

雞始基生殖細胞移植後之胚胎存活率與其性腺遷徙之探討⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 許義明⁽²⁾ 劉曉龍⁽³⁾ 郭曉芸⁽²⁾ 蕭振文⁽⁴⁾ 戴謙⁽⁵⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾

收件日期：103 年 8 月 17 日；接受日期：104 年 1 月 13 日

摘 要

始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 為精子與卵子的前驅細胞，是目前家禽基因轉殖研究甚具潛力之轉殖途徑之一。本研究之目的是探討家禽 PGC 進行活體移植後之胚胎存活率及性腺遷徙效率。PGC 的收集是自孵化 5.5 天的來亨雞早期胚胎之性腺進行分離而得；在評估移植後之胚胎存活率與性腺遷徙效率，是先將 PGC 以電穿孔方式轉染綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 報導基因後，注入 2 μ L (150 – 500 cells / μ L) 的 PGC 到孵化 3.5 天 (stage12 – 15) 胚胎的背大動脈之方式進行活體移植測試。結果顯示，胚胎進行 PGC 移植後，在孵化到第 10 天和 19 天的存活率分別為 68.7% (90/131) 和 60.0% (39/65)；在移植後孵化到第 10 天和 19 天胚胎性腺 GFP 報導基因的檢測呈現陽性反應分別為 20.7% (38/183) 和 11.4% (7/61)。

關鍵詞：始基生殖細胞、雞、活體移植、胚胎存率、性腺遷徙率。

緒 言

雞的始基生殖細胞是起源於剛產下的受精蛋 (stage X) 的胚盤 (blastodisc or germinal disc) 之上胚葉 (epiblast) 層 (Eyal-Giladi *et al.*, 1981)，或是入孵一天後的受精蛋 (stage 4) 之胚體 (Hamburger and Hamilton, 1951) 胚葉透明區 (area pellucida) 的下胚葉層 (hypoblast layer) 中之生殖新月區 (germinal crescent) (Swift, 1914; Ginsburg and Eyal-Giladi, 1986)。雞的 PGC 於雞胚發育到 stage 10 – 12 時 (約在孵化後 30 – 32 h)，開始遷移進入正在發育的血管內，藉著血液循環系統而遷移，此時的 PGC 稱作循環始基生殖細胞 (circulating PGC, cPGC)。在正常的雞胚中，大部份的 PGC 最後會離開血液循環系統，遷移集中至發育中的早期性腺，即稱為生殖嵴 (germinal ridge) 的部位 (Ando and Fujimoto, 1983; Ukeshima *et al.*, 1991; Urven *et al.*, 1988)；PGC 於此階段稱作性腺始基生殖細胞 (gonadal PGCs, gPGCs)。生殖嵴位於中腎的內側，左右成對，隨著胚胎的發育會逐漸地發展成性腺，而始基生殖細胞在完成遷移之後，在雄性個體中會分化為精原細胞 (spermatogonia)，而在雌性個體中則分化為卵原細胞 (oogonia) (Nakamura *et al.*, 1988)，接著再進一步分化成為精子與卵子。

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 的細胞予以株化，以提高家禽基因轉殖的準確性和效率。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保存珍貴、瀕絕的品系。

家禽幹細胞的來源有二，一是自 stage X 的胚盤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培養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) 由胚盤細胞分離所得的 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 ESC 注入 stage X 的雞胚胎後，得到了嵌合體雞隻。在家禽生殖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

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2191 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) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(5) 南台科技大學生物科技系。

(6) 國立成功大學生物科技研究所。

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

and Han, 2000)。證實雞的 ESC 與 EGC 經體外培養後，仍維持分化的多能性，能夠參與胚胎組織的形成。

然而，家禽基因轉殖技術的新發展除了胚幹細胞的建立之外，人為調控以促進外源基因於雞蛋中專一且適時適量表現的組織特異性啟動子 (promoter) 的構築，是另一個具有潛力的發展方向。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臺。

