中国科学 C 辑:生命科学 2008 年 第 38 卷 第 7 期: 626 ~ 634
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

体内外精原干细胞介导大群生产转基因鸡

李碧春, 孙国波, 孙怀昌, 徐琪, 高波, 周冠月, 赵文明, 吴信生, 包文斌, 余飞, 陈国宏*

扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009

* 联系人, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-06; 接受日期: 2007-12-21

国家自然科学基金(批准号: 30671509) 和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20061117004)资助项目

摘要 本研究以重组的绿色荧光蛋白基因为标记, 采用公鸡睾丸内转染精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)和体外转染 SSCs 再移植的方法, 探索家禽转基因新方法. 同时比较了公鸡接受不同剂量外源基因的转基因效率. 结果显示: (i) 接受外源基因剂量分别为 50, 100, 150 和 200 μg/mL 时, 48 h 后睾丸细胞显示绿色荧光的比率分别为 4.0%, 8.7% , 10.2% 和 13.6% , 差异显著(P<0.05). 睾丸内注射外源基因第 25 天后, 随着时间的增长, 精子表达绿色荧光的百分率逐渐提高, 到第 70 天后表达率达到高峰, 且趋于稳定, 4 个剂量组分别为 12.7%, 12.8%, 15.9%和 19.1%. 差异显著(P<0.05); (ii) 第 70 天的睾丸冰冻切片观察, 曲精细管周边均有荧光表达; (iii) F_1 代中, 56.2% (254/452)的胚盘表达绿色荧光. 活鸡血样 PCR 检测 56.5% (13/23)为阳性, Southern blot 检测证明外源基因已整合到鸡基因组; F_2 代中, 53.2% (275/517)的胚盘表达绿色荧光. 活鸡血样 PCR 检测 52.9% (9/17)为阳性; (iv) F_1 代和 F_2 代鸡心、肝、肾和肌肉等组织冰冻切片观察和 PCR 检测, 绿色荧光阳性率在 50.0%~66.7%之间; (v) 体外 SSCs 转染外源基因后移植, 可在受体公鸡睾丸中生长发育, 正常产生精子. 后代中, 12.5% (8/64)的胚盘表达绿色荧光, 活鸡血样 PCR 检测 11.1% (2/18)为阳性. 结果证明精原干细胞介导转基因是一种简单、高效、可大群体生产转基因鸡的有效途径.

关键词
鸡(*Gallus gallus*)
精原干细胞
绿色荧光蛋白基因
生物反应器

转基因鸡作为药物蛋白生产的生物反应器, 其以成本低, 繁殖速度快而优于哺乳动物. 亦吸引着生物制药业和科研人员的极大关注. 因而科学家们一直在探索家禽转基因的有效方法. 目前, 生产转基因鸡大多采用重组病毒感染和重组载体转染受精单细胞胚胎、囊胚期胚胎、原始生殖细胞(PGC)和精子以及显微注射法、胚胎干细胞转染等方法. 但是, 由于雌性家禽特殊的生理生殖特点, 这些方法普遍存在效率低(3%～10%), 不能大批量生产的缺点, 使得转基因鸡的应用几乎停滞不前. Brinster 等人[1]提出了精原干细胞是一种比精子携带外源DNA更为理想的载体的新思路. 因为精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs) 是动物成体睾丸生精上皮内唯一可复制的多潜能二倍体细胞, 它能在体外分离纯化、培养、冻存及同体或异体移植[2~7]. Kim等人[8]用显微注射针将脂质体/*Lac Z*基因复合物注射进小鼠和猪的曲细精管内. PCR检测, 小鼠和猪曲细精管内分别有 8.0%～14.8%和 15.3%～25.1%的生殖细胞表达*Lac Z*基因. Yama-

zaki等人[9]的实验也得到同样的结果. Shinohara等人[10]用显微注射法将逆转录病毒注入未成熟小鼠曲细精管内转染SSCs, 转染的雄性小鼠与雌性小鼠交配后产生的后代, 其阳性率达 2.8%, 且外源基因可稳定地在子代中表达. 此后, 用该方法产生的转基因小鼠、山羊和兔等相继有了报道[11~14]. 但是用精原干细胞介导制备转基因家禽的研究尚未见报道. 此外, 人们还设想如能在精原干细胞移植前进行基因转染, 对研究精子发生过程中某一特定基因的作用及生产转基因动物可能是更可行的途径. 然而, 迄 今为止相关报道甚少, 为此本研究目的在于对鸡体内、外精原干细胞分离和转基因的探索, 寻找一种简单、高效、可大批量生产转基因鸡的新方法.

1 材料和方法

1.1 实验动物

取 18~19 周龄体重相近、健康青年公鸡作为实验鸡, 来自中国农业科学院家禽研究所实验禽场苏禽 96 鸡群.

1.2 pEGFP-N1 质粒的准备

表达绿色荧光蛋白的报告基因 pEGFP-N1 质粒由扬州大学兽医学院孙怀昌老师惠赠(启动子为 CMV, 结构基因为 *EGFP*), pEGFP-N1 转染空白感受态菌种 DH5α, 铺板, 用卡那霉素筛选后, 挑取阳性克隆, 大量培养, 抽提纯化质粒, 然后用无菌 TE(10 mmol/ L , 0. 1 mmol/ L EDTA , pH 7. 5) 溶解, 检测质粒浓度, 置于–20℃备用.

实验前, 应用 *Apa*L Ⅰ限制性核酸内切酶 37℃进行单酶切, 使质粒线性化. 纯化后待注射.

