

# 转基因 DT40 细胞导入早期鸡胚后的分布 及绿色荧光蛋白表达的研究

孙 鹏<sup>1,2</sup> 赵 晨<sup>1</sup> 燕 丽<sup>1</sup> 靳文静<sup>1</sup> 张文新<sup>1</sup> 李赞东<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室,北京 100193; 2. 北京教育考试院,北京 100083)

**【摘要】** 目的 为了研究经过基因修饰的体细胞导入到禽类胚胎以后,供体细胞及外源基因是否能在受体胚胎中成活并且外源基因是否可以长期表达。方法 筛选得到稳定整合绿色荧光蛋白基因的鸡 DT40 细胞作为外源蛋白的运载工具,通过血管微注射的方法将其导入到于 38.5 °C 温度条件下孵化 65 ~ 70 h 的鸡胚中,并将操作后的鸡胚在原孵化条件下继续孵化。在孵化的不同时期取移植了 DT40 细胞的嵌合体胚胎在荧光显微镜下观察荧光细胞的存活与分布情况。并通过 PCR 以及免疫组织化学方法检测供体细胞在受体中的位置以及绿色荧光蛋白的表达情况。结果 荧光标记的 DT40 细胞可以存活于受体不同的组织器官中,包括:脑、心脏、肝脏等。导入胚胎的整合外源基因的 DT40 细胞可以存活到胚胎出雏之前,并且外源基因能够正常表达。结论 可以通过此方法将外源基因导入到受体中,并使目的蛋白在受体胚胎中持续表达,为胚胎期导入外源蛋白诱导免疫耐受的研究以及将转基因细胞移植到动物体内生产目的蛋白的研究提供科学依据和技术平台。

**【关键词】** DT40 细胞; 血管微注射; 基因表达; 绿色荧光蛋白; 鸡胚

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)09-0013-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.09.004

## The Distribution and Green Fluorescent Protein Expression of Transfected Chicken DT40 Cells after Transplanted into Early Chicken Embryos

SUN Peng<sup>1,2</sup>, ZHAO Chen<sup>1</sup>, YAN Li<sup>1</sup>, JIN Wen-jing<sup>1</sup>, ZHANG Wen-xin<sup>1</sup>, LI Zan-dong<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Education Examinations Authority, Beijing 100083, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate whether the genetically modified somatic cells can survive and express foreign gene for a long time after being transplanted into avian embryo. **Methods** Chicken DT40 cells as a cell vehicle for delivering foreign protein were transfected with the green fluorescent protein (GFP) gene, and were introduced into early chicken embryos via blood vessel microinjection at 65 ~ 70 h of incubation at 38.5 °C. The manipulated eggs were continued to incubate at same condition. The chimerisms of the transplanted DT40 cells were preliminarily observed under fluorescence microscopy at the different stages in the embryos and the hatchlings. Meanwhile, the chimeric positions of the donor DT40 cells and the expression of GFP were further examined by polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. **Results** The results showed that fluorescent-labeled DT40 cells embed in the different organs of the recipients including brain, heart, liver, etc. and can survive before chicken hatch and the GFP gene can be expressed normally. **Conclusion** Long-term survival of the donor DT40 cells in recipient and normal expression of the GFP gene

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划): 2007AA100504。

[作者简介] 孙鹏,男,助理研究员,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail: sp319@163.com。

[通讯作者] 李赞东,女,教授,博士,研究方向:禽类转基因研究。lzdws@cau.edu.cn。

imply that this approach can be explored for continuous production of target protein in the host chicken, which may provide a basis for avian immune tolerance research and the production of bioreactor.

**【Key words】** DT40 cells; Blood vessel microinjection; Gene expression; Green fluorescent protein; Chicken embryo

随着重组 DNA 技术的迅猛发展,动物转基因技术的研究取得了一系列可喜的进展。这种基因转移技术为人类提供了从遗传上改变高等动物细胞的能力,并成为制备转基因动物和进行基因治疗的基础。把经基因改造的细胞移植到动物体内将可能为生产药用蛋白<sup>[1]</sup>或者进行基因治疗<sup>[2]</sup>提供一种更加经济的途径。但是,对于许多高等动物,特别是具有完善的免疫系统的脊椎动物,基因传递系统存在潜在的免疫刺激性,异源基因的表达容易引起宿主产生免疫应答,进而将降低异源基因表达产物的量甚至将其完全消除<sup>[1,3-5]</sup>。Mohammed 等<sup>[1]</sup>将重组的人免疫球蛋白(rhIgG3)基因转入鸡法氏囊淋巴细胞系(DT40)后再将后者通过静脉注射到产蛋母鸡体内,在注射细胞 6 d 后宿主鸡所产蛋中可通过 ELISA 检测到 rhIgG3,该蛋白含量在注射 12 d 后的蛋中达到最高峰,但在此之后骤然下降,这可能是宿主对 rhIgG3 产生了免疫应答的结果。要解决这一问题,需要使宿主动物对异源蛋白形成免疫耐受。根据 Burnet 提出的抗体产生克隆选择学说<sup>[6]</sup>,有研究人员在鸡胚发育早期将异源蛋白注射到胚胎内,可以诱导出出生后的鸡对此抗原的免疫耐受<sup>[7]</sup>。