家禽基因轉殖技術之開發有其難度，自 1989 年至今，僅有少數成功生產出基因轉殖家禽的案例。該技術雖未臻成熟，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，所以可供生產高量的生醫藥用蛋白質，或具特殊功能的家禽及其產品。在家禽基因轉殖的研究上曾利用反轉錄病毒 (retroviruses) 來轉染家禽胚葉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 PGC (Naito *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1995) 後再注入受胚個體。但是至目前為止，成功利用 PGC 進行基因轉殖而獲得基因轉殖雞的機率仍然偏低。若要以 PGC 為媒介成功產製基因轉殖雞，首要關鍵就是移植的 PGC 必須能夠在被接受移植的胚胎 (recipient) 內順利遷徙並且拓殖 (colonize) 到性腺，並且能夠進一步分化成為生殖細胞。因此，本研究目的是要分析探討 PGC 活體移植後之胚胎存活率與性腺遷徙效率，以提供進行家禽基因轉殖研究與提昇家禽生殖效率之參考。

材料與方法

I. PGC 的分離與培養

將白色來亨雞受精蛋置於 38°C、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摘出，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)]，將 PGC 細胞連同其性腺基質細胞重新懸浮，並移入預先鋪覆以 gelatin 的 4 孔培養皿 (gelatin-coated 4-well plates)，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱進行培養。

II. 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 分鐘後棄上清液，移入電融合小管 (BTX, model 620)；取 285 μ L 的電穿孔培養基 (M199 + 10% CS + 1.32% DMSO) 加入 15 μ L 綠色螢光蛋白 (GFP) 報導基因 (pAcGFP1-N1) (購自 Clontech. Laboratories, Inc.) 的質體 DNA (0.5 μ g / μ 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 μ 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) 後持續進行培養。

III. PGC 之活體移植測試

PGC 之活體移植測試係以體外培養之 PGC 經轉殖報導基因後，參考 Naito *et al.* (1994) 的方式，以顯微注射方式將 2 μ L 的 PGC 以 Micro-Injector (model IM-88, Nikon; Tokyo, Japan) 注入進孵 3.5 天雞胚 (stages 14-15) 的背大動脈進行活體移植。

在移植測試實驗中，分別將 PGC 做不同的處理分組進行移植：其中 A 處理組為 PGC 分離之後，即進行 GFP 電穿孔轉染與移植；B 處理組為 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染，然後經培養 1 天再移植；C 處理組為 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染，然後經培養 7 天再移植。D 處理組則為 PGC 分離後，經體外培養 7 天後再進行 GFP 轉染及移植。另外，在進行活體移植時亦將移植 PGC 的細胞數進行調整，最終每個胚胎以 300、500、700 和 1,000 個細胞數進行移植測試。

IV. PGC 移植後性腺遷徙效率分析

移植 PGC 的胚胎經持續孵化後，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胎報導基因的表現，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 10 天和 19 天後，摘取性腺並萃取 DNA，再以 PCR 進行檢測，所使用的引子序列分別為 F1: 5'-GCTCAATCGAATTCTGC3' 與 R1: 5'-GAACTTCAG GGTCAGCTTGC3'，PCR 反應條件為：98°C，15 min；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94°C，30 sec；annealing：56°C，45 sec；extension：72°C，1 min，接著 72°C，10 min 後，維持在 4°C。若反應為陽性，經電泳分析可擴增一段長度 280 bp 的 DNA 片段。

另外，將部分移植 PGC 的胚胎持續孵化至第 19 天後，再取出胚胎性腺，以 4°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® O.C.T™ 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°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 (7 mm)，供後續螢光顯微鏡 (DM IRB; Leica, Wetzlar, Germany) 檢測觀察性腺組織是否有綠色螢光表現。

V. 統計分析

本試驗所得數據之差異顯著性以卡方 (Chi-square) 測驗分析之。

結果與討論

本試驗共收集 955 個孵化 5.5 天的來亨雞胚胎性腺供分離 PGC。PGC 經以 150 Volt、10 μ s、1 pulse 的條件進行電穿孔處理 (Shiue *et al.*, 2009；劉等 2013)，成功轉染 GFP 報導基因後，在螢光顯微鏡下可呈現綠色螢光 (圖 1)；再以本條件進行電穿孔處理 GFP 報導基因的轉染率約 40 – 45%。

