鸡种系嵌和体的研制及其 AFLP 检测

胡小芬[1,3,①],谢　蓓[1,4,①],于瑞嵩[1,2],黄启忠[1],
张德福[1,2],黄路生[3],李　震[1,2,①]

(1. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所,上海 201106; 2. 上海市农业遗传育种重点实验室,上海 201106;
3. 江西农业大学江西省动物生物技术重点开放实验室,南昌,330045; 4. 南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

摘　要:利用密度梯度离心等方法从孵化 51～56 h 的石歧杂鸡胚血液中提取 PGCs,用自制的玻璃注射针将 PGCs 注射到孵化 2.5 d 的 H 系受体鸡胚中制备种系嵌和体鸡;通过筛选 AFLP 引物建立起家禽嵌和体的 AFLP 检测方法;经检测 20 个发育的 PGCs 受体鸡胚中有 8 个种系嵌和体,嵌和率为 40%。

关键词:家禽原始生殖细胞; 种系嵌和体; 扩增片段长度多态性

中图分类号:Q953　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0253－9772(2005)03－0367－05

Generation of Chicken Germ-line Chimeras by Transferring PGCs and Their Identification by AFLP

HU Xiao-Fen[1,3], XIE Bei[1,4], YU Rui-Song[1,2], HUANG Qi-Zhong[1], ZHANG De-Fu[1,2],
HUANG Lu-Sheng[3], LI Zhen[1,2]

(1. *Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai* 201106, *China*;
2. *Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai* 201106, *China*;
3. *Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang* 330045, *China*;
4. *School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing* 210097, *China*)

Abstract: PGCs (Primordial germ cells) were isolated from the blood of 51～56 h hatching Shiqiza chicken embryos by Ficoll density gradient centrifugation. The PGCs were injected into 2.5 d hatching embryos of H breed chicken to produce germ-line chimeras. AFLP checking method was established to identify chicken germline chimeras. Eight germ-line H-S chimera embryos were identified among 20 developing H breed embryos.

Key words: PGCs; germline chimeras; AFLP

家禽原始生殖细胞(PGCs)起源自上胚层,首先出现在胚盘透明区的中央盘,然后由上胚层移至下胚层的生殖新月区内。在正常的鸡胚中,大多数的 PGCs 都经由血管沿着背肠系膜进入生殖脊随后进入性腺原基,最后快速分化为精原细胞(在雄鸡中)或卵母细胞(在雌鸡中)[1]。在 PGCs 移行过程中,可将其从血液中分离出来,进行培养增殖,或进行冷冻保存。因此,PGCs 可作为接受外源基因的载体

收稿日期:2004－06－09;**修回日期**:2004－09－14

基金项目:上海市农业科学院中青年学术技术带头人培养基金资助[This work is supported by grants from Shanghai Academy of Agricultural Science]

①共同为第一作者。

作者简介:胡小芬(1975—),女,硕士研究生,研究方向:动物遗传育种,E-mail:hxf999.student@sina.com
谢　蓓(1980—),女,硕士研究生,研究方向:细胞与分子生物学,E-mail:xiebei1980@163.com

通讯作者:李　震(1963—),男,研究员,研究方向:动物生物技术。Tel: 021-62206391; E-mail: zhenli60@public3.sta.net.cn

生产转基因鸡或用于品种资源保存。但目前 PGCs 的体外操作技术尚不成熟,对其中的环节进行探讨仍然十分重要。

扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术是 Vos 等于 1995 年创建的一项分子标记技术[2]。一次 AFLP 分析一般可获得 50～150 种分子标记。一种酶切组合可利用的选择性引物组合可多达 4 096 种,由此可产生 20～40 万个 DNA 标记,即使仅有 10% 左右的标记为多态标记,也可获得 2～4 万个多态标记。AFLP 最适宜应用于品种指纹鉴定以及品种的质量和纯度检测[3]。因此,该实验中我们尝试应用 AFLP 进行种系嵌和体的检测。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PGCs 供体鸡胚为广东石岐杂,受体鸡胚为荷兰 H 系,均由上海农业科学院畜牧兽医研究所种鸡场提供。过碘酸、希夫试剂、胎牛血清等试剂购自上海博鑫公司。AFLP 所用 *Eco*R Ⅰ、*Taq* Ⅰ和 T4 DNA 连接酶及其 Buffer、*Eco*R Ⅰ接头和 *Taq* Ⅰ接头均购自上海宝生物工程公司。

