

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 5/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00803553.9

[45] 授权公告日 2008年5月7日

[11] 授权公告号 CN 100386429C

[22] 申请日 2000.2.11 [21] 申请号 00803553.9

[30] 优先权

[32] 1999.2.11 [33] KR [31] 1999/4860

[86] 国际申请 PCT/KR2000/000104 2000.2.11

[87] 国际公布 WO2000/047717 英 2000.8.17

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.8

[73] 专利权人 韩在容

地址 韩国京畿道

共同专利权人 韩美药品工业株式会社

[72] 发明人 韩在容 朴泰燮

[56] 参考文献

US5340740A 1994.8.23

WO9816630A 1998.4.23

审查员 邢云龙

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 胡交宇

权利要求书2页 说明书13页 附图5页

[54] 发明名称

鸟类多能胚胎生殖细胞系

[57] 摘要

本发明公开了一种制备已建立的鸟类胚胎生殖细胞系的方法，包括以下步骤：(a)在补加细胞生长因子和分化抑制因子的培养基中培养从鸟胚胎生殖腺分离出的原生殖细胞(PGC)，以获得EG细胞集落；(b)在与步骤(a)相同的培养基中，应用饲喂层培养EG细胞，直到EG细胞建群；和(c)提取并在与步骤(a)相同的培养基中传代培养EG细胞，以建立EG细胞系。

1. 一种制备确立的鸡胚胎生殖细胞系的方法，包括以下步骤：

(a) 用生殖脊基质细胞的饲喂层在补加细胞生长因子和分化抑制因子的培养基中将从处于 14 至 36 期的鸡胚胎生殖腺分离出的原生殖细胞培养足以获得胚胎生殖细胞集落的时间，其中所述细胞生长因子包含 0.05-500 ng/ml 干细胞因子、0.1-1000 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、0.0004-4 ng/ml 白介素-11、0.1-1000 ng/ml 胰岛素样生长因子-I，其中所述分化抑制因子是 0.1-1000 单位/ml 白血病抑制因子；

(b) 在与步骤 (a) 相同的培养基中，应用饲喂层培养胚胎生殖细胞，直到胚胎生殖细胞建群；和

(c) 回收并在与步骤 (a) 相同的培养基中传代培养胚胎生殖细胞，以便建立胚胎生殖细胞系。

2. 权利要求 1 的方法，其中鸡胚胎生殖腺处于 24 至 30 期。

3. 权利要求 1 的方法，其中培养基进一步含哺乳动物或家禽血清。

4. 权利要求 1 的方法，其中培养基进一步含有选自由丙酮酸钠、谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇和它们混合物组成的组的补加成分。

5. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)的饲喂层具有有丝分裂活性。

6. 权利要求 1 的方法，其中饲喂层是成纤维细胞。

7. 权利要求 6 的方法，其中成纤维细胞是家禽成纤维细胞或家禽胚胎成纤维细胞。

8. 一种制备体细胞或种系嵌合体的方法，包括将按照权利要求 1 的方法制备的鸡胚胎生殖细胞注射到受精卵中。

9. 权利要求 8 的方法，其中将胚胎生殖细胞注射到生殖腔或受精卵的血管中。

10. 权利要求 9 的方法，其中将胚胎生殖细胞注射到 X 期的受精卵的生殖腔中。

11. 权利要求 9 的方法，其中将胚胎生殖细胞注射到 13 至 17

期的受精卵的血管中。

## 鸟类多能胚胎生殖细胞系

### 发明领域

本发明涉及一种制备已建立的鸟类多能胚胎生殖细胞系的方法和一种鸟类多能胚胎生殖细胞系。

### 发明背景

胚胎干 (ES) 细胞系是从胚泡或桑葚胚中分离出来的未分化的多能细胞。虽然预期 ES 细胞将非常有用, 例如, 用于发育生物学的研究, 分析全能细胞的特征, 和基因-靶向以产生遗传修饰的家畜, 但是仅建立了具有已证实的种系传递的小鼠 ES 细胞 (Evans, M. J. 和 Kaufman, M. H., 自然, 292, 154-156 (1981); Bradley 等, 自然, 309, 255-256 (1984)), 由于在除小鼠之外的其它物种中种系传递的局限性, 使 ES 细胞用于生产家畜尚未得以实现 (First, N. L. 等, *Reprod. Feril. Dev.*, 6, 553-562 (1994); Wheeler, M. B., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 563-568 (1994); Giles, J. R. 等, *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 130-138 (1993); Doetschman, T. C. 等, *Dev. Biol.*, 127, 224-227 (1988))。