1.3 实验方法

(1) 外源基因-脂质体混合液的制备. 用梭华-Sofast^{TM} 阳离子聚合物(厦门太阳马生物工程有限公司)作为转染液, 按 8 μL 梭华-Sofast^{TM}转染液与 50 μg DNA 的比例配制脂质体/ DNA 复合物. 制备过程: A 液: 取 80 μg DNA(800 ng/μL)线性质粒 100 μL 稀释于 200 μL 的 5% 葡萄糖溶液, 轻轻混匀; B 液: 13μL 梭华-Sofast^{TM} 转染液稀释于 487 μL 的 5% 葡萄糖溶液(DNA∶转染液=50 μg∶8 μL), 轻轻混匀; 将上述配制的 B 液滴加到 A 液中, 一边滴加一边混匀, 确定 DNA 终浓度为 100 μg/mL, 混合液在室温孵育 15 min 后, 吸入 2.5 mL 注射器(5 号针头)中待用.

同理, 按比例可配制 DNA 终浓度为 50, 150 和 200 μg/mL 混合液, 供实验需要.

(2) 睾丸内直接注射 pEGFP-N1. 27 只公鸡, 分为 5 组, 按照注射剂量 50, 100, 150 和 200 μg/mL 分为 4 组, 每组 6 只, 对照组 3 只. 速眠新Ⅱ(军事医学科学院军事兽医研究所)全身麻醉剂, 按 0.2 mL/kg 体重肌肉注射公鸡, 麻醉后, 右侧肋骨处开 2~3 cm 切口, 暴露两侧睾丸, 分别随机点注射转染液, 每侧睾丸注射 4~5 点, 注射约 0.5 mL 的转染混合液. 缝合创口, 注射破伤风一次及青、链霉素一周, 以防感染.

(3) 转染公鸡日常活动观察和鸡精子常规检测. 转染手术后观察公鸡的采食、饮水、打鸣、求偶行为等日常活动与对照组公鸡进行比较. 人工采集精液, 检测排精量、精子密度(亿/mL)、精子活率、外观、黏稠度等.

(4) 转染公鸡转基因表达检测. 体内、外转染手术后 48 h采集公鸡一侧睾丸, 剥去白膜, 在PBS中洗涤 4~5 次, 经二酶三步法[15]消化取睾丸细胞进行涂片, 检测睾丸细胞转染情况.

体内、外转染手术后, 第 25 天开始, 每间隔 7～10 天检测一次, 分别采集精液, 进行常规精子检测, 可见光下, 白细胞计数板计录精子总数, 荧光显微镜下观察记录表达阳性精子数. 同时提取精子中 DNA 进行 PCR 和 Southern blot 检测.

手术后 70 天, 获取睾丸, 冰冻切片, 荧光显微镜下观察转染情况.

(5) 繁殖后代鸡转基因检测. 70 天后, 采集当代转染公鸡的精液与正常健康的母鸡进行人工授精, 产生 F_1 代, 对其胚盘细胞、不同孵化日龄胚胎的原始生殖细胞和 10 天胚龄成纤维细胞在荧光显微镜下观察荧光表达情况. F_1 代鸡达性成熟时, 采集阳性公鸡的精液与正常健康的母鸡进行人工授精, 产生 F_2 代. 转染公鸡睾丸组织和 F_1代、F_2 代鸡胚肝脏、肾脏、肌肉、心脏等组织样本, 冰冻切片, 荧光显微镜下检测各组织 *EGFP* 基因表达情况. 同时提取后代组织中 DNA, 进行 PCR 检测.

(6) 转染率的计算. 精液或者细胞涂片表达效率

计算按照下述方法: 选分散较好的 10 个视野, 先在可见光下, 计数细胞总数, 在对应的荧光下, 计数发绿色荧光的细胞数. 转染率计算公式如下:

转染率=发出荧光的精子或者细胞数/可见光下细胞总数×100%.

(7) PCR 检测. 提取 F_1 代、F_2 代鸡胚各组织 DNA 及其血样 DNA, 公鸡精液进行 PCR 检测. 上游引物序列为: 5′-CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG-3′(724~745 bp), 下游引物序列为: 5′-CACGAACTCCAGCAGGACCATG-3′(1332~1351 bp). PCR 参数为: 10×buffer2.5 μL, dNTP2 μL, Taq0.2 μL, 模板 1μL(10 pmol/μL), 上游引物和下游引物各 1 μL(10 pmol/μL), 加无菌双蒸水补充到 25 μL. PCR 条件为 94℃, 预变性 4 min, 进入循环: 94℃变性 35 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 共 30 个循环, 72℃延伸 10 min. PCR 产物长度为 628 bp, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳.

(8) Southern blot 检测. 提取转染后的当代公鸡精子 DNA、F_1 代鸡胚和血样 DNA, 进行 Southern blot 检测. 电泳结束后, 凝胶用 ddH_2O 淋洗后, 转入变性液(0.5 mol/L NaOH, 0.15 mol/L NaCl)置于摇床上浸泡 30 min, 再转入中和液(0.15 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris-HCl, pH 7.2)中 15 min, 重复中和步骤一次, 阳离子尼龙膜, 转膜 16～24 h, 滤纸吸干后 120℃烘烤 30 min 双链 DNA 于尼龙膜上. 42℃水浴预杂交 30 min. 杂交: 将 DIG 标记的探针稀释到 25 ng/mL 使用, 置水浴中煮沸加热 10 min 后速放冰浴中 10 min. 变性后的探针加入到 20 mL 的杂交液中, 42℃杂交过夜. 免疫学检测, Blocking solution 封闭 30 min; 抗体孵育 30 min, 加入 ECL 化学发光底物; X 光片显影、定影、洗片.

(9) 鸡胚SSCs的分离纯化和培养. SSCs分离、纯化和培养参见文献[15].

