

## 狼山鸡-AA肉鸡嵌合体的制作及其转基因鸡研究

李建许, 陈杰, 蔡亚飞, 刘健, 徐世永, 刘红林\*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 试验 I: 以狼山鸡为供体, AA肉鸡为受体, 通过赤道开窗法制作了狼山鸡-AA肉鸡的嵌合体。共操作了 108 枚鸡蛋, 孵化成活 19 只, 孵化成活率 17.6%。获得表型嵌合体鸡胚 22 枚, 其中 15 只孵化成活, 嵌合体率为 13.9%。对 2 只嵌合体公鸡解剖发现, 有 1 只的睾丸发育异常。PCR 扩增禽类 W 染色体特异性的重复序列发现, 2 只嵌合体公鸡的性腺都嵌合了供体异性的细胞。结果表明所采用的嵌合体制作方法制备转基因鸡是可行的。试验 II: 利用脂质体介导法, 在体外将外源 pEGFP 质粒转入到鸡 X 期胚胎细胞中, 培养 8 h 开始有外源基因的表达, 体外培养 12 h 后获得了 21.43% 的转染效率。将转染后的鸡胚盘细胞移入到受体 AA 肉鸡的胚下腔, 孵化 6 d 后在 8 个鸡胚中检测到有外源基因的存在, 阳性率为 40% (8/20)。

**关键词:** 胚盘细胞; 嵌合体; 转基因; 狼山鸡

中图分类号: S814.8; Q813.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 02-0083-06

## Production of Langshan-AA chimeras and transgenic study via chimeras

LI Jian-xu, CHEN Jie, CAI Ya-fei, LIU Jian, XU Shi-yong, LIU Hong-lin\*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Experiment I: The Langshan was used as the donor and the AA broiler was the recipient, the Langshan-AA chimeras were produced via windowing the recipient eggs. 108 eggs were manipulated, and 19 chickens were hatched. The hatching rate was 17.6%. 22 chimeric embryos were obtained, 15 chimeras survived. The survived chimera rate was 13.9%. Abnormal testis was founded in one of the two male chimeras by dissecting. Hetero-sexual cells were found in the gonads of both chimeras by PCR amplifying the W-specific repeating sequences. The result showed that it was possible to produce transgenic avians by using our method of producing chimeras. Experiment II: Plasmid pEGFP was introduced into the X stage chicken blastodermal cells via lipofectamine *in vitro*, the exogenous gene began to express 8 h later. After cultured for 12 h *in vitro* the transfecting rate reached 21.43%. The transfected blastodermal cells were injected into the subgerminal cavity of the recipient, after being hatched for 6 days the exogenous gene were detected in 40% (8/20) of the embryos examined.

**Key words:** blastodermal cells; chimera; transgene; Langshan

转基因技术已在许多哺乳动物和鱼类上取得成功<sup>[1]</sup>, 但是, 由于禽类生殖生理结构及其卵的特殊性, 禽类的转基因工作面临着许多困难。目前, 已有多种方法被应用于禽类的转基因研究, 例如原核显微注射法、胚体直接转染法、精子载体转基因法、嵌合体法等。其中, 利用嵌合体途径制作转基因禽的方法, 因具有可对供体细胞进行遗传修饰而得到纯合的转基因个体<sup>[2]</sup>等独特的优点而越来越受到研究者的关注。

在利用嵌合体途径制作转基因禽的过程中, 研究者们主要对两类细胞进行体外的操作: 禽类 X 期胚盘细胞 (blastodermal cells, BCs) 和原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs)。BCs 具有类似于鼠胚胎干细胞的特征, 在引入同期发育的受体胚胎时能够参与受体的各种组织分化<sup>[3]</sup>。Ginsburg<sup>[4]</sup>和 Karagenc 等<sup>[5]</sup>的研究表明, PGCs 的前体细胞主要来源于 X 期的胚盘细胞。相对于禽类的原始生殖细胞, 禽类囊胚细胞的分离相对比较容易, 并且运用禽类的囊胚细胞制作嵌合体还具有方便从表型上鉴定是否发生了嵌合的优点。1970 年, Marzullo<sup>[6]</sup>首先运用胚盘细胞组织块制作了芦花洛克鸡与白来航鸡的嵌合体。Petitte 等<sup>[7]</sup>、Thoraval 等<sup>[8]</sup>、Ono 等<sup>[9]</sup>又分别运用胚盘细胞制作了芦花鸡与白来航、野生羽色

