

# 雞始基生殖細胞的培養與移植測試<sup>(1)</sup>

劉振發<sup>(2)</sup> 許義明<sup>(2)</sup> 劉曉龍<sup>(3)</sup> 戴謙<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)(4)(5)</sup> 蕭振文<sup>(6)(7)</sup>

收件日期：102 年 3 月 20 日；接受日期 102 年 10 月 1 日

## 摘 要

本研究旨在探討雞的始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 體外培養與移植後之性腺遷徙。PGC 分離自孵化 5.5 天雞胚胎的早期性腺，並與性腺中的基質細胞 (stroma cells) 共培養。在培養 7 – 10 天後 PGC 會增生並形成細胞團的樣態。PGC 持續培養至 280 天，檢測包括 SSEA-1、SSEA-4、Integrin  $\alpha 6$ 、Integrin  $\beta 1$  等未分化細胞的表面專一性標幟與 PAS (periodic acid Schiff) 染色檢測，結果均呈現陽性反應。此外，為證實 PGC 在血液循環系統具有遷徙至性腺的能力，將 PGC 移植到孵化 3 天 (stage 14 – 15) 雞胚胎的背大動脈。結果顯示 PGC 經過長期的體外培養，仍保有分化多能性 (pluripotency) 的標幟表現與遷徙至性腺的能力。

關鍵詞：雞、始基生殖細胞、分化多能性、遷徙。

## 緒 言

近年來，有許多科學家投入建立家禽幹細胞株的研究。家禽幹細胞株的建立，除了可以提供大量的細胞以進行基因轉殖之需；同時也可以在體外培養時，經由篩選正確表現外源 DNA 的細胞並予以株化，以提高家禽基因轉殖的準確性和基因轉殖效率。除此之外，幹細胞株還可以應用在家禽發育生物學相關的基礎研究或是珍貴、瀕絕品系的保存。

家禽幹細胞的來源有二，一是自 stage X 的胚葉細胞分離所獲得之胚幹細胞 (embryonic stem cell, ESC)，二是由始基生殖細胞分離而來的胚生殖幹細胞 (embryonic germ cell, EGC)。在家禽胚幹細胞分離與體外培養方面的研究，Pain *et al.* (1996) 由胚葉細胞分離所得的 ESC 可透過在培養液中添加生長因子而進行體外培養，並且將培養七天的胚葉細胞注入 stage X 的雞胚胎後，得到了嵌合體雞隻。在家禽胚幹細胞之體外培養方面，Park 和 Han 曾將始基生殖細胞於體外培養長達四個月，並證實這些經過培養的生殖幹細胞注入 stage X 的雞胚胎後，可以得到嵌合體雞隻 (Park and Han, 2000)。家禽基因轉殖技術的新發展除了幹細胞的建立之外，人為調控的組織特異性啟動子 (promoter) 是另一個具有潛力的發展方向，藉以促進外來基因於雞蛋中專一且適時適量的表現。因此，綜合上述基因轉殖法、幹細胞的培養和組織專一性啟動子篩檢的技術整合，可建立具有極大的發展空間之家禽基因轉殖平台。

家禽基因轉殖技術之開發有其難度，自 1989 年至今，僅有少數科學家成功生產出基因轉殖家禽。該技術雖未成熟，卻有高度的應用價值。由於家禽的世代間距短，每隻蛋雞平均年產蛋量可達 250 顆以上，每顆蛋的蛋白質含量極高，又基因轉殖家禽大量繁殖之可行性較高，所以可供產出高量的生醫藥用蛋白質，

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2020 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(4) 南台科技大學。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

(6) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(7) 通訊作者，E-mail：jwshiau@mail.tlri.gov.tw。

或利用其生產具特殊功能的家禽及其產品。由哺乳動物胎兒期原始性腺分離始基生殖細胞，經培養所得之胚生殖幹細胞為未分化且具分化多能性的幹細胞。PGC 為精子與卵子的前驅細胞，是很具潛力的一種基因轉殖家禽的標的之一。在家禽基因轉殖的研究上曾利用反轉錄病毒 (retroviruses) 來轉染家禽細胞以得到基因轉殖家禽 (Salter *et al.*, 1993; Thoraval *et al.*, 1995)、利用顯微注射 (Love *et al.*, 1994) 或利用微脂體 (liposome) 方法轉染胚葉細胞 (Brazolot *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1993) 或始基生殖細胞 (Naito *et al.*, 1994a; Chang *et al.*, 1995) 後再注入受胚個體。但是至目前為止，成功利用始基生殖細胞進行基因轉殖而獲得的轉殖雞的機率仍然偏低，原因之一是在於 PGC 於體外條件下無法長期培養，不易進行基因轉殖與篩選之操作。因此，建立 PGC 之體外培養系統，將提供充足而穩定的 PGC 來源之外源性基因轉殖的操作平台。而且，在長期培養的過程中，可利用細胞標記來篩選成功導入轉殖基因的細胞，作為轉移之媒介，提高基因轉殖效率。因此，本研究旨在建立雞的 PGC 分離與其體外培養的技術，供家禽基因轉殖研究之用。