(10) 鸡胚 SSCs 的鉴定. (i) 油红 O 染色鉴定(逆向鉴定 SSCs): 取少许新鲜提取的细胞用 70% 酒精固定 15 min, 滴片自然晾干, 油红 O 染液作用 15 min, 水洗, 苏木精复染 30 s, 水洗, 滴片晾干, 镜检, 油红 O 染色, 支持细胞质中因含较多的脂滴, 所以被染后呈红色, 精原干细胞质中脂滴较少油红 O 染色后着色较浅或不着色, 经苏木精复染之后, 支持细胞整个着色, 精原干细胞只有细胞核着色; (ii) AKP 染色鉴定: 将培养 5 天的 SSCs 集落, PBS 清洗 3 遍, 2.5% 戊二醛固定(4℃冰箱保存), 30 min, 染色液(Fast Blue B 盐 5 mg, 双蒸水 0.08 mL, 36%HCl 0.04 mL, 4% $NaNO_2$ 0.1 mL, 萘酚 ASTR Na_4PO_4 10 mg, DMSO 0.5 mL, pH 8.6 的 PBS 5 mL, 10%$MgCl_2$ 0.05 mL, 以 1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 8.4, 现用现配)作用 20 min, 双蒸水洗 3 遍, 甘油 PBS 封片, 阳性红棕色为精原干细胞集落; (iii) 阶段特异性表面抗原(SSEA-1)免疫荧光鉴定: 取第 2 代生长良好的鸡胚胎精原干细胞克隆进行 SSEA-1 免疫荧光检测. 用冷丙酮和无水乙醇(3∶2)作用 30 min 以上, PBS 漂洗 3 次, 用含 0.5%~1% 的 BSA 或含 10% FCS 的 PBS 封闭 2 h, PBS 漂洗后, 加入 SSEA-1 抗体稀释液, 37℃水浴 1 h, 反复漂洗 3 次, 每次 5 min 以上, 再加入 FITC 标记的山羊抗鼠的二抗, 37℃水浴 45 min, PBS 漂洗. 每孔加一滴 60% 甘油后在荧光显微镜下(激发光 490 nm)观察.

(11) 内源性SSCs消除方法根据Nagano等人[5]的方法, 取公鸡 18 只, 其中 15 只为实验组, 将 2% 的白消安(Busulfan, 二甲磺酸丁酯, 一种抑制细胞增殖的抗肿瘤药, Sigma 公司)溶液, 按 35 mg/kg剂量腹腔注射白消安进行腹腔注射, 3 只为对照组, 常温下饲养并定期检测公鸡消除内源性精原干细胞的情况. 饲养至少 4 周后, 存活公鸡睾丸生精功能被破坏, 作为受体鸡进行精原干细胞移植.

(12) 体外 SSCs 转染和移植方法. 体外培养 SSCs, 待第 2 代 SSCs 细胞生长至指数生长期(5 天左右), 用 EDTA-胰酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μL Eppendorf 电穿孔缓冲液悬浮细胞, 计数板计数, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL. 用优化的电穿孔转染法转染细胞: 吸取 400 μL 细胞, 小心加入体积为电极杯 (Eppendorf, 2mm, Germany) 中. 分别取质粒 pEGFP-N1(2 ~8 μg)和 5 μL 的 DMSO 也加入电极杯中, 混合均匀. 将电极杯装入电极槽内, 静置 1 min, 在电压为 270 V 条件下作用 80 μs 进行电穿孔转染. 操作完毕后, 将含有细胞的电极杯室温下放置 10 min, 然后小心将细胞转移至明胶包被的 24 孔板中(每孔 1×10^5 个细胞), 置 CO_2 培养箱中培养 1 天, 无需筛选, 取约 50 μL 用于计算转染率, 其余部分直接用

于移植(SSCs 细胞浓度为 10^6 个/mL 以上).

白消安处理消除内源性生精细胞后的公鸡, 经麻醉, 手术法移植 SSCs, 方法同(2)小节.

1.4 统计方法

SPSS 11.5 统计软件, *t* 检验进行显著性分析, 结果以平均值±标准误表示.

1.5 两个新验证实验

为了检测该方法的可靠性和广泛应用性, 本研究又设计了两个验证实验: (i) 用相同的报告基因在家鸭上进行重复实验; (ii) 转染功能基因—人组织激肽释放蛋白酶基因, 观察生产转基因鸡的稳定性.

2 结果

2.1 转染公鸡精子常规检测结果

手术后观察实验公鸡的采食、饮水、打鸣、求偶行为等日常活动, 以及排精量、精子密度、精子活率、颜色、精液黏稠度等常规指标, 与正常公鸡比较无差异. 说明转染外源基因后公鸡的生殖功能正常.

2.2 转染公鸡精子表达荧光蛋白结果

睾丸内注射后 48 h, 取 200 μg/μL 剂量组 3 只公鸡一侧睾丸, 酶消化分离细胞, 涂片观察, 睾丸细胞中有绿色荧光蛋白表达. 手术后 70 天的睾丸冰冻切片观察, 可见表达荧光的细胞均匀地分布在曲精细管周壁内(图 1, 2), 对照正常睾丸组织切片, 曲精细管周壁内分布的精原干细胞(图 3).

睾丸内注射后, 不同时期检测精子表达绿色荧光蛋白结果见表 1. 由表 1 可知, 注射后 25 天, 不同剂量组之间绿色荧光蛋白的表达率差异均不显著(P>0.05), 均小于 2.5%; 注射 32 天后不同的检测时期, 50 μg/mL 剂量组与其他 3 剂量组之间基因表达率均有显著差异(P <0.05), 100 μg/mL 剂量组与 150, 200 μg/mL 剂量组之间亦有显著差异(P <0.05); 200 μg/mL 剂量组在各个时期的表达率均为最佳(图 4~6). 正常对照组精子图片见图 7.