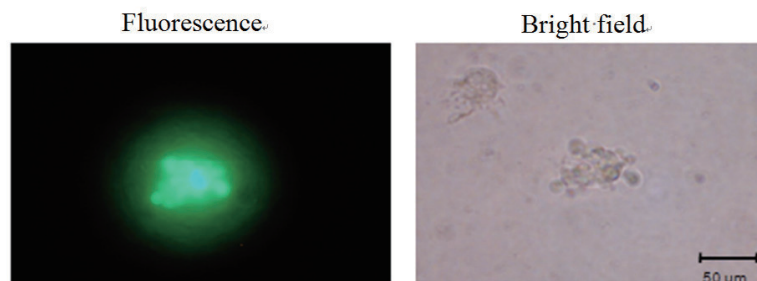


圖 1. PGC 經 GFP 基因轉染後，表現出綠色螢光。

Fig. 1. Green fluorescence expression of PGCs transfected with GFP reporter gene.

Scale bar = 50 μ m.

在活體移植測試部分，本研究分別將不同處理分組的 PGC 進行移植，A 處理組為 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染與移植。B 處理組為 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染，之後經體外培養 1 天再移植。C 處理組為 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染，隨後經體外培養 7 天再移植。D 處理組則為 PGC 分離後先體外培養 7 天，然後再進行 GFP 轉染及移植。本試驗共進行 242 例胚胎活體移植試驗 (包括 A 處理組有 92 例，B 處理組有 47 例，C 處理組有 42 例，D 處理組則有 59 例)。胚胎在完成 PGC 移植後繼續進行孵化，並分別於孵化第 10 天和 19 天先進行胚胎存活率紀錄，然後再將存活的胚胎性腺取出，萃取獲得 genomic DNA 後，分別以 PCR 分析及螢光顯微鏡檢的方式來偵測胚胎性腺組織報導基因的表現情形，若為陽性反應者，經電泳分析可檢出一段長度為 280bp 的擴增 DNA 片段 (圖 2)。試驗結果顯示，胚胎在經活體移植轉染 GFP 的 PGC 後，孵化第 10 天和 19 天的性腺呈現陽性反應的百分率分別為 20.7% (38/183) 和 11.4% (7/61)。

本試驗共進行 PCR 檢測 242 例，在不同分組的分析樣品數與 GFP 基因檢出呈現陽性反應的比例如表 1 所示，其中 A 處理組有 5.4% (5/92)，B 處理組有 48.9% (23/47)，C 處理組有 20.45% (9/44) 以及 D 處理組有 13.5% (8/59) 呈陽性反應。以上結果顯示以 B 組之於 PGC 分離後，馬上進行 GFP 轉染，然後經體外培養 1 天再進行移植的處理之檢出率較高 ($P < 0.05$)。

在移植不同數量的 PGC (300、500、700 和 1,000 個)，對移植後胚胎存活率與 PGC 移植後在不同取樣時間 (孵化第 10、天 19 天和 21 天) 之胚胎存活率的影響方面如表 2 所示。結果顯示在移植 300、500、700 與 1000 個 PGC 後胚胎的存活率分別是 0.3% (76/108)、54.4% (37/68)、57.4% (31/57) 與 50.0% (6/12)。移植不同細胞數後之胚胎孵化到第 10、天 19 天和 21 天之存活率如表 3 所示。若不考慮移植細胞數的因素，本研究所進行 242 例 PGC 活體移植之胚胎於孵化第 10 天、19 天和 21 天的存活率則分別為 68.7% (90/131)、60.0% (39/65) 和 45.6% (21/46)。整體而言，