1.2 实验仪器

AFLP 分析电泳仪为 Sequi-Gen GT electrophoresis System (BIO RAD)。其电源为 Electrophoresis Power Supply-EPS 3500XL (BIO RAD)。PTC-200、PTC-100 PCR 仪(美国 MJ-Research)。Narishige CO, LTD 拉针仪。

1.3 实验方法

1.3.1 受体鸡胚的准备

将孵化 52 h 的受体鸡胚蛋壳的尖端破一个直径 2 cm 左右直径的圆孔,用直径 35 μm、25°针尖的玻璃针吸取鸡胚的血液 4 μL 左右弃去,用保鲜膜和双面胶将破口封住,放入 37.5℃ 继续孵化 3～6 h 备用。

1.3.2 供体 PGCs 提取

Ficoll 400 溶于添加 10% 胎牛血清的 M199 培养液中,配成浓度为 16% 和 6.3% (W/V)的溶液。使用拉针仪将 1 mm 直径的玻璃管拉成 50 μm 左右直径的玻璃针,然后在磨针仪上磨出 30°的针尖,用制作好的玻璃针从孵化 51～56 h 日龄的广东石岐杂鸡胚的卵黄静脉或心脏中取血,置 1 mL M199 培养液(含 10% 胎牛血清)中,然后 200 g 离心 3 min,沉淀用 0.1 mL 不含有胎牛血清的 M199 悬浮,加入 0.9 mL 16% Ficoll,充分混匀后,在其上缓慢覆盖 0.2 mL 6.3% 的 Ficoll,800 g 离心 30 min。富含 PGCs 的片层位于 16% 和 6.3% Ficoll 接口处。吸取此接口处的溶液 0.2 mL 与 0.3 mL 的 M199(含有 10% 胎牛血清)混合,400 g 离心 3 min,弃去上清液。再将片状沉淀悬浮于 1.2 mL 的 M199(含有 10% 胎牛血清)中,200 g 离心 3 min,弃去上清液,如此重复 3 次,最后将片状沉淀悬浮于一定量 M199(含有 10% 胎牛血清)中制成 PGCs 注射液,注射液中 PGCs 占总细胞的 75% 左右,密度为 300/μL 左右[4]。

1.3.3 PGCs 希夫试剂染色

将 PGCs 溶液滴在载玻片上,静置 10 min。37% 甲醛:无水乙醇(1∶9)的溶液覆盖在沉淀液滴上固定 1 min,迅速倾去。用 5% 过碘酸覆盖在沉淀液滴上 2～5 min,蒸馏水冲洗,去多余的过碘酸溶液。室温下希夫试剂作用 15 min,自来水洗 5 min,洗去多余的希夫试剂。在亚硫酸水中迅速洗一下。Leica DMIRB 显微镜下观察玻片。

1.3.4 PGCs 的移植

取 1.2.1 中制备的受体鸡胚,掀去受体鸡胚的保鲜膜,用直径 35 μm、25°针尖的玻璃针吸取 1.5 μL 左右 PGCs 注射液注入到受体鸡胚的血液中,再用保鲜膜将蛋壳破口封住放入孵化箱中继续孵化[5]。

