动 物 学 研 究 2012，Dec. 33(6): 591−596 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.06591

朱鹮细胞系的建立及其生物学特性观察

王金焕[1], 苏 榕[2], 苏伟婷[1], 成 诚[2], 魏曙光[2], 丁海华[3], 段 英[3], 李生斌[2], 佴文惠[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;
2. 西安交通大学 法医学院, 陕西 西安 710061; 3. 国家林业总局, 陕西省林业厅, 陕西 西安 710082)

摘要：濒危级生物朱鹮是朱鹮属的唯一物种。为保藏朱鹮的遗传资源并为开展其相关生物学研究提供方便的实验材料, 利用采自雌、雄两只成年朱鹮的皮肤样品, 成功建立了两株朱鹮的细胞系。两株细胞系的形态均为典型的成纤维样细胞; 免疫荧光染色检测显示细胞强表达平滑肌特异 α-actin, 表明两株细胞均来源于血管平滑肌组织; 生长特性分析显示细胞增殖能力在 10 代以前较强, 在 15 代以后逐渐减弱, 25 代以后则生长缓慢, 难以生成单层细胞; 染色体分析显示，两株细胞系均为正常二倍体, 核型为 2*n*=68, ZZ(♂), ZW(♀)。该研究首次报道了朱鹮染色体的 Ag 带、C 带和 G 带, 并通过带型分析和荧光原位杂交鉴别了朱鹮的性染色体。该文建系所用的皮肤组织块贴壁种植法, 可以应用于其他鸟类, 特别是珍稀濒危鸟类细胞系的建立。

关键词：朱鹮; 细胞培养; 生长特征; 染色体带型
中图分类号：Q343.2; Q915.865 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)06-0591-06

Establishment of cell lines derived from skin biopsies of crested ibis (*Nipponia nippon*) and their biological characteristics

WANG Jin-Huan[1], SU Rong[2], SU Wei-Ting[1], CHENG Cheng[2], WEI Shu-Guang[2], DING Hai-Hua[3], DUAN Ying[3], LI Sheng-Bin[2], NIE Wen-Hui[1,*]

(1. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*; 2. *Key Laboratory of Forensic Sciences*, *Ministry of Health*, *Xi'an Jiaotong University*, *Xi'an* 710061, *China*;
3. *Shaanxi Branch of State Forestry Administration*, *Xi'an* 710082, *China*)

Abstract: The crested ibis is among the rarest and most endangered species worldwide. To preserve its genetic resources and conveniently provide materials for biological research, we successfully established two cell lines from biopsies of a male and female adult crested ibis. The cultured cells from both specimens had typical fibroblast morphology. Immunofluorescence staining revealed that the cultured cells strongly expressed the marker of smooth muscle specific α-actin, clearly indicating the cells were from the smooth muscle tissue. Growth property analysis showed that the cells grew well past the first 10 passages and continued growing with reduced proliferation after 15 passages, but ceased by passage 25 as the cells could not grow to form a confluent monolayer. From these two cell lines, we harvested mitotic metaphase chromosomes and conducted different staining, banding, and fluorescent in situ hybridization. Throughout the process, cells maintained normal diploidy, with the karyotypes of these two cell lines being 2*n*=68, ZZ in the male and 2*n*=68, ZW in the female. Patterns of Ag staining, C- and G-bands of the crested ibis chromosomes were also studied. Banding analyses and fluorescent in situ hybridization also allowed identification of the sex chromosomes. We suggest that the external implants method for establishing primary cell lines used in this study may also be applicable to other birds, especially similarly endangered avian species.