## 材料與方法

### I. PGC 的分離與培養

將白色來亨雞受精卵置於 38℃、60–70% 濕度下孵化 5.5 天後 (約 stage 28)，將受精蛋取出。蛋的鈍端以 70% 酒精擦拭，利用滅菌鑷子敲擊打開蛋殼後，取出胚胎，放入 HBSS + 1% Penicillin/Streptomycin 培養基中，在解剖顯微鏡下將性腺取出，置於 10 mL 的 HBSS + 1% Penicillin/Streptomycin 培養基中。隨後以 200  $\times$ g 離心 5 分鐘後，棄上清液，將性腺組織以 1 mL 含有 0.53 mM EDTA 的 0.05% trypsin 處理 5 分鐘後，將細胞打散，再加入 10 mL 的 HBSS + 1% Penicillin/Streptomycin 培養基以 200  $\times$ g 5 分鐘的離心條件清洗兩次，棄上清液後，再以 4 mL 雞胚生殖幹細胞基礎培養基 [DMEM 內含 10 units/mL of human leukaemia inhibitory factor (mLIF; Sigma-Aldrich)、5 ng/mL of human stem cell factor (hSCF; Sigma-Aldrich)、10 ng/mL of human basic fibroblast growth factor (hbFGF; Sigma-Aldrich)、10 ng/mL of human insulin-like factor-I (hIGF-I; Sigma-Aldrich) 和 0.04 ng/mL of human interleukin-11(hIL-11; Sigma-Aldrich)]，再將 PGC 細胞連同其性腺基質細胞移入預先鋪覆以 gelatin 的 4 孔培養皿 (gelatin-coated 4-well plates)，置於 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培養箱進行培養。

### II. 分化多能性分析

本實驗是利用 PAS (periodic acid Schiff) 染色檢測及免疫細胞化學染色法進行經長期培養後之 PGC 細胞之分化多能性分析，選用的專一性抗體有 SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1)、SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen-4)、Integrin  $\alpha$ 6、Integrin  $\beta$ 1 等四種家禽生殖幹細胞的組織免疫染色抗體 (均購自 Chemicon Int., Temecula, CA, USA) 來進行檢測，以辨別經過長期培養後之細胞是否分化。

#### (i) PAS 染色檢測：

將培養盤中的細胞培養液吸出以 PBS 清洗一次再加入 1 mL 的 10% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 分鐘以 PBS 清洗二次加入 1 mL Periodic acid (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 5 分鐘。以 PBS 清洗二次。再加入 Schiff reagent (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 10 分鐘後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

#### (ii) 免疫細胞化學染色：

PGC 以含有 10% 福馬林的無水酒精固定在載玻片 30 分鐘，再加入 0.3% Triton X-100 反應 10 分鐘，再加入 5% FCS，於室溫靜置 2 小時，之後加入第一級抗體 (1:200 的比例添加)，置於 4℃ 作用 16–18 小時後，以 PBS 清洗 3 次，再加入第二級抗體 (biotin conjugated goat anti-mouse IgM; Chemicon AP128B; 以 1:1000 的比例添加)，於室溫靜置 2 小時後，以 PBS 清洗二次。加入 SAP (Streptavidin alkaline phosphatase conjugated, Chemicon SA204; 以 1:500 的比例添加) 於室溫下反應半小時後，再加入呈色劑 (NBT/BCIP; Chemicon ES0006)，於室溫下反應 10–15 分鐘，以 distilled water 潤洗，終止反應。然後以螢光顯微鏡 (DM IRB; Leica, Wetzlar, Germany) 進行觀察。

### III. PGC 報導基因轉染

本研究係利用電穿孔方式 (Electroporation) 對 PGC 進行報導基因之基因轉殖。細胞經 800  $\times$ g 離心

5 分鐘棄上清液，移入電融合小管 (BTX, model 620)；取 285  $\mu\text{L}$  的電穿孔培養基 (M199 + 10% CS + 1.32% DMSO) 加入 15  $\mu\text{L}$  綠色螢光蛋白 (GFP) 報導基因的 DNA (0.5  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$ ) 混合放入電融合小管，利用電穿孔儀 (BTX, Genetronics, Inc., San Diego, CA, USA) 以 150 Volt、10  $\mu\text{s}$ 、1 pulse 的條件進行電穿孔處理，之後將細胞再放回培養皿中培養，並於一小時後加入抗生素 (1% Penicillin / Streptomycin)。

#### IV. PGC 之活體移植測試

體外培養之 PGC 經轉殖報導基因後，參考 Naito *et al.* (1994a) 的方式，以顯微注射方式將 300 個 /  $\mu\text{L}$  的 PGC 以 Micro-Injector (model IM-88, Nikon; Tokyo, Japan) 注入 stages 14 – 15 雞胚的背大動脈進行活體移植。移植 PGC 的胚胎再經孵化後，分別以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分析及螢光顯微鏡鏡檢的方式來偵測胚體報導基因的表現，以檢視 PGC 移植後能否成功遷徙到被移植個體的性腺組織。