1.3.5 受测鸡胚性腺的 DNA 制备及受体和供体 DNA 池的获得

将受体鸡胚孵化至 16～18 d,然后取出每只鸡胚的性腺和适量肌肉,提取性腺和肌肉的基因组 DNA 作为 AFLP 分析用,基因组 DNA 的制备参考卢盛栋主编《分子生物学实验技术》。供体鸡与受体鸡的 DNA 池的获得:各提取 60 只供体鸡胚和 30 只受体鸡胚的基因组 DNA。将 60 只石头岐杂供体鸡胚的基因组 DNA 各取一定量混合成一管,构成供体鸡胚 DNA 池;将 30 只 H 系受体鸡胚的基因组 DNA 各取一定量混合均匀,形成受体鸡胚 DNA 池。

1.3.6 基因组 DNA 的酶切和接头的连接

家禽基因组 AFLP 分析所用内切酶是 *Eco*R Ⅰ/

Taq Ⅰ，首先利用 *Taq* Ⅰ 酶切基因组 DNA，然后将 *Eco*R Ⅰ 的酶切反应和接头的连接反应同步进行。*Taq* Ⅰ 的酶切反应体系为：模板 DNA 100～400 ng，*Taq* Ⅰ 5 U，10×H Buffer 4 μL，加超纯水至 40 μL，65℃ 恒温水浴消化 2 h。*Eco*R Ⅰ 酶切-接头连接反应体系为：*Tap* Ⅰ 酶切产物 40 μL，10 U/μL *Eco*R Ⅰ 1 μL，5 pmol/μL *Eco*R Ⅰ 接头 1 μL，50 pmol/μL *Taq* Ⅰ 接头 1μL，10 mmol/L ATP 1 μL，350 U/μL T4 DNA 连接酶 1 μL，10×H Buffer 1 μL，加超纯水 4 μL 至 50 μL，37 ℃ 恒温水浴消化 3 h。酶切-连接产物经 1∶10 稀释后，取出 5 μL 用做下一步扩增反应的模板[6]。*Eco*R Ⅰ 接头和 *Taq* Ⅰ 接头序列为：

*Eco*R Ⅰ 接头：5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′；3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′。

Taq Ⅰ 接头：5′-GACGATGAGTCCTGAC-3′；3′-TACTCAGGACTGGC-5′。

1.3.7　限制性片段的预扩增引物设计及 PCR 扩增条件

用于预扩增的两对引物是 E01/T01（*Eco*R Ⅰ＋A，*Taq* Ⅰ＋A）和 E01/T02（*Eco*R Ⅰ＋A，*Taq* Ⅰ＋C）。引物序列是：E01：5′-GACTGCGTACCAATTCA；T01：5′-GATGAGTCCTG ACCGAA；T02：5′-GATGAGTCCTGACCGAC；预扩增反应体系为：5μL 1∶10 稀释的连接产物，5 μL 10×PCR Buffer，3 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，1 μL 10 mmol/L dNTP，1.5 μL 50 ng/μL E01，1.5 μL 50 ng/μL T01（或 T02），1.5 U *Taq* 酶（Sangon，上海），加超纯水至 50 μL。PCR 反应条件为：94℃ 30 s，56℃ 60 s，72℃ 60 s 共 20 个循环；72℃ 延伸 5 min。预扩增产物 1∶20 稀释后，用于选择性扩增。

1.3.8　预扩增产物的选择性扩增引物设计和 PCR 扩增条件

以 5 种 *Eco*R Ⅰ 引物和 5 种 *Taq* Ⅰ 引物组成的 25 对引物进行选择性扩增实验，选择性扩增的反应体系为：5 μL 1∶20 稀释的预扩增限制性片段产物，1.2 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，0.4 μL 10 mmol/L dNTP，2 μL 10×PCR Buffer，0.3 μL 50 ng/μL Exx，0.6 μL 50 ng/μL Txx，1 U *Taq* 酶（Sangon，上海），加超纯水至 20 μL。PCR 反应条件为：94℃ 预变性 30 s；94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 120 s，每个循环退火温度降低 0.7℃；13 个循环以后，再进行另外 23 个循环的扩增，条件为：94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 120 s。