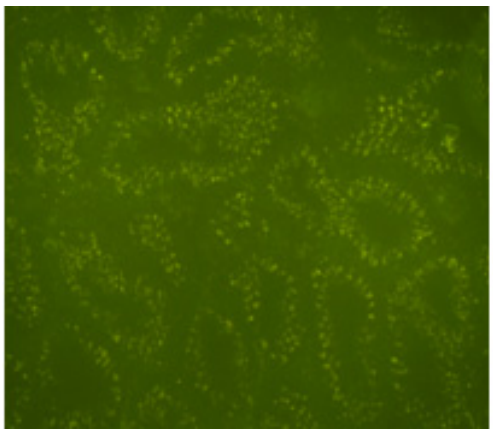


图 1 转染 70 天睾丸组织冰冻切片, ×100

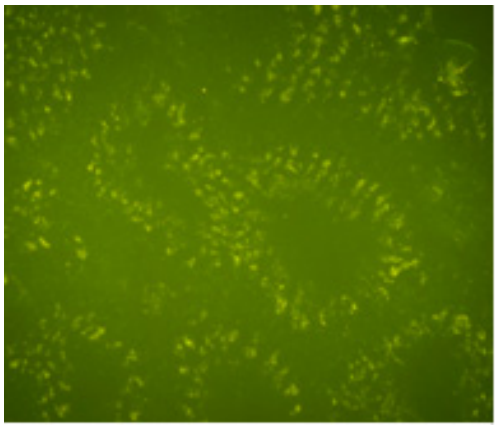


图 2 转染 70 天睾丸组织冰冻切片, ×400

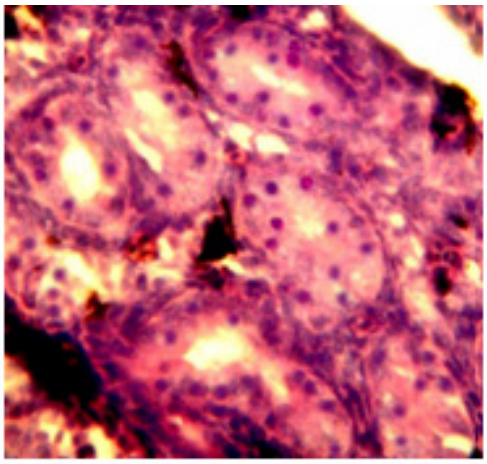


图 3 睾丸组织石蜡切片, ×200

同一剂量组的精子在转染后 25～70 天, 绿色荧光蛋白的表达率随时间逐渐升高, 各时期之间基因表达率均有显著差异(P<0.05); 70～160 天稳定在一个水平, 基因表达率差异不显著(P >0.05), 但是与其他时间段之间基因表达率差异显著(P <0.05).

在转染 25 天时已有 2.2%的精子转染率, 到了 70 天后转染率达到高峰值 19.1%, 并维持一段时间, 直

表 1　手术后不同时间精子中 pEGFP-N1 表达

DNA 注射量/μg	术后不同时期精子绿色荧光蛋白表达率(%)									
	25	32	39	46	70	90	100	110	125	160/天
50	2.2±0.16^{a1}	6.7±0.42^{a2}	8.3±0.49^{a3}	9.8±0.65^{a4}	12.7±0.37^{a5}	12.4±0.68^{a6}	12.2±0.43^{a7}	12.5±0.37^{a8}	12.2±0.91^{a9}	12.2±0.58^{a10}
100	2.3±0.18^{a1}	7.9±0.90^{a2}	9.2±0.90^{a3}	10.6±0.63^{a4}	12.1±0.44^{a5}	12.8±0.29^{a6}	12.0±0.51^{a7}	12.7±0.43^{a8}	12.8±0.46^{a9}	12.7±0.64^{a10}
150	2.1±0.10^{a1}	8.7±0.37^{b2}	9.9±0.37^{b3}	12.3±0.60^{b4}	15.6±0.62^{b5}	15.7±0.53^{b6}	15.9±0.58^{b7}	15.8±0.65^{b8}	15.4±0.45^{b8}	15.5±0.75^{b8}
200	2.2±0.17^{a1}	9.0±0.60^{b2}	10.2±0.60^{b3}	14.2±0.52^{d4}	19.1±0.56^{d5}	18.7±0.65^{d6}	19.0±0.48^{d8}	19.0±0.81^{d8}	18.9±0.80^{d9}	18.7±0.65^{d10}

注：同列肩注不同字母示差异显著(P< 0.05)