移植 PGC 的胚胎孵化到第 7 天後，取性腺並萃取 DNA，再以 PCR 進行檢測，所使用的引子序列分別為 F1：5'-GCTCAATCGAATTCTGC3' 與 1：5'-GAACTTCAGGGTCAGCTTGC3'，PCR 反應條件為：98 $^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94 $^{\circ}\text{C}$ ，30 秒；annealing：56 $^{\circ}\text{C}$ ，45 秒；extension：72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 分鐘，接著 72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 分鐘後，維持在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。若反應為陽性，則經電泳分析後，膠片可見一段長度 202 bp 的 PCR 產物。

另外，將部分移植胚胎持續孵化至第 19 天後，再取出胚胎性腺，以 4 $^{\circ}\text{C}$  生理鹽水清洗後放入以鋁箔紙製成的圓筒狀的容器中，加入 O.T.C. 冷凍包埋劑 (Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T<sup>™</sup> Compound; SAKURA Inc., USA)，再置放於液態氮中 5 分鐘，待 O.T.C. 包埋劑凝固後立即將其放入 -30 $^{\circ}\text{C}$  冰箱暫存。包埋後樣品委請國立成功大學醫學院核心實驗室進行組織冷凍切片 (7mm)。冷凍切片保存於 -30 $^{\circ}\text{C}$ ，供後續螢光顯微鏡檢測 (DM IRB; Leica, Wetzlar, Germany)，藉以觀察性腺組織是否有綠色螢光表現。

## 結果與討論

PGC 為精子與卵子的共同前驅細胞，目前是研究與產製基因轉殖家禽極具潛力的工具。在未孵化胚胎的胚盤、孵化後 3.5 天胚胎的背大動脈或孵化後 5.5 天時期的性腺均可分離出 PGC，並在適當體外培養條件下，使其細胞增生而形成具幹細胞表型特徵的細胞群落 (colony) (Shiue *et al.*, 2009; Park and Han, 2000)。本研究中，從孵化後 5.5 天的來亨雞胚胎性腺所分離的 PGC 為單一細胞型態 (圖 1)，經培養 7 至 10 天，即可觀察到 PGC 有細胞群落形成 (圖 2)。本研究使用的培養系統不需將 PGC 與性腺基質細胞分離，直接利用性腺基質細胞作為 PGC 培養時的飼養層進行共培養。

依據文獻指出，家禽 PGC 在形態學上特徵為：PGC 外觀呈現圓形或橢圓形，明顯大於與其他體細胞的細胞，有明顯的細胞質膜 (cytoplasmic membranes) 且在膜上含有肝醣 (glycogen)，在顯微鏡下觀察這些肝醣是以不同大小的囊泡狀顆粒之樣態呈現。另外，PGC 具有大的細胞核，核仁的位置偏側而不是在細胞核的中心位置 (Romanoff, 1960; Ukeshima *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1993)。PGC 在位於新月區 (germinal crescent) 時期的大小約為 12 – 18  $\mu\text{m}$ ，當進到血液循環時期的大小約為 11 – 22.21  $\mu\text{m}$  (Fujimoto *et al.*, 1976)，最後移行到生殖脊 (genital ridge) 的大小約為 10 – 25  $\mu\text{m}$  (Meyer, 1964)。

PGC 的鑑定，可經由顯微鏡觀察細胞形態或利用細胞染色等方法進行。PGC 其細胞形態特徵的確認一般可利用：(1) 細胞大小、(2) 細胞核的特徵、(3) 細胞形狀、(4) 細胞質中的物質來做為描述。依照此原則，可以辨識出三種形式的 PGC 型態：(1) 細胞較小、圓核、細胞質中含較少的肝醣顆粒。(2) 細胞較大，細胞質中含較多分佈均勻的肝醣顆粒。(3) 細胞最大，但細胞質中只含少量的肝醣顆粒 (Goldsmith, 1928)。然而，僅由顯微鏡的觀察鑑定，很難給予 PGC 完整的特徵描述。因此需進一步應用細胞學染色方式以更準確的辨識 PGC。由於 PGC 之細胞質含肝醣顆粒，在組織學上便可利用 periodic acid-Schiff (PAS) 將 PGC 中的肝醣染色獲得證實 (Meyer, 1960)。本研究體外培養出現的細胞群落，經 PAS 染色後的結果如圖 3 所示，經過 280 天長期的體外培養，這些細胞群落呈現陽性反應 (圖 3A 與 3B)，但與其進行共培養擔任滋養層細胞角色的基質細胞則呈現陰性反應 (圖 3C)，因此可以確定這些細胞群落乃是衍生自 PGC，而非性腺基質細胞。



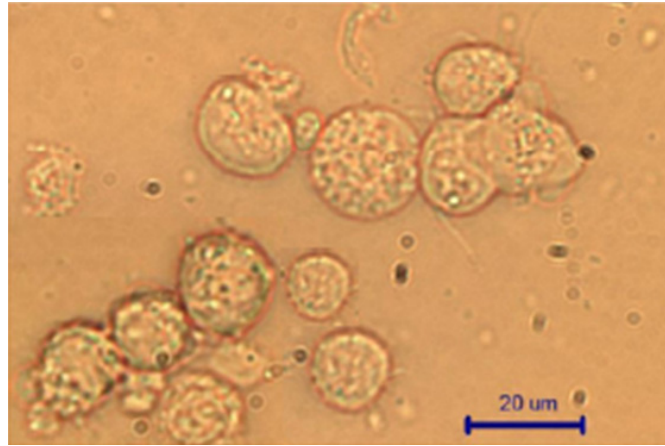


圖 1. 自 5.5 天雞胚胎性腺分離之始基生殖細胞的形態。

Fig. 1. The morphology of chicken PGC collected from the gonads of 5.5-day-old embryos. Scale bar = 20  $\mu$ m.