禽类的胚胎发育模式与哺乳动物存在很大差异,前者的胚胎发育是在离开母体的密闭蛋壳内独立完成的,可以在不停止胚胎发育的情况下对其进行研究,这使得胚胎血管微注射外源物质的方法成为对禽类进行研究的一种重要手段<sup>[8-11]</sup>。本实验室曾在胚胎早期注射异种蛋白诱导鸡免疫耐受方面进行过一系列的研究<sup>[12]</sup>,但在实验过程中发现,在胚胎发育过程中持续导入外源蛋白比较困难,一次性大剂量的接种外源蛋白可能会导致受体胚胎大量死亡。将携带异源基因的细胞导入早期发育的胚胎中,若导入细胞可以存活且目的基因能够正常持续表达,则可能解决这一问题。

本实验的目的是通过血管微注射法将表达异源蛋白的细胞导入早期鸡胚,研究供体细胞在鸡胚中的分布以及所携带的外源基因的表达情况,为胚胎期导入外源蛋白诱导免疫耐受的研究以及将转基因细胞移植到动物体内生产目的蛋白的研究提

供科学依据和技术平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与设备

1.1.1 实验动物:本实验所用白莱航鸡(White Leghorn, *Gallus domesticus*)种蛋购自中国农业大学动物科技学院养鸡场。

1.1.2 细胞及载体:鸡法氏囊淋巴细胞系(DT40)由韩国首尔国立大学 Han Jae Yong 教授赠送。pEGFP-N1 载体由军事医学科学院范宝兴博士赠送。

1.1.3 主要试剂及材料:限制性内切酶 *Eco*O109 I 购自 MBI 公司;限制性内切酶 *Hind* III 购自 NEB 公司;DMEM/F-12 1:1、双抗、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、非必需氨基酸和丙酮酸钠均购自 HyClone 公司;G418 购自 Sigma 公司;PCR 预混液购自宝生物工程大连有限公司;胶回收试剂盒购自北京 Tiangen 生物技术有限公司;Southern 杂交膜(Amersham-XL 尼龙膜)购自 GE 公司;放射性同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自中国同位素进出口公司;X 光片购自 Kodak 公司;显影浓缩液及定影浓缩液购自乐凯公司;PCR 引物的合成由上海英骏生物技术有限公司完成;一抗:小鼠抗绿色荧光蛋白(GFP)单克隆抗体购自 MBL 公司;生物素化羊抗小鼠 IgG 二抗试剂盒、联苯二胺(DAB)显色试剂盒及小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.1.4 主要设备:电击仪:Gene Pulser X Cell™ Electroporation System(Bio-Rad USA);倒置荧光显微镜:IX71(Olympus Japan);纤维光源(Nikon Japan);杂交炉(Bio-Rad USA);拉针仪:PN-40(Narishige Japan);切片机(Leica Germany)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DT40 细胞的转染与筛选:将 DT40 细胞悬浮培养于 DMEM/F-12 培养基(含 10% 胎牛血清,1% 丙酮酸钠,1% 非必需氨基酸,100 U/mL 青霉素,100  $\mu$ g/mL 链霉素)中置于二氧化碳培养箱中培养(37.5 °C 5% CO<sub>2</sub>)。收集对数期生长的 DT40 细胞约  $5 \times 10^6$  个与 60  $\mu$ g 线性化 pEGFP-N1 载体于无

血清的 DMEM/F-12 基础培养基中混匀后电击转染 (550 V 50  $\mu$ F)。电击后的 DT40 细胞用 DMEM/F-12 培养基培养 24 h 后添加 G418 (终浓度为 1.5 mg/mL) 继续培养 7 d,在此期间,每 2 d 更换一次含 G418 的培养基。之后换为含终浓度为 0.4 mg/mL 的 G418 培养基继续培养 14 d,在此期间,每 2 d 更换一次含 G418 的培养基。收集细胞,将细胞按 5~10 个/孔的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板,在终浓度为 0.4 mg/mL 的 G418 培养基中继续培养,每日观察 21 d 后挑出由单个细胞形成的克隆,扩大培养,荧光显微镜镜检。选取将作为供体细胞的细胞株命名为 DT40-GFP。