2　结　果

2.1　PGCs 的染色及形态鉴定

取注射液直接观察在显微镜下能观察到比普通血液细胞大一倍左右的细胞，细胞核为圆形，处稍偏离细胞中心的位置，细胞的另一侧有颜色较细胞核浅的颗粒状分布的脂质和糖原颗粒。用 Leica-Qwin 软件测量到这些较大细胞的直径在 12～16 μm 之间，可判定为 PGCs，因血细胞最大的只在 10 μm 左右。图 1 中左图标希夫试剂染色的 PGCs（×400），由于大量糖原颗粒存在，PGCs 同时可被希夫试剂染为玫瑰红色。

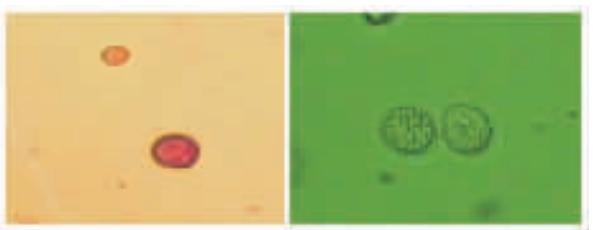

图 1　分离自广东石岐杂的家禽原始生殖细胞（PGCs）

左图为 PGCs 希夫试剂染色图片（×400），PGCs 被染为玫瑰红色；右图为 400 倍光镜图片。

Fig.1　Primordial germ cells isolated from ShiQiZa chicken embryo

Left picture shows the Schiff reagent stained PGCs; Right picture shows the PGCs (×400).

2.2　PGCs 的提取效率和纯度

从 10 枚鸡胚的血液中提取到的 PGCs 细胞的数量和百分比如表 1 所示。

表 1　10 枚供体鸡胚血液中提取 PGCs 数量及 PGCs 百分比

Table 1　Number and percentage of PGCs isolated from 10 donor chicken embryos

	PGCs	血细胞 Blood cells
不同细胞数量 Number of cells	490	163
占细胞总数百分比 Percentage of cells（%）	75	25

2.3 嵌和体 AFLP 鉴定引物筛选

通过对 60 PGCs 供体鸡的池 DNA 和 60 受体鸡的池 DNA 进行 AFLP 分析，采用 *Eco*R Ⅰ/*Taq* Ⅰ双酶切组合进行基因 DNA 酶切和相应接头的连接，从 25 对引物中筛选出一对引物(*Eco*R Ⅰ引物：5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3′，*Taq* Ⅰ引物：5′-GAT GAG TCC TGA CCG ACA G-3′)可用于石岐杂和 H 系嵌和体的检测(图 2)。

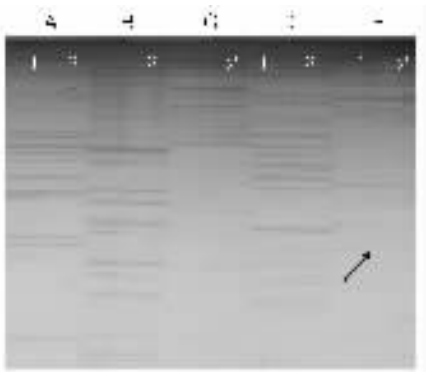

图 2 5 对引物组合的 AFLP 凝胶电泳图像

A、B、C、D、E 分别代表由 5 对引物扩增所得的图谱(E 是筛选出来的引物组合)；1：H 系 AFLP；2：石岐杂 AFLP；箭头所指为石岐杂有别于 H 系的特异条带。

Fig.2 AFLP band patterns from 5 different PCR primer pairs

A、B、C、D、E represents 5 different PCR primer pairs; 1: the AFLP of H breed genomic DNA; 2: the AFLP of shiqiza chicken genomic DNA. E primer pairs was chosen for identification of chimeras. The arrow indicates the unique AFLP band of shiqiza chickens.