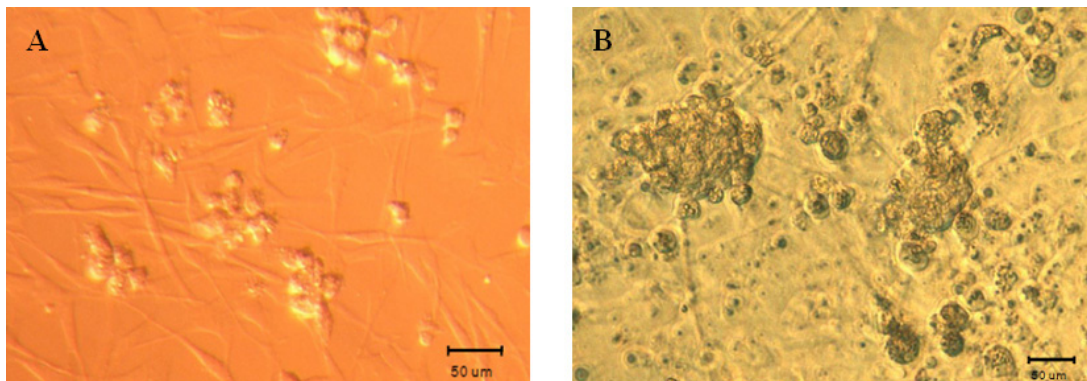


圖 2. 雞性腺始基生殖細胞 (PGC) 培養 10 天 (A) 和培養 280 天 (B) 的形態。

Fig. 2. The morphology of chicken PGC cultured for 10 days (A) and 280 days (B). Scale bar = 50  $\mu$ m.

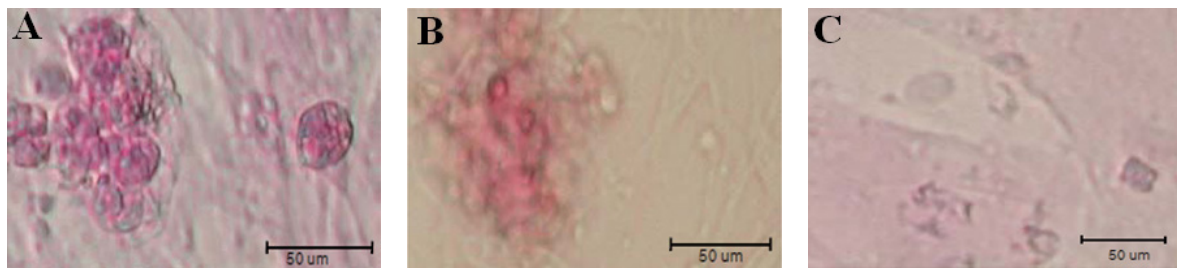


圖 3. 雞始基生殖細胞 (PGC) 利用 periodic acid-Schiff (PAS) 進行組織學染色。A：為 PGC 培養 60 天；B：為 PGC 培養 280 天；C：為性腺基質細胞 (陰性對照)。

Fig. 3. Histochemical staining of chicken PGC with periodic acid-Schiff (PAS). A: PGCs cultured for 60 days. B: PGCs cultured for 280 days. C: gonadal stroma cells (negative control). Scale bar = 50  $\mu$ m.

自早期胚胎性腺所分離的 PGC 是一種具有類幹細胞之未分化的特性的細胞，檢測 PGC 除了上述 PAS 染色法以外，亦可利用免疫組織學的方法，針對 PGC 表面的碳水化合物抗原決定基 (carbohydrate epitope) 如 EMA-1 (stage-specific embryonic antigen 1) 和 SSEA-4 等進行專一性染色辨別 (Urven *et al.*, 1988; Loveless *et al.*, 1990; Karagence *et al.*, 1996; Shiue *et al.*, 2009)。EMA-1 最早是應用在小鼠畸胎瘤細胞 (mouse embryonic carcinoma cells) 的單株抗體，可辨認細胞表面之 fucosylated polylactosamine 碳水化合物基團，而 Urven *et al.* (1988) 發現 EMA-1 亦可應用在雞 PGC 的辨識。SSEA-1 為未分化小鼠胚幹細胞 (embryonic stem cell) 的多能性標幟之一 (Solter and Knowles, 1978)。Anti-SSEA-1 可辨認細胞表面的 galactose ( $\beta$ 1-4) N-acetylglucosamine ( $\alpha$ 1-3) fucose，目前亦已證實在家禽生殖細胞之發育過程中也會表現此抗原 (Karagence