收稿日期: 2006-11-02

基金项目: 农业部 948 项目 (201084)

作者简介: 李建许, 硕士研究生。\* 通讯作者: 刘红林, 教授, 博士生导师, 从事动物遗传育种研究, E-mail: liuhonglin@263.net。

鹤鹑与白羽鹤鹑的嵌合体。Naito 等<sup>[10]</sup>、Li 等<sup>[11]</sup>将此方法应用于不同种别的禽类嵌合体的制作, 测试结果显示, 有 1 只鹤鹑与鸡、6 只来航鸡与麻鸭的嵌合体还发生了性腺的嵌合。

Brazolot 等<sup>[12]</sup>、Fraser 等<sup>[13]</sup>将脂质体转染过的含有 *lacZ* 基因的 BCs 转入受体鸡胚内, 经过 2~3 d 孵化后, 在嵌合体的胚胎内检测到  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。Ono 等<sup>[9]</sup>把鹤鹑的 BCs 与含有 *lacZ* 的质粒共同温育后转入受体的胚内, 孵化 52 h 后在 1/3 的活胚组织中检测到了 *lacZ* 基因, 但在成活的个体中都没有检测到外源基因的存在。

本试验中, 我们以狼山鸡为供体, AA 肉鸡为受体, 对嵌合体的制作及转基因鸡进行了探索和研究, 以期为转基因禽的制作打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供体狼山黑鸡(黑羽)受精蛋购自江苏省家禽研究所, 受体 AA 肉鸡(白羽)受精蛋购自南京迈皋桥种鸡场。DMEM、0.05% trypsin/0.02% EDTA、脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>均为 GIBCOBRL 公司产品, FBS 为杭州四季清产品。1% 明胶、*Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 为 Promega 产品, W 染色体上重复序列特异性引物 (5'-CCCAAATATAACACGCTTCACT-3' 和 5'-GAAATGAATTATTTCTGGCGAC-3')<sup>[14]</sup> 和 GFP 基因特异性引物 (5'-CACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' 和 5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA-3') 由上海生物工程技术有限公司合成。pEGFP-C1 由加拿大 Guelph 大学 Gibbins 教授惠赠。主要仪器设备包括凝胶成像系统 (GIS-700D)、细胞培养箱、冰冻切片机 (德国 Leica)、荧光显微镜 (德国 Leica) 等。

### 1.2 试 验 I: 嵌合体鸡的制备及鉴定

1.2.1 嵌合体鸡的制备 将新鲜的狼山鸡受精蛋用 75% 乙醇擦拭消毒, 打开蛋壳将内容物倒入培养皿中。用眼科剪沿四周将胚盘小心分离, 移入盛有 PBS-G (含胶原的磷酸盐缓冲液) 的培养皿中, 轻轻漂洗, 去除卵黄, 并将胚盘与卵黄膜小心分离, 胚盘移入另一盛有 PBS-G 的 1.5 mL 离心管中。1 000 g 离心 5 min, 移去 PBS-G, 加入预冷的 0.05% trypsin/0.02% EDTA 消化 10 min。1 000 g 离心 5 min, 移去 0.05% trypsin/0.02% EDTA, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液洗两次, 制成细胞悬液, 并使每毫升约含 150 000~200 000 个鸡胚细胞。用医用砂轮在受体 AA 种蛋的赤道面打开一小孔 (不损伤蛋壳膜), 在蛋壳膜上滴 1 滴 PBS-G, 然后打开蛋壳膜暴露胚盘, 将供体鸡胚细胞悬液注入受体鸡胚胚盘中。另取一块较大的蛋壳膜盖住蛋壳开口处, 并以蛋黄封口。制作完成的鸡胚放入孵化箱, 保持 37.5 °C、相对湿度 55% 孵化直至出雏。孵化期间定期观察并记录总的发育个体数、嵌合体鸡发育数以及非嵌合体鸡发育数。

1.2.2 嵌合体公鸡性腺的解剖学观察 将 5 月龄的 2 只嵌合体公鸡解剖, 检查其性腺的发育状况。

1.2.3 嵌合体鸡性腺 DNA 的提取及 W 染色体上特异性重复序列的检测 性腺 DNA 的提取方法见文献 [15]。将提取的 DNA 稀释到  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , PCR 反应体系为 12.5  $\mu\text{L}$ , 其中 ddH<sub>2</sub>O 8.65  $\mu\text{L}$ , 10 × Buffer 1.25  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> ( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.75  $\mu\text{L}$ , 4 dNTPs ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 2% 琼脂糖凝胶 50 V 电泳 50 min, EB 显色。