Key words: Crested ibis; Cell culture; Growth property; Chromosome banding patterns

朱鹮 (*Nipponia nippon*)属鹳形目(Ciconiiformes)鹮科(Threskiornithidae)朱鹮属(*Nipponia*), 是世界级珍稀濒危物种, 国家 I 级重点保护鸟类。朱鹮曾经广泛分布于日本、朝鲜半岛、中国和俄罗斯西伯利亚西南部。然而, 20 世纪中叶以来, 由于环境污染、全球气候变暖、捕猎和人类活动等因素的影响, 朱

收稿日期：2012-09-06；接受日期：2012-10-31
基金项目：国家实验细胞平台专项运行经费; 朱鹮野化放飞工程 (2008, 2010); 中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室专项经费；西安交通大学高等教育创新基金；光华教育基金 (2010822)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: whnie@mail.kiz.ac.cn

鹮的数量急剧减少, 野生种群在日本、朝鲜半岛和俄罗斯的分布地区先后消失。中国自从 1964 年在甘肃康县采集到一只标本后, 直到 1981 年的近 20 年一直没有朱鹮的报道（Ding, 2004)。1981 年野生朱鹮种群(7 只)在陕西洋县被重新发现（Liu, 1981)。此后, 我国在朱鹮的保护和研究方面开展了大量的工作, 主要包括朱鹮生态生物学、保护生物学、遗传学、解剖学、饲养繁殖、病理学、疾病防治以及保护管理和再引入等。由于国家的高度重视, 野生朱鹮及其栖息地得到了有效保护, 野生种群数量不断增加。同时, 朱鹮人工饲养繁殖也与野生种群的保护同步进行。1989 年, 北京动物园人工繁殖朱鹮在世界上首次获得成功(Li, 1989)。随后三个朱鹮人工种群分别在北京和陕西建立, 有力保证了朱鹮种群的恢复和发展。大量的研究工作也为朱鹮的科学保护奠定了坚实的基础（Ding, 2004)。

野生动物的遗传资源保护, 除建立专门的保护机构、制定相关法律和建立国家公园、自然保护区及易地保护外, 以深低温(−196 ℃)冻存动物的生殖细胞和体细胞则为另一条有效的途径(Shi, 1989)。细胞是生命的基本单位, 具有生命所有的遗传信息。动物体细胞系的建立, 为从细胞和分子水平开展各类研究提供经济、方便的材料来源, 也为以后再建当时或许已灭绝的物种提供材料储备。迄今为止, 还没有关于朱鹮体细胞成功建系的报道。对我国的朱鹮, Liu et al（1992)报道了两只饲养于北京动物园的朱鹮的染色体性别鉴定及核型分析的结果, 但未见朱鹮染色体 G 带、C 带和 Ag 带的报道。

本研究利用微创取样方法, 在不对朱鹮造成致命伤害的前提下, 获得其皮肤样本, 成功建立了朱鹮的体细胞系, 并对该细胞系的体外生长特征、性染色体的荧光原位杂交鉴定以及染色体 G 带、C 带和 Ag 带等进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料来源

雌、雄两只成年朱鹮均来自陕西朱鹮人工繁殖中心。取材前彻底消毒背部皮肤, 用眼科剪剪下～0.5 cm×1 cm 的一块皮肤, 迅速放入运输培养基内。动物行伤口缝合处理后放回饲养网。

1.2 细胞培养

细胞培养用运输液为含有 100 U/mL 青霉素钠以及 100 μg/mL 链霉素的 DMEM(GIBCO); 生长液为含有 10%胎牛血清的 OPTI-MEM(GIBCO), pH 7.2～7.4; 培养器皿为培养面积 25 cm^2 的一次性塑料培养瓶(Corning)。

1.2.1 原代细胞培养 使用含两倍双抗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤皮肤组织块 5 次, 剪小至～1 mm; 加入 0.25%胰酶(1:250, Amresco)0.5 mL 消化 0.5 min 后迅速加入生长液抑制胰酶作用; PBS 清洗一次后, 将组织块贴至培养瓶瓶壁, 1 h 后加入 1 mL 生长液, 37 ºC 培养 24 h 后补加培养液至 5 mL; 此后每 3 天换液一次。待 15 d 后可见细胞开始从组织块长出, 再培养 5 d 后即可传代。

1.2.2 细胞传代 待组织块周围细胞均长成致密的单层后即可进行细胞传代。弃去生长液, PBS 清洗一次后加入 0.25%胰蛋白酶 1 mL, 37 ºC 消化 1～2 min 后加入 5 mL 新鲜生长液; 轻拍瓶壁分散细胞, 补加生长液至 15 mL 后吸出一半至另外一个培养瓶(1:2 传代); 37 ºC, 5% CO_2 条件下培养, 待长成单层后, 再按上述方法传代。

