

# 雞單一性別始基生殖細胞移植之胚胎存活率探討<sup>(1)</sup>

劉振發<sup>(2)</sup> 許義明<sup>(2)</sup> 康定傑<sup>(2)</sup> 陳裕信<sup>(2)</sup> 曲鳳翔<sup>(2)</sup> 蕭振文<sup>(3)</sup> 陳立人<sup>(2)(4)(5)(6)</sup>

收件日期：104 年 7 月 20 日；接受日期：105 年 1 月 19 日

## 摘 要

本研究之目的係探討單一性別之家禽始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 進行活體移植後之胚胎存活率與性腺遷徙效率。供試 PGC 是分離自孵化 5.5 天的早期雞胚胎之性腺，PGC 移植後之胚胎存活率與性腺遷徙效率之評估，則是將轉染綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 報導基因的 PGC，注入 (2  $\mu$ L, 150 – 300 cells /  $\mu$ L) 到孵育 3.5 天 (stage 12 – 15) 胚胎的背大動脈，進行活體移植測試。結果顯示，經 PGC 移植後孵育至第 14 天之胚胎存活率，以來亨雞的 PGC 移植到畜試土雞的胚胎存活率顯著高於以畜試土雞的 PGC 移植到來亨雞的胚胎者 (50.7% vs. 17.4%； $P < 0.05$ )；胚胎性腺 GFP 報導基因的檢測呈現陽性反應者，在來亨雞 PGC 移植到畜試土雞胚胎者為 17.4% (18/103)，而畜試土雞 PGC 移植到來亨雞胚胎者為 15.5% (5/33)。本研究之結果將可供作後續家禽基因轉殖研究之參考。

關鍵詞：雞、始基生殖細胞、單一性別、活體移植、胚胎存活率。

## 緒 言

始基生殖細胞為精子與卵子的前驅細胞，是目前進行家禽基因轉殖研究甚具潛力之轉殖方法之一 (Chojnacka-Puchta *et al.*, 2012)。雞的始基生殖細胞起源於剛產下之受精蛋 (stage X, Eyal-Giladi *et al.*, 1981) 的胚盤 (blastodisc or germinal disc) 之上胚葉層 (epiblast layer)，或是入孵一天後受精蛋 (stage 4, Hamburger and Hamilton, 1951) 之胚體胚葉透明區 (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 (約在入孵後 30 – 32 h)，開始進入發育中的血管內，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，大部分的 PGC 最後離開血液循環系統，遷移至發育中的早期性腺，(即生殖嵴，germinal ridge) (Ando and Fujimoto, 1983; Ukeshima *et al.*, 1991; Urven *et al.*, 1988)；於此階段之 PGC 稱為性腺始基生殖細胞 (gonadal PGC, gPGC)。生殖嵴位於中腎的內側，左右成對，隨著胚胎的發育逐漸地發展成性腺，而始基生殖細胞在完成遷移之後，在雄性個體中分化為精原細胞 (spermatogonia)，在雌性個體中則分化為卵原細胞 (oogonia) (Nakamura *et al.*, 1988)，兩者隨後進一步分別形成精子與卵子。

近年來，有許多學者投入建立家禽胚幹細胞株的研究。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與瀕臨絕種的品系。

而家禽胚幹細胞除可自 stage X 的胚盤細胞分離獲得外，亦可由始基生殖細胞培養成為胚生殖幹細胞 (embryonic germ cell, EGC)。在家禽生殖幹細胞之體外培養長達四個月後，並將其注入 stage X 的雞胚胎，可以得到嵌合體雞隻 (Park and Han, 2000)。此證實雞的 EGC 經體外培養後，仍維持分化的多能性，並參與胚體組織的形成。目前家禽基因轉殖技術的發展除了可利用人為調控以促進外源基因於雞蛋中專一且適時適量表現之組織特異性啟動子 (promoter) 的構築外，整合胚幹細胞或 PGC 技術是另一個具有潛力的發展方向。然而，家禽基因轉殖技術之開發有

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2348 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新竹分所。

(4) 南台科技大學生物科技系。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

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

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。在家禽基因轉殖成功的案例包括利用反轉錄病毒 (retroviruses) 轉染家禽胚葉細胞 (Salter *et al.*, 1993; Thoraval *et al.*, 1995)，亦可利用顯微注射 (Love *et al.*, 1994) 或微脂體 (liposome) 轉染胚葉細胞 (Brazolot *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1993) 或 PGC (Naito *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1995) 再注入受胚個體等得到基因轉殖家禽。但截至目前，成功利用 PGC 進行基因轉殖而獲得基因轉殖雞的效率仍然偏低。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 embryos) 內順利遷徙並拓殖 (colonize) 到性腺，並且能夠進一步分化成為生殖細胞。