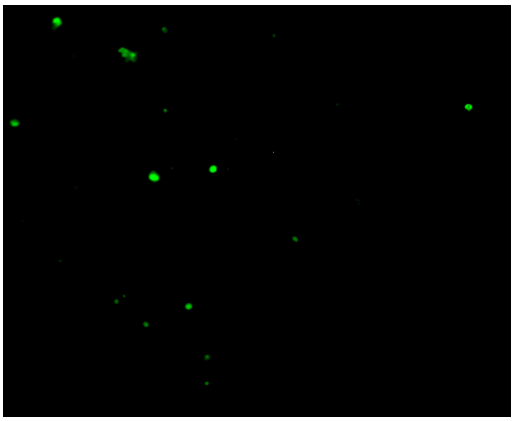


图 4　转染后 25 天精子涂片, ×200

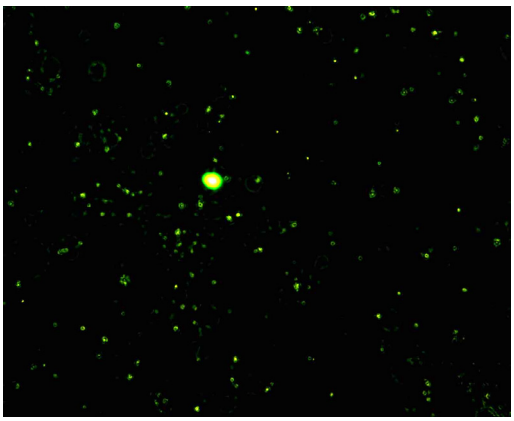


图 5　转染后 90 天精子涂片, ×200

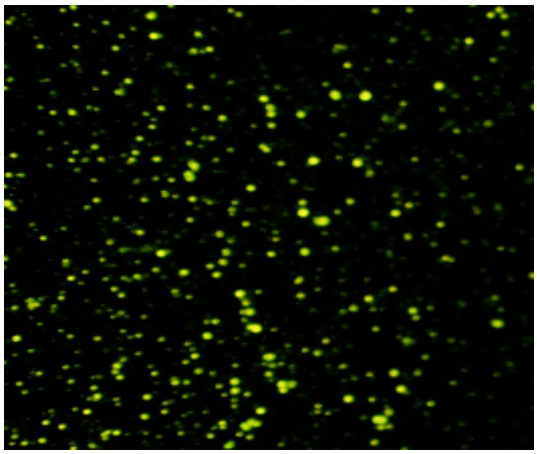


图 6 转染后 160 天精子涂片, ×200

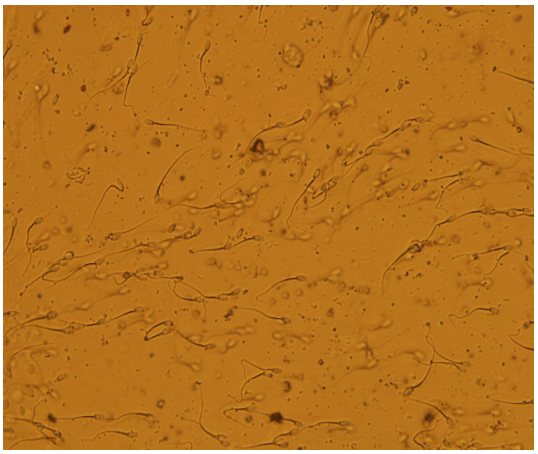


图 7　正常精子涂片, ×400

到 180 天时转染率明显下降至 15%左右，但此后一直保持这一转染水平.

各个剂量组精液 DNA 进行 Southern blot 检测为阳性.

2.3　F_1 代转基因结果

睾丸注射 70 天后，用注射剂量为 200 μg/mL 的公鸡精液进行人工授精. 产生的 F_1 代中，56.2% (254/452)的胚盘表达绿色荧光蛋白(图 8, 9). 正常对照胚盘如图 10 所示. 孵化 3 天的全胚绿色荧光百分率为 55.6% (29/51). 孵化 5.5 天的鸡胚, 50.0% (13/ 26)的鸡胚中原始生殖细胞表达绿色荧光蛋白. 孵化 10 天的鸡胚，66.7% (6/9)的鸡胚中成纤维细胞表达绿

色荧光蛋白. 57.1% (12/21)鸡胚的肝脏、性腺、肾脏、肌肉和心脏细胞有绿色荧光蛋白表达(图 11~14).

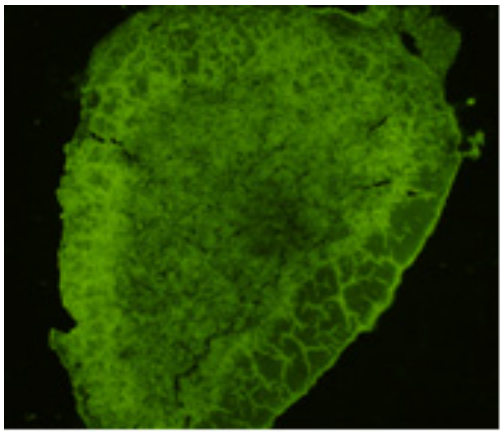


图 8 F_1 受精卵胚盘, ×400

F_1代经重复 PCR 检测结果, 孵化 3 天的鸡胚 PCR 阳性率为 69.2% (9/13); 孵化 5.5 天的全胚 PCR 阳性率为 60.0% (6/10); 孵化 10 天的鸡胚阳性率为 55.6%(5/9); 孵化 15 天的鸡胚 PCR 阳性率为 62.8% (27/43). 活鸡群中 53.2% (13/23)为 PCR 阳性, 血样 Southern blot 检测为阳性(图 15).

2.4 F_2 代转基因结果

在 F_2 代中, 53.2% (275/517)的胚盘中表达绿色荧光. 46.7% (7/15)的鸡胚肝脏、肾脏、肌肉和心脏冷冻切片有绿色荧光表达. 全胚 PCR 检测结果为阳性.

F_2 代经重复 PCR 检测结果, 未孵化鸡胚盘 PCR 阳性率为 50.0% (18/36); 活鸡群中 52.9% (9/17)携带有 *EGFP* 基因.