1.2.3 细胞冻存 用 0.25%胰酶消化、收集对数生长期细胞, 离心后弃去上清液; 加入新鲜配制的冻存液[小牛血清 90%, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Amresco) 10%]制备成 2×10^6 个/mL 的细胞悬液, 每个冻存管分装 1 mL; 冻存管置于程序冻存盒(Nalgen)内, −80 ºC 过夜后, 移入液氮内长期保存。

1.2.4 细胞复苏 从液氮中取出冻存管后迅速放入 37 ºC 水浴中, 让细胞在 1～2 min 内完全融化; 在无菌环境下将细胞接种到培养瓶内, 37 ºC, 5% CO_2 条件下培养。3 d 后细胞即可长成单层。

1.3 细胞生长评价

参照 Mosmann (1983)的方法, 测定 5、10、20 和 25 代的细胞生长率。细胞按 1×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔培养板内, 每孔接种 180 μL。37 ºC 培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT [3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐, 3-(4,5)-dimethylthiazol (-z-y1)-3,5-di-phenytetrazoliumromide, Sigma], 重复做 5 个孔 。继续培养 4 h, 小心吸出上清, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 10 min 后, 于振荡器上振摇 10 min, 并在酶标仪(BIO-RAD-680)上测定 570 nm 波长下的吸光度值(optical density value, OD)。以后每天按此方法测定 5 孔细胞的 OD 值, 连续测定 7 d。以培养时间为横坐标,

吸光值为纵坐标绘制细胞的生长曲线。

1.4　免疫荧光染色法鉴定细胞来源

将对数生长期的细胞接种到置于 6 孔板内, 且已灭菌的 7 mm×22 mm 盖玻片上, 培养 24 h 后吸去培养液, 用冰冷的 PBS 漂洗 3 次; 4%的多聚甲醛室温下固定细胞 15 min, 用含 0.03% Triton-100 的 PBS (PBST) 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1% BSA (bovine serum albumin, 牛血清白蛋白, Amresco) 室温封闭 20 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 分别加鼠抗人波形蛋白和鼠抗人平滑肌 α-actin (肌动蛋白)单克隆抗体(1:200, Dako), 4 ºC 孵育过夜; PBS 漂洗细胞 3 次, 每次 3 min, 加入 Cy_3 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 37 ºC 孵育 30 min; PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 用含 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚,4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) 的封片液封片后, 荧光显微镜下观察并照相。

1.5　细胞遗传学分析

1.5.1　染色体标本制备　在细胞对数生长期, 每 10 mL 培养液加入 20 μL 秋水仙素(100 μg/mL, Sigma), 处理细胞 60 min 后弃去培养液; 用 0.25%胰酶消化细胞 1～2 min, 然后加入适量的生长液抑制胰酶作用; 混匀细胞悬液, 离心后弃上清, 用 0.075 mol/L KCl 溶液低渗处理细胞 15 min, 离心后加入甲醇:冰乙酸(3:1)固定细胞 3 次; 以空气干燥法制片。

1.5.2　染色体带型分析　参照 Seabright (1971), Summer (1972) 和 Goodpasture & Bloom (1975)的方法进行 G 带、C 带和 Ag 带显示。

1.5.3　荧光原位杂交　参照 Nie et al (2009) 的方法, 利用石鸻 (*Burhinus oedicnemus*, 鸻形目) 的 Z 和 W 染色体特异探针与朱鹮的中期染色体进行荧光原位杂交, 鉴别朱鹮的性染色体。

1.6　图像拍摄与分析

用装有 CCD 摄像装置的蔡司荧光显微镜 (Axioplan 2, Zeiss company) 和图像分析软件 (CytoVision system, Applied Imaging Corp, UK)进行图像拍摄和分析。