Naito *et al.* (1999) 在有關移植 PGC 和接受移植胚胎兩者間性別對產製性腺嵌合家禽研究中指出將雄性 PGC 移植至雄性的胚胎中經後裔檢測其性腺嵌合率為 68.2% (15/22)，雌性 PGC 移植至雌性的胚胎之性腺嵌合率為 62.5% (10/16)。另外，將雌性 PGC 移植至雄性胚胎中，性腺嵌合的率為 22.2% (4/18)；雄性 PGC 移植至雌性胚胎中，性腺嵌合的率為 11.1% (2/18)。進一步分析雌性 PGC 移植至雄性胚胎所產製的雄性嵌合雞之精子，可檢測出源自移入之雌性 PGC 的 W 染色體基因序列，證實雌性的 PGC 在雄性的性腺中雖可分化為精原細胞，但是效率偏低。Macdonald *et al.* (2010) 報告指出將雄性的 PGC 移植至雌性的雞胚胎中，雖然移植的雄性 PGC 可隨著胚胎發育進行減數分裂，但無法形成具有活性的生殖細胞；但是將雄性的 PGC 移植到雄性的雞胚胎中，這些被移植的 PGC 則可以在雄性的性腺環境中發育形成具有活性的精細胞。在許多的研究報告亦曾指出捐贈者與接受者之性別的差異是會影響到移入 PGC 之後續分化成為具功能性生殖細胞之效率 (Tagami *et al.*, 2007; Tagami *et al.*, 1997; Kagami *et al.*, 1995)。至於 PGC 被移植入不同性別的接受者胚胎是否會影響胚胎的存活率，相關的研究不多。因此，本研究目的是要探討單一性別之雞始基生殖細胞經活體移植後之性腺遷徙效率，以提供利用 PGC 進行家禽基因轉殖研究與提昇家禽生殖研究效率之參考。

## 材料與方法

### I. 雞 PGC 的分離與培養

將雞受精蛋置於 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，置於解剖顯微鏡下將胚胎以胸腹部朝上之仰躺姿式，以滅菌鑷子將腹部劃開後再輕輕撥開內臟及消化道等組織並將其移除，孵化 5.5 天時期之雞胚性腺是依附在腎臟旁，而腎臟是位於腰部之脊椎附近，因此於解剖顯微鏡下延著脊椎走向於腰部位置找到腎臟，在 2 顆腎臟 (顏色較深) 中間位置即可見成對之性腺 (2 條細小顏色偏白，形如細長之米粒)，然後直接以滅菌鑷子輕輕的將性腺摘取並暫時置於 10 mL 的 HBSS + 1% Penicillin/Streptomycin 培養基中。隨後以 200 × 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 × 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 leukemia inhibitory factor (hLIF; 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°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱進行培養 (Shiue *et al.*, 2009; 劉等, 2013)。

### II. PGC 性別檢測

胚胎孵化到第 5.5 天後，取性腺進行 PGC 之分離，同時取下腿部組織萃取 DNA，再以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行性別檢測，所使用的引子序列分別為 2376F: 5'-GCTACTGATTCGTCTGCGAGA3' 和 2524R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG3'，PCR 反應條件為：94°C，5 分鐘；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94°C，30 秒；annealing：51.3°C，30 秒；extension：72°C，30 秒，接著 72°C，10 分鐘後，維持在 4°C。若為雌性，經電泳分析可擴增 2 段長度 650 bp 和 450 bp 的 DNA 片段 (650 bp 為 Z 染色體，450 bp 為 W 染色體之專一性片段)。若為雄性經電泳分析則僅可擴增 1 段長度 650 bp DNA 片段 (Z 染色體之專一性片段) (Liu *et al.*, 2010)。

### III. PGC 報導基因轉染

本研究係利用電穿孔方式 (electroporation) 對 PGC 進行綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP; pAcGFP1-N1,

Clontech Laboratories, Inc.) 報導基因轉殖，GFP 報導基因先以限制酶 (*Apa*LI) 截切呈線性樣態 (linear form) 後再進行轉染。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  $\mu$ L 的電穿孔培養基 (M199 + 10% CS + 1.32% DMSO) 加入 15  $\mu$ L GFP 報導基因的質體 DNA (0.5  $\mu$ g /  $\mu$ 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  $\mu$ 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 (Shiue *et al.*, 2009；劉等，2013)。

#### IV. PGC 之活體移植

體外培養之 PGC 經轉殖報導基因後，參考 Naito *et al.* (1994) 以顯微注射方式將 2  $\mu$ L (150 – 300 cells /  $\mu$ L) 的 PGC 以 Micro-Injector (model IM-88, Nikon; Tokyo, Japan) 注入 Stages 14 – 15 雞胚 (3.5 天) 的背大動脈進行活體移植。將完成性別鑑定後之單一性別的來亨雞與畜試土雞的 PGC，進行相互之間的移植 (即來亨雞的 PGC 移植至畜試土雞的胚胎，畜試土雞的 PGC 移植至來亨雞的胚胎)。