### 1.3 试 验 II: 转基因鸡的制作

1.3.1 鸡 X 期胚盘细胞的体外转染 供体狼山鸡 X 期胚盘细胞的分离方法同上, 为了找到质粒 pEGFP 与脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>对鸡胚盘细胞的最佳转染效率, 用不同比例的质粒与脂质体转染鸡胚细胞。转染细胞步骤为: (1) 先将  $1 \times 10^5$  个细胞用 200  $\mu\text{L}$  DMEM 悬浮起来, 并将细胞悬液加入到预先用 1% 明胶处理的 1.9 cm<sup>2</sup> 的细胞培养孔之中; (2) 将不同比例的质粒和脂质体混合孵育 15 min, 然后用 200  $\mu\text{L}$  DMEM 稀释并加入到上述细胞转染皿里; (3) 把转染细胞的培养皿放入细胞培养箱中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 转染 4 h; (4) 吸掉转染液, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 400  $\mu\text{L}$  代替, 细胞培养箱中 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养过夜; (5) 荧光显微镜下检查鸡胚细胞中绿色荧光蛋白的表达, 同时做细胞计数, 计算并绘制各比例的荧光表达效率图。

1.3.2 转基因鸡的制作及外源基因在早期鸡胚中的检测 在制作转基因鸡时, 将经过 4 h 转染的鸡胚

盘细胞吹打悬浮起来，1 000 g 离心，将细胞沉淀下来；除掉上清转染液，用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 清洗细胞 2 次，同样离心方法沉淀细胞；最后用 10% 胎牛血清的 DMEM 悬浮细胞，并使每毫升悬液约含  $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  个鸡胚细胞，以下步骤与嵌合体的制作方法相同。将制作完成的鸡胚放入孵化箱，37.5 °C、相对湿度 55% 孵化 6 d 后取出，分离鸡胚并制作冰冻切片；收集剩余的胚体材料提取基因组 DNA。性腺 DNA 的提取方法同上。模板 DNA 的稀释及 PCR 反应的体系同上，反应程序：94 °C 5 min：94 °C 30 s，62 °C 30 s，72 °C 1 min，35 个循环；72 °C 7 min。12% 聚丙烯酰胺凝胶，120 V 恒压电泳 10 ~ 12 h，银染。

## 2 结果与分析

### 2.1 嵌合体制作结果

本次试验共对 108 枚受体受精蛋进行了操作，孵化早期有 30 枚鸡胚发育，其中 22 枚为表型嵌合鸡胚，8 枚为非嵌合鸡胚，表型嵌合率为 20.4% (22/108)。最终孵化成活 19 只鸡，孵化成活率为 17.6% (19/108)。其中表型嵌合鸡 15 只 (13 ♀, 2 ♂)，非嵌合鸡 4 只。嵌合体比率为 13.9% (15/108) (表 1)。表型的嵌合具有随机性。在嵌合个体中 (图 1)，嵌合的程度有所不同，有的仅很少部位发生嵌合，有的几乎整个背部都发生了嵌合 (图 1-B)。

表 1 孵化过程中鸡胚发育及成活率

Table 1 Developing and survival rate of chicken embryos

项目 Items	发育时间/d Time of development				
	9	14	18	20	21
存活的鸡胚数 Number of developing embryos	30	28	19	19	19
嵌合体鸡胚存活数 Number of developing chimeric embryos	22	22	15	15	15
非嵌合体鸡胚存活数 Number of developing non-chimeric embryos	8	6	4	4	4
孵化成活率/% Survival rate	27.8	25.9	17.6	17.6	17.6