2.4 种系嵌和体检测及制备效率

用筛选出的引物对每一个受测鸡胚的肌肉和性腺基因组 DNA 进行 AFLP 分析，分析 20 个受体鸡胚的性腺基因组 AFLP，其中有 8 个存在石岐杂 AFLP 的特异片段，因此可以断定注射石岐杂 PGCs 的 H 系鸡胚有 8 只嵌和体，嵌和率为 40%，如图 3 为嵌和体 AFLP 分析部分图谱。

3 讨 论

获取 PGCs 通常有 3 个途径：一是从 5 期胚的生殖新月区提取；二是从 13～17 期胚的血液中提取；三是从生殖腺中提取。这 3 种胚源中 PGCs 的

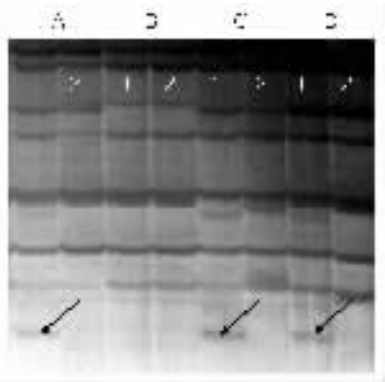

图 3 4 只受体胚胎肌肉和性腺的 AFLP 分析

A、B、C、D 分别代表 4 只胚胎，A、C 及 D 为嵌合体鸡胚；每只个体样品 1 泳道为性腺 AFLP 分析，2 泳道为肌肉的 AFLP 分析；箭头示嵌和体的特异条带。

Fig.3 The AFLP Analysis with muscle and gonad gland DNA from 4 PGCs recepients

A、B、C、D represents 4 chicken embryos injected with PGCs medium. A, C and D were germline chimaeras. Canal 1 and 2 represents AFLP analysis of sex gland and muscle tissue DNA.

含量分别为 2%、0.003% 和 1.5%[7]。据研究，10 期胚中的生殖新月区的 PGCs 含量最高，为 150～250 个[8]。但是由于难以避免的上下胚层以及卵黄的污染，使该阶段 PGCs 的分离纯化非常的困难。本实验也尝试从性腺中提取 PGCs，但由于性腺组织中的各类细胞太多，有许多的细胞与 PGCs 的密度相近，因此采用梯度离心提取出来的 PGCs 占总细胞的百分比非常的低。

鸡胚孵化至 48 h 时，中胚层出现，血液循环建立，生殖新月区的 PGCs 逐渐进入血液并随血液迁移至生殖脊原基处，逐渐发育成为有功能的配子[8]。在孵化至 48 h 胚胎血液中 PGCs 的密度最高，以后则逐渐下降[9]，但是在 48 h 至 60 h 之间，胚胎 PGCs 的密度差异并不是很大[10]，而且 48 h 血管的发育还不完全，只能看到很浅的血管痕迹，不适合吸取血液，当鸡胚孵化至 51 h，血管比较粗，同时大量的 PGCs 进入血液循环向性腺迁移，这时能吸取到大量的血液。当超过 56 h，鸡胚的血液太多，相对来说能提取到的 PGCs 会更少，因此通常都选择孵化 51～56 h 吸取鸡胚血液进行 PGCs 的提取。

在梯度离心中，由 16% Ficoll 和 1 mL 含有

PGCs 的培养液混合形成 14.4% 的 FicoII 溶液,当离心力达到 800 g 时,PGCs 停留在 14.4% 的 FicoII 溶液和 6.3% FicoII 溶液分层处,其下层为红细胞,一些卵黄颗粒及细胞碎片被沉淀到最下层。IL-KuK Chang 的细胞分层法可将 PGCs 浓度提高到 86%[4] 以上,本实验的提取浓度达到 75% 左右。

