粒和端粒酶活性. 福建医科大学学报,2006,40(3): 215 - 218.
- [ 17 ] Rodriguez P, Barquinero J F, Duran A, et al. Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. Mutation Research,2009,670(1/2): 53 - 58.
- [ 18 ] Chen Q, Fischer A, Reagan J D, et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci,1995,92(10): 4337 - 4341.
- [ 19 ] Mackenzie C G, Mackenzie J B, Beck P. The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology,1961,9(1): 141 - 156.
- [ 20 ] Moynihan E P, Mahon G A T. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L. Aquaculture,1983,33(1/4): 301 - 309.
- [ 21 ] Jenkins E C, Jenkins E C Jr, Genovese M, et al. The effect of colcemid and aluminum on the ultrastructure of human



- metaphase chromosomes. *Scanning*, 2006, 28(4): 228-232.
- [22] 黄燕,赵小平,余红,等. 动物骨髓细胞染色体标本制备失败的原因分析. *生物学通报*,2006,41(1): 52-53.
- [23] 王晓华,吴彪,李琪,等. 金乌贼染色体核型分析. *动物学杂志*,2011,46(2): 77-81.
- [24] 李瑜,蔺海明,程卫东. 红芪染色体数目及核型分析. *科技导报*,2010,28(1): 40-43.
- [25] Evans H J, Buckland R A, Sumner A T. Chromosome homology and heterochromatin in Goat, Sheep and Ox studied by banding techniques. *Chromosoma*, 1973, 42(4): 383-402.
- [26] 亏开兴,张继才,杨国荣,等. BMY 牛和婆罗门牛核型分析. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*,2011,39(3): 8-12.
- [27] 顾丰颖,葛长荣,曹振辉,等. 云南圭山山羊及红骨圭山山羊的染色体核型及带型研究. *中国畜牧兽医*,2009,36(5): 79-84.
- [28] 房兴堂,陈宏,游余群,等. 海门白山羊染色体核型研究及 C-带分析. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005,33(5): 19-22.
- [29] 雷初朝,李瑞彪,陈宏,等. 山羊与绵羊的染色体核型比较. *西北农业学报*,2001,10(3): 12-15.

## 欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2012年每册定价60元,全年360元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.): BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院5号中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部

邮编:100101; 电话:(010)64807162。

E-mail: journal@ioz.ac.cn。网址: <http://dwzzz.ioz.ac.cn>。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。