*et al.*, 1996; Shiue *et al.*, 2009)。Jung *et al.* (2005) 與 Shiue *et al.* (2006) 之研究亦指出 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Integrin  $\alpha 6$  及 Integrin  $\beta 1$  可以做為檢測家禽 PGC 分化多能性標幟。故為了確認本研究 PGC 在培養過程中仍維持未分化的狀態，使用包括 SSEA-1、SSEA-4、Integrin  $\alpha 6$  及 Integrin  $\beta 1$  等抗體，進行檢測。結果顯示經過 280 天培養的 PGC 皆可被這些單株抗體所辨識，證實這些經過長時間體外培養的 PGC 仍維持在未分化的狀態 (圖 4)。

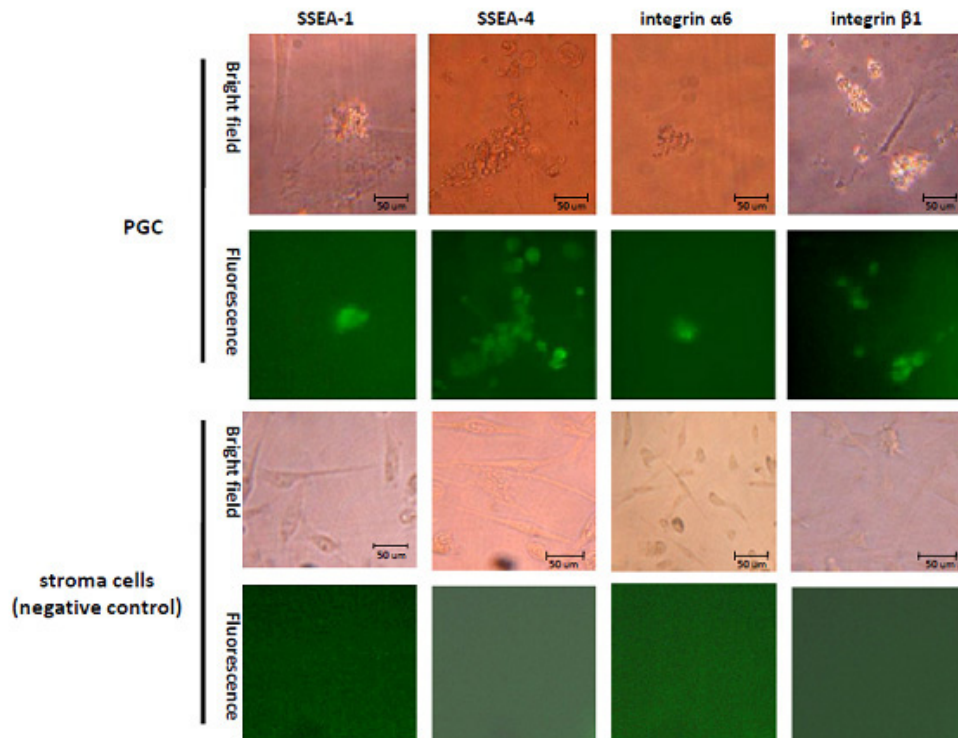


圖 4. 利用 SSEA-1、SSEA-4、integrin  $\alpha 6$  及 integrin  $\beta 1$  抗體對培養 280 天的雞 PGC 進行免疫組織學染色。

Fig. 4. Immunohistochemical staining of PGCs cultured for 280 days with antibodies to SSEA-1, SSEA-4, integrin  $\alpha 6$  and integrin  $\beta 1$ . Scale bar = 50  $\mu$ m.

除了使用細胞表面標記檢測 PGC 以確證其經長期培養後仍處於未分化的狀態外，本研究進一步將經過長期培養後的 PGC 進行活體移植測試，藉以探討此等 PGC 是否仍保有移行至性腺的特性。利用長期培養的 PGC 經轉殖報導基因 GFP 再經過 24 小時的培養後，在螢光顯微鏡下觀察可見綠色螢光表現 (圖 5)，隨後將 PGC 與飼養層之性腺基質細胞分離，再進行進行活體移植。本試驗共完成 120 個胚胎的 PGC 活體移植，其中有 50 個胚胎在移植後孵化到第 7 天將性腺取出萃取 DNA 供 PCR 檢測，結果有 15.7% (8/51) 的胚呈陽性反應 (圖 6)。

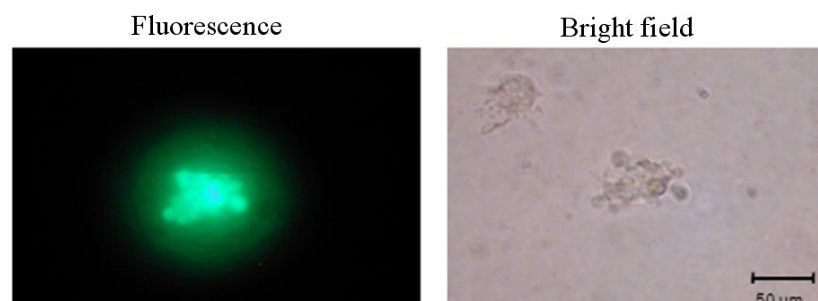


圖 5. 培養 253 天的 PGC 進行 GFP 基因轉染。

Fig. 5. GFP-transfected PGCs which have been cultured for 253 days before transfection. Scale bar=50  $\mu$ m.