1.2.2 GFP 基因的 Southern blot 检测:以 pEGFP-N1 载体序列 (GenBank Accession No. U55762) 设计探针引物,上游 5'-GGACGGCGACGTAAACGGCC-ACAA-3',下游 5'-ACGAACTCCAGCAGGACCATG-3',目的片段为 GFP 基因内长度为 618 bp 的一段序列。提取 DT40-GFP 细胞的基因组 DNA,取 30  $\mu$ g 基因组 DNA 用 *Hind* III 37  $^{\circ}$ C 过夜消化。将消化后的基因组 DNA 通过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离,然后转移到尼龙杂交膜上。通过随机引物法将 618 bp 的 DNA 探针用  $^{32}$ P 标记后,进行杂交,放射自显影。

1.2.3 鸡胚血管微注射 DT40-GFP 细胞及荧光显微镜检测:种蛋表面以新洁尔灭溶液擦洗干净后置于孵化器中在 38.5  $^{\circ}$ C,相对湿度 70% 的条件下孵化 2 h 翻蛋一次,翻蛋角度为 90 $^{\circ}$ 。将孵化 65~70 h (胚胎发育至 17~18 期<sup>[13]</sup>) 的种蛋取出,用酒精棉擦拭表面消毒后,通过纤维光源照蛋确定胚胎所处位置并做标记。在记号附近的蛋壳上用医用牙钻开一个直径约 4 mm 的小窗。在实体显微镜下用外径为 50~70  $\mu$ m 的玻璃针将 2  $\mu$ L 含有约  $6 \times 10^4$  个 DT40-GFP 细胞的 PBS (pH 7.6) 缓慢注射到鸡胚的前卵黄静脉中,注射后用 parafilm 封闭开口,标记,共注射 117 个鸡胚。将处理后的胚胎放回孵化器继续孵化,在孵化后 4~19 d,每天取 4~5 个活胚,用镊子将胚胎不同组织分开,置于玻璃平皿中,荧光显微镜下镜检,观察荧光细胞在胚胎中的分布情况。取 4 只新生小鸡,颈椎脱臼处死并解剖,取脑、心脏、卵黄囊膜、法氏囊等组织、器官,荧光显微镜下镜检,观察荧光细胞在小鸡各组织器官中的分布情况。

1.2.4 PCR 检测:在荧光显微镜下收集含有荧光细胞的胚胎组织样品并提取基因组 DNA,方法同

Taberlet and Bouvet 的报道<sup>[14]</sup>。以 pEGFP-N1 载体序列 (GenBank Accession No. U55762) 设计 PCR 引物:上游 5'-TTCAAGGACGACGGCAACT-3',下游 5'-TGGGTGCTCAGGTAGTGGTT-3' 扩增 GFP 基因内部的一段 314 bp 大小的 DNA 片段。PCR 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,54  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束,1.5% 琼脂糖分析。

1.2.5 免疫组织化学检测 GFP 的表达:分别取孵化 5 d 和 10 d 的注射了 DT40-GFP 细胞的鸡胚组织,于 10% 中性缓冲福尔马林溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋。取组织蜡块连续切片,厚度 6  $\mu$ m,60  $^{\circ}$ C 烤片 15 min,常规脱蜡至水,其余步骤严格按照生物素化羊抗小鼠 IgG 二抗试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明书操作。一抗工作浓度为 1:250,DAB 显色后,切片于显微镜下检测。

## 2 结果

2.1 稳定整合 GFP 基因的 DT40 细胞株 (DT40-GFP) 的获得与鉴定:电击转染后经 G418 筛选得到了多个 DT40 细胞株。经荧光显微镜检测,在其中选择 GFP 表达效果好,分裂周期较短的一株 DT40 细胞 (彩插 3 图 1 A、B) 作为鸡胚血管微注射实验的供体细胞,命名为 DT40-GFP。Southern blot 结果表明 (彩插 3 图 1 C),GFP 基因整合到了 DT40-GFP 细胞基因组中,且拷贝数为 1。

2.2 DT40-GFP 细胞在鸡胚中的分布及存活情况:在孵化 4 d (即注射后 1 d) 至孵化 19 d (出雏前) 的胚胎中均可以检测到荧光细胞。DT40-GFP 细胞在胚胎中分布比较广泛,在心脏 (彩插 4 图 2 H)、肝脏 (彩插 4 图 2 J)、脾脏 (彩插 4 图 2 K)、肾脏 (彩插 4 图 2 I) 及肠 (彩插 4 图 2 F) 等内脏器官上数量较少,胚胎头部的荧光细胞数量较多,主要集中在脑部 (彩插 4 图 2 A、B、C、L),在卵黄囊膜 (彩插 4 图 2 G) 和尿囊膜 (彩插 4 图 2 D) 上也相对较多。DT40-GFP 细胞被导入胚胎后,细胞形状发生了较大变化 (彩插 4 图 2 C、G)。