近来, 已经将原生殖细胞 (PGC), 性成熟后发育的精细胞或卵细胞的祖细胞, 作为多能干细胞的另一来源。来源于 PGC 的干细胞被称为胚胎生殖 (EG) 细胞 (Resnick, J. L. 等, 自然, 359, 550-551 (1992); Matsui, Y. 等, 细胞, 70, 841-847 (1992))。小鼠 PGC 已经成功地与有丝分裂激活的 STO 细胞在提供三种重要生长因子: 干细胞因子 (SCF)、白血病抑制因子 (LIF)、和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的条件下共培养 (Godin, J. R. 等, *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 130-138 (1991); Dolci, S. 等, 自然, 352, 809-811 (1991); Matsui, Y. 等, 自然, 353, 750-752 (1991); Resnick, J. L. 等, 自然, 359, 550-551 (1992))。Resnick 等报道, 小鼠 PGC 传代培养后持续增殖, 并形成类似 ES 细胞的细胞集落 (Resnick, J. L. 等, 自然,

359, 550-551 (1992))。Labosky 等证明鼠 EG 细胞系具有体内种系传递必需的多能性 (Labosky, P. A.等, *Development*, 120,3197-3204 (1994))。

牛和猪 EG 细胞存在某些特性, 例如形态学、碱性磷酸酶活性、和胚状体形成 (Cherny, R. A.等, *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 569-575 (1994); Shim, H.等, *Biol. Reprod.*, 57, 1189-1095 (1997); Piedrahita, J. A.等, *J. Reprod. Fertil.*, 52, 245-254 (1997))。然而, 在这些物种中还未证实种系传递。

Pain 等报道, 从长期培养的胚盘细胞得到具有多种形态发生潜能的鸟干细胞并在体外维持生长。然而, 以前未曾报道过在任何非-哺乳动物物种中从 PGC 产生多能 EG 细胞。

在鸟类物种中, PGC 首先发生于明区 (生殖细胞半月体) 的外胚层, 然后在第 4 期, 孵化后约 18-19 小时, 迁移到内胚层 (Swift, C. H., *Am. J. Anat.*, 15, 483-516 (1914); Hamburger, V.和 Hamilton, H. L., *J. Morphol.*, 88, 49-92(1951); Eyal-Giladi, H.和 Kochav, S., *Dev. Biol.*, 49, 321-337(1976))。在 10-12 期, PGC 从生殖细胞半月体移动到血流中 (Ando, Y.和 Fujimoto, T., *Dev. Growth Differ.*, 25, 345-32(1983); Ukeshima, A.等, *J. Electron. Microsc.*, 40, 124-128(1991)), 在血管系统中循环直到第 17 期 (孵化后 2.5 天), 此时它们到达生殖脊区, 最后它们在那里浓缩并建群 (Nieuwkoop, P. D.和 Sutasurya, L. A., *In Primordial Germ Cells in the chrodates*, 113-127 (1979))。该迁移途径和随后的发育过程与哺乳动物物种中相应过程完全不同。

Allioli 等报道从生殖腺分离出来的鸡 PGC 在体外培养条件下能够增殖几天 (Allioli, N.等, *Dev. Biol.*, 165,30-37(1994))。Chang 等将来自生殖腺的鸡 PGC 在生殖脊的基质细胞上培养了 5 天 (Chang, I.等, *Cell Biol. Int.*, 19, 569-676(1995))。当将这些培养的生殖腺 PGC 重新注射到受体胚胎中, 它们具有迁移到生殖脊的能力。最近, Chang 等通过注射体外培养 5 天的生殖腺 PGC 产生种系嵌合小鸡 (Chang, I.等, *Cell Biol. Int.*, 21, 495-499 (1997))。

另外, PCT 公开号 WO 99/06534 公开了一种建立 EG 细胞的方法, 该方法通过在补加 LIF、bFGF、SCF 和 IGF-I 而不应用饲喂层的培养基中培养从 13-14 期胚胎血流分离出的 PGC 实现。然而, 从胚胎可获得的

血流 PGC 的量,即约 100 个细胞/胚胎,远远低于 gPGC 的量,即超过 1000 个细胞/胚胎,这使得难以从胚胎血液中分离血液 PGC。而且,虽然培养 PGC 不应用饲喂层,但它们粘附到培养容器的壁上,仅传代 3-4 次后它们的形态即发生改变。因此,推测该方法建立的 EG 细胞可能已经分化。而且,仅考察了 EG 细胞的碱性磷酸酶活性,以证明其多能性,而没有考察它们的其它特性,因此,不能确定是否真正建立了 EG 细胞。另外,参考文献没有指教或预期 EG 细胞是否具有体外和体内分化能力,而该能力是一种已建立 EG 细胞的特性,而且也没有指教或预期它们在几次传代后是否连续增殖。

因此,一直需要建立一种连续多代传递外源基因的 EG 细胞系,由此能够利用外源基因转染和基因靶向生产转基因家畜。

#### 发明概述

因此,本发明的目的在于提供一种建立鸟类多能胚胎生殖(EG)细胞系的方法。

本发明的另一个目的在于提供一种鸟类多能胚胎生殖细胞系。

按照本发明的一个方面,提供了一种制备一种已建立的鸟胚胎生殖细胞系的方法,包括以下步骤:

(a) 在补加细胞生长因子和分化抑制因子的培养基中培养从鸟胚胎生殖腺分离出的原生殖细胞(PGC),以便获得 EG 细胞集落;

(b) 在与步骤(a)相同的培养基中,应用饲喂层培养 EG 细胞,直到 EG 细胞建群;和

(c) 提取并在与步骤(a)相同的培养基中传代培养 EG 细胞,以便建立 EG 细胞系。

按照本发明的另一方面,提供了一种具有基本上与保藏登记号为 KCLRF-BP-00026 的生物材料相同特征的鸡胚生殖细胞系。

#### 附图简述

本发明的上述和其它目的和特征将通过本发明的下列描述并结合附图变得更清楚,其中:

图 1a 和 1b 显示了鸡 EG 细胞集落在鸡胚成纤维细胞上 3 次传代后的形态学特征（图 1a：标尺，50  $\mu$  m；图 1b：标尺，25  $\mu$  m）；

图 2 显示了 4 次传代后形成的 EG 细胞集落的 PAS 反应性。

图 3 显示了 4 次传代后形成的 EG 细胞集落的抗-SSEA-1 抗体筛选结果；

图 4 显示了 8 次传代后染色的 EG 细胞集落的增殖分析结果；

图 5a 显示了鸡 EG 细胞在悬浮培养 8 天后形成的胚状体；图 5b 到 5d，分别显示了用抗肌动蛋白、 $\alpha$ -1-lectoprotein 和 S100 对胚状体进行免疫组织化学分析的结果；

图 6a 显示了具有黑羽毛的典型朝鲜 Ogol 小鸡；图 6b 显示了颈周和胸部具有白斑的体细胞嵌合小鸡；

图 7 显示了体细胞和种系嵌合型的 PCR 分析结果。

## 发明详述

本发明的建立鸟类胚胎生殖（EG）细胞系的方法从分离鸟类原生殖细胞（PGC）开始。鸟类可以是火鸡、小鸡、鹌鹑、雉、鸭子。PGC 可以从早期鸟类胚胎，即 14-36 期（孵化后 50 小时到 10 天），优选 24-30 期（孵化后 4-6.5 天）的胚胎生殖腺分离。例如，分离 28 期的白来杭鸡的胚胎生殖腺，然后在胰蛋白酶-EDTA 中解离生殖腺组织，得到含生殖腺原生殖细胞（gPGC）的悬浮液。然而，胚胎的发育期没有限制，除非它破坏了本发明目的，胚胎的发育期可以按照 PGC 从中分离的鸟类品种或器官、组织和膜种类改变。

分离的 PGC 在 37°C-42°C 温度范围内，在含 5% CO<sub>2</sub> 的大气条件下，在含细胞生长因子和分化抑制因子的培养基中培养，直到 EG 细胞建群。培养基优选 DMEM（Dulbecco's 改进的 Eagle's 培养基；Gibco BRL cat#, 10313-021）或其功能等同物。

用于本发明的细胞生长因子的实例包括干细胞因子（SCF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、白介素-11（IL-11），胰岛素样生长因子-I（IGF-I）和它们的混合物。代表性的分化抑制因子是白血病抑制因子（LIF）。培养基可以进一步含有哺乳动物血清、鸟类血清、或选自丙酮

酸钠、谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇和它们混合物的补加成分。

培养基优选补加 0.1-30%胎牛血清 (FBS)、0.02-20%小鸡血清、0.01-100 mM 丙酮酸钠、0.02-200 mM 谷氨酰胺、0.55-5500  $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇、0.05-500 ng/ml SCF、0.1-1000 单位/ml LIF、0.1-1000 ng/ml bFGF、0.0004-4 ng/ml IL-11 和 0.1-1000 ng/ml IGF-1 的 DMEM。

将在培养基上形成的 EG 细胞集落分离成单独 EG 细胞，例如，通过反复用吸管抽吸，提取 EG 细胞，悬浮于培养基，例如，上述培养基，然后在 37°C-42°C 下，在饲喂层上培养 7-10 天，直到表现 EG 细胞系形态学特征的细胞建群。作为饲喂层，可以使用鸟类胚胎成纤维细胞或其等同物，而有丝分裂活性的鸟类胚胎成纤维细胞 (CEF) 或鸟类成纤维细胞是最优选的。