#### V. PGC 移植後胚胎存活率的分析

經 PGC 移植後的胚胎持續孵育到第 14 天後，以鑷子輕輕敲擊方式打開胚蛋將胚胎置於 10 公分之培養皿，觀測並記錄胚胎存活率；並進行胚胎性腺與腿部組織取樣以萃取 DNA，再以聚合酶連鎖反應檢測胚胎之性別 (方法同上述 PGC 性別檢測)。

#### VI. PGC 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 14 天後，分別摘取性腺並萃取 DNA，再以 PCR 進行檢測分析 GFP 基因，所使用的引子序列分別為 F1: 5'-GCTCAATCGAATCTGTC3' 與 R1: 5'-GAAGTTCAG GGTGAGCTTGC3'，PCR 反應條件為：98 $^{\circ}$ C，15 min；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94 $^{\circ}$ C，30 sec；annealing：56 $^{\circ}$ C，45 sec；extension：72 $^{\circ}$ C，1 min，接著 72 $^{\circ}$ C，10 min 後，維持在 4 $^{\circ}$ 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。

#### VII. 統計分析

相關數據利用 SAS 套裝軟體統計分析，並以卡方檢定 (Chi-square test) 比較 PGC 移植後之胚胎存活率之差異。

## 結果與討論

本研究使用之 PGC 係分別分離自孵化 5.5 天之來亨雞與畜試土雞的胚胎性腺，共計完成 596 個雞胚胎性腺 PGC 的分離。其中包含 363 個來亨雞胚胎及 223 個畜試土雞胚胎。

PGC 分離是採個別胚胎單獨操作，先摘取性腺進行 PGC 的分離，同時取下胚胎之腿部組織進行 DNA 萃取供性別鑑定用。個別胚胎性腺所分離的 PGC (圖 1) 先培養於 96 孔細胞培養皿中。待性別確定後再將同品種相同性別的 PGC 自 96 孔細胞培養皿中取出混合，重新置換到 4 孔細胞培養皿中繼續培養。胚胎的性別鑑定是以聚合酶連鎖反應方式進行，若為雌性，經電泳分析可擴增 2 段長度 650 bp 和 450 bp 的 DNA 片段。若為雄性經電泳分析則可擴增 1 段長度 650 bp DNA 片段 (圖 2)。

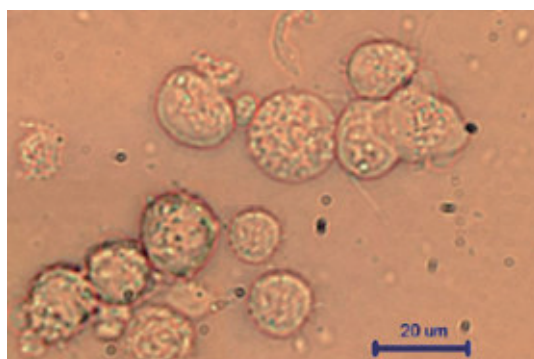


圖 1. 自 5.5 天雞胚胎性腺分離之始基生殖細胞的形態。

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



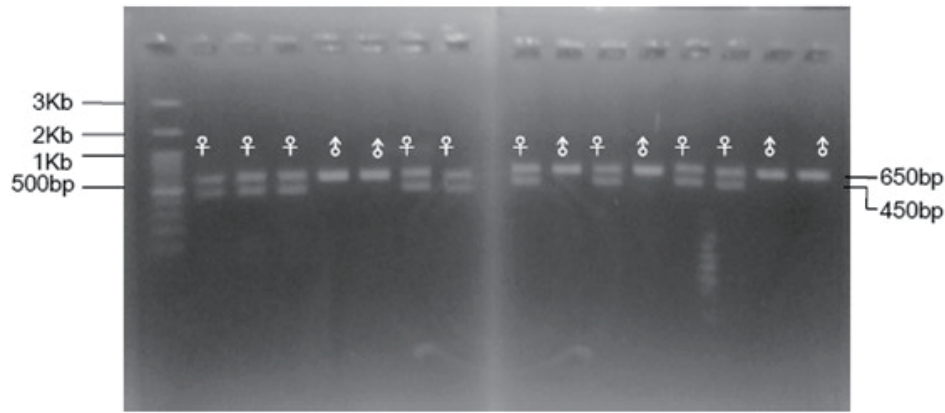


圖 2. 雞胚胎 ( 孵化 5.5 天 ) 的性別鑑定。

Fig. 2. Sexes of chicken embryos (5.5-day-old) detected by nest-PCR.