2.3 DT40-GFP 细胞在孵出小鸡体内的分布及存活情况:将四只注射 DT40-GFP 细胞的新生小鸡解剖后,在荧光显微镜下仔细观察小鸡的脑、心脏、卵黄囊膜、法氏囊及各内脏器官,均未检测到荧光细胞。

2.4 DT40-GFP 细胞在鸡胚内的荧光检测统计:本实验共检测了 67 只注射了 DT40-GFP 细胞的鸡胚,

表 1 DT40-GFP 细胞在受体中的荧光检测结果  
Tab. 1 Detection of DT40-GFP cells in recipients under fluorescence microscopy

	检测数量 Number of chimeras	检测到荧光细胞的受体数 Number of the individuals expressing GFP	DT40-GFP 细胞存在部位 Positions of GFP expression					
			脑 Brain	心脏 Heart	肝脏 Liver	肠 Intestine	卵黄囊膜 Yolk sac	其他组织 Other tissues
胚胎 Embryo	67	58 (86.6%)	52	34	7 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	55	49 <sup>b</sup>
鸡 Hatchling	4	0	0	0	0	0	0	0

注: <sup>a</sup> 从孵化 6 日胚胎开始检测; <sup>b</sup> 无论同一胚胎其他组织中检测到多少处荧光信号均计为 1

Note: <sup>a</sup> Embryos were tested after 6 days of incubation; <sup>b</sup> No matter how many fluorescent signals were found in other tissues of the same embryo, they were recorded conclusively as 1

在 58 只鸡胚中检测到了荧光细胞, 占所检测样本的 86.6%; 共检测 4 只胚胎期导入 DT40-GFP 细胞后孵出的小鸡, 没有检测到荧光细胞, 具体数据总结于表 1。

2.5 体细胞转基因嵌合体鸡胚中 GFP 基因的检测: 取孵化 5 d 的嵌合体鸡胚头部和身体部分分别

提取基因组 DNA, 取孵化 10 d、15 d 嵌合体胚胎的脑和心脏分别提取基因组 DNA, 共得到基因组样品 28 份, 通过 PCR 反应, 全部能扩增出相应的 DNA 片段, 而未注射的野生型胚胎基因组中没有扩增出相应 DNA 片段, 部分样本的 PCR 扩增电泳结果见图 3。

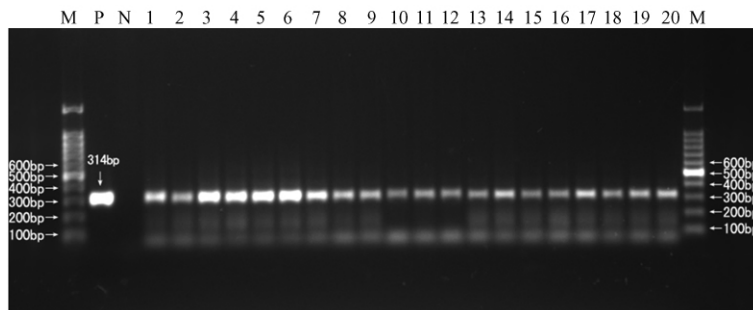


图 3 PCR 扩增注射 DT40-GFP 细胞受体组织基因组 DNA

Fig. 3 The PCR amplification of chimeric tissue genome DNA

注: M. DNA marker; P. pEGFP-N1 质粒 (阳性对照); N. 未注射鸡胚基因组样本 (阴性对照);  
1~4. 孵化 5 d 嵌合体胚胎头部基因组样本; 5~8. 孵化 5 d 嵌合体胚胎身体基因组样本;  
9~11. 孵化 10 d 嵌合体胚胎头部基因组样本; 12~14. 孵化 10 d 嵌合体胚胎心脏基因组样本;  
15~17. 孵化 15 d 嵌合体胚胎头部基因组样本; 18~20. 孵化 15 d 嵌合体胚胎心脏基因组样本  
Note: Lane M: DNA size markers; Lanes 1 - 4: The head of four 5-day somatic chimeric chicken respectively.

Lanes 5 ~ 8: The body of four 5-day somatic chimeric chicken respectively. Lanes 9 ~ 11: The head of three 10-day somatic chimeric chicken embryo respectively. Lanes 12 ~ 14: The body of three 10-day somatic chimeric chicken embryo respectively. Lanes 15 ~ 17: The head of three 15-day somatic chimeric chicken embryo respectively. Lanes 18 ~ 20: The body of three 15-day somatic chimeric chicken embryo respectively. Genomic DNA of a nonmanipulated chicken embryo and plasmid DNA (pEGFP-N1) were used as negative (lane N) and positive (lane P) control, respectively

## 2.6 体细胞转基因嵌合体鸡胚中 GFP 的检测

通过免疫组化法, 在鸡胚的头部、心脏、身体等部位检测到了 GFP 阳性细胞, 而在阴性对照组中没有检测到阳性信号, 证明在荧光显微镜下观察到的注射了 DT40-GFP 细胞的鸡胚中的荧光细胞的确表