得到的 EG 细胞以 7-10 天的间隔在与上面建立胚胎生殖细胞系同样的培养基中传代。由此建立的胚胎生殖细胞系通过反复传代培养可以维持 4 个月以上。

本发明还提供了一种利用本发明方法生产的鸡 EG 细胞系。

该鸡 EG 细胞系集落的形态是多层的，对该集落有清楚的描绘。每个鸡 EG 细胞由一个较大的细胞核和相对较小量的细胞质组成，类似于鼠和猪 ES 细胞和 EG 细胞的各自形态 (Wobus, A. M. 等, *Exp. Cell. Res.*, 152, 212-2199(1984); Matsui, Y. 等细胞, 70, 841-847 (1992); Resnick, J. L. 等, *自然*, 359, 550-551 (1992); Shim, H. 等, *Biol. Reprod.*, 57, 1089-1095(1997); Piedrahita, J. A. 等, *Biol. Reprod.*, 58,1321-1329(1998))。然而，鸡 EG 细胞的形态学与小鼠 EG 或 EG 细胞的形态学存在细微差异，即鸡 EG 细胞几乎所有集落都是圆形的，并且其它物种中观察到的显著暗核仁在鸡 EG 细胞中不能清楚地分辨。鸟类物种与哺乳动物物种在生殖细胞的生理、发育和分化上不同，因此，鸡 EG 细胞与小鼠 EG 细胞在形态、粘附特性、和其它特征方面存在差异。

鸡 EG 细胞保持生殖腺 PGC 和未分化干细胞的特征。鸡 EG 细胞表达 SSEA-1 抗原，在体外悬浮培养中成功地发育成胚状体，该胚状体又能分化成多种细胞形态。进一步确定鸡 EG 细胞增殖和分化成多种组织，包括在应用鸡的实验中的胚胎发育过程中的生殖腺，因此，它们在体内



是多能的。

本发明建立的一种鸡胚生殖细胞系按照布达佩斯条约关于国际认可的用于专利程序的微生物保藏规定于 1999 年 9 月 22 日保藏于韩国细胞系研究基金会 (KCLRF) (地址: 癌症研究所, 汉城国立大学医学院, #28, Yongon-dong, Dhongno-gu, 汉城, 110-744, 韩国), 保藏号为 KCLRF-BP-00026。

可以通过将 EG 细胞注射到卵细胞, 优选微量注射到生殖腔或其血管中制备体细胞或种系嵌合体。更优选, 可以将 EG 细胞微量注射到 X 期卵的生殖腔中, 或微量注射到 13-17 期卵的血管中。

可以将所需外源基因通过电穿孔或脂质体转染和导入本发明的鸡 EG 细胞, 可以将它们在含抗生素的培养基中传代培养筛选稳定转染的鸡 EG 细胞。

因此, 本发明的鸡 EG 细胞系对于制备转基因鸡以及对于研究生殖细胞分化和基因组印记是有用的。

下面实施例意在进一步说明本发明而不是限制其范围。

另外, 下面给出的固体在固体混合物中、液体在液体中、和固体在液体中的百分比分别基于 wt/wt, vol/vol 和 wt/vol, 除非另有具体说明。

## 实施例 1: PGC 的分离和用于制备鸡 EG 细胞系的培养条件的建立

### (步骤 1) PGC 的分离

从农业和生命科学院, 汉城国立大学得到的白来杭鸡的受精卵在 37.5 °C 和相对湿度 60-70% 条件下孵育 5.5 天 (直到 28 期)。从 28 期的受精卵提取胚胎, 用无镁的磷酸盐缓冲的生理盐水 (PBS) 在 100 mm 有盖培养皿中清洗, 以除去卵黄和血液。将胚胎转移到涂布黑蜡的培养皿中, 用镊子从中分离胚胎生殖腺。生殖腺组织用 0.25% 胰蛋白酶-0.05% EDTA 处理, 使其解离成单独的生殖腺原生殖细胞 (gPGC)。将其加入含有 10% FBS (胎牛血清, Gibco, USA) 的 DMEM (Dulbecco's 改进的 Eagle's 培养基, Gibco BRL, USA) 中, 以使胰蛋白酶-EDTA 灭活, 离心收获 gPGC。

## （步骤2）培养条件的建立

EG（胚胎生殖）细胞培养基（即，DMEM）附加一种或多种选自干细胞因子（SCF）、白血病抑制因子（LIF）、和碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）的生长因子。曾报道 SCF、LIF、和 bFGF 是使 PGC 在小鼠中存活和增殖的重要生长因子（Resnick, J. L.等, 自然, 359, 550-551 (1992); Donovan, P. J., Curr. Top. Dev. Biol., 29, 189-225 (1994)）。除了这三种因子，还向培养基中加入生长相关因子例如白介素-11（IL-11）和胰岛素样生长因子-I（IGF-1）。将步骤1中得到的 gPGC 悬浮于附加上述因子的多种混合物的培养基中，在 37°C，含 5% CO<sub>2</sub> 的大气条件下培养，直到 EG 细胞建群。