本实验在做检测时将每一个受测鸡胚的肌肉 AFLP 作为对照,从分子遗传学的角度来说受体鸡胚的肌肉 DNA 的 AFLP 图谱应和性腺 DNA 的 AFLP 图谱完全相同,如发现性腺 AFLP 图谱中有不同于肌肉的条带,且此条带为石岐杂鸡池 DNA 的 AFLP 分析图谱中有别于 H 系鸡池 DNA 的 AFLP 分析图谱中的特异条带时,即可断定为石岐杂-H 系种系嵌和体。

目前国内家禽多采用活体保种的方式,要浪费大量的人力和物力,同时由于今年各种家禽疾病的频频爆发给一些地方家禽尤其是一些濒临灭绝的家禽的活体保种带来了更大的难度。如果能将 PGCs 作为家禽保种的对象进行液氮超低温保存[11],然后通过嵌和体的后代的产生仍能获得纯种家禽。该研究为 PGCs 进行家禽品种资源保存打下技术基础。

参 考 文 献(References):

[1] Chang I K, Tajima A, Yasuda Y, Chikamune T, Ohno T. Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int*, 1995, 19(7): 569～576.

[2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407～4414.

[3] Zabeau M, Vos P. Eurpean patent application publication number EP 0534858 A1. 1993.

[4] Chang I K, Tajima A, Yasuda Y, Chikamune T, Ohno T. Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos. *Cell Biol Int Reports*, 1992, 16(9): 853～857.

[5] YAN Hai-Feng, XIAO Bing-Nan, P TREFIL, GUO Xiang-Xia, WU Xiao-Lin. Achievements and applications in making chicken chimeras using BCs. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(4): 537～543.
燕海峰,肖兵南,P TREFIL,郭湘霞,吴晓林. 鸡囊胚细胞嵌合体制作技术研究及其应用前景,遗传,2004,26(4):537～543.

[6] REN Jun, HUANG Lu-Sheng, Gary Evens, GAO Jun, AI Hua-Shui, CHEN Ke-Fei, DING Neng-Shui, DENG Su-Hua. Construction of finger printings of genomic DNA of pig. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(2): 179～182.
任　军, 黄路生, Gary Evens, 高　军, 艾华水, 陈克飞, 丁能水, 邓素华. 猪基因组 AFLP 指纹图谱构建. 农业生物技术学报, 2003, 11(2): 179～182.

[7] Wentworth B C, *et al*. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differention. *Poultry Science*, 1989, 68: 999～1010.

[8] LIU Chun-Hai, LI Zan-Dong, HUANG Jin-Song, SHA Jin, WEI Hua, ZHAO Chen, SUN Ming-Jun. Production of chicken/duck chimeras by isolating and transferring chicken circulating primordial germ cells into duck embryos. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2001, 24(3): 62～66.
刘春海, 李赞东, 黄劲松, 沙　金, 危　华, 赵　晨, 孙明军. 鸡胚原始生殖细胞的分离和鸡鸭嵌和体的制备研究. 河北农业大学学报, 2001, 24(3): 62～66.

[9] HAN Yi-Bing, YU Kang-Zhen, ZHOU Qi, QIN Peng-Chun. Study on the cultivation of primordial germ cells from chick embryos. *Biotechnology*, 1996, 61(2): 11～13.
韩毅冰, 于康震, 周　琦, 秦鹏春. 鸡胚血液中原始生殖细胞及其培养的研究. 生物技术, 1996, 61(2): 11～13.

[10] MA Yu-Zhong, LI Zan-Dong, SHA Jin, LIU Chun-Hai, WANG Ning. Development of donor cells in chicken-duck chimeric embryos. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(11): 1002～1005.
马玉忠, 李赞东, 沙　金, 刘春海, 王　宁. 供体细胞在鸡-麻鸭嵌合体胚胎中的发育. 遗传学报, 2001, 28(11): 1002～1005.

[11] Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y, Kuwana T. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1994, 102: 321～325.