达了 GFP, 部分样本的免疫组化结果彩插 3 见图 4。

## 3 讨论

### 3.1 胚胎血管微注射时期的选择

禽类胚胎的发育与哺乳动物差别很大, 禽受精

卵产出体外时胚胎通常已发育至第 X 期,即胚盘期,相当于哺乳动物的囊胚期。有一些研究<sup>[15-16]</sup>采用了将其他来源的供体细胞注入胚盘下腔的方法制备嵌合体禽类,也有使用这种方法制备转基因嵌合体禽类<sup>[18-19]</sup>的报道。但经这种注射方法处理过的种蛋孵化率一般在 20%~40% 之间,得到后代的比例较低。本实验室尝试过在鸡胚处于胚盘期时注射供体细胞的方法,由于胚盘下腔的空间小,只能容纳少量的供体细胞,操作时针尖穿过胚盘下腔导致供体细胞流失的概率很大,并且发现在胚胎发育过程中大量供体细胞分散在胚外组织膜上,只有少量的供体细胞在胚体内部,不能满足本实验的要求。

在胚胎形成血管之后,此时,可以将外源细胞以血管微注射的方法导入胚胎中形成嵌合体<sup>[8-11,19-21]</sup>。在这一时期,可以将供体细胞直接导入到胚胎的循环系统中,使进入到胚体内的供体细胞的比例明显增加。但若在胚胎免疫系统开始建立之后再表达外源蛋白的供体细胞导入,供体细胞就可能被胚胎免疫排斥。本实验室前期在鸡胚胎期诱导免疫耐受的研究中发现:在胚胎发育 65~70 h 阶段接种抗原后孵化的小鸡中表现出对这种蛋白抗原的耐受<sup>[22]</sup>。所以本实验选择了鸡胚孵化 65~70 h 时通过血管微注射的方法导入供体细胞,以增加供体细胞在受体中存活的比例。

### 3.2 受体的阳性率

本实验采用血管微注射法将供体细胞直接导入胚胎,提高了含有 GFP 细胞的胚胎比例。在本实验中,含表达 GFP 的 DT40 细胞的胚胎比例为 86.6% (58/67),远高于 2001 年 Toba 等<sup>[17]</sup>通过胚盘注射法将经基因修饰的 DT40 细胞导入鸡胚的实验以及 2004 年 Xi 等<sup>[23]</sup>将转基因融合细胞注入胚盘的实验得到的嵌合胚胎阳性率,但低于我们之前以鸡胚成纤维细胞(CEFs)作为供体细胞得到的实验结果<sup>[24]</sup>。这可能是因为 DT40 细胞是经过改造且经长期体外培养的细胞系,已经不适于在胚胎体内长期生长所致。实验中可以持续观察到绿色荧光细胞,表明 GFP 基因均可以在导入受体后的 DT40 细胞中正常表达。

### 3.3 供体细胞在受体中的分布

供体细胞被导入鸡胚循环系统后,可随血液循环到达胚胎的各个部位,在胚体中分布广泛,尤其在循环系统末端的毛细血管附近分布最多。由表

1 荧光细胞最多出现在胚胎的脑和卵黄囊膜中,分别在 52 个胚胎脑中和 55 个胚胎的卵黄囊膜中存在荧光细胞,其次是心脏,在 34 个胚胎的心脏中检测到荧光细胞。由于孵化 5 d 的胚胎脑泡中水分比例非常大,经石蜡切片后脑泡部分呈空泡状,通过免疫组化无法检测到阳性细胞,但在脑泡附近的头部组织中可以检测到 GFP 阳性细胞。免疫组化结果与荧光检测结果及 PCR 结果一致。

### 3.4 荧光细胞在受体体内存活的时间

荧光显微镜观察结果表明,鸡胚发育早期导入的 DT40-GFP 不但可以在鸡胚内存活,而且其存活时间较长,可以持续到鸡胚发育末期。但 DT40-GFP 细胞数量并未随胚胎发育而增加,而是呈现出逐渐减少的趋势。以本实验的观察结果与我们之前导入携带 GFP 基因的鸡胚成纤维细胞(CEF-GFP)的实验结果<sup>[24]</sup>相比较,两实验导入胚胎的细胞数量均为  $6 \times 10^4$  个/胚。在注射后第 1 d,即胚胎孵化第 4 d,两实验的胚胎中荧光细胞的数量基本相同。总体上看,在胚胎孵化至第 9 d 时,注射 DT40-GFP 细胞的胚胎中的荧光细胞数量少于注射 CEF-GFP 细胞的胚胎中的荧光细胞数。胚胎孵化至 15 d 时,注射 DT40-GFP 细胞的胚胎中的荧光细胞数量远少于注射 CEF-GFP 细胞的胚胎中的荧光细胞数。