另外 70 個胚胎有 33 個於孵化過程中發育中止，僅剩 37 胚胎持續正常發育，在孵化到第 19 天時取出性腺，進行冷凍切片檢查胚胎個體性腺中 GFP 基因的表現，結果有 13.5% (5/37) 的胚在螢光顯微鏡下觀察到其生精小管 (seminiferous tubules) 有 GFP 的表現 (圖 7)，顯示經體外培養的 PGC，以顯微注射的方式移植入接受移植胚胎 (孵化 3.5 天) 的背大動脈進入血液循環系統中後，能夠在接受移植胚胎的性腺拓殖 (colonize)。

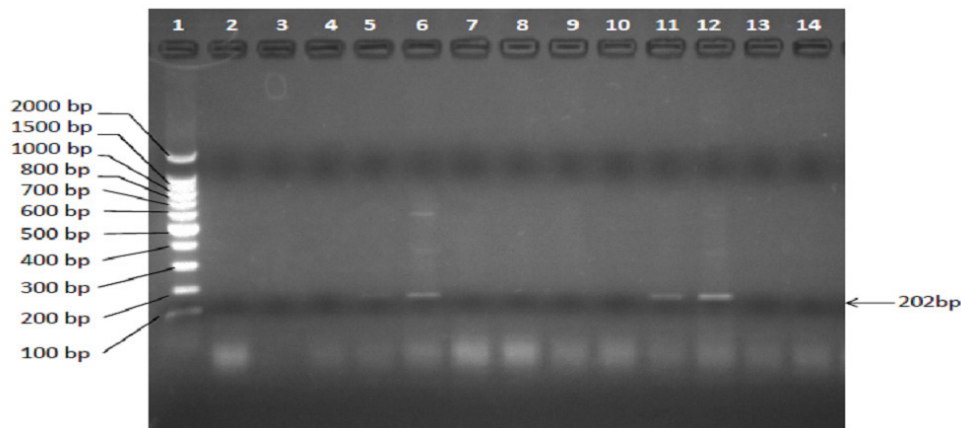


圖 6. 以 PCR 反應進行經 GFP 轉染之 PGC 移植的雞胚胎 (第 7 天) 性腺中 GFP 基因檢測。Lane 1 為 100 bp ladder marker；Lane 2 至 11 為經 GFP 基因轉染的 PGC 移植的胚胎性腺 DNA；Lane 12 為 pEGFP-CMV 質體 DNA (陽性對照組)；Lane 13 為注入不含細胞的 HBSS buffer 雞隻性腺 DNA (negative control)；Lane 14 為無菌水 (blank)。

Fig. 6. PCR analysis of gonads from 7-day-old chick embryos injected with GFP-transfected PGCs. Lane 1: 100bp ladder marker; Lane 2-11: genomic DNA from gonads of chicken embryos injected with GFP-transfected PGCs; Lane 12: pEGFP-CMV plasmid DNA (positive control); Lane 13: genomic DNA from gonads of chicken embryos injected with cell-free HBSS buffer (negative control); Lane 14: Deionized water (blank).

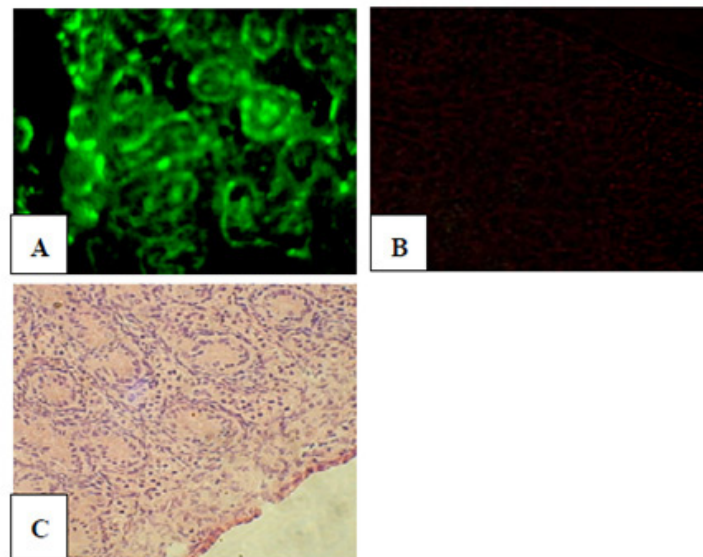


圖 7. 以螢光顯微鏡檢測移植以 GFP 轉染後的 PGC 之雞胚胎 (第 19 天) 性腺切片的 GFP 基因表現。A. 為移植以經 GFP 基因轉染的 PGC 的雞胚胎性腺。B. 注入不含細胞的 HBSS buffer 之雞隻性腺 DNA (negative control)。C. 為冷凍切片的性腺經 H&E 染色後圖片。(400x)

Fig. 7. Fluorescent microscope detection of gonads sections from 19-day-old chick embryos injected with GFP-transfected PGCs. A: gonads from chicken embryos injected with GFP-transfected PGCs; B: gonads from chicken embryos injected with cell-free HBSS buffer (negative control); and H&E staining (C). (400x)