2　结果与讨论

2.1　朱鹮皮肤细胞系的建立

在陕西朱鹮人工繁殖中心获得两只朱鹮(雌、雄各一只)的皮肤样品后, 置于运输液中运送到昆明。原代培养 15 d 后, 有细胞从组织块周围长出(图 1 A), 继续培养 5 d 后细胞长成致密单层(图 1 B), 即可以 1:2 的比例进行传代培养, 以维持细胞增殖。我们对 10 代以前不同代数的细胞进行冷冻保存, 成功建立了两株朱鹮细胞系, 分别命名为 KCB 201253S（雄性)和 KCB 2012055S（雌性)。细胞均为典型的成纤维样细胞, 且支原体污染检测（荧光法)结果均为阴性。冻存的朱鹮细胞在复苏后能够正常生长, 且生长速度与冻存前相比并未减低。

为优化培养条件, 我们选用了不同的培养基如 DMEM、MEM 和 OPTI-MEM (GIBCO)同时培养朱鹮细胞, 并添加相同比例牛血清, 经比较发现 OPTI-MEM 培养基最适宜朱鹮细胞的生长。

为鉴别所建立的朱鹮细胞系的来源, 我们采用免疫荧光染色的方法, 用两种不同的抗体对培养的朱鹮细胞进行免疫抗体染色。 结果显示在朱鹮细胞中鼠抗人波形蛋白抗体染色为阴性, 而鼠抗人平滑肌 α-actin 抗体染色为强阳性(图 2, 呈束状的红色

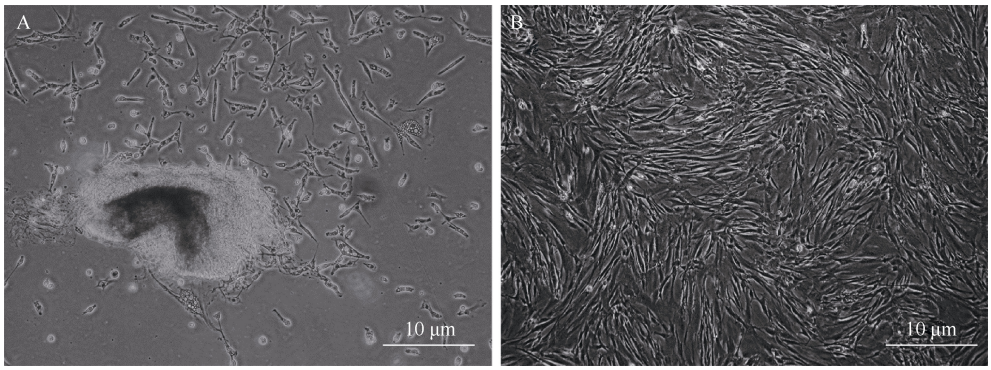

图 1　培养的朱鹮细胞形态

Fig. 1　Morphology of *N. nippon* cultured cells

A：原代细胞; B：传代细胞。

A: Primary cultured cells; B: Subcultured cells.

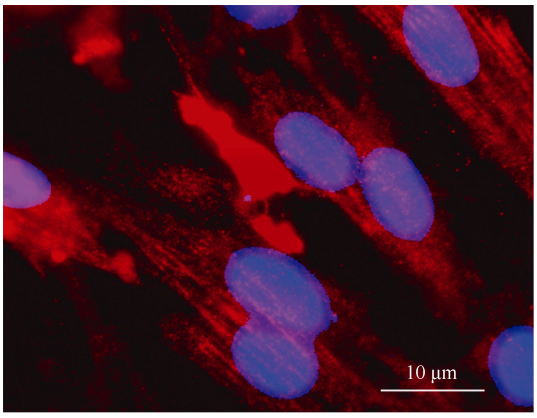

图 2 朱鹮细胞的平滑肌肌动蛋白抗体免疫荧光染色
Fig. 2 Immunofluorescence staining of smooth muscle special actin in *N. nippon* fibroblast cells
红色：抗肌动蛋白抗体染色的肌动蛋白；蓝色：DAPI 染色的细胞核。
Red: smooth muscle special actin immunoreactivity stained with anti-α-actin antibody; Blue: the nucleus stained with DAPI.