供試 596 個胚胎經鑑定後，確定為雄性胚胎有 247 個 (45.97%)，確定為雌性胚胎有 322 個 (54.03%)，性別比百分率為 85.1。若單獨就各別雞種進行分析，在 363 個來亨雞胚胎確定為雄性胚胎有 164 個 (45.18%)，雌性胚胎有 199 個 (54.82%)，性比率為 82.41；在 233 個畜試土雞胚胎確定為雄性胚胎有 110 個 (47.21%)，雌性胚胎有 123 個 (52.79%)，性別比百分率為 89.43 (表 1)。

表 1. 孵化 5.5 天之來亨雞與畜試土雞胚胎性別鑑定

Table 1. Sexing of Leghorn chicken and TLRI native chicken embryos detected by nest-PCR at 5.5 days after incubation

Breed	No. of embryos	Sexes		Sex ratio*
		Male	Female	
Leghorn chicken	363	164 (45.18%) <sup>a</sup>	199 (54.82%) <sup>b</sup>	82.41
TLRI native chicken	233	110 (47.21%) <sup>a</sup>	123 (52.79%) <sup>a</sup>	89.43
Total	596	274 (45.97%) <sup>a</sup>	322 (54.03%) <sup>b</sup>	85.1

\* Sex ratio = No. of male / No. of female × 100

<sup>a, b</sup> Means in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

性別鑑定後的 PGC 經 GFP 報導基因轉染後，利用顯微注射方式注入到 Stages 14 – 15 雞胚 ( 孵育 3.5 天 ) 的背大動脈進行活體移植。採來亨雞與畜試土雞相互移植方式，分別將單一性別 ( 雄性或雌性 ) 的來亨雞 PGC 移植到畜試土雞的胚胎；畜試土雞的 PGC 則是移植到來亨雞的胚胎。胚胎在接受 PGC 移植後持續孵育，並在孵育 14 天後觀測記錄胚胎存活率及進行胚胎性腺及腿部組織取樣，隨後進行 DNA 的萃取；性腺部分作為後續 GFP 的檢測，供做 PGC 移植後的性腺遷徙效率分析；腿部組織作為胚胎性別的鑑定，藉以進行單一性別移植後對不同胚胎性別間存活率的分析。本實驗共進行 353 例胚胎的 PGC 移植，在孵育 14 天的胚胎存活率為 38.5% (136/353)，其中進行雄性 PGC 移植的胚胎有 183 例，進行雌性 PGC 移植的胚胎有 170 例，其在孵育 14 天的胚胎存活率分別為 41.5% (76/183) 和 35.3% (60/170) (表 2)。

表 2. 單一性別 PGC 移植後之胚胎存活率

Table 2. The survival rate of recipient embryos after transplantation with sex-limited PGCs

Sexes of PGCs	No. of embryo transplanted	No. of embryo survival*	Embryo survival rate** (%)
Male	183	76	41.5% <sup>a</sup>
Female	170	60	35.3% <sup>b</sup>
Total	353	136	38.5%

\* Recorder at 14 days of incubation.

\*\* Embryo survival rate = No. of embryo survival / No. of embryo transplanted × 100

<sup>a, b</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

另外，比較來亨雞與畜試土雞不同品種間之 PGC 相互移植後的胚胎存活率。在來亨雞 PGC 移植到畜試土雞的胚胎，共進行 203 例，於孵育 14 天的胚胎存活率為 50.7% (103/203)。畜試土雞 PGC 移植到來亨雞的胚胎，共進行 150 例，於孵育 14 天的胚胎存活率為 22% (33/150) (表 3)。結果顯示，以來亨雞的 PGC 移植到畜試土雞的胚胎存活率較高 ( $P < 0.05$ )。有關 PGC 移植後對胚胎存活率的影響，在過去的研究發現與移植 PGC 的數量呈負相關，且胚胎死亡率也會有隨著孵育時間的加而提高，但與性腺遷徙效率呈正相關 (劉等，2013；Kim *et al.*, 2010)。在本研究 PGC 的移植數量約為 300 – 600 個 (150 – 300 cells/2  $\mu$ L)，是否因為 PGC 移植的數量之因素導致來亨雞的 PGC 移植到畜試土雞的胚胎存活率較高，或是品種間的因素，有待日後一步進探討。進一步分析本研究執行來亨雞 PGC 移植到畜試土雞胚胎的時間為 4 – 6 月間，畜試土雞 PGC 移植到來亨雞胚胎的時間為 7 – 9 月間；因此，推測季節因素亦可能是導致胚胎存活率差異的原因之一。

在不同品種間之單一性別 PGC 相互移植的胚胎存活率比較，將來亨雞雄性 PGC 移植到畜試土雞的胚胎，共進行 110 例；雌性 PGC 移植到畜試土雞的胚胎，共進行 93 例，於孵化 14 天的胚胎存活率分別為 47.3% (52/110) 和 54.8% (51/93)。在 110 例雄性 PGC 移植存活的 52 個胚胎中，有 36 個為雄性，16 個雌性。在 93 例雌性 PGC 移植存活的 51 個胚胎中，有 24 個為雄性，27 個雌性胚胎 (表 4)。

表 3. 來亨雞與畜試土雞 PGC 相互移植後之胚胎存活率

Table 3. The survival rates of recipient embryos after reciprocal transplantation of PGCs from Leghorn and TLRI native chicken

Transplantation schemes	No. of embryo transplanted	No. of embryo survival*	Embryo survival rate** (%)
Leghorn PGCs to TLRI native chicken embryos	203	103	50.7% <sup>a</sup>
TLRI native PGCs to Leghorn chicken embryos	150	33	22% <sup>b</sup>

\* Recorder at 14 days of incubation.