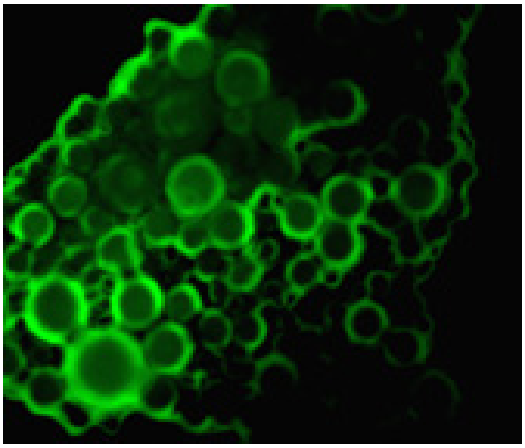


图 9 F_1 受精卵胚盘细胞, ×400

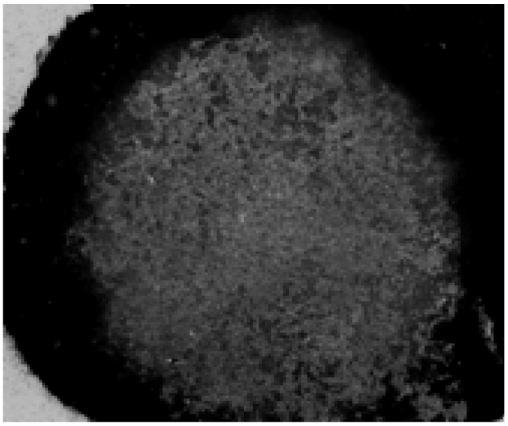


图 10 对照组受精卵胚盘, ×40

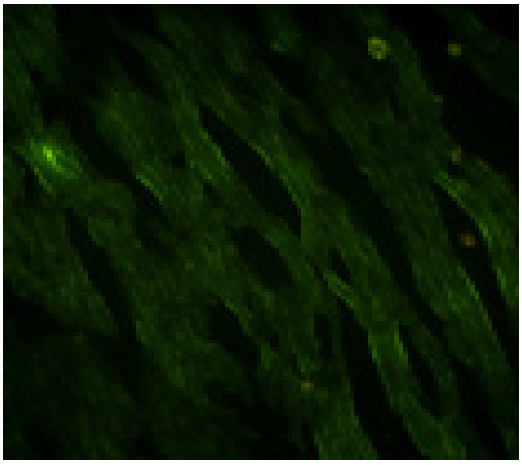


图 11 F_1 代鸡胚胎肌肉组织冰冻切片, ×200

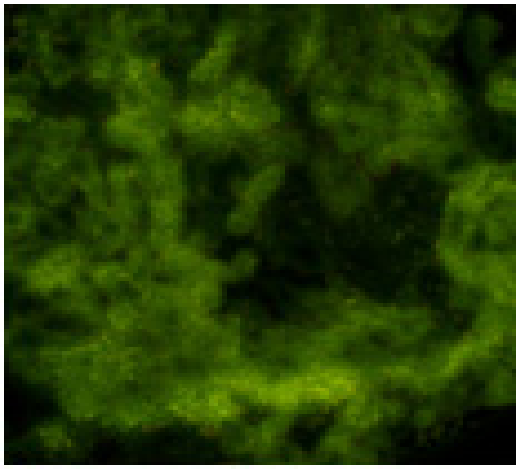


图 12 F_1 代鸡胚胎肾脏组织肾小球冰冻切片, ×200

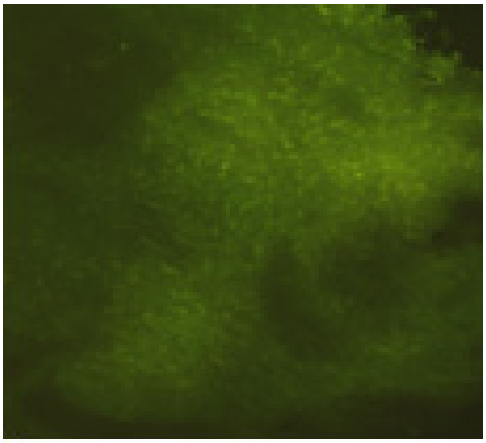


图 13　F_1 代鸡胚胎心脏组织冰冻切片 ×200

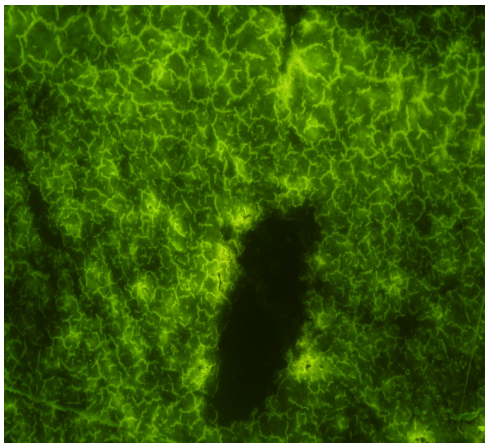


图 14　F_1 代鸡胚胎肝脏组织冰冻切片 ×400

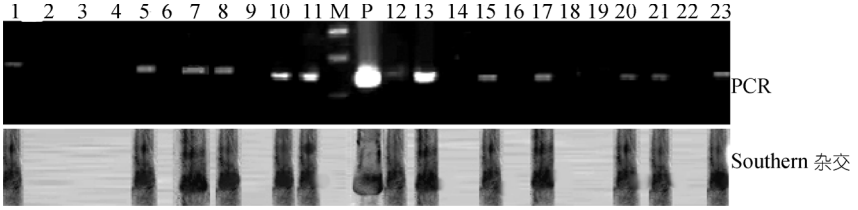


图 15　F_1 代血样 PCR 和 Southern 杂交检测结果

2.5　体外 SSCs 转染外源基因和移植结果

电穿孔法转染后, 细胞生长状态良好, 4 h 后即见有少量阳性细胞, 荧光强度较亮, 24 h 后阳性细胞明显增多, 荧光蛋白表达高峰期在 48 h, 48 h 后有些表达 EGFP 的细胞荧光消失, 且表达量高的细胞脱壁死亡.

将转染后携带有 *EGFP* 基因的 SSCs 移入经白消安处理的公鸡睾丸内, 经过一个生精周期(70 天)后, 常规精子检测, 实验鸡精液呈清水状, 黏稠度低, 精子相对密度为 1.35 (10^5 个/mL), 表达荧光阳性率为 8.0%, 精子 DNA 经 PCR 检测呈 EGFP 阳性, 荧光显微镜下鸡睾丸组织冰冻切片, 曲细精管中有携带 *EGFP* 基因的生精细胞, 并围绕成管状(图 16). 而经白消安处理未移植 SSCs 的睾丸组织曲细精管中未见有绿色荧光出现(图 17).