PGC 移植後胚胎的存活率會隨著移入 PGC 數量的增加而降低；同時，PGC 移植後的胚胎在孵化早期較後期的存活率高。另外，以 PCR 檢測分析個別胚胎經移植 300、500 和 700 等不同數量的經轉染 GFP 的 PGC 後，胚胎中外源 PGC 之性腺遷徙率分別為 27.0% (13/48)、18.7% (6/32) 和 61.9% (13/21) (表 4)，是以每個胚移植 700 個 PGC 的檢出率較高。

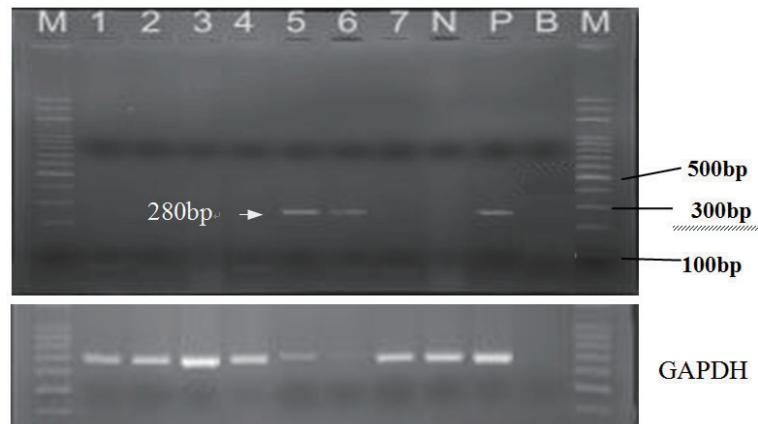


圖 2. 以 PCR 檢測轉染 GFP 之 PGC 移植的雞胚胎性腺中之 GFP 基因。

M：為 100 bp ladder marker；Lane 1 至 7：為經 GFP 基因轉染的 PGC 移植的胚胎性腺 DNA；P：為 pAcGFP1-N1 質體 DNA(陽性對照組)；N 為注入不含細胞的 HBSS buffer 雞隻性腺 DNA (negative control)；B：為無菌水 (blank)。

Fig. 2. PCR analysis of gonads from chicken embryos transplanted with GFP-transfected PGCs. Lane M: 100 bp ladder marker; Lane 1-7: genomic DNA from gonads of chicken embryos transplanted with GFP-transfected PGCs; Lane N: genomic DNA from gonads of chicken embryos injected with cell-free HBSS buffer (negative control); Lane P: pEGFP-CMV plasmid DNA (positive control); Lane B: Deionized water (blank).

表 1. 以 PCR 方式檢測 PGC 移植胚胎性腺中 GFP 基因之表現分析

Table 1. Expression of GFP gene in the gonads developed from PGC transplanted embryos detected by PCR

Treatment*	No. of embryos detected	No. of embryos expressing GFP (%)
A	92	5.4% (5/92) ^a
B	47	48.9% (23/47) ^c
C	44	20.45% (9/44) ^b
D	59	13.5% (8/59) ^{ab}

*Treatment:

A: After isolation and GFP transfection, the PGCs were immediately transplanted into recipient embryos.

B: After isolation and GFP transfection, the PGCs were cultured for 1 day and then transplanted into recipient embryos.

C: After isolation and GFP transfection, the PGCs were cultured for 7 days and then transplanted into recipient embryos.

D: After isolation and in vitro culture for 7 days, the PGCs were transfected with GFP and then transplanted into recipient embryos.

^{a, b} Means in the column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 2. 移植不同數量 PGC 之胚胎存活率

Table 2. The survival rate of recipient embryos after transplanted with different number of PGCs

No. of PGC injected per embryo	No. of embryo transplanted	Survival rate, %
300	108	70.3 (76/108) ^b
500	68	54.4 (37/68) ^a
700	54	57.4 (31/54) ^a
1,000	12	50.0 (6/12) ^a

^{a, b} Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. 移植不同數量的 PGC 對接受移植胚胎於不同時期之胚胎存活之影響

Table 3. The effect of different PGC number transplantation on embryo survival rate at different incubation periods