表 2. 第 7 天和第 19 天胚胎性腺中 GFP 基因之檢測

Table 2. Detection of GFP gene expression in the gonads of 7-day-old and 19-day-old chicken embryos

Detection Methods	Age of Embryos (day)	No. of embryos detected	No. of embryos expressing GFP (%)
PCR	7	51	8 (15.7)
Microscope	19	37	5 (13.5)

近年來，家禽的基因轉殖研究已有成功的例子，McGrew *et al.* (2004) 以慢病毒載體 (lentiviral vectors) 為媒介，轉染新鮮受精蛋 (stage X) 的胚盤成功產製帶有增強螢光蛋白質 (enhance green fluorescent protein, eGFP) 及  $\beta$  半乳糖苷酶 (LacZ) 兩種報導基因之基因轉殖雞，其 G0 代到 G1 代外源基因的性腺傳承率為 4 – 45%；這些外源基因能穩定傳遞到 G2 代，證實慢病毒載體轉染可有效產製基因轉殖家禽。Lillico *et al.* (2007) 將選殖自卵管的卵白蛋白基因啟動子構築到慢病毒載體內，藉以調控醫療用蛋白質 miR24 和 hIFN $\beta$ 1a 基因在卵管中表現並分泌到雞蛋之蛋白中，成功產製基因轉殖雞，並將外源基因順利傳遞到 G2 代。這些基因轉殖雞生產的雞蛋可純化出 miR24 和 hIFN $\beta$ 1a 兩種醫療用蛋白質。Scott and Lois (2005) 亦利用慢病毒載體成功產製具有組織表現特異性的基因轉殖鵪鶉。此外，Koo (2006) 應用鼠科白血病一反轉錄病毒 (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) 載體系統，成功產製一個高效率表現 eGFP 之基因轉殖雞品系。在性腺傳承後保留了 eGFP 基因，且表現水準高達 100  $\mu$ g/1 mg 之組織蛋白質。經 DNA 序列分析，顯示外源基因穩定插入 G1 代與 G2 代基因轉殖雞之第 26 號染色體。Kwon *et al.* (2008) 亦利用 MoMLV 載體，注射於 stage X 之雞胚中，成功產製帶有人類顆粒細胞刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rh G-CSF) 重組蛋白並證實可以性腺傳承到後代，這些基因轉殖雞表現之 rhG-CSF 其生物活性顯著高於利用大腸桿菌生產之商業化產品。

在家禽基因轉殖技術之發展上，除了直接將慢病毒載體注入新鮮受精蛋的胚盤內而成功產製基因轉殖家禽外，也可利用 PGCs 為媒介來進行雞之基因轉殖 (Naito *et al.*, 2007; van de Lavoie *et al.*, 2006)；然而，卻僅能在胚胎階段偵測到外源 eGFP 的表現，迄今尚未能成功產出基因轉殖雞個體。儘管如此，以 PGC 為媒介，產製基因轉殖雞仍是很有潛力之途徑之一，利用 PGC 的移植，已成功產出性腺嵌合的後代 (van de Lavoie *et al.*, 2006)。

目前雖已有成功產製基因轉殖雞的報告 (McGrew *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2006; Lillico *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2008)，但在家禽的基因轉殖技術的可重複性，導入的外源基因表現強度與世代傳承的穩定程度等方面，仍有進一步的改善空間。利用基因轉殖動物做為生物反應器來生產特用蛋白的技術平台是科學界極力想達成的目標。然而，如何讓基因轉殖動物能長時間且穩定的表現外源基因，則是畜禽基因轉殖技術平台能否順利步入商業化應用之重要關鍵。

## 致 謝

本研究由生理組同仁李秀美、孫碧月、陳英麗等協助完成，特此致謝。

## 參考文獻

- Brackett, B. G., W. Baranska, W. Sawicki and H. Kooprowski. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 353–357.
- Brazolot, C. L., J. N. Petitte, R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins. 1991. Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 30:304–312.
- Chang, I. K., A. Yoshiki, M. Kusakabe, A. Tajima, T. Chikamune, M. Naito and T. Ohno. 1995. Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 19: 569–576.