荧光显示肌丝特征)。鼠抗人平滑肌 α-actin 抗体只与血管平滑肌细胞中的 actin 的 α 异构体特异性结合，而与成纤维细胞中的 β-、γ-actin 均不能结合。因此该抗体可以作为血管平滑肌细胞的鉴定(Cai et al, 2005)。免疫荧光染色的结果提示我们建立的朱鹮细胞系来源于血管平滑肌组织。体外培养细胞源于动物机体，而机体内的细胞都混杂生长，每一种组织都有血管和间叶组织，因此，由动物体来源的培养材料而进行的原代培养，绝大多数都呈各种细胞混合生长（Zhou, 2006)。我们所取的朱鹮皮肤样品中也含有血管，在剪小的组织块中包含有血管平滑肌组织，在原代培养时包括血管平滑肌细胞在内的各类细胞均可从组织块中长出，因此，可能在后续的传代培养过程中，血管平滑肌细胞成为优势细胞而保留下来。

2.2 朱鹮细胞生长特性分析

利用 MTT 法，我们测定了连续培养 7 d 的不同传代数的朱鹮细胞生长情况。 图 3 为 5、10、20 和 25 代朱鹮细胞的生长曲线。体外培养的朱鹮细胞表现出了典型的“潜伏期—对数生长期—停滞期”的生长模式。在细胞传代过程中，我们发现不同代数细胞的增殖能力和形成单层的时间有所不同。传代数<10 的细胞，轮廓清晰、立体感强且增殖能力强，3 d 即可形成致密单层；传代数>15 的细胞，形成单层的时间逐渐延长，到 20 代以后，细胞增殖能力明显减慢，5 d 才可形成单层；传代数>25 的细胞，形态扁大，显现衰老特征且不能再形成单层。因此，我们所建立的朱鹮细胞系为有限细胞系，为保证细胞的旺盛生长力，需在建系早期多冻存传代数低的细胞，且要避免长时间连续传代细胞。

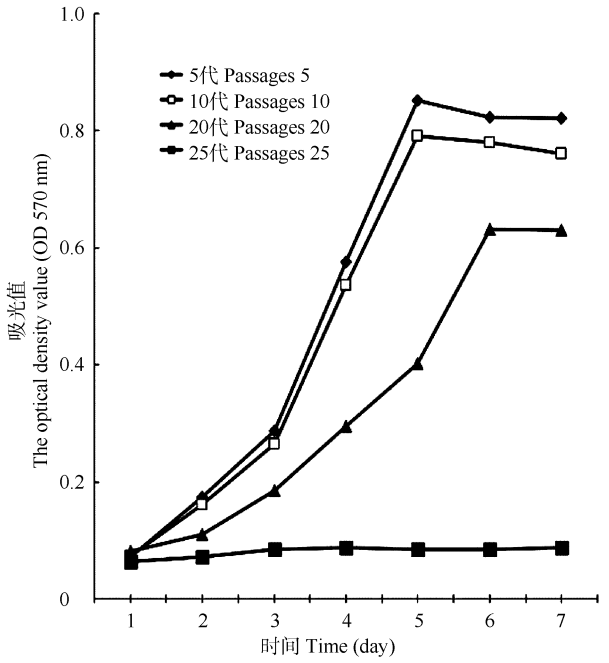

图 3 不同传代数的朱鹮细胞生长曲线
Fig. 3 Growth curves of *N. nippon* cells of different passages

2.3 细胞遗传学分析

为证实我们所建立的细胞系确实来源于朱鹮，排除培养过程中可能发生的细胞交叉污染， 我们制备了这两株培养朱鹮细胞的中期染色体，并进行了以下细胞遗传学分析。

染色体数目和形态 鸟类染色体所具有的大量微小染色体在使用 Giemsa 染液染色时着色较浅(图 4A)，在染色体分散不理想时不易计数。为了准确计数微小染色体，我们采用能使所有鸟类染色体均匀着色的荧光染料碘化丙啶 (propidium iodine, PI, Amresco) 对所制备的中期染色体进行染色(图 4B)。对 100 个中期分裂相的计数结果表明，细胞的染色体众数为 2*n*=68，包括性染色体在内有 10 对大染色体，其余为微小染色体。我们的结果与 Liu et al（1992)报道的朱鹮核型分析结果一致，证明我们所建立的细胞系确实来源于朱鹮。

带型分析 目前，有关朱鹮显带染色体未见报道。在本研究中，我们首次进行了朱鹮染色体 Ag 带、C 带(图 4C, D)和 G 带(图 5)显示。在所观察的 20 个细胞中，银染的核仁组织者区(nucleolar organizer region, NOR)分布在一对微小染色体上(图 4C，箭头所示)。C 带(异染色质)主要分布在多数大