No. of PGC injected per embryo	No. of embryo transplant	Age of embryos survival, %		
		day 10	day 19	day 21
300	108	79.3 (50/63) ^{aA}	57.7 (26/45) ^{aB}	-
500	68	54.2 (19/32) ^{aB}	65 (13/20) ^{aB}	31.2 (5/16) ^{aB}
700	54	58.3 (21/36) ^{aA}	-	55.5 (10/18) ^{aA}
1,000	12	-	-	50.0 (6/12) ^a
Total	242	68.7 (90/131) ^b	60 (39/65) ^{ab}	45.6 (21/46) ^a

^{A, B} Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

^{a, b} Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 4. 移植不同 PGC 數量之胚胎性腺遷徙率檢測

Table 4. The effect of transplant numbers on gonad migration rate of the transplanted PGCs in recipient embryos

No. of PGC transplanted	No. of embryos detected	Efficiency of gonad migration, %
300	48	27.0 (13/48) ^a
500	32	18.7 (6/32) ^a
700	21	61.6 (13/21) ^b

^{a, b} Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

另外，將部分進行 PGC 活體移植之胚胎的性腺組織進行冷凍切片 (7 mm)，直接利用螢光顯微鏡進行觀察性腺組織之綠色螢光表現。結果顯示，供試的 23 個樣品中有 10 個 (43.4%) 在螢光顯微鏡下呈現 GFP 的綠色螢光 (圖 3)。表示 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。

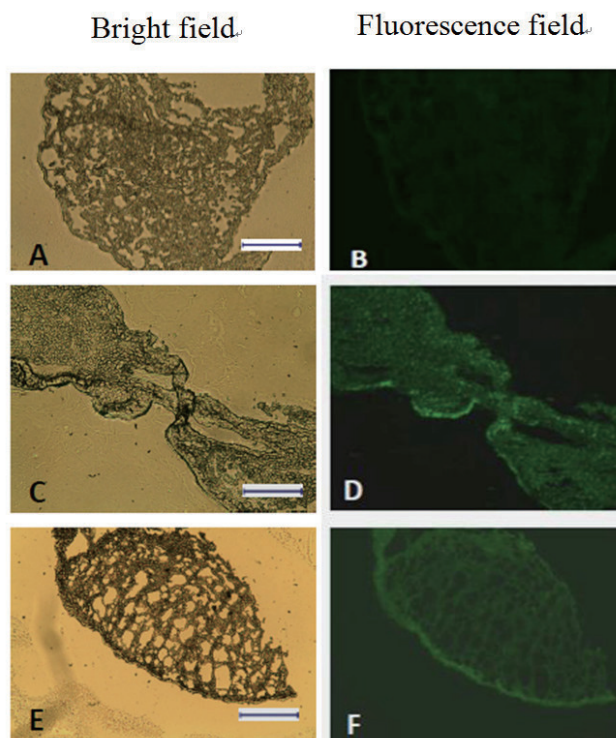


圖 3. 以螢光顯微鏡檢測移植以 GFP 轉染後的 PGC 之雞胚胎 (第 19 天) 性腺切片的 GFP 基因表現。A 和 B：為注入不含細胞的 HBSS buffer 之雞隻性腺 (negative control)；C – F：為移植以經 GFP 基因轉染的 PGC 的雞胚胎性腺。

Fig. 3. Fluorescent microscope detection of gonad sections from 19-day-old chick embryos transplanted with GFP-transfected PGCs. A and B: gonads from chicken embryos injected with cell-free HBSS buffer (negative control); C-F: gonads from chicken embryos injected with GFP-transfected PGCs. Scale bar = 100 μ m.