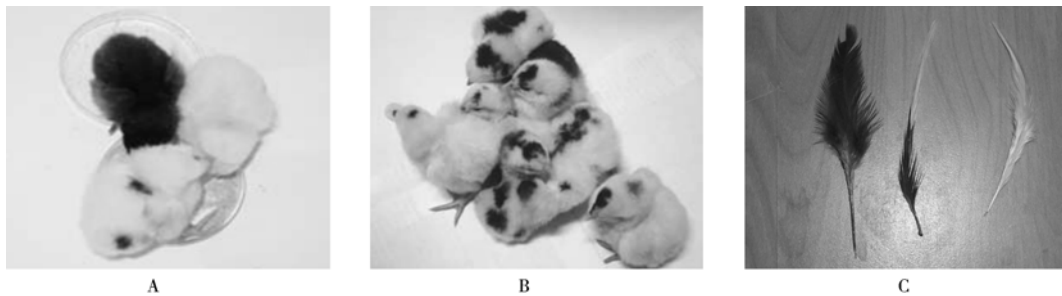


图 1 表型嵌合体鸡

Fig.1 Phenotypic chimeric chickens

A: 供体狼山黑鸡 (黑色羽毛)、受体 AA 肉鸡 (白色)、毛色嵌合鸡 (黑、白羽毛); B: 不同程度毛色嵌合鸡; C: 左: 狼山鸡的羽毛 (黑色); 中: 一只成年嵌合体鸡的羽毛; 右: AA 肉鸡的羽毛 (白色)

A: Donor Langshan black chicken (black feather), recipient AA broiler (white feather), phenotypic chimeric chicken (black and white feather); B: Phenotypic chimeric chickens in differential degree; C: Left: Feather of Langshan chickens (black), Middle: Feather of one adult chimeric, Right: Feather of AA broilers (white)

### 2.2 性腺的解剖观察

将 2 只饲养到 5 月龄的雄性嵌合体进行解剖，发现其中 1 只嵌合体鸡的睾丸明显小于正常个体的睾丸 (图 2)，而另 1 只则与正常个体的睾丸大小没有明显的差别。

### 2.3 禽类 W 染色体上重复序列的 PCR 检测

对上述 2 只嵌合体睾丸 W 染色体上特有的重复序列进行 PCR 检测表明，在 2 只嵌合体的性腺中都存在有 W 染色体特异重复序列，这表明在嵌合公鸡的性腺中都嵌合了供体狼山鸡的雌性细胞 (图 3)。

### 2.4 鸡胚盘细胞的体外瞬时转染

本试验采用的 pEGFP-C1 质粒是以 CMV (Cytomegalovirus, 巨细胞病毒) 为启动子的增强型绿色荧光蛋白真核表达质粒，转染鸡胚盘细胞后用荧光显微镜观察到绿色荧光蛋白基因的表达。转染后 12 h，表达荧光的细胞数以及表达量达到高峰 (图 4)。

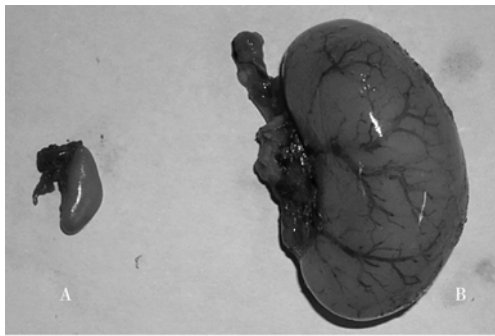


图 2 嵌合体鸡睾丸 (A) 与正常 AA 肉鸡睾丸 (B) 的比较  
Fig. 2 Comparison of testis between the chimera (A) and the normal AA broiler (B)

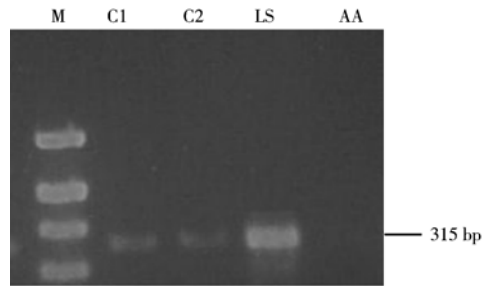


图 3 睾丸中禽类 W 染色体特异重复序列的 PCR 检测图  
Fig. 3 PCR analysis of the W chromosome-specific repeating sequence in the testis of male chimera

M: DNA 标准品; C1: 嵌合体 1 (♂); C2: 嵌合体 2 (♂); LS: 狼山鸡 (♀); AA: AA 肉鸡 (♂)。M: DNA marker; C1: Chimera 1 (♂); C2: Chimera 2 (♂); LS: Langshan (♀); AA: AA broiler (♂)

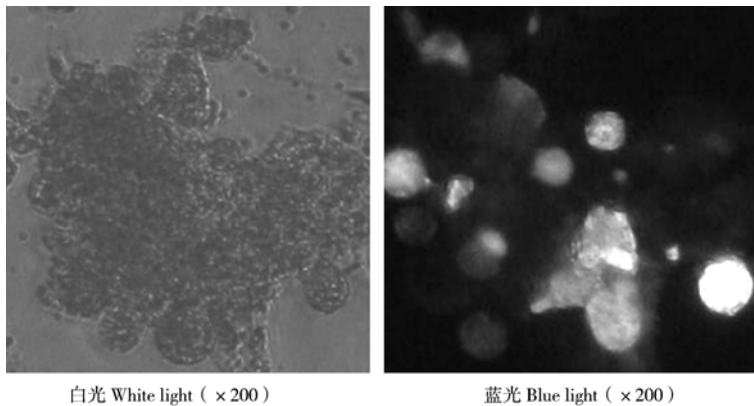


图 4 绿色荧光蛋白在鸡胚盘细胞中的表达

Fig. 4 Expression of GFP in chicken blastodermal cells

2.5 脂质体用量对鸡胚盘细胞转染的影响

通过固定质粒的用量, 改变脂质体的用量来转染鸡胚盘细胞。从表 2 可见, 以 W (质粒): W (脂质体) = 1: 4 的转染效果最好, 达到 21.43%, 极显著地高于其他组 (P < 0.01), 其他组之间没有显著差异 (P > 0.05)。

2.6 外源基因在 6 日龄鸡胚中的表达

本试验共操作了 34 枚鸡蛋, 经过 6 d 的孵化, 得到 20 枚发育的鸡胚。对整个鸡胚做冰冻切片没有检测到 GFP 基因的表达, 然而通过 PCR 扩增, 我们在 8 个鸡胚中检测到了外源 GFP 基因的存在, 阳性率为 40% (图 5)。

表 2 pEGFP 与 Lipofectamine™ 在转染鸡 X 胚盘细胞中的结果  
Table 2 The result of pEGFP plasmid and Lipofectamine™ used in transfecting chicken X blastodermal cells

质粒用量/μg Dose of pEGFP	脂质体用量/μg Dose of Lipofectamine™	表达 GFP 的细胞比例/% Rate of cells expressing GFP
4	8	10.47 <sup>Bb</sup>
4	12	9.35 <sup>Bb</sup>
4	16	21.43 <sup>Aa</sup>
4	20	12.97 <sup>Bb</sup>
4	24	12.52 <sup>Bb</sup>

注: 不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。The different capital and small letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels.

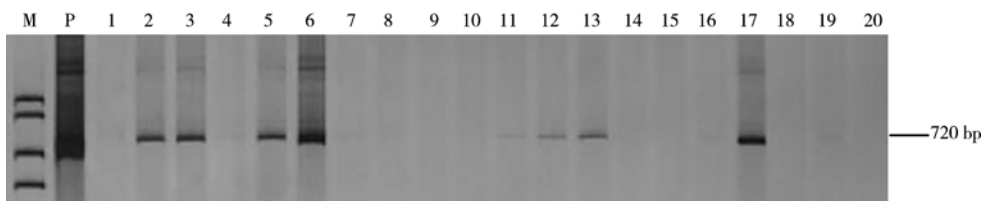


图 5 鸡胚中 GFP 基因的检测

Fig. 5 Detection of GFP in the chicken embryos

M: DNA marker; P: pEGFP; 1-20: 鸡胚 Chicken embryos

### 3 讨论

本试验采用了 Speksnijder 等<sup>[16]</sup>改进的方法, 通过在赤道部打孔将 X 期胚盘细胞注射到受体的胚下腔, 第 21 天的孵化率达到了 17.6% (19/108)。这一孵化效率高于 Petite 等<sup>[7]</sup>和 Thoraval 等<sup>[8]</sup>所报道的 7.5% 和 7.3%, 但低于 Speksnijder 等<sup>[16]</sup>和燕海峰等<sup>[17]</sup>30% ~ 35% 和 31% 的孵化率。在发育的鸡胚中, 表型嵌合率为 20.4% (22/108), 但到孵化出雏时, 表型嵌合率却只有 13.9%。这一表型嵌合率远远高于 Petite 等<sup>[7]</sup>和 Thoraval 等<sup>[8]</sup>所报道的 1.9% 和 3.2%, 而稍低于 Speksnijder 等<sup>[16]</sup>和燕海峰等<sup>[17]</sup>所报道的 14.2% 和 16.2%。

在孵化的前 1 ~ 8 d, 有 72.2% (78/108) 的胚胎死亡, 在孵化的第 14 ~ 18 天, 胚胎又出现了一个死亡的高峰, 成活个体数由 25.9% 降到了 17.6%。这与 Bednarczyk 等<sup>[18]</sup>、贾彦征等<sup>[19]</sup>和刘士寻等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。造成孵化前期的高胚胎死亡率的原因有待进一步研究。

Kagami 等<sup>[21]</sup>、Furuta 等<sup>[22]</sup>、Yamaguchi 等<sup>[23]</sup>的研究都表明, 在异性嵌合的个体中, 大约有 30% 的个体其性腺在发育过程中会出现不同程度的卵巢样畸形。而本试验中有 1 只嵌合体公鸡的性腺比正常 AA 肉公鸡的性腺小, 而另 1 只的则正常, 并且, 2 只嵌合体公鸡的性腺都嵌合了供体异性的细胞。所以, 这只嵌合体公鸡性腺的发育不良可能是由于发生了异性嵌合造成的, 但由于嵌合程度不同, 即在受体性腺中供体异性细胞所占比例不同使受体性腺受到的影响也不同。嵌合体中表型嵌合程度的深浅也可能是由于来源于供体细胞数量的不同所造成的。由于试验中所使用的受体为 AA 肉鸡, 其繁殖性能极低, 所以不能用测交的方法来检测嵌合个体是否发生了生殖体系的嵌合, 但从这 2 只嵌合体公鸡的检测结果来看, 它们的性腺中确实嵌合了供体的细胞。已有的研究表明, 鸡的 X 期胚盘细胞含有原生殖细胞的前体细胞, 在将供体的 X 期胚盘细胞移入受体的胚下腔后, 这些细胞可以发育为原生殖细胞, 经血液迁移到受体的性腺中并发育为功能配子<sup>[4]</sup>。所以, 从检测结果来看, 这 2 只嵌合体公鸡为生殖嵌合体, 这一结果也佐证了我们所采用的嵌合体制作方法来制备转基因禽是可行的。

Brazolot 等<sup>[12]</sup>用脂质体转染鸡胚盘细胞 16 ~ 24 h 后发现, 转染效率为 4%; Pain 等<sup>[24]</sup>用 3 种不同的脂质体和 pEGFP-C1 质粒转染了鸡胚盘细胞, 发现转染的细胞在培养过程中出现了分化现象, 经过流式细胞筛选发现, 没有分化的胚盘细胞的转染效率为 4%, 而发生分化的胚盘细胞的转染效率达到了 15%。易学瑞等<sup>[25]</sup>用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 和 pEGFP-C1 质粒转染鸡胚盘细胞的最高效率达到了 6%。本次试验中我们的转染效率明显高于前人的结果, 分析可能的原因, 首先是所用的脂质体质量所导致的; 其次是受精蛋的新鲜程度。受精蛋刚产出时, 胚盘细胞处于 X 期, 但是即使在低温下, 胚盘也可缓慢发育, 所以受精蛋的新鲜程度可影响到转染时胚盘细胞所处的状态, 从而也会对转染产生影响。另外, 转染时细胞的密度、培养液的 pH 值等因素都可能影响到转染效率。

Etches 等<sup>[26]</sup>将 X 期鸡胚的 BCs 取出, 在体外培养 7 d, 发现这些 BCs 仍具有多能干细胞的特征。他们还发现这些 BCs 能够被转染, 并且转染过的 BCs 无论是在体内还是在体外都能表达外源基因。本次试验中, 经转染的细胞在随后的培养中没有加入各种干细胞因子来抑制鸡胚盘细胞的分化, 所以在经过 24 h 培养后, 已经有部分发生分化。随着培养时间的延长, 表达外源基因的细胞数减少, 外源基因的表达强度也随之减弱。另外早期胚胎中没有检测到 GFP 基因的表达, 而用 PCR 在 8 个 6 日龄的鸡胚中检测到了外源基因的存在, 这些结果都表明外源基因可能并没有整合到所转染细胞的基因组中, 而是游离在基因组之外, 随着细胞的增殖和分化, 这些外源基因被细胞的核酸酶降解掉了。所以在今后的研究中在抑制胚盘细胞分化的同时, 筛选那些能够稳定表达外源基因的细胞并将之移植到受体的胚下腔, 从而得到转基因鸡将是可行的途径。

#### 参考文献:

- [1] Wall R J. Transgenic livestock: progress and prospects for future [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 57-68
- [2] Etches R J, Carsience R S, Clark M E, et al. Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome [J]. *Poultry Science*, 1993, 72(5): 882-889
- [3] Watt J M, Petite J N, Etches R J. Early development of the chick embryo [J]. *Journal of Morphology*, 1993, 215(2): 165-182

- [4] Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians [J]. *Poultry Science*, 1997, 76(1): 91-95
- [5] Karagenc L, Cinnamon Y, Ginsburg M, et al. Origin of primordial germ cells in the prestreak chicken embryo [J]. *Developmental Genetics*, 1996, 19(4): 290-301
- [6] Marzullo G. Production of chick chimaeras [J]. *Nature*, 1970, 225: 72-73
- [7] Petite J N, Clark M E, Liu G, et al. Production of somatic and germ line chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells [J]. *Development*, 1990, 108(1): 185-195
- [8] Thoraval P, Lasserre F, Coudert F, et al. Somatic and germline chicken chimeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells [J]. *Poultry Science*, 1994, 73(12): 1897-1905
- [9] Ono T, Muto S, Mizutani M. Production of quail chimera by transfer of early blastodermal cells and its use for transgenesis [J]. *Japanese Poultry Science*, 1994, 31(2): 119-129
- [10] Naito M, Watanabe M, Kinutani M. Production of quail-chick chimeras by blastodermal cell transfer [J]. *British Poultry Science*, 1991, 31(1): 79-86
- [11] Li Z D, Deng H, Liu C H, et al. Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells [J]. *Poultry Science*, 2002, 81(9): 1360-1364
- [12] Brazolot C L, Petite J N, Etches R J, et al. Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo [J]. *Molecular Reproduction Development*, 1991, 30: 304-312
- [13] Fraser R A, Carsience R S, Clark M E, et al. Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos [J]. *International Journal of Developmental Biology*, 1993, 37(3): 381-385
- [14] Trefil P, Bruno M, Mikuš T, et al. Sexing of chicken feather follicle, blastodermal and blood cells [J]. *Folia Biologica*, 1999, 45: 253-256
- [15] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 483-485
- [16] Speksnijder G, Ivarie R. A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilized chicken eggs [J]. *Poultry Science*, 2000, 79(10): 1430-1433
- [17] 燕海峰, 肖兵南, 刘世寻, 等. 家鸡羽色嵌合体模型与高效率 BCs 嵌合体制作技术的研究 [J]. *中国家禽学报*, 2002, 6(1): 1-4
- [18] Bednarczyk M, Lakota P, Siwek M. Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastoderm cells [J]. *Poultry Science*, 2000, 79(12): 1823-1828
- [19] 贾彦征, 熊一力, 刘光泽, 等. 鸡胚培养与嵌合体鸡的制备 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2001, 11(2): 93-94
- [20] 刘士寻, 燕海峰, 肖兵南, 等. 鸡蛋开窗法导入供体胚盘细胞对家鸡胚胎发育的影响研究 [J]. *生命科学研究*, 2001, 5(3): 270-274
- [21] Kagami H, Clark M E, Gibbins V A M, et al. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline [J]. *Molecular Reproduction Development*, 1995, 42: 379-387
- [22] Furuta H, Fujihara N. Production of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan-treated chicken embryos [J]. *Asian Journal of Andrology*, 1999, 1(4): 187-190
- [23] Yamaguchi H, Xi Y M, Fujihara N. Inter embryonic (homo- or hetero-sexual) transfer of primordial germ cells between chicken embryos [J]. *Cytotechnology*, 2000, 33: 101-108
- [24] Pain B, Chenevier P, Samarut J. Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies [J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 165(3/4): 212-219
- [25] 易学瑞, 祖萍, 刘慧萍, 等. 增强型绿色荧光蛋白基因在鸡胚盘细胞中的表达 [J]. *上海实验动物科学*, 2001, 24(3): 137-140
- [26] Etches R J, Clark M E, Zajchowski L, et al. Manipulation of blastodermal cells [J]. *Poultry Science*, 1997, 76(8): 1075-1083

责任编辑: 周广礼