实验显示，缺乏 IL-11 和 IGF-1 时，EG 细胞不会建群。因此，IL-11 和 IGF-I 对于鸡 EG 细胞的存活和增殖是关键。

## 实施例 2：鸡 EG 细胞的培养

将实施例 1 得到的 EG 细胞接种于装有由 DMEM（Gibco, USA）附加 10% FBS、2% 鸡血清（Gibco, USA）、1 mM 丙酮酸钠、2 mM L-谷氨酰胺、 $5.5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -巯基乙醇、100  $\mu$ g/ml 链霉素、100 单位/ml 青霉素、5 ng/ml 人干细胞因子（hSCF; Sigma, USA）、10 单位/ml 鼠白血病抑制因子（mLIF; Sigma, USA）、10 ng/ml 牛碱性成纤维细胞生长因子（bFGF; Sigma, USA）、0.04 ng/ml 人白介素-11（h-IL-11; Sigma, USA）、和 10 ng/ml 人胰岛素样-生长因子-I（IGF-I; Sigma, USA）组成的 EG 细胞培养基的 24 孔培养板中，在 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 大气的培养箱中培养 7-10 天，以制备沉积在生殖脊基质细胞（GRSC）层上的 EG 细胞集落。用吸管轻柔抽吸从 GRSC 层分离鸡 EG 细胞集落，200 X g 离心 5 分钟收获。收获的 EG 细胞悬浮于 DMEM，然后与未有丝分裂静止的鸡胚胎成纤维细胞（CEFs）一起分置于新鲜 24-孔平板。在上述条件下，以 7-10 天的间隔传代 EG 细胞集落。这些集落维持 10 代以上，反复继代培养增殖 4 个月以上。

图 1a 和 1b 显示在鸡胚胎成纤维细胞（CEF）上的 3 代后的鸡 EG 细胞集落（图 1a：标尺，50  $\mu$ m；图 1b：标尺，25  $\mu$ m）。鸡 EG 细胞的形态于小鼠 ES 活 EG 细胞的形态略有不同。几乎所有鸡 EG 细胞集落均为

圆形，与 CEF 饲养层没有牢固边界。与小鼠 ES 或 EG 细胞比较而言，鸡 EG 细胞不会紧密地堆积到一起；因此不难分辨个体成员细胞。集落的形态是多层的，其边界轮廓清晰。鸡 EG 细胞有一个较大的细胞核和相对少量细胞质组成，但其核仁不显著。

### 实施例 3: EG 细胞的特征

为了确定 EG 细胞的多能性是否具有多能细胞的特征性质，考察了其是否存在糖原和 SSEA-1 表位，以及其碱性磷酸酶活性和体外增殖和分化的能力。

#### (1) 高碘酸希夫 (PAS) 染色

实施例 2 得到的 4 代后的 EG 细胞集落置于平板上在 1%戊二醛溶液中固定 5 分钟，用等体积磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 漂洗两次。将 EG 细胞集落浸泡于高碘酸溶液 (Sigma, USA) 室温保持 5 分钟，然后用等体积 PBS 漂洗。然后将 EG 细胞集落浸泡于希夫溶液 (Sigma, USA) 室温保持 15 分钟，然后用等体积 PBS 漂洗两次。在倒置显微镜下观察得到的 EG 细胞集落。通过对细胞质中糖原染色的 PAS 反应可以容易地鉴定鸡 PGC (Meyer, D. B., *Dve. Biol.*, 10, 154-190(1964))。如图 2 所示，4 代后的 EG 细胞可以被 PAS 染色，虽然染色相对较弱。

#### (2) 抗-SSEA-1 抗体的筛选

SSEA-1 表位是未分化鼠 ES 细胞的特征，其已被认为是区别多能干细胞的标准 (Solter, D.等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 5565-5596 (1978))。为了确定 EG 细胞的多能性是否具有多能细胞的特性，考察了 EG 细胞是否存在 SSEA-1 表位。

将实施例 2 得到的 4 代后的 EG 细胞集落在 1%戊二醛溶液中 5 分钟固定于平板上，用等体积 PBS 漂洗两次。从 Development Studies Hybridoma Bank (开发研究杂交瘤库)，Iowa 大学，USA 购买抗-SSEA-1 单克隆抗体的腹水 (MC-480; Solter, D.等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 5565-5596 (1978))，用 PBS 稀释 1000 倍，加入 EG 细胞集落。将得到的 EG 细胞集落与抗生物素蛋白/生物素-结合的碱性磷酸酶 (Vector Lab., USA) 反应，然后与 BCIP/NBT 碱性磷酸酶底物 (BCIP/NBT 碱性磷酸酶底物试剂盒