鳥類的 PGC 具有能經由血液循環遷移並擴殖於性腺，以及其後續分化為生殖細胞的特性。因此，PGC 已經被認為是家禽用來取代受精卵，並且藉由改變 PGC 的基因，而成為生產轉殖基因家禽最具潛力的媒介標的。自禽類早期胚的生殖新月區 (germinal crescent) (Wentworth *et al.*, 1989, Jeong *et al.*, 1999) 或者胚胎的血液 (Naito *et al.*, 1994) 中收集 PGC，進行移植均有成功生產性腺嵌合 (germline chimeras) 後代的案例。但是，在不同階段與不同部位分離 PGCs 的困難度有所差別，且可分離到的 PGCs 數量多寡也不同。

最近，自 gPGC 被廣泛用來生產性腺嵌合 (germline chimeric) 雞，因為從早期胚胎的性腺組織進行 PGC 收集，相對比較其他的部位 (如胚盤或血液) 可以收集到較多的 PGC。Tajima *et al.* (1998) 以孵化 5 天的胚胎的性腺組織分離的 PGC，經冷凍解凍後再進行移植成功生產出性腺嵌合雞。

利用 PGC 移植進行性腺嵌合家禽產製，成功的關鍵為捐贈 (donor) 的 PGC 能夠在被接受 (recipient) 移植胚胎內順利遷徙並且擴殖 (colonize) 到性腺，且進一步要能夠成功發育成為生殖細胞 (精子或卵子)。因此，捐贈的 PGC 與接受移植胚胎的性腺內的 PGC 可能發生競爭的情形。有研究指出當以白色來亨雞的 PGCs 移植到橫斑蘆花雞 (Barred Plymouth Rock)，其成功產製性腺嵌合的比率是將橫斑蘆花雞的 PGC 移植到白色來亨雞的百分率高出 3.5 倍 (Naito *et al.*, 1994)，類似結果也發生在不同品系白色來亨雞之間的 PGC 進行互相移植 (23.3% 與 3.1%；Nakamura *et al.*, 2010b)。另外，在雞與鵪鶉之不同家禽間 PGC 相互移植的研究結果顯示，將雞的 PGC 注入鵪鶉胚胎，PGC 遷徙到性腺的百分率約為移植總數的 5.6% (Ono *et al.*, 1998a)；反之將鵪鶉的 PGC 注入到雞的胚胎，則 PGC 遷徙到性腺的百分率約為移植總數的 14.2% (Ono *et al.*, 1998b)。這些結果顯示以外源 PGC 的移植來產製性腺嵌合家禽，其性腺嵌合的效率與提供捐贈和接受移植的品種 (或品系) 有關 (Naito *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2010b)。除此之外，PGC 移植數量的多寡亦是一個提升性腺嵌合的關鍵要素。Kim *et al.* (2010) 分別進行不同數量的 PGC (0、90、900、1,800 和 3,000 細胞) 以背大動脈顯微注射的方式進行 PGC 的移植測試，並於孵化第六天時取其胚胎的性腺進行性腺遷徙率分析。結果顯示在胚胎發育到第 6 天分析性腺遷徙效率是以移植 900 個 PGC 為最高 (35.8%)，在少於 900 個 PGC 的移植情況下性腺遷徙效率隨著移植 PGC 數量的增加而提升 ($P < 0.0001$)。但是當移植 PGC 數量超過 900 個以上，則性腺遷徙效率並沒有因為 PGC 數量的增加而增加。故 Kim *et al.* (2010) 認為在接受移植者之性腺能夠接受 PGC 的數量可能有所限制，所以導致移植較多數量的 PGC (3,000 個) 也未能增加其性腺的移行效率，因此認為 PGC 移植的最大數量約為 900 個。

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 β 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。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。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 PGC 為媒介來進行雞之基因轉殖 (van de Lavoie *et al.*, 2006; Naito *et al.*, 2007)。因為 PGC 為精子與卵子的前驅細胞，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臺是科學界極力想達成的目標。然而，在以 PGC 為媒介進基因轉殖的研究，如何提升移植 PGC 的的胚胎存活率與性腺遷徙效率，是產製基因轉殖家禽的重要關鍵之一，根據本試驗顯示移植 700 個 PGC 可得到較好性腺遷徙效率，此結果將可供後續相關研究參考。