### 3.5 结论

本实验将稳定整合了一个拷贝绿色荧光蛋白基因的 DT40 细胞在鸡胚发育 65~70 h 时通过血管微注射法导入鸡胚中,整合了外源基因的 DT40 细胞可以在胚胎中存活直至胚胎出雏之前,且外源基因能够持续表达。这一结果表明,可以通过此方法将外源基因导入到受体中,并使目的蛋白在受体胚胎中持续表达,可以为深入研究免疫耐受的机制提供一定的技术支持。

#### 参考文献:

- [1] Mohammed SM, Morrison S, Wims L, et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens [J]. Immunotechnology, 1998, 4(2): 115-125.
- [2] Murray M, Kim D, Liu Y, et al. Transplantation of genetically modified cells contributes to repair and recovery from spinal injury [J]. Brain Research Reviews, 2002, 40(1-3): 292-300.
- [3] Domenico CD, Villani GRD, Napoli DD, et al. Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral- $\Delta$ DUA vector [J]. Human Gene Therapy, 2005, 16(1): 81-90.
- [4] Schagen FHE, Ossevoort M, Toes REM, et al. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products:

- a review of strategies for evasion [J]. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2004, 50(1): 51-70.
- [5] Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, et al. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(5): 4212-4223.
- [6] Burnet FM. *The clonal selection theory of acquired immunity* [M]. London: Cambridge University Press, 1959.
- [7] Stevens KM, Pietryk HC and Ciminera JK. Acquired immunological tolerance to protein antigen in chickens [J]. *British Journal of Experimental Pathology*, 1958, 39(1): 1-7.
- [8] Naito M, Tajima A, Yasuda Y, et al. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1994, 39(2): 153-161.
- [9] Li HC, Zhao L, Kagami H, et al. Identification of transferred chicken germ cells in quail gonad and semen by amplification of chicken-specific PCR products [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2001, 38(4): 308-316.
- [10] Naito M, Minematsu T, Harumi T, et al. Preferential migration of transferred primordial germ cells to left germinal ridge of recipient embryos in chickens [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2009, 46(1): 40-45.
- [11] Naito M, Minematsu T, Harumi T, et al. Intense expression of GFP gene in gonads of chicken embryos by transfecting circulating primordial germ cells in vitro and in vivo [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2007, 44(4): 416-425.
- [12] Zhao C, Song C, Wang X, et al. Induction of immunological tolerance in chickens inoculated with xenogeneic antigens at an early stage of embryonic development [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(4): 431-440.
- [13] Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo [J]. *Journal of Morphology*, 1951, 88(1): 49-92.
- [14] Taberlet P and Bouvet J. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies [J]. *The Auk*, 1991, 108(4): 959-960.
- [15] Naito M, Watanabe M, Kinutani M, et al. Production of quail-chick chimaeras by blastoderm cell transfer [J]. *British poultry science*, 1991, 32(1): 79-86.
- [16] Petite JN. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells [J]. *Development*, 1990, 108(1): 185-189.
- [17] Toba M, Ebara F, Furuta H, et al. Introduction of DT40 cells into chick embryos [J]. *Asian Journal of Andrology*, 2001, 3(1): 49-53.
- [18] Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, et al. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(9): 1159-1169.
- [19] Naito M, Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2003, 40(1): 1-12.
- [20] Tajima A, Barbato GF, Kuwana T, et al. Conservation of a genetically selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PGCs) isolated by filtration method [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2003, 40(1): 53-61.
- [21] Minematsu T, Tajima A, and Kanai Y. The migratory ability of gonadal germ cells in the domestic chicken [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2004, 41(3): 178-185.
- [22] Zhao C, Li Z, Song C, et al. Induction of immune-tolerance in chickens by injecting exogenous antigen into embryonic blood vessel during embryogenesis [C]. *Proceeding of X<sup>III</sup> World's Poultry Congress*, 2004, 178.
- [23] Xi Y, Nada Y, Soh T, et al. Green fluorescent protein gene-transfected peafowl somatic cells participate in the development of chicken embryos [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 2004, 301(2): 139-149.
- [24] Sun P, Zhao C, Yan L, et al. Expression of green fluorescent protein gene in somatic chimeric chickens produced by transplantation of transfected chicken embryonic fibroblasts [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2009, 46(4): 363-369.