IV, Vector Lab., USA) 反应。向其中加入 10 mM EDTA (pH 8.0) 终止反应。

如图 3 所示, 所有 4 代后的 EG 细胞对 SSEA-1 染色均为阳性, 表明鸡 EG 细胞表达了 SSEA-1 表位。

### (3) 增殖分析

实施例 2 得到的 8 代后的 EG 细胞集落在含溴脱氧尿苷 (BrdU, 一种腺苷类似物) 的溶液中, 在 37°C 保持 1 小时, 用等体积 PBS 漂洗两次。用细胞增殖分析试剂盒 (Amersham, UK) 染色得到的 EG 细胞集落, 然后用 PAS 重复 (1) 的程序进行复染。应用任意抗-BrdU 的单克隆抗体和过氧化酶/DAB 系统 (Amersham, UK) 检测含有合并的 BrdU 的 EG 细胞集落。

图 4 显示了 8 代后染色的 EG 细胞集落的增殖分析结果。如图 4 所示, 8 代后的 EG 细胞是连续增殖的。

### (4) 碱性磷酸酶活性分析

应用碱性磷酸酶底物试剂盒 IV (Vector Lab., USA) 测定实施例 2 得到的 4 代后的 EG 细胞集落的碱性磷酸酶活性。

结果表明 EG 细胞几乎没有碱性磷酸酶活性, 在继代培养中也没有恢复该活性。

按照 Swartz, W. J., Anat. Rec., 202, 379-385(1982), 鸟类 PGC 的碱性磷酸酶活性早在孵化后 2 天可以观察到, 但在 PGC 进入生殖脊后就观察不到了, 这可能意味着生殖腺 PGC 以及从其传代得到的 EG 细胞的碱性磷酸酶活性实际上已经非常弱。

### (5) 体外分化盒免疫组织化学分析

为了考察鸡 EG 细胞是否会形成胚状体, 轻柔搅动实施例 2 得到的 4 代后的 EG 细胞集落, 并离心得到彼此分离的 EG 细胞。将 EG 细胞悬浮于无 mLIF 的 EG 细胞培养基, 然后置于非粘附性细菌学培养皿。每隔 8 天更换培养基一次, 每天监测细胞的形态。

图 5a 显示悬浮培养 8 天后由鸡 EG 细胞形成的胚状体。

收集由此形成的胚状体, 然后分散于 96-孔平板, 进一步粘附于其上并分化。应用抗肌-特异性肌动蛋白的抗体 (Dako, USA)、内胚层-特异

性  $\alpha$ -1-lectoprotein (Dako, USA) 和外胚层-特异性 S100 (Dako, USA), 以及 DAKO LSAB 试剂盒和抗生物素蛋白/生物素-结合的过氧化酶系统 (Dako, USA) 对得到的细胞进行免疫组织化学分析。

图 5b 到 5d 图示说明了分别应用抗肌动蛋白、 $\alpha$ -1-lectoprotein 和 S100 的抗体对胚状体进行的免疫组织化学分析结果。如图 5b 到 5d 所示, EG 细胞能够在体外分化成多种细胞类型, 例如, 内胚层、中胚层和外胚层谱系。

#### 实施例 4: 嵌合鸡的制备

用 X 期或 13-17 期的朝鲜 Ogol 鸡胚胎 (Eyal- Giladi, H.等, Dev Biol, 49, 321-337(1976)) 作为受体。在各朝鲜 Ogol 鸡蛋的侧面或尖端穿刺, 形成一个小窗, 然后取出壳膜。

将实施例 2 得到的 3 或 4 代后的 EG 细胞以  $10^3$  个细胞/ $\mu$ l 的浓度悬浮于 EG 细胞培养基, 然后用微量移液管将  $2\mu$ l 悬浮液注射到鸡蛋的生殖腔或血管中。注射 CEF 的鸡蛋用作对照。各鸡蛋的窗口用石蜡膜封两次, 然后, 将鸡蛋尖端朝下放置直到孵化。孵化的鸡生长 3 个月, 得到体细胞嵌合鸡。

对于胚胎操作的 45 个蛋, 8 个蛋被孵化, 在这 8 只鸡中, 3 只 (37.5%) 在外形上是嵌合的。在嵌合鸡中, 注射 3 代 EG 细胞的胚胎孵化出两只白色斑点鸡, 注射 4 代的 EG 细胞的胚胎孵化出一只。3 只鸡的白斑范围变化很大。对照鸡没有观察到白色羽毛。

图 6a 显示了一对具有黑色羽毛的典型朝鲜 Ogol 鸡; 图 6b 为颈周和胸部具有白斑的体细胞嵌合鸡。白来杭鸡的毛色是白色, 因其显性色素抑制基因 (I/I), 朝鲜 Ogol 鸡, 由于其隐性色素基因为黑色。因此, 上述结果表明白来杭鸡的 EG 细胞能够在受体朝鲜 Ogol 鸡胚胎中在体内分化, 因此, EG 细胞在体内是多能的。为了验证鸡的体细胞嵌合型, 从孵化过程中死亡的 5 只鸡的肌肉、心脏、肝脏和生殖腺利用酚抽提得到基因组 DNA 样品, 然后用具有 SEQ ID NO: 1 (正向引物) 和 SEQ ID NO: 2 (反向引物) 核苷酸序列的白来杭鸡-特异性 SCAR (序列特征性扩增区) 引物进行 PCR 分析。