\*\* Embryo survival rate = No. of embryo survival / No. of embryo transplanted  $\times$  100

<sup>a, b</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表 4. 來亨雞單一性別 PGC 移植至畜試土雞胚胎之存活率

Table 4. The survival rate of recipient embryos of TLRI native chicken transplanted with sex-limited PGCs from Leghorn chicken

Sexes of PGCs	No. of embryos transplanted	No. of embryos survival (%) <sup>*</sup>		
		♂	♀	Total
Male	110	36 (32.7) <sup>a, x</sup>	16 (14.5) <sup>b, x</sup>	52 (47.3) <sup>x</sup>
Female	93	24 (25.8) <sup>a, x</sup>	27 (29.0) <sup>a, y</sup>	51 (54.8) <sup>y</sup>
Total	203	60 (29.6) <sup>a</sup>	43 (21.1) <sup>b</sup>	103 (50.7)

\* Recorder at 14 days of incubation.

<sup>a, b</sup> Means in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>x, y</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

另一方面，將畜試土雞雄性 PGC 移植到來亨雞的胚胎，共進行 73 例，雌性 PGC 移植到來亨雞的胚胎，共進行 77 例；在孵化 14 天的胚胎存活率分別為 32.8% (24/73) 和 11.7% (9/77)。在 73 例雄性 PGC 移植存活的 24 個胚胎中，有 16 個為雄性，8 個雌性。在 93 例雌性 PGC 移植存活的 9 個胚胎中，有 5 個為雄性，4 個雌性 (表 5)。在來亨雞的 PGC 移植至畜試土雞的胚胎部分，是以移植雌性 PGC 之胚胎存活率較高。但是在畜試土雞的 PGC 移植至來亨雞的胚胎部分，則是以移植雄性 PGC 之胚胎存活率較高。進一步探討來亨雞移植雌性 PGC 胚胎存活之性別是以雌性略高於雄性 (29.0% vs. 25.8%)，在移植雄性 PGC 胚胎存活之性別是以雄性顯著高於雌性 (32.7% vs. 14.5%)；另外，畜試土雞移植雌性 PGC 胚胎存活之性別雌性與雄性無明顯差異 (6.5% vs. 5.2%)，在移植雌性 PGC 胚胎存活之性別

是以雄性顯著高於雌性 (21.9% vs. 10.9%)；整體而言，胚胎的存活率與移植 PGC 之性別呈現相關的趨勢，當移植雄性 PGC 之胚胎存活率是雄性高於雌性，反之亦同；這樣的結果與 Furuta *et al.* (2007; 2008) 所發表之結果相類似。

表 5. 畜試土雞單一性別 PGC 移植至來亨雞胚胎之存活率

Table 5. The survival rates of recipient embryos of Leghorn chicken transplanted with sex-limited PGCs from TLRI native chicken

Sexes of PGCs	No. of embryos transplanted	No. of embryos survival (%) <sup>*</sup>		
		♂	♀	Total
Male	73	16 (21.9) <sup>a,x</sup>	8 (10.9) <sup>b,x</sup>	24 (32.8) <sup>x</sup>
Female	77	5 (6.5) <sup>a,y</sup>	4 (5.2) <sup>a,y</sup>	9 (11.7) <sup>y</sup>
Total	150	21 (14.0) <sup>a</sup>	12 (8.0) <sup>b</sup>	33 (22)

<sup>\*</sup> Recorder at 14 days of incubation.

<sup>a, b</sup> Means in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>x, y</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

本研究除了分析來亨雞與畜試土雞間 PGC 相互移植後之胚胎存活率外，進一步亦針對存活胚胎進行報導基因 (GFP) 分析，藉以檢視 PGC 移植後能否成功遷徙到被移植個體的性腺組織。分別在來亨雞 PGC 移植到畜試土雞存活的 103 個胚胎及畜試土雞 PGC 移植到來亨雞存活的 33 個胚胎，取其性腺組織並進行 DNA 的萃取，利用合成 GFP 專一性的引子，以 PCR 方式進行檢測；若反應為陽性者經電泳分析可擴增一段長度 280 bp 的 DNA 片段 (圖 3)。結果在來亨雞 PGC 移植到畜試土雞與畜試土雞 PGC 移植到來亨雞之存活胚胎，被檢出呈陽性反應者分別為 17.4% (18/103) 和 15.5% (5/33) (表 6)，兩者並無顯著差異。