(修回日期)2011-06-13

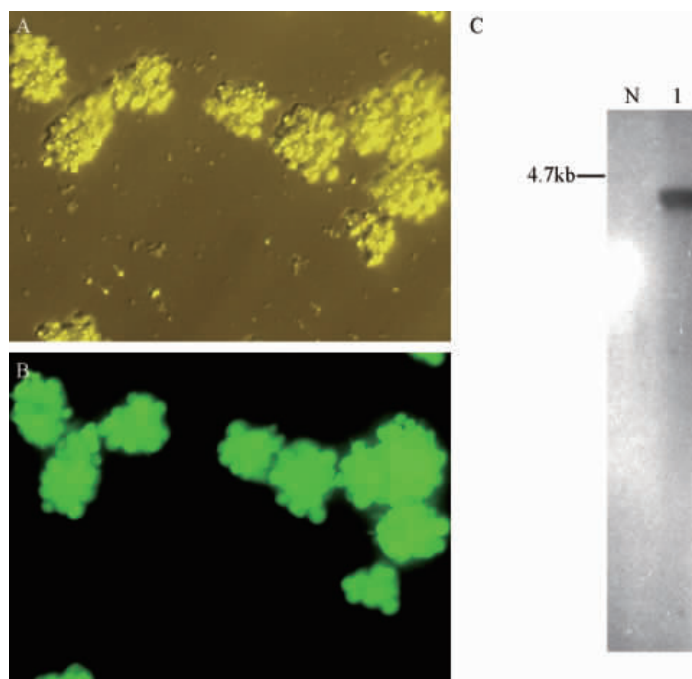


图 1 经 G418 筛选得到的 DT40-GFP 细胞及 Southern blot 检测结果

Fig. 1 DT40-GFP cells after G418 selection and the result of Southern blot assay

注: A. 明场下观察(200x); B. 暗场下观察(200x); C. Southern blot 检测, N:DT40 细胞基因组; 1:DT40-GFP 细胞基因组

Note: A. Bright field (200x); B. Dark field (200x); C. Southern blot assay, N: genomic DNA of DT40 cells; 1: genomic DNA of DT40-GFP cells

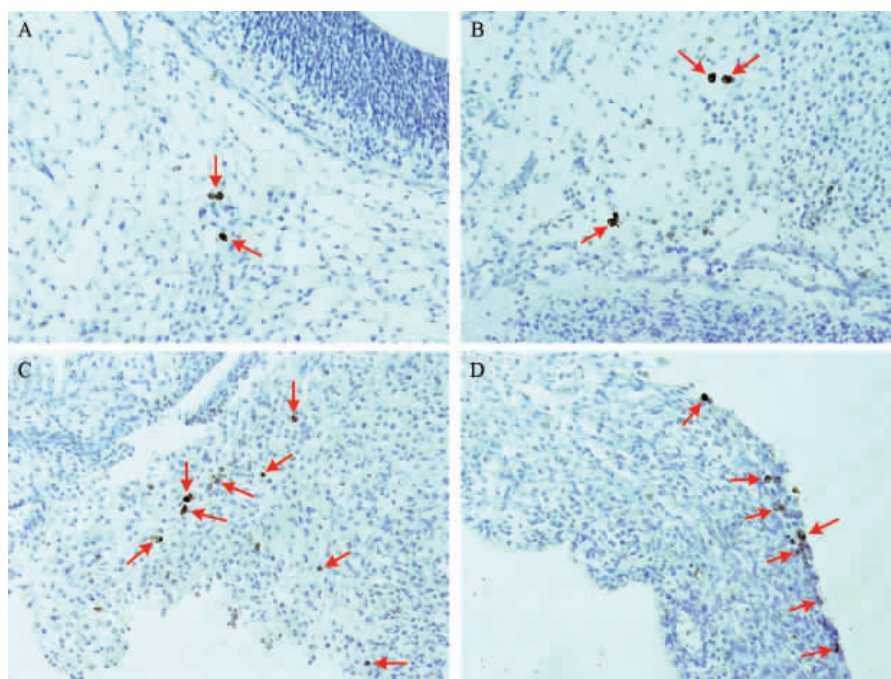


图 4 免疫组化检测在嵌合体鸡胚中 DT40-GFP 细胞中 GFP 蛋白的表达

Fig. 4 Immunohistochemical location of GFP in DT40-GFP cells of chimeric embryos using GFP-specific antibodies

A、B. 孵化 5 d 嵌合体鸡胚头部(400x); C、D. 孵化 10 d 嵌合体鸡胚头部(400x)。箭所指为阳性细胞

A, B: Immunohistochemical detections of transgenic cells in the head of 5-day somatic chimeric chicken embryo; C, D: Immunohistochemical detections of transgenic cells in the head sections of 10-day somatic chimeric chicken embryo. GFP-expressed cells exhibited distinct staining for diaminobenzidine (arrows)