用 50-100 ng 基因组 DNA、0.2 mM 各种 dNTP、10 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.4 pmol 正向引物、0.4 pmol 反向引物和 1 单位 Taq 聚合酶的 25 μl 溶液进行 PCR 反应。PCR 程序为在 DNA 热循环仪 (Perkin Elmer Cetus) 中 94°C 变性 1 分钟, 60°C 退火 1 分钟和 72°C 延伸 2 分钟, 循环 45 次。产生的白来杭鸡特异性 DNA 片段约 3 kb。图 7 描绘了体细胞嵌合型的 PCR 分析结果: 泳道 1、5、9、13 和 17 为应用肝 DNA 的 PCR 产物; 泳道 2、6、10、14 和 18 为肌 DNA; 泳道 3、7、11、15 和 19 为心 DNA; 泳道 4、8、12、16 和 20 为生殖腺 DNA; 泳道 21 为朝鲜 Ogo1 鸡基因组 DNA; 泳道 22 为白来杭鸡基因组 DNA; 泳道 23 无模板。如图 7 所示, 体细胞嵌合型在个体之间不同: 5 只鸡之一在所有组织样品 (肝脏、心脏、肌肉、和生殖腺) 表现体细胞嵌合型。注射的 EG 细胞形成两只孵化鸡的生殖腺, 和所有鸡的心脏; 两只鸡仅在心脏中表现体细胞嵌合型。这些结果显示鸡 EG 细胞可以在体内分化并形成各种组织包括生殖腺。

#### 实施例 5: 外源基因转染 PGC 或 EG 细胞, 及其筛选

分别应用电穿孔和脂质体将报告基因 (GFP 或 Lac Z) 转染到 PGC 或 EG 细胞中。应用电穿孔基因的转染效率约为 80%, 应用脂质体为 30%。转染后的 PGC 或 EG 细胞在含 350 μg/ml 新霉素的 DMEM 培养基中传代, 以筛选稳定转染的 PGC 或 EG 细胞。

虽然本发明就上面具体实施方式进行了描述, 应当认识到本领域技术人员可以对本发明进行各种修饰和改动, 它们也落在所附权利要求限定的本发明的范围内。

## 微生物国际保藏证明（译文）

保藏人	韩在容
地址	Dongbo APT 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-City, Kyonggi-do 449-840, 韩国
保藏日	1999年9月22日
保藏号	KCLRF-BP-00026
微生物分类命名	CEG（鸡胚生殖细胞系）
国际保藏单位名称	韩国细胞系研究基金会
国际保藏单位地址	汉城国立大学医学院癌症研究所, 28 Yongon-dong, Chongno-Gu, 汉城, 110-744, 韩国

## 序列表

<110> 韩在容

韩美药品工业株式会社

朴泰燮

<120> 鸟类多能胚胎生殖细胞系

<130> PC91143/HMY

<150> KR 1999-4860

<151> 1999-02-11

<160> 2

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 白来杭鸡特异性 SCAR 引物(正向引物)

<400> 1

aacgcgtaga gttgcaggga tcag

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 白来杭鸡特异性 SCAR 引物(反向引物)