鳥類的 PGC 具有能經由血液循環遷徙而拓殖 (colonize) 於性腺，並分化成為生殖細胞的特性。因此，PGC 已經被認為是用來取代受精卵，成為生產轉殖基因家禽最具潛力的媒介標的 (Chojnacka-Puchta *et al.*, 2012)。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，進行移植後均有成功生產性腺嵌合 (germline chimeras) 後代的案例。

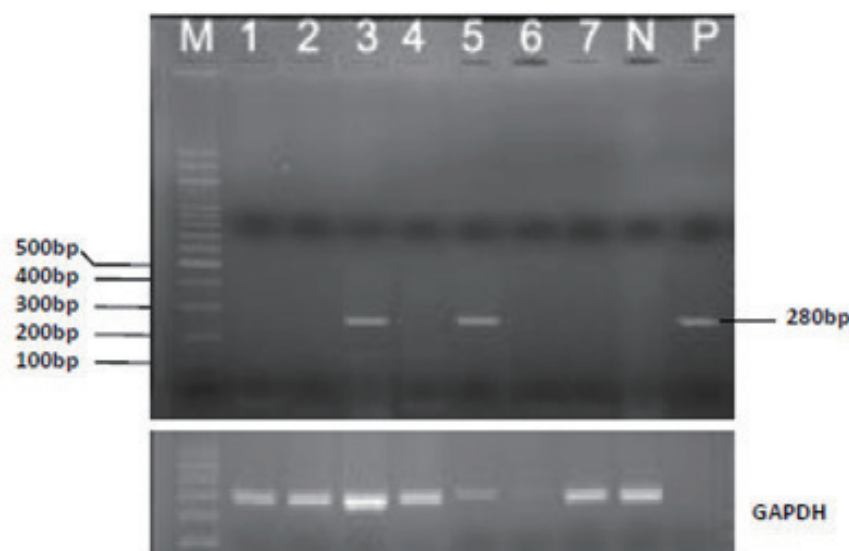


圖 3. 以 PCR 檢測轉染 GFP 之 PGC 移植入雞胚胎性腺中之 GFP 基因

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；N 為注入不含細胞的 HBSS buffer 雞隻性腺 DNA (陰性對照組)；P：為 pAcGFP1-N1 質體 DNA (陽性對照組)。

Fig. 3. PCR analysis of gonads from chicken embryos transplanted with GFP-transfected PGCs. Lane M: 100 bp ladder marker; Lanes 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).

表 6. 單一性別 PGC 移植後之胚胎性腺遷徙率檢測

Table 6. The efficiency of gonadal migration of the sex-limited PGCs transplanted into recipient embryos.

Transplantation schemes	Sexes of PGCs	No. of embryos detected	Efficiency of gonadal migration %
Leghorn PGCs to TLRI native chicken embryos	Male	52	13.5 (7/52) <sup>a</sup>
	Female	51	21.5 (11/51) <sup>b</sup>
	Total	103	17.4 (18/103)
TLRI native chicken PGCs to Leghorn chicken embryos	Male	24	12.5 (3/24) <sup>a</sup>
	Female	9	22.2 (2/9) <sup>b</sup>
	Total	33	15.5 (5/33)

<sup>a, b</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

利用 PGC 移植進行性腺嵌合家禽產製，成功的關鍵為捐贈 (donor) 者的 PGC 能夠在被接受 (recipient) 移植胚胎內順利遷徙並且拓殖到性腺，且進一步能夠成功發育成為生殖細胞 (精子或卵子)。然而，捐贈者的 PGC 與接受移植胚胎性腺內本身的 PGC 可能發生競爭的情形；有研究指出當以白色來亨雞的 PGC 移植至橫斑蘆花雞 (Barred Plymouth Rock) 胚胎，性腺嵌合的機率是將橫斑蘆花雞 PGC 移植至白色來亨雞胚胎者的 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% vs. 3.1%) (Nakamura *et al.*, 2010)。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 注入雞的胚胎者，則約 14.2% (Ono *et al.*, 1998b)。有研究指出，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; Furuta *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2010)。本研究中比較來亨雞與畜試土雞之不同品種間相互移植之胚胎存活率，是以來亨雞的 PGC 移植到畜試土雞的胚胎存活率較高 ( $P < 0.05$ )；然而不同品種間相互移植之胚胎存活率是否與上述性腺嵌合的效率有品種間 (或品系) 間之關係尚需更多的測試來證實。