采集实验公鸡的精液进行人工授精, 产生后代中, 12.5% (8/64)的胚盘表达绿色荧光蛋白, 未孵化胚

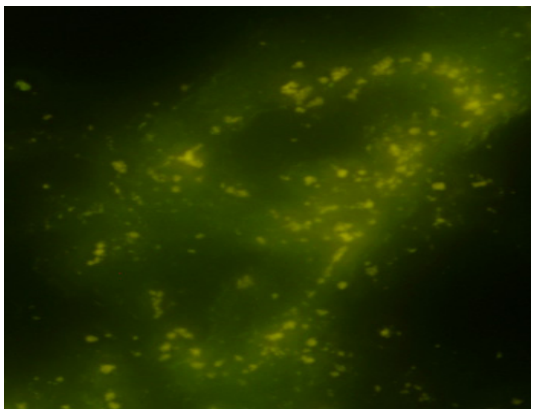


图 16　SSCs 移植 70 天后睾丸组织冰冻切片, ×200

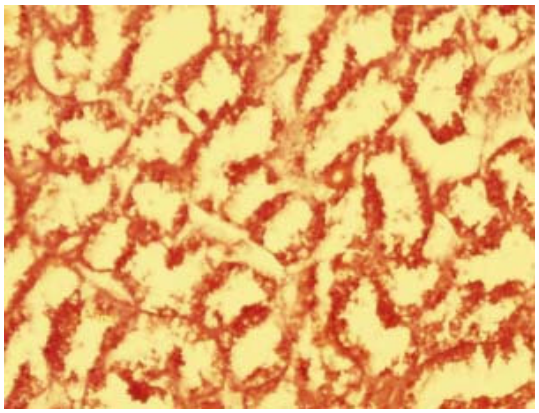


图 17　经白消安处理未移植 SSCs 的睾丸组织切片, ×200

盘经重复 PCR 阳性率为 20.0%. 活鸡群中 11.1% (2/18)为 PCR 阳性. 结果证明了外源性 SSCs 可在受体公鸡的睾丸中生长发育, 并能发生正常功能.

2.6 家鸭 SSCs 转染 *EGFP* 基因结果

5 只公鸭, 睾丸内转染 *EGFP* 基因, 采集精液, 人工授精, 共产生 60 枚种蛋, 孵化雏鸭 31 只, 5 月龄时存活 31 只, 采集它们的血样, 经 PCR 检测, 54.8% (17/31)的个体携带有 *EGFP* 基因.

2.7 鸡 SSCs 转染人组织激肽释放蛋白酶基因结果

4 只公鸡, 睾丸内转染重组人组织激肽释放蛋白酶基因(*rhK1*), 采集精液, 人工授精, 共产生 67 枚种蛋, 孵化小鸡 38 只, 5 月龄时存活 35 只, 血样 PCR 检测 42.9% (15/35)的个体携带有人 *hK1* 基因.

3 讨 论

目前在家禽上采用重组病毒感染和重组载体转染受精单细胞胚胎、囊胚期胚胎、原始生殖细胞(PGC)和精子以及显微注射法、胚胎干细胞转染等方法生产转基因鸡, 但是这些方法存在共同的缺点是转基因操作效率低、成本高. Lavitrano等人[16]曾想避开胚胎操作, 用精子作为载体将外源基因带入卵细胞. 但是他们的实验结果重复性低.

该研究在比较了鸟类和哺乳动物生殖过程存在很大差异的基础上, 提出了在雄性一方寻求鸟类转基因出路的战略思想, 本研究首次在家鸡上通过 SSCs 体内、外转染外源基因, 成功地生产出了转基因鸡, 并且在家鸭和家鸡上转染功能基因进行验证, 结果均说明该方法无需特殊的仪器要求, 即可完成转染外源基因的过程, 方法简单, 操作方便, 效率高、成本低, 可大批量地生产转基因鸡群. 该方法的建立在家禽上意义重大, 突破了制约家禽转基因生产的瓶颈, 解决了家禽转基因难的问题. 特别是体外转染移植的成功, 不仅解决了家禽转基因难的问题, 而且为成体干细胞的应用开辟了更广阔的应用前景.

由于公鸡的睾丸解剖学上的特殊性, 不能被拖出体腔外进行操作, 在本研究中, 采用手术法打开实验公鸡腹腔, 暴露睾丸, 用装有基因悬液的注射器, 直接在睾丸上随机打点注射 4~5 个点, 然后缝合创口, 使公鸡恢复. 手术后观察公鸡的采食、饮水、打鸣、求偶行为等日常活动, 以及公鸡排精量、精子密度、精子活率、颜色、精液黏稠度等与对照组公鸡比较无差异. 手术后 25 天, 仅有少量表达荧光的精子. 70~160 天, 精子表达荧光达到高峰时期. 说明该方法对公鸡的生殖功能无影响, 且保持高效地外源基因转移, 操作方便. 睾丸内注射的原理是, 动物睾丸实体部分主要是由曲精细管盘绕折叠组成, 合适大小的注射针穿刺睾丸时, 可将液体注射进入曲精细管, 液体可在曲精细管内流动散开[17,18]. 在本实验获得高效率转基因鸡的原因可能是, 由于鸡的睾丸大小类似大豆, 每一个注射针运行的地方同时可通过多条曲精细管, 4~5 个注射点注入含有基因的缓冲液几乎可覆盖整个睾丸(本实验睾丸连续冷冻切片观察证明), 所以可能使得整个睾丸内大部分曲精细管获得了转染而产生转基因精子.