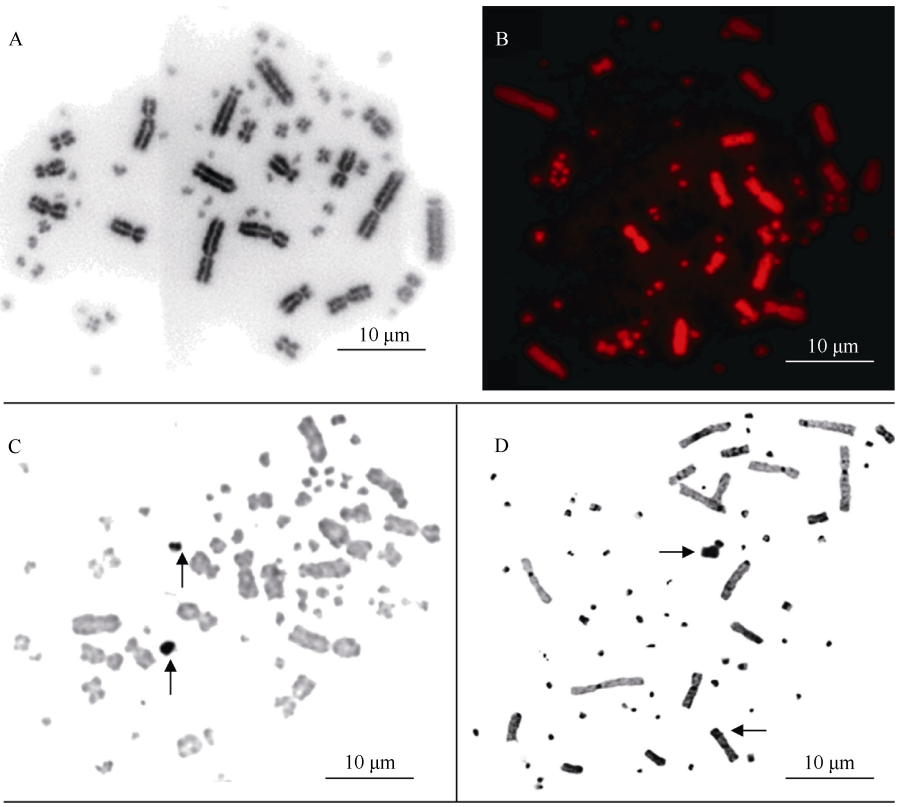

图 4　不同染色和显带的朱鹮染色体

Fig. 4　Examples of *N. nippon* chromosomes with different staining and banding

A：Giemsa 染色；　B：PI 染色; C：染色体银带（箭头示有 NOR 的染色体); D：染色体 C 带（箭头示 Z 和 W 染色体)。

A: Giemsa staining; B: PI staining; C: Ag-NOR staining (arrows indicate the two chromosomes with NOR); D: C-band (arrows show the Z and W chromosomes).

染色体的着丝粒区域, 微小染色体多为 C 带阳性, 表明其微小染色体含有丰富的异染色质。W 染色体和 Z 染色体的长臂末端均为 C 带阳性(图 4D, 箭头所示)。朱鹮的染色体 C 带与已报道的家鸡的染色体 C 带相似(Pollock & Fechheimer, 1981)。图 5 为朱鹮的 G 带核型图, 染色体排列方式参照 Liu et al(1992)的报道, 按染色体的相对长度, 从长到短进行排列。G 带分析结果表明, 除雌性性染色体为异配的 ZW 以及雄性性染色体为同配的 ZZ 外, 雌、雄个体的 G 带核型一致; Z 染色体为中着丝粒染色体, 相对长度仅次于第 5 号染色体; W 染色体长度约为 Z 染色体的一半。这些结果与 Liu et al(1992)的报道一致。虽然可以根据性染色体为同配或异配来鉴别鸟类的性别, 但鸟类的 W 染色体较小, 长度与一些较小的常染色体相当, 因此, 在常规染色的分裂相中, 仅根据外形, 很难准确鉴别 W 染色体(Shields,1982)。对于朱鹮 W 染色体的形态, Takasi & Sasaki（1974)的报道为亚端着丝粒染色体, Liu et al（1992)认为是中着丝粒染色体, 而我们的 G 带核型分析支持其为亚端着丝粒染色体（图 5)。