以 PGC 為媒介進行性腺嵌合家禽產製，除了捐贈和接受移植間的品種 (或品系) 關係的因素影響外，在捐贈和接受移植兩者間的性別也會影響到產製性腺嵌合家禽的成功率。鳥類性別是由雌性的 W 染色體決定，在雄性是屬同型配子 (homogametic, ZZ) 形成帶有 Z 染色體的精子 (spermatozoa)，雌性則是屬異型配子 (heterogametic, ZW) 形成帶有 Z 染色體或 W 染色體的卵子。鳥類的生殖細胞 (germ cells) 在性腺分化期間會因處在不同性別的組織環境中而有差異，如雌性胚胎性腺中的 PGC 約在 Stage 34 (孵育第 8 天) 的時期分化成為初級卵母細胞，在 Stage 39 (孵育第 13 天) 的時期開始進入減數分裂，並於雙絲期 (diplotene stage) 進入休眠狀態。雄性的 PGC 約在 Stage 39 (孵育第 13 天) 的時期分化成為精原細胞後進入休眠狀態，直到孵出後 10 週齡才重新進行分裂並進入到分化的路徑 (Nakamura *et al.*, 2013)，約 16 週齡始可形成具有功能的精細胞 (Macdonald *et al.*, 2010)。

Naito *et al.* (1998) 以胚葉細胞 (blastodermal cells) 或 PGC 的移植成功產製出性別混合的嵌合雞 (mixed-sex chimaeric chickens)，Karagenc *et al.* (1996) 指出 Stage X 分離的胚葉細胞中包含有 PGC (或者是 PGC 的前驅細胞)，將 stage X 的雄性或者雌性之胚葉細胞移植至相同或者不同性別的胚胎，所產製的嵌合雞 (包括相同性別和混合性別的嵌合雞)，經後裔測試都證實源自胚葉細胞中的 PGC 能有效的產出後代 (Kagami *et al.*, 1995, 1997)。另外，源自不同胚胎血液分離的 PGC，將其混合後移植至雄性或雌性的胚胎中，如果 PGC 在 stages 13 – 15 的胚胎中能夠進行分化成為具有功能的配子 (精子或卵子)，在不考慮性別遺傳 (genetic sex) 情況下，嵌合雞生產的後代之雌：雄的比例，應該偏離 1：1 的比例，但是 Naito *et al.* (1994, 1998) 將性別混合的 PGC 移植進行嵌合雞的產製，並觀察嵌合雞生產的後代其性別比例並沒有偏離 1：1 的情形。這樣的結果顯示，當 PGC 被移植至不同性別的胚胎，要分化成為具有功能的配子 (精子或卵子)，在過程中是受到某種程度上的限制。本研究在 110 例來亨雞雄性 PGC 移植至畜試土雞的胚胎存活的 52 個胚胎中之雌：雄為 1：2.25 (雌性 16：雄性 36)。在 93 例來亨雞雌性 PGC 移植至畜試土雞的胚胎存活的 51 個胚胎中之雌：雄為 1：0.89 (雌性 27：雄性 24)。在 73 例畜試土雞雄性 PGC 移植至來亨雞的胚胎存活的 24 個胚胎中之雌：雄為 1：2 (雌性 8：雄性 16)。在 93 例畜試土雞雌性 PGC 移植至來亨雞的胚胎存活的 9 個胚胎中之雌：雄為 1：1.25 (雌性 4：雄性 5)。這樣的結果顯示雄性 PGC 移植後之胚胎的存活率雄性高於雌性，但是在雌性 PGC 移植後之胚胎的存活率雄性與雌性並無明顯差異。在許多得研究報告中也指出移植雄性 PGC 所得胚胎存活率會高於移植雌性 PGC (Furuta *et al.*, 1999; 2007; 2008)，本實驗亦得到相似之結果。



Naito *et al.* (1999) 指出 PGC 的性別分化是於生殖脊 (Stages 13 – 15) 時才開始進行，此時胚胎性別若為雄性，生殖脊有一部分細胞會分化成為 sertoli 細胞和 leydig 細胞，若為雌性則分化成為 granulosa 細胞和 theca 細胞，這些細胞與 PGC 共同存在於性腺，對 PGC 的發育與分化扮演重要的角色。PGC 移植到不同性別的的胚中，會因為處在不同細胞環境 (sertoli 細胞和 leydig 細胞或 granulosa 細胞和 theca 細胞) 中，而致進行性別的分化及配子形成 (gametogenesis) 能力會有減弱的 (或受到抑制) 情形。

在本研究結果與相關報告顯示，移植雄性 PGC 所得到胚胎存活率會高於移植雌性 PGC，這樣現象是否與 PGC 在性腺組織中共存之細胞環境有關，此等問題值得後續進行相關研究來釐清。