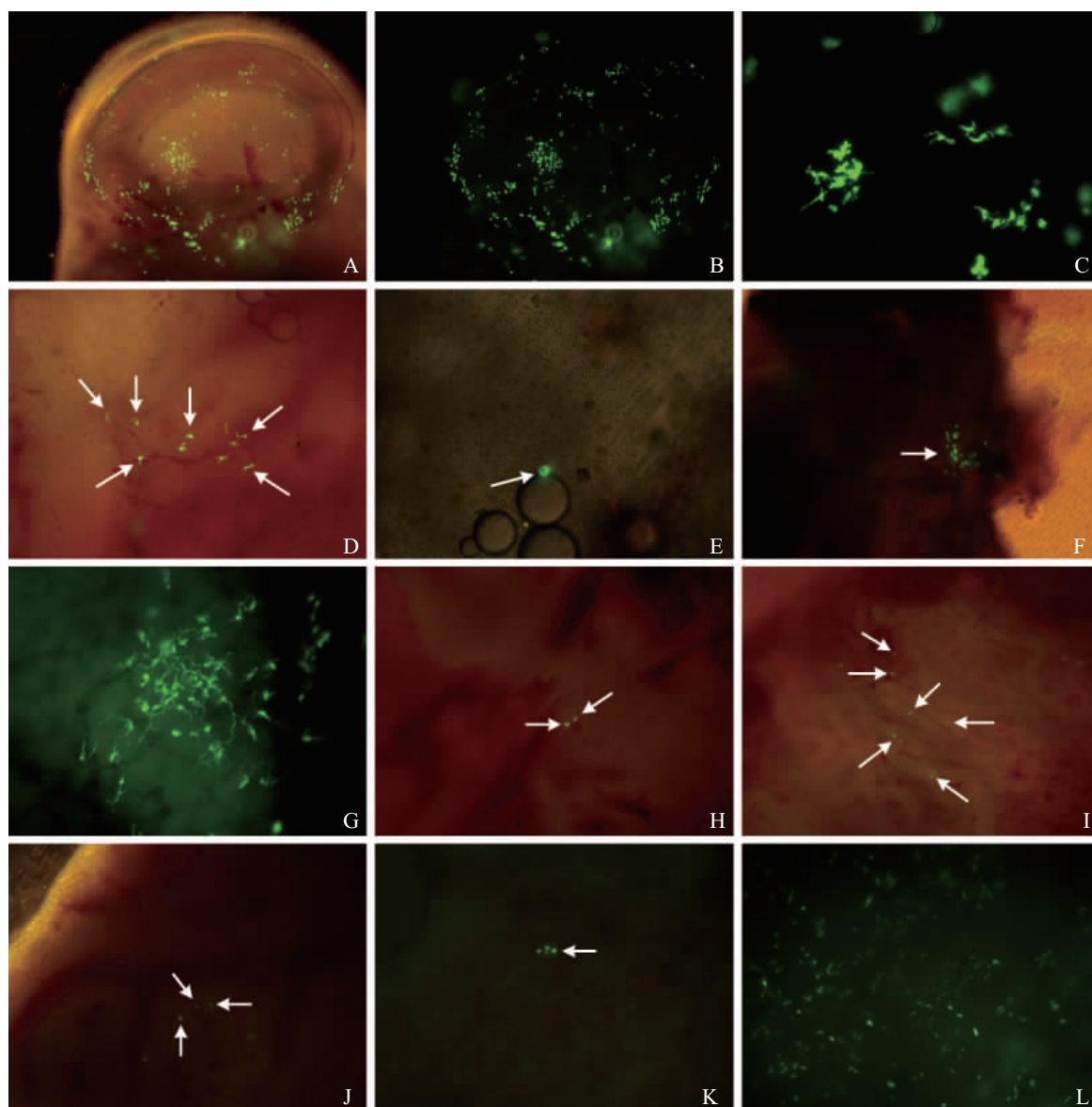


图 2 DT40-GFP 细胞在鸡胚中的分布

Fig. 2 Distribution of DT40-GFP cells in chicken embryos

注:A. 孵化 4 d 鸡胚头部(半明场下观察,40×);B. 孵化 4 d 鸡胚头部(暗场下观察,40×);C. 孵化 4 d 鸡胚脑泡(暗场下观察,400×);D. 孵化 9 d 鸡胚尿囊膜(半明场下观察,200×);E. 孵化 9 d 鸡胚解剖流出的荧光细胞(半明场下观察,200×);F. 孵化 10 d 鸡胚肠(半明场下观察,100×);G. 孵化 11 d 鸡胚卵黄囊膜(暗场下观察,200×);H. 孵化 13 d 鸡胚心脏(半明场下观察,100×);I. 孵化 13 d 鸡胚肾脏(半明场下观察,100×);J. 孵化 14 d 鸡胚肝脏(半明场下观察,100×);K. 孵化 15 d 鸡胚脾脏(暗场下观察,100×);L. 孵化 16 d 鸡胚脑部(暗场下观察,100×)。箭所指为阳性细胞

Note: A. The head of the chicken embryo at embryonic day 4 (half bright field, 40×); B. The head of the chicken embryo at embryonic day 4 (dark field, 40×); C. The cerebral vesicle of the chicken embryo at embryonic day 4 (dark field, 400×); D. The allantois of the chicken