在本研究中, 按照孟德尔遗传的测交实验来分析结果, 在杂交 F_1 代 56.2% 胚盘呈现阳性, F_2 代 53.2% 胚盘呈现阳性. 与测交结果的 50% 进行符合性检验, 差异不显著, 证明外源基因已经插入到受体鸡精子的染色体上, Southern blot检测结果也支持这一结果. 外源基因插入精子基因组中的机制虽然不是十分清楚, 但是一些研究者[17~22]认为在精原干细胞分化为精子的整个发生过程中, 外源基因整合到精子的染色体中. 另外在本实验中, 精子绿色荧光的表达率在 25~70 天, 随时间的推移不断提高, 70 天后达到高峰, 由此推测, 公鸡的一个生精周期为 70 天. 分析其原因是不难理解的, 在注射后的 25 天之内, 已经分化成为精细胞的那些细胞被转染的机会小, 因为其染色体分裂在这些细胞上已经完成, 外源基因插入的可能性较小, 精细胞再经历变态形成精子的过程中, 甩掉了大量的细胞质, 所以被转染的可能性较小, 所产生的携带有外源基因的精子少. 而在此期间, 被转染的精原干细胞先后分裂成各级精原细胞, 各级精原细胞继续分裂成精细胞, 在这个过程中, 这些还处在有丝分裂阶段的精原干细胞和减数分裂阶段的各级精原细胞, 其染色体也活跃地发生着复制和分裂, 外源基因有更多的机会插入到基因组中去, 所以携带有外源基因的精原干细胞及各级精原细胞不断分化产生新的精子, 使得携带*EGFP*基因的精子比例随时间推移而增多, 70 天后达到最高峰, 并稳定表达.

为了探索基因浓度对转染效率的影响，本研究分了 4 个剂量组进行比较，结果显示，注射基因浓度为 200 μg/mL 的公鸡精子中绿色荧光表达率最高，但是 pEGFP-N1 的用量是否还可更高，需要进一步探索.

为了探索同种异体间精原干细胞移植的情况，本研究将体外转染供体SSCs移植到经白消安消除了内源性SSCs的受体公鸡睾丸中，移植 70 天后，睾丸冰冻切片显示有表达绿色荧光蛋白的SSCs在曲精细管周壁排列规律、且所处位置与正常SSCs相同. 由于被移植的细胞中能在受体中存活下来的只有精原干细胞[23]，因此，尽管供体细胞悬液中可能混有少量的其他细胞被移植到受体鸡睾丸内，但是只有被移植的SSCs能在受体鸡睾丸中存活下来，其他细胞不能在睾丸中长期定居存活. 在本实验中，通过荧光显微镜观察受体鸡睾丸的冷冻切片，发现有表达绿色荧光蛋白的细胞，固定实验结果亦充分证明了上述“被移植的细胞中以在受体中有活下来的只有精原干细胞”这一观点.

参考文献

1 Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(24): 11298—11302[DOI]

2 Schlatt S, Schonfeldt V, Schepers A G. Male germ cell transplantation: an experimental approach with a clinical perspective. Br Med Bul, 2000, 56(3): 824—836[DOI]

3 Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock M R, et al. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. Biol Reprod, 1999, 60(2): 515—521[DOI]

4 Nagano M, Avarbock M R, Leonida E B, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell, 1998, 30(4): 389—397[DOI]

5 Nagano M, Brinster C J. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. APMIS, 1998, 106(1): 47—55

6 Hem S, Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia : stem cells with a great perspective. Reproduction, 2001, 121(6): 825—834[DOI]

7 Farre L, Rigau T, Mogas T, et al. A denovirus mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. Mol Reprod Dev, 1999, 53(2): 149—158[DOI]

8 Kim J H, Jung-Ha H S, Lee H T, et al. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. Mol Reprod Dev, 1997, 46(4): 515—526[DOI]

9 Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. Biol Reprod, 1998, 59(6): 1439—1444[DOI]

10 Shinohara M K, Toyokuni S, Shinohara T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells *in vivo*. Biol Reprod, 2004, 71: 1202－1207[DOI]

11 Bucci L R, Meistrich M L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, anddominant lethal mutations. Mutat Res, 1987, 176(2): 259—268

12 He X, Qi B, Liu G S, et al. A novel method to transfer gene *in vivo* system. Prog Biochemi Biophys, 2006, 33(7): 685—690

13 李福兵，魏泓，孙新良，等. 睾丸内注射 pEGFP-N1 体内转染精子并在山羊早期胚胎成功表达. 中国实验动物学报，2005，13(2): 110－114

14 曹阳，高华颖，李庆伟，等. 精子干细胞转染法制备转基因兔的研究. 高技术通讯, 2001, 10: 17－21

15 吴洪，李碧春，周冠月，等. 鸡精原细胞分离纯化与体外培养的研究. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1173—1178

16 Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell, 1989, 57(5): 717—723[DOI]

17 Ogawa T, Arechaga J M, Avarbock M R, et al. Translantation of testis germinal cells into mouse seiniferous tubules. Int J Dev Biol, 1997, 41(1): 111—122

18 Virginie O, Francois C. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. Biochem Cell Biol, 2005, (37): 246—250

19 Chang K, Qian J, Jiang M, et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. BMC Biotechnol, 2002, 2(1): 2—5

20 Brinster R L, Avarbock M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(24): 11303—11306[DOI]

21 Shen W, Li L, Pan Q J, et al. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. Mol Rep Dev, 2006, 73(5): 589—594[DOI]

22 Chang K T, Ikeda A, Hayashi K, et al. Possible mechanisms for the testis-mediated gene transfer as a new method for producing transgenic animals. J Reprod Dev, 1999a, 45(1): 37—42[DOI]

23 Yonezawa T, Furuhata Y, Hirabayashi K, et al. Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. Mol Reprod Dev, 2001, 60(2): 196—201[DOI]