- Fraser, R. A., R. S. Carsience, M. E. Clark, R. J. Etches and A. M. Gibbins. 1993. Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 381–385.
- Fujimoto, T., T. Menomiya and A. Ukeshima. 1976. Observation of the primordial germ cells in blood samples from the chick embryo. *Dev. Biol.* 49: 278–82.
- Karagenc, L., Y. Cinnamon, M. Ginsburg and J. N. Petitte. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Developmental Genetics* 19: 290–301.
- Koo, B. C., M. S. Kwon, B. R. Choi, J. H. Kim, S. K. Cho, S. H. Sohn, E. J. Cho, H. T. Lee, W. Chang, I. Jeon, J. K. Park, J. B. Park and T. Kim. 2006. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV based retrovirus vector. *FASEB J.* 20: 2251–2260.
- Kwon, M. S., B. C. Koo, B. R. Choi, Y. Y. Park, Y. M. Lee, H. S. Suh, Y. S. Park, H. T. Lee, J. H. Kim, J. Y. Roh, N. H. Kim and T. Kim. 2008. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 1120–1126.
- Love, J., C. Gribbin, C. Mather and H. Sang. 1994. Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12: 60–63.
- Loveless, W., R. Bellairs, S. J. Thorpe, M. Page and T. Feiz. 1990. Developmental patterning of carbohydrate antigen FC10.2 during early embryogenesis in the chicken. *Development* 108: 97–106.
- Lillico, S. G., A. Sherman, M. J. McGrew, C. D. Robertson, J. Smith, C. Haslam, P. Barnard, P. A. Radcliffe, K. A. Mitrophanous, E. A. Elliot and H. M. Sang. 2007. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1771–1776.
- McGrew, M. J., A. Sherman, F. M. Ellard, S. G. Lillico, H. J. Gilhooley, A. J. Kingsman, K. A. Mitrophanous and H. Sang. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO J.* 5: 728–733.
- Meyer, D. B. 1960. Application of period acid–Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technology* 35: 83–89.
- Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1994a. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 39: 153–161.
- Natio, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1994b. Preservation of chicken primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J. Reprod. Fertil.* 102: 321–325.
- Naito, M., T. Minematsu, T. Harumi and T. Kuwana. 2007. Testicular and ovarian gonocytes from 20-day incubated chicken embryos contribute to germline lineage after transfer into bloodstream of recipient embryos. *Reproduction* 134: 577–784.
- Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut and R. J. Etches. 1996. Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339–2348.
- Park, T. S. and J. Y. Han, 2000: Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 475–482.
- Romanoff, A. L. 1960. *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. New York: Macmillan Company.
- Salter, D. W., W. S. Payne, L. B. Crittenden, M. J. Federspiel, C. J. Petropoulos, J. A. Bradac and S. Hughes. 1993. Avian leukemia retroviruses and gene transfer into the avian genome. Pages 135–150 *in*: *Manipulation of the Avian Genome*. R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Scott, B. B. and C. Lois. 2005. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 16443–16447.
- Shiue, Y. L., J. J. Tailiu, J. F. Liou, H. T. Lu, C. Tai, J. W. Shiau and L. R. Chen. 2009. Establishment of the Long-Term *In Vitro* Culture System for Chicken Primordial Germ Cells. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 55–61.
- Solter, D. and B. B. Knowles. 1978. Monoclonal antibody defining stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-



- 1). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75: 5565.
- Thoraval, P., M. Afanassieff, F. L. Cosset, F. Lasserre, G. Verdier, F. Coudert and G. Dambrine. 1995. Germline transmission of exogenous genes in chickens using helperfree ecotropic avian leukosis virus-based vectors. *Trans. Res.* 4: 369–376.
- Ukeshima, A., K. Yoshinaga and T. Fujimoto. 1991. Scanning and transmission electron microscopic observation of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J. Electron. Microsc.* 40: 124–128.
- Urven, I. E., C. A. Erickson, U. K. Abbott and J. R. McCarrey. 1998. Analysis of germline development in the chick using anti-mouse EC cell antibody. *Development* 103: 299–304.
- van de Lavoie, M., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, T. M. Gessaro, S. E. Swanberg, M. E. Delany and R. J. Etches. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441: 766–769.
- Yoshinaga, K., M. Nakamura and A. Ukeshima. 1993. Ultrastructural characteristics of primordial germ cells in the quail embryo. *Anat. Rec.* 236: 547–52.

# Transplantation of chicken primordial germ cells after long-term in vitro culture<sup>(1)</sup>

Jenn-Fa Liou<sup>(2)</sup> Yu-Min Shue<sup>(2)</sup> Hsiao-Lung Liu<sup>(3)</sup> Chein Tai<sup>(4)</sup>  
Lih-Ren Chen<sup>(2)(4)(5)</sup> and Jen-Wen Shiau<sup>(6)(7)</sup>

Received: Mar. 20, 2013; Accepted: Oct. 9, 2013

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the capacity of gonadal migration and characterization for chicken primordial germ cells (PGCs) after long-term in vitro culture. Chicken PGCs collected the primitive gonads from 5.5-day-old White Leghorn chicken embryos were plated together with their own stroma cells as co-culture. The cultures PGCs began to form colonies 7-10 days after plating. The PGC-derived colonies maintained in culture up to 280 days were positively stained with antibodies specific to anti-SSEA-1, SSEA-4, integrin  $\alpha 6$  and integrin  $\beta 1$ , and also strongly expressed periodic acid Schiff reaction. Their capacities of migration and colonizing in the primary gonadal ridge were further demonstrated by transferring to stage 14-15 (3 days old) recipient embryos. These results suggested that chicken PGCs maintained in long-term culture retains their capacity to express pluripotent markers and to integrate into the gonads.

Key words: Chicken, Primordial Germ Cell (PGC), Pluripotent, Migration.

---

(1) Contribution No.2020 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(3) Animal Industry Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(4) Southern Taiwan University, Tainan 710, Taiwan, Taiwan, R. O. C.

(5) Institute of Biotechnology, National Chung Kung University, Tainan 701, Taiwan, R. O. C.

(6) Technical Service Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(7) Corresponding author, E-mail: jwshiau@mail.tlri.gov.tw