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

劉振發、許義明、劉曉龍、戴謙、陳立人、蕭振文。2013。雞始基生殖細胞的培養與移植測試。畜產研究。46(4)：

245-254。

- Ando, Y. and T. Fujimoto. 1983. Ultrastructure evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migration to the gonadal anlagen. *Dev. Growth Differ.* 25: 345-352.
- 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.
- Eyal-Giladi, H., M. Ginsburg and A. Fabarov. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morph.* 65: 139-147.
- 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.
- Ginsburg, M. and H. Eyal-Giladi. 1986. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 95: 53-71.
- Jeong, D. K., T. S. Park, D. K. Kim, K. D. Song, Y. H. Hong and J. Y. Han. 1999. Production of germline chimeric chicken using primordial germ cells from germinal crescent and blood. *Korean J. Anim. Sci.* 41: 621-628.
- Kim, J. T., T. S. Park, S. H. Park, K. J. Park, T. M. Kim, S. K. Lee, J. M. Lim and J. Y. Han. 2010. Migration and proliferation of intact and genetically modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken. *Biol. Reprod.* 82: 257-262.
- 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.
- 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.
- Love, J., C. Gribbin, C. Mather and H. Sang. 1994. Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnol.* 12: 60-63.
- 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.
- Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Molecular Mol. Reprod. Dev.* 39: 153-161.
- 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.
- Nakamura, Y., F. Usui, D. Miyahara, T. Mori, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami and T. Tagami. 2010. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 1237-1246.
- Ono, T., R. Yokoi, S. Maeda, T. Nishida and H. Aoyama. 1998a. Settlement of quail primordial germ cells in chicken gonads. *Anim. Sci. Technol* 69: 546-555.
- Ono, T., R. Yokoi, S. Maeda, T. Nishida and H. Aoyama. 1998b. Transfusion of chick primordial germ cells into quail embryos and their settlement in gonads. *Anim. Sci. Technol* 69: 911-915.
- 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*. Macmillan Company, NY, USA.
- Salter, D. W., W. S. Payne, L. B. Crittenden, M. J. Federspiel, C. J. Petropoulos, J. A. Bradac and S. Hughes. 1993. Avian

- leukosis retroviruses and gene transfer into the avian genome. In: Manipulation of the Avian Genome. R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, F. L., pp. 135-150.
- 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: 5565-5569.
- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am. J. Anat.* 15: 483-516.
- Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J. Exp. Zool.* 280: 265-267.
- 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.
- Wentworth, B. C., H. Tsai, J. H. Hallett, D. S. Gonzales and G. Rajcic-spasojevic. 1989. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poul. Sci.* 68: 999-1010.

Embryo survival rate and gonadal migration efficiency after primordial germ cells transplantation in chicken ⁽¹⁾

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

Received: Aug. 17, 2014; Accepted: Jan. 13, 2015

Abstract

Primordial germ cells (PGCs) are the precursors of the germ cell lineage and are restricted to the formation of sperm and eggs in the adult organism. PGCs are recognized as the most potential pathway for the production of transgenic avian. The objective of this study is to evaluate the embryo survival rate and gonadal migration efficiency of PGCs after transplantation. Chicken PGCs collected from the primitive gonads of White Leghorn chicken embryos (5.5-day-old) were used as donor cells for transplanting into the recipient chicken embryos. Before transplantation, an eGFP reporter gene was transferred into the PGCs. Approximately 2 μ L of electroporated PGCs suspension containing 150-500 cells μ L were injected into the dorsal aorta of the recipient chicken embryos (3.5-day-old). The results showed that the survival rate of the treated embryos at day 10 and 19 after incubation was 68.7% (90/131) and 60.0% (39/65), respectively. The expression of eGFP gene was detected in the gonads of 20.7% (38/183) and 11.4% (7/61) embryos examined at days 10 and 19 of incubation, respectively.

Key words: Primordial germ cell, Chicken, In vivo transplantation, Embryos survival rate, Gonadal migration efficiency.

(1) Contribution No. 2191 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) Technical Service Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(5) Institute of Biotechnology, Southern Taiwan University, Tainan 710, Taiwan, Taiwan, R.O.C.

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

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