<400> 2

aacgcgtaga tattcgagta cctt



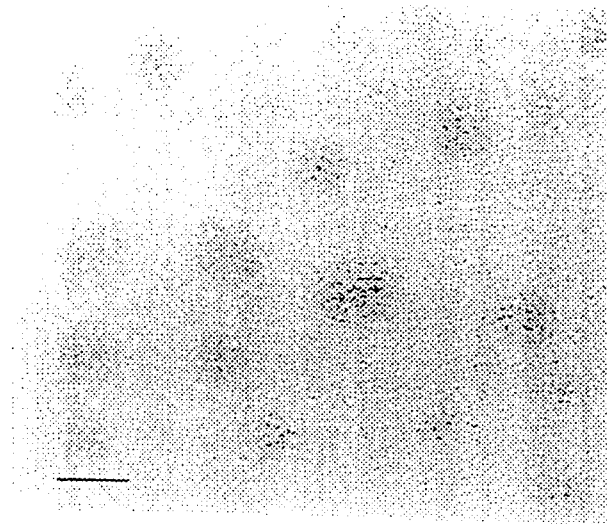


图 1a

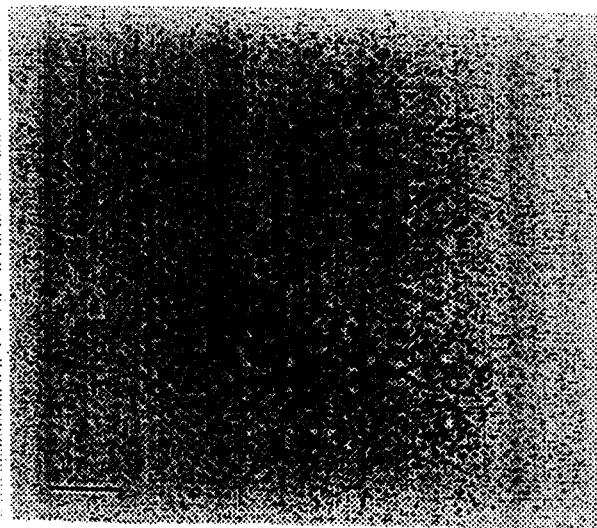


图 1b

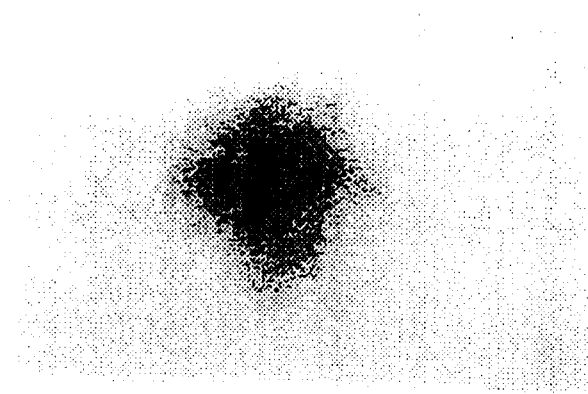


图 2

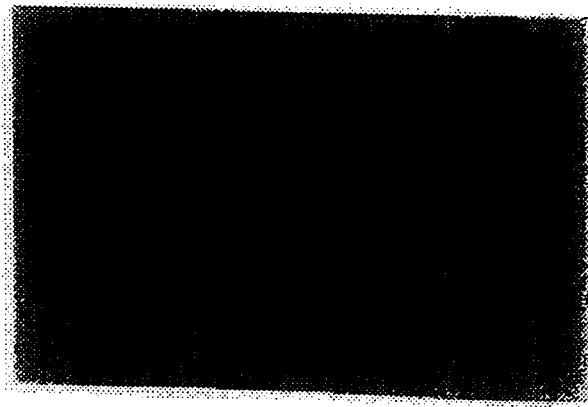


图 3

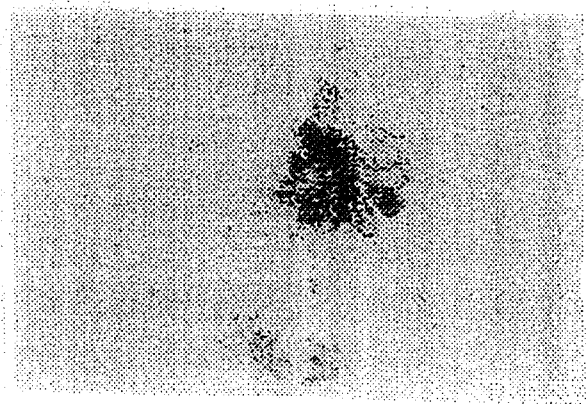


图 4

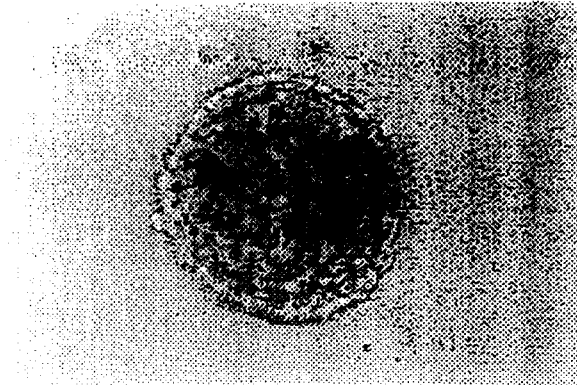


图 5a



图 5b



图 5c

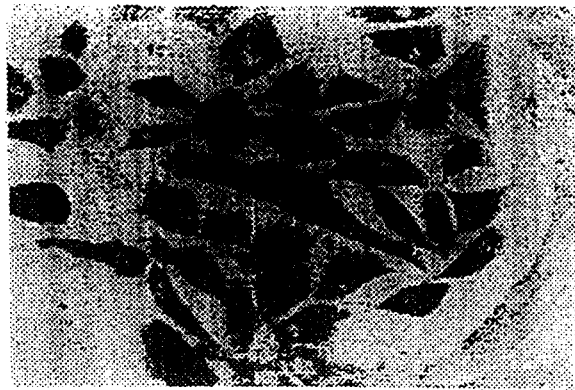


图 5d



图 6a



图 6b

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 M



图 7