朱鹮性染色体鉴别　在以前的研究中, 通过流式分选, 我们已获得了石鸽 (*B. oedicnemus*, 鸻形目)的 Z 和 W 染色体特异探针(Nie et al, 2009)。为

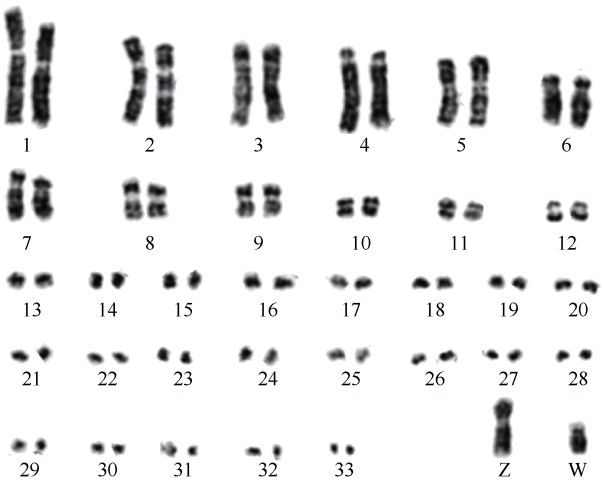

图 5　朱鹮的 G 带核型

Fig. 5　G-banded karyotype of *N. nippon*

染色体下面的数字为每条染色体的编号。

Chromosome numbers indicated below the chromosomes.

准确鉴别朱鹮的性染色体, 特别是 W 染色体, 我们利用石鸻的 Z 和 W 染色体特异探针, 分别与雄、雌性朱鹮的中期分裂相进行荧光原位杂交(图 6A, B)。在雄性朱鹮的中期分裂相中, 石鸻的 Z 染色体探针涂染了一对中着丝粒染色体(图 6A), 即 Z 染色体, 与核型分析确定的 Z 染色体一致。在雌性朱鹮的中期分裂相中, 石鸻的 W 染色体探针涂染了一条较小的亚端着丝粒染色体(图 6B), 直接证明 W 染色体是一条较小的亚端着丝粒染色体(图 6C)。另外, 石鸻的 Z 和 W 染色体探针分别在朱鹮的一对微小染色体和 Z 染色体长臂的末端有交叉杂交的信号。这种交叉杂交的信号, 在以石鸻的 Z 和 W 染色体探针与家鸡的中期分裂相进行荧光原位杂交的实验中也曾被检测到(Nie et al, 2009), 表明石鸻的 Z 和 W 染色体探针中包含有与被杂交的染色体同源的序列, 这些同源的序列可能是重复序列。

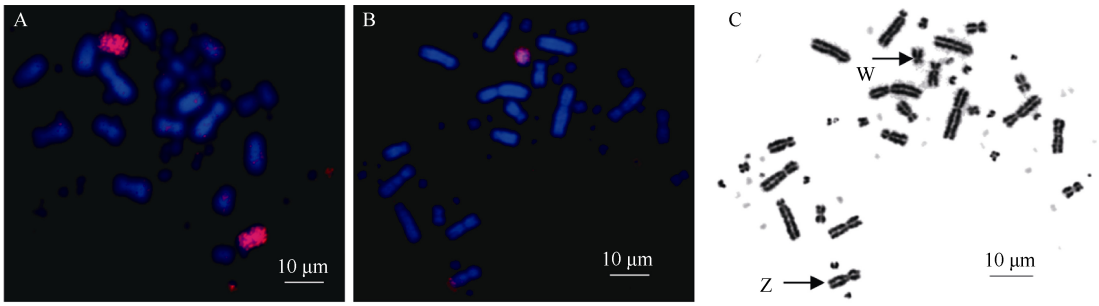

图 6 荧光原位杂交示例

Fig. 6 Examples of fluorescent *in situ* hybridization

A：石鸻的 Z 染色体探针与朱鹮的 Z 染色体杂交(红色); B：石鸻的 W 染色体探针与朱鹮的 W 染色体杂交(红色); C：杂交前的朱鹮染色体(与 B 为同一分裂相), 箭头示 Z 和 W 染色体。