## 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 46：245-254。
- 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. Petite, 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., D. K. Jeong, Y. H. Hong, T. K. Park, Y. K. Moon and J. Y. Han. 1995. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 19: 569-576.
- Chojnacka-Puchta, L., K. Kasprczyk, G. Pucienniczak, D. Sawicka and M. Bednarczyk. 2012. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 15: 181-188.
- 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.
- Furuta, H., H. Yamaguchi and N. Fujihara. 1999. Development of the gonads derived from hetero-sexually transferred primordial germ cells (PGCs) between embryos in the chicken. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 12: 1188-1191.
- Furuta, H., S. Marumiya, I. Nakano, T. Yoshida, H. Mukouyama and M. Tanaka. 2007. Effector of transfer primordial germ cells (PGCs) into chicken gonad. *J. Poult. Sci.*, 44: 335-338.
- Furuta, H., T. Sawada, K. Nishikawa, I. Yamamoto, T. Yoshida and M. Tanaka. 2008. Transfer of blood containing primordial germ cells between chicken eggs development of embryonic reproductive tract. *Cytotechnology.* 56: 27-32.
- 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.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton, 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- 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.
- Kagami, H., M. E. Clark, A. M. Verrinder Gibbins and R. J. Etches. 1995. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 379-387.
- Kagami, H., T. Tagami, Y. Matsubara, T. Harumi, H. Hanada, K. Maruyama, M. Sakurai, K. Kuwana and M. Naito. 1997. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 48: 501-510.
- Karagenc, L., Y. Cinnamon, M. Ginsburg and J. N. Petite. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 19: 290-301.
- 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.
- Liu, W. Y., C. J. Zhao and J. Y. Li. 2010. A non-invasive and inexpensive PCR-based procedure for rapid sex diagnosis of Chinese gamecock chicks and embryos. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 962-970.



- Love, J., C. Gribbin, C. Mather and H. Sang. 1994. Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12: 60-63.
- Macdonald, J., J. D. Glover, L. Taylor, H. M. Sang and M. J. McGrew. 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE* 5: e15518.
- Nakamura, M., T. Kuwana and T. Fujimoto. 1988. Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Anat. Rec.* 222: 90-94.
- 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. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 153-161.
- Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1998. Donor primordial germ cell-derived offspring from recipient germline chimaeric chickens: absence of long term immune rejection and effects on sex ratios. *Brit. Poultry Sci.* 39: 20-23.
- Naito, M., Y. Matsubara, T. Harumi, T. Tagami, H. Kagami, M. Sakurai and T. Kuwana. 1999. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J. Reprod. Fertil.* 117: 291-298.
- 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 (Gifu-jidori). *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 1237-1246.
- Nakamura, Y., H. Kagami and T. Tagami. 2013. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Dev. Growth Differ.* 55: 20-40.
- 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.
- 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, FL. pp. 135-150.
- Shiue, Y. L., J. J. Tailiu, J. F. Liou, H. T. Lu, C. Tai, J. W. Shiao and L. R. Chen. 2009. Establishment of the long-term in vitro culture system for chicken primordial germ cells. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 55-61.
- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am. J. Anat.* 15: 483-516.
- Tagami, T., Y. Matsubara, H. Hanada and M. Naito. 1997. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev. Growth. Differ.* 39: 267-271.
- Tagami, T., H. Kagami, Y. Matsubara, T. Harumi, M. Naito and K. Takeda. 2007. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 68-75.
- 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 helper-free 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.
- 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. *Poultry Sci.* 68: 999-1010.

# Evaluation of chicken embryos survival rates of sex-limited PGCs after transplantation <sup>(1)</sup>

Jenn-Fa Liou <sup>(2)</sup> Yu-Min Shue <sup>(2)</sup> Ting-Chieh Kang <sup>(2)</sup> Yu-Hisn Chen <sup>(2)</sup>  
Fung-Hsiang Chu <sup>(2)</sup> Jen-Wen Shiau <sup>(3)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2) (4) (5) (6)</sup>

Received: Jul. 20, 2015; Accepted: Jan. 19, 2016

## Abstract

The objectives of this study were to evaluate embryo survival and gonadal migration rate of sex-limited PGCs after transplantation. Chicken PGCs collected from the primitive gonads of chicken embryos (5.5-day-old) were used as donor cells for transplantation into the recipient chicken embryos. Before transplantation, an EGFP reporter gene was transferred into the PGCs. Approximately 2  $\mu$ L of electroporated PGC suspension containing 150-300 cells/ $\mu$ L were injected into the dorsal aorta of the recipient chicken embryos of 3.5-day-old. The results showed that the survival rate at day 14 after incubation in embryos of TLRI native chicken transplanted with Leghorn PGCs was higher than the Leghorn embryos transplanted with TLRI PGCs (50.7% vs. 17.4%;  $P < 0.05$ ). The expression rates of GFP gene detected in the gonads of transplanted embryos was 17.4% (18/103) and 15.5% (5/33) in TLRI native chicken and Leghorn chicken embryos examined at 14 days of incubation, respectively. Results of this study can facilitate further transgenic chicken studies in the future.

Key words : Chicken, Primordial germ cell, Sex-limited, In vivo transplantation, Embryos survival rate.

---

(1) Contribution No. 2348 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Hsinchu Branch COA-LRI, Shi Hwu 368, Taiwan, R.O.C.

(4) Institute of Biotechnology, 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) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw.