

于建宁, 陈哲, 闫乐艳, 等. 白消安消减鹅胚内源性原始生殖细胞[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 863-867.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.021

## 白消安消减鹅胚内源性原始生殖细胞

于建宁<sup>1</sup>, 陈哲<sup>1</sup>, 闫乐艳<sup>1</sup>, 宋永宏<sup>2</sup>, 朱欢喜<sup>1</sup>, 李辉<sup>1</sup>, 戴子淳<sup>1</sup>

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.阿联酋总统事务部自然保护管理, 阿联酋 艾因 64634)

**摘要:** 降低胚胎内源性原始生殖细胞是提高禽类生殖嵌合体效率的最有效途径, 本试验首次研究白消安对鹅胚内源性原始生殖细胞的消减作用。将白消安乳剂直接注射到鹅种蛋的卵黄内, 待鹅胚发育到第8 d时分离生殖腺中的PGCs, 并统计PGCs数目。结果显示, 糖原染色与免疫荧光染色充分证明从鹅胚生殖腺中成功分离到PGCs; 较低浓度(每1颗卵注射150  $\mu\text{g}$ )的白消安能显著降低鹅胚内源性原始生殖细胞, 从对照的单胚约1 200个PGCs降低到处理组的80个左右。鹅相对于鸡而言对白消安更敏感, 较低浓度即可显著降低鹅内源性PGCs。

**关键词:** 鹅; 白消安; 生殖腺; 原始生殖细胞

**中图分类号:** S835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0863-05

## Decrease of goose embryonic primordial germ cells(PGCs) with busulfan

YU Jian-ning<sup>1</sup>, CHEN Zhe<sup>1</sup>, YAN Le-yan<sup>1</sup>, SONG Yong-hong<sup>2</sup>, ZHU Huan-xi<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>,  
DAI Zi-chun<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Laboratory of Animal Improvement and Reproduction, Nanjing 210014, China; 2. Management of Nature Conservation, Department of President's Affairs, Al Ain 64634, United Arab Emirates)

**Abstract:** Elimination of endogenous embryonic primordial germ cells(PGCs) is regarded as the most effective way to enhance the efficiency of poultry germline chimeras. Busulfan was injected into goose egg yolk directly, and PGCs were isolated from goose gonads and counted when goose embryos developed to 8 d. Periodic acid-schiff (PAS) staining and immunofluorescence staining fully demonstrated that PGCs were successfully isolated from goose gonads. A low concentration (150  $\mu\text{g}/\text{eggs}$ ) busulfan could significantly reduce goose embryonic endogenous PGCs, the number from about 1 200 in the control down to about 80. Compared with chicken, goose embryos were more sensitive to busulfan and low concentration of busulfan worked well.

**Key words:** goose; busulfan; gonad; primordial germ cell

目前家禽种质资源保存采用的主要方式是活体动物保种, 即建立规模较大的保种资源场, 集中保存遗传资源。但对活体保种而言, 保护群的有效群体

含量与保种有效程度始终是一对矛盾。不仅如此, 由此带来近亲繁殖、物种衰退及疾病威胁等问题<sup>[1]</sup>, 所以探索新的家禽遗传资源保存技术, 实现高效保种是我们所面临和必须解决的难题。随着生物技术的飞速发展, 非活体保种技术将有效弥补活体保种的不足, 成为活体保种的有效补充甚至替代<sup>[2]</sup>。在哺乳动物中, 非活体保种技术比较成熟, 如精子与卵子的冷冻保存技术及胚胎冷冻保存技术。但对于禽类, 因卵个体大且卵黄多无法采用配

收稿日期: 2017-02-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(14) 2068 ]; 江苏省自然科学基金项目(BK20150546)

作者简介: 于建宁(1980-), 女, 山东烟台人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽生物技术研究。(Tel) 025-84390341; (E-mail) jian-ningyu@jaas.ac.cn

子或胚胎冷冻保存技术,因此建立禽类的非活体保种技术尤为重要。

原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)是配子前体细胞,与配子相比携带的遗传信息更全面,目前基于冷冻保存 PGCs 的非活体保种技术在鸡、鹌鹑上已初显成效<sup>[3-4]</sup>。即将冷冻保存的供体 PGCs 移植到受体中,制备生殖嵌合体,使供体 PGCs 分化成功能性配子,通过横交获得纯合的 PGCs 供体后代。然而限制这一技术的主要瓶颈是如何提高生殖嵌合体产生供体 PGCs 后代的比例。根据现有的研究结果,降低或者去除受体内源性的 PGCs 是最有效的途径之一。目前降低受体内源性 PGCs 的主要方法有组织切除法、射线照射法和白消安处理法<sup>[5]</sup>。组织切除法操作步骤繁琐,不利于下一步的生产应用;射线照射后能有效去除受体来源的 PGCs,但对胚胎发育的负面影响较大,不利于胚胎的正常发育;白消安注射法应用较多,从对胚胎发育的影响及去除受体 PGCs 的效率综合考虑,是目前相对合适的处理方法。Song 等<sup>[6]</sup>利用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解白消安并与芝麻油等体积混合处理早期鸡胚,结果显示能短时间去除鸡胚内源 PGCs,但白消安不能持续作用。Nakamura 等<sup>[7]</sup>将白消安进行乳化大大提高了白消安在鸡胚内的作用时间,更加有效地去除了内源性的 PGCs,使来源于供体 PGCs 的生殖嵌合体效率提高了 28 倍。以上均是在鸡胚上的研究报道,对于鹅胚白消安是否亦能发挥作用以及如何操作、作用浓度等具体问题尚无研究报道。

中国拥有狮头鹅、浙东白鹅、四川白鹅、太湖鹅、豁眼鹅等优良品种,鹅品种资源丰富,如何将这些地方鹅种保护好,长久保存下去是鹅养殖业面临的难题之一。本研究首次尝试将白消安用于鹅胚胎,从白消安的注射浓度、注射形态等方面研究白消安降低鹅胚 PGCs 的作用,建立有效减少鹅胚内源性 PGCs 的方法技术,为后期提高供体 PGCs 的生殖嵌合效率奠定基础,更为将来通过冷冻保存 PGCs 达到鹅非活体保种的目标提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

鹅种蛋购于苏州市乡韵太湖鹅有限公司,品种为太湖鹅。选取大小差异不大的鹅种蛋,剔除偏大和偏小的种蛋。

PBS、不含钙镁的 PBS、0.25%胰蛋白酶-EDTA、KnockOut DMEM 购自 Invitrogen 公司,白消安、DMF、芝麻油、多聚甲醛、BSA、Triton X-100、Hoechst 33342 购自 Sigma 公司,一抗兔多克隆抗体 anti-DDX4(MVH antibody)、二抗 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 购于 Abcam 公司,其余普通化学试剂均为国产或进口分装。培养基、试剂的配制若无特别要求,均以重蒸水为溶剂,高压灭菌条件为 102.9 kPa 蒸气灭菌 30 min。

培养 PGCs 的 KnockOut DMEM 的配制:40% BRL 条件化 KnockOut DMEM,7.5% FCS,2.5% 鸡血清,2.0 mmol/L GlutaMax,1×非必须氨基酸,1.0 mmol/L 丙酮酸钠,0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,1%青链霉素,6 ng/ml 合成小鼠 SCF,4 ng/ml 合成人 FGF。抽滤除菌 4℃保存备用。

### 1.2 白消安注射鹅胚

白消安乳液的制备:参照 Nakamura 等<sup>[7]</sup>的方法,将白消安溶于 DMF,浓度为 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,注射时用无钙镁的 PBS 稀释,与芝麻油等体积混合,采用高速匀浆仪进行乳化,待用。

白消安乳液注射方法:在注射前 2 h 将种蛋水平放置,将提前乳化好的白消安乳液或者不含白消安的 DMF-芝麻油乳液从种蛋的小头注射,直接注入到卵黄中,注射深度约 3 cm。注射完毕,将小孔用石蜡封好,于孵化箱中孵育。注射的白消安乳液因为密度较低会缓慢升到卵黄上部的胚胎位置,从而发挥作用。单个卵的注射量为 150  $\mu\text{g}$ (低浓度)与 225  $\mu\text{g}$ (高浓度)。

### 1.3 鹅胚生殖腺中原始生殖细胞的分离与计数

鹅胚发育第 8 d,将胚胎从种蛋中取出,生殖腺位于肾上方,呈条状,仔细剥离其他组织,在 PBS 中清洗 3 次,即获得左右 2 条生殖腺。用不含钙镁的 PBS 将 0.25%胰蛋白酶-EDTA 稀释 3 倍,左右生殖腺放在已经稀释好的胰蛋白酶-EDTA 中 37℃消化 5 min 后呈单个细胞,加入 400  $\mu\text{l}$  KnockOut DMEM,于 24 孔培养板中培养 4 h 后收集细胞,并于倒置荧光显微镜下统计细胞数量。

### 1.4 鹅胚原始生殖细胞的鉴定

1.4.1 糖原染色(PAS) 糖原染液试剂盒购于南京建成科技有限公司,根据试剂盒说明进行操作。将细胞悬液涂片晾干,4%多聚甲醛固定 3~5 min,在 0.5%高碘酸溶液中孵育 10~12 min,蒸馏水冲洗 2

次,每次 5 min;倾去载玻片上的液体,放入 Schiff 试剂中避光 10 min,迅速用蒸馏水冲洗后,亚硫酸氢钠溶液冲洗 2 次,每次 5 min,自来水冲洗 5 min,用蒸馏水冲洗 5 min,滴 1 滴中性树胶,盖上盖玻片,显微镜下观察。

**1.4.2 原始生殖细胞的免疫荧光染色** 染色步骤:4% 多聚甲醛固定 PGCs 细胞,4 °C 过夜,放于粘附载玻片(表面带正电荷)上,自然风干,PBS-T(含有 0.05% tween 20 的 PBS)清洗载玻片 3 次,每次 30 min,用含有 1% BSA 的 PBS 液处理载玻片 6 h,以阻断非特异性蛋白,0.1% Triton X-100 处理 10~20 min,PBS-T 清洗后,anti-DDX4 一抗 1:100 稀释,4 °C 过夜孵育,PBS-T 清洗后,二抗 1:1 000 稀释,37 °C 避光孵育 1 h,将 Hoechst 33342 用 PBS 稀释 1 000 倍至 10 µg/ml,加入到 PGCs 中,避光染色 2 min,倒置荧光显微镜下观察细胞。

## 1.5 数据分析

每个处理采集 15 个鹅胚的数据,采用 SPSS 11.0 中 ANOVA 进行相关统计学分析,显著性差异以  $P < 0.05$  为标准。统计作图采用 SigmaPlot 绘图软件。

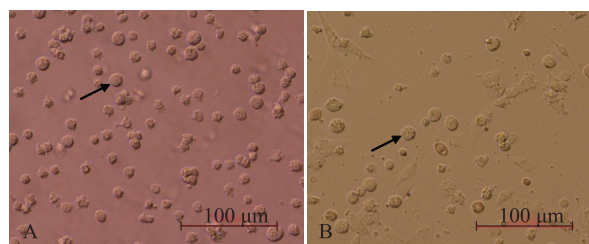
## 2 结果

### 2.1 鹅胚 PGCs 的形态观察

将每只鹅胚分离的左右两侧生殖腺进行胰酶-EDTA 消化,放到 24 孔培养板体外培养 4 h,收集培养液,于显微镜下进行观察。可见刚消化后的细胞中杂细胞很多(图 1A),体外培养 4 h 后大多数杂细胞贴壁(图 1B),而鹅胚 PGCs 不贴壁,由此将鹅胚 PGCs 与其他细胞分离开来。从图 1 中可以看出鹅胚 PGCs 呈圆形或椭圆形,直径约为 15~25 µm,体积比体细胞大,比红细胞大 2 倍左右,细胞核为圆形,分布在稍偏中心位置,细胞另一侧有颜色较浅的脂滴,细胞表现出典型的原始生殖细胞特点。

### 2.2 鹅胚 PGCs 的鉴定

采用糖原染色法和免疫荧光染色法对鹅胚生殖腺中分离的 PGCs 进行鉴定,结果表明,从鹅胚生殖腺中成功分离到 PGCs。糖原染色如图 2 所示,深紫色的为 PGCs,而其他细胞呈淡蓝色,形成明显的着色差异。抗原抗体染色是利用 PGCs 特异表达 Vasa 蛋白,将抗 Vasa 的多克隆抗体 anti-DDX4(一抗)处理分离的细胞,再用 Cy3 标记的二抗(红色荧光)处理后于荧光显微镜下观察,如图 3 所示,PGCs 细胞除细胞

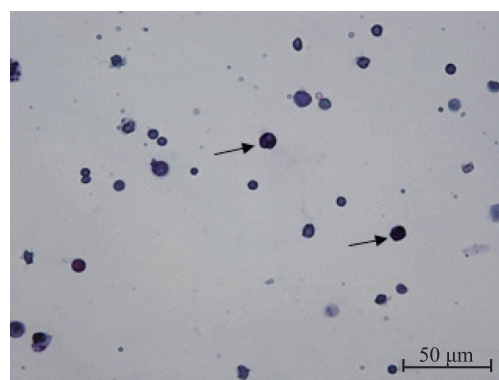


A: 鹅胚生殖腺经胰酶-EDTA 消化成单个细胞;B: 混合细胞体外培养 4 h;箭头所示为鹅胚 PGCs。

图 1 鹅生殖腺中分离出的 PGCs

Fig.1 Primordial germ cells (PGCs) isolated from goose gonads

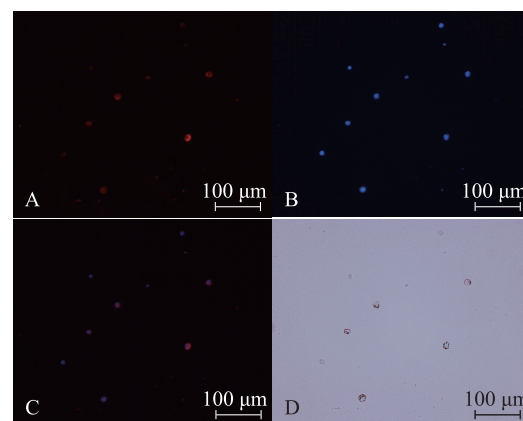
核为蓝色外,细胞膜周围呈红色荧光,而其他类型的细胞只有细胞核为蓝色,细胞膜周围无红色荧光。由此可见,分离出的细胞中存在一定比例的 PGCs。



箭头所示为阳性着色的 PGCs。

图 2 鹅胚原始生殖细胞的糖原染色

Fig.2 Periodic acid-schiff staining (PAS) of goose PGCs



A: 特异免疫荧光染色后 PGCs 呈红色荧光;B: Hoechst 33342 染色后 PGCs 呈蓝色荧光;C: B 与 A 的叠加图;D: 明场下 PGCs。

图 3 鹅胚原始生殖细胞的免疫荧光染色

Fig.3 The immunofluorescence staining of PGCs

### 2.3 注射白消安后鹅胚中 PGCs 的数量变化

将鹅胚随机分成 4 组,分别为对照组(未注射)、DMF-芝麻油对照组、白消安低浓度组(每 1 颗卵注射 150  $\mu\text{g}$ )与白消安高浓度组(每 1 颗卵注射 225  $\mu\text{g}$ )。在种蛋孵育之前进行注射,待鹅胚发育至第 8 d 时分离两侧生殖腺,统计生殖腺中 PGCs 的数量,统计结果如图 4 所示。2 个对照组之间差异不显著( $P>0.05$ ),说明 DMF-芝麻油作为白消安注射的辅佐剂不会对 PGCs 数目产生影响。处理组中低浓度白消安同高浓度白消安一样都能显著降低鹅胚中 PGCs 的数量( $P<0.05$ ),由对照组的单胚约 1 200 个 PGCs 降低到 80 个左右,表明白消安能有效降低鹅胚体内 PGCs 的数量。

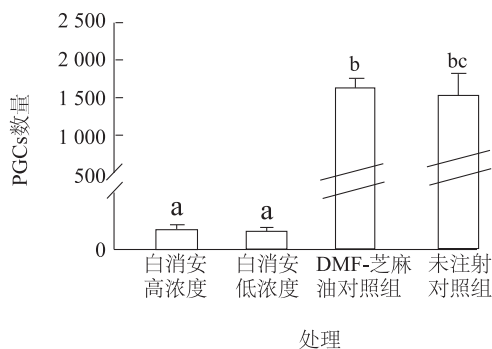


图 4 白消安处理鹅胚后 PGCs 数量的变化

Fig.4 Change of PGCs number in goose embryos treated with busulfan

## 3 讨论

本试验首次从鹅胚生殖腺中成功分离到 PGCs,并完成了鹅胚 PGCs 的鉴定。从形态上看,鹅 PGCs 与鸡 PGCs 相似,直径约 15~25  $\mu\text{m}$ ,比红细胞大 2 倍左右,细胞核为圆形、分布在稍偏中心位置,胞质一侧含有丰富的脂肪滴颗粒。经典的糖原染色法显示鹅生殖腺 PGCs 中含有丰富的糖原。已经证明 *Vasa* 基因是动物生殖细胞特有的,在鸡上也发现存在同源基因 *CVH*<sup>[8]</sup>,免疫荧光染色法显示本试验分离到的细胞亦存在 *Vasa* 基因,充分证明其为鹅 PGCs。

如何降低内源性 PGCs 是提高供体来源的生殖嵌合体效率的可靠途径<sup>[7]</sup>。研究结果表明降低内源性 PGCs 主要方法有手术切除法、射线照射法和

白消安处理法<sup>[5]</sup>。利用手术法可以移除囊胚层细胞或早期胚胎的血液<sup>[9-10]</sup>,能够降低胚胎内 PGCs,但易造成胚胎的发育畸形,而且该方法对无菌环境要求严格并需要熟练的操作。相比早期应用的紫外线和  $\gamma$ -射线<sup>[11-12]</sup>,近年来 X 射线应用较多。X 射线辐射在日本鹌鹑和鸡胚的研究结果表明,受 X 射线辐射的 PGCs 仍然能够迁移到受体胚胎的生殖嵴,说明 X 射线不能完全消除胚胎内的 PGCs<sup>[13-15]</sup>。另一方面,X 射线辐射系统需要特殊的仪器,一般实验室很难承受。第 3 种方法是利用白消安抑制 PGCs,因为操作简便、可重复性好,故近几年应用广泛。Song 等<sup>[6]</sup>比较了白消安悬浮液与白消安乳液消减鸡胚 PGCs 的效果,结果表明白消安溶解于 DMF 中再与芝麻油混合形成乳液效果要远远好于白消安悬浮液,供体来源的 PGCs 嵌合体比例与对照组相比提高了 8 倍。Nakamura 先后于 2008 年和 2010 年发表白消安致鸡胚不育的研究成果<sup>[7,16]</sup>,将白消安的注射方式进一步优化,即将溶解于 DMF 中的白消安与芝麻油等体积混合后利用特殊注射器进行乳化形成“油包水”稳定结构,保证了白消安在鸡胚发育过程中的持续作用,结果显示供体来源的 PGCs 生殖嵌合体比例提高了 28 倍。以上研究结果表明白消安在消减鸡胚 PGCs 方面有很好的效果,但由于白消安的不育作用在不同种类之间差异较大<sup>[7]</sup>,故有必要研究白消安在鹅胚上的表现效果。本研究结果显示,相比白消安在鸡胚的作用浓度,鹅只需要较低的浓度即可达到效果,可见鹅胚对于白消安要比鸡胚敏感。

由此可见,利用白消安消减受体 PGCs 具备便捷、可重复性好、可用物种多的优点,利用白消安不仅可以有效提高供体来源 PGCs 生殖嵌合体的比例,亦是提高转基因禽类阳性率的有效方法,更是实现利用 PGCs 保存禽类种质资源的关键环节。本试验验证白消安能有效降低鹅胚 PGCs 数量,拓宽了白消安的作用物种,为其今后更科学有效地应用于生物技术提供可靠依据。

### 参考文献:

- [1] 汤青萍,章双杰,郭 军,等.太湖鹅群体遗传多样性研究[J].家畜生态学报,2010,31(1):30-33.
- [2] 吴常信.畜禽遗传资源保存的理论与技术[J].家畜生态,2001,22(1):1-4.
- [3] NAKAMURA Y, TASAI M, TAKEDA K, et al. Production of

- functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the japanese quail [J]. *J Reprod Dev*, 2013, 59(6):580-587.
- [4] NAKAMURA Y, USUI F, MIYAHARA D, et al. 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) [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(8):1237-1246.
- [5] YAN L, GAO J S, RUI L, et al. A review of strategies for producing chimeric birds [J]. *Avian Biology Research*, 2014, 7(1):1-7.
- [6] SONG Y, D'COSTA S, PARDUE S L, et al. Production of germ-line chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70(4):438-444.
- [7] NAKAMURA Y, YAMAMOTO Y, USUI F, et al. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20(8):900-907.
- [8] TSUNEKAWA N, NAITO M, SAKAI Y, et al. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells [J]. *Development*, 2000, 127(12):2741-2750.
- [9] KAGAMI H, TAGAMI T, MATSUBARA Y, et al. 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 [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48(4):501-510.
- [10] NAITO M, TAJIMA A, YASUDA Y, et al. Production of germ line chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39(2):153-161.
- [11] THOMAS V, HEASMAN J, FORD C, et al. Further analysis of the effect of ultra-violet irradiation on the formation of the germ line in *Xenopus laevis* [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 76(29):67.
- [12] TREFIL P, POLAK J, POPLSTEIN M, et al. Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiation [J]. *Br Poult Sci*, 2003, 44(4):643-650.
- [13] LI HC, KAGAMI H, MATSUI K, et al. Restriction of proliferation of primordial germ cells by the irradiation of Japanese quail embryos with soft X-rays [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001, 130(1):133-140.
- [14] NAITO M, HARUMI T, MINEMATSU T, et al. Effect of soft X-ray irradiation on the migratory ability of primordial germ cells in chickens [J]. *Br Poult Sci*, 2007, 48(2):121-126.
- [15] NAKAMURA Y, USUI F, MIYAHARA D, et al. X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens [J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(4):432-437.
- [16] NAKAMURA Y, USUI F, ONO T, et al. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(1):130-137.

(责任编辑:陈海霞)