A: Z chromosome probe of *B. oedicnemus* painted the two Z chromosomes of *N. nippon* (red); B: W chromosome probe of *B. oedicnemus* hybridized the W chromosome of *N. Nippon* (red); C: Metaphase spread of *N. nippon* before hybridizing with *B. oedicnemus* W chromosome probe (Arrows indicate the Z and W chromosomes of *N. Nippon*).

近期, 西安交通大学和华大基因已合作完成了朱鹮全基因组序列图谱绘制。朱鹮体细胞系的成功建立, 不仅保存了这一珍稀濒危鸟类的遗传资源, 也为后续开展其基因定位和其它生物学研究提供了实验材料。在本研究中所建立的朱鹮体细胞培养的方法, 也可以用于其他鸟类的体细胞系建立和保藏。

参考文献:

Cai WW, Lu P, Sheng J. 2005. The influence of the vascular smooth muscle cell proliferation in catheter injuried rat common carotid artery after eNOS transfection in vitro[J]. *J Chn Microcirc,* **9**(4): 251-260. [蔡文玮, 陆平, 盛静. 2005. eNOS 基因体外转染对大鼠颈总动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞增殖规律的影响. 中国微循环, **9**(4): 251-260.]

Ding CQ. 2004. Research on the Crested Ibis[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Education Publishing House. [丁长青. 2004. 朱鹮研究. 上海: 上海科技教育出版社.]

Goodpasture C, Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining[J]. *Chromosoma,* **53**(1): 37-50.

Li FL. 1989. The first crested ibis under artificial rearing conditions was born in the world[J]. *Chn J Zool*, **24**(6): 49, 50. [李福来. 1989. 人工饲养下世界第一只朱鹮出生. 动物学杂志, **24**(6): 49, 50.]

Liu LY, Wang BG, Guo XC, Li FL. 1992. Chromosomal identification of sex and karyotype analysis in *Nipponia Nippon*[J]. *J Beijing Normal Univ*: *Nat Sci Ed,* **28**(4): 554-547. [刘凌云, 王宝贵, 郭学聪, 李福来. 1992. 朱鹮的染色体性别鉴定及核型分析. 北京师范大学学报: 自然科学版, **28**(4): 554-557.]

Liu YZ. 1981. Recovery of Japanese crested ibis in Qin-Ling range[J]. *Acta Zool Sin,* **27**(3): 273. [刘荫增. 1981. 朱鹮在秦岭的重新发现(陕西省). 动物学报, **27**(3): 273.]

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods,* **65**(1-2): 55-63.

Nie WH, O'Brien PCM, Ng BL, Fu BY, Volobouev V, Carter NP, Ferguson-Smith MA, Yang FT. 2009. Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicnemus*, Charadriiformes)—An atypical species with low diploid number[J]. *Chromosome Res,* **17**(1): 99-113.

Pollock BJ, Fechheimer NS. 1981. Variable C-banding pattens and a proposed C-band karyotype in *Gallus domesticus*[J]. *Genetica,* **54**(3): 273-279.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes[J]. *Lancet,* **2**: 971-972.

Shi LM. 1989. Frozen Zoo-The establishment and application of animal cell repository[J]. *Bull Bio,* **31**(6): 1-3. [施立明. 1989. 冷冻动物园—野生动物细胞库的建立和应用. 生物学通报, **31**(6): 1-3.]

Shields GF. 1982. Comparative Avian cytogenetics: a review[J]. *Condor,* **84**(1): 45-58.

Summer AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin[J]. *Exp Cell Res,* **75**(1): 304 -306.

Takasi N, Sasaki M. 1974. A phylogenetic study of bird karyotypes[J]. *Chromosoma,* **46**(1): 91-120.

Zhou ZH. 2006. Animal Cell Culture Techniques[M]. Beijing: China Environmental Science Press. [周珍辉. 2006. 动物细胞培养技术. 北京: 中国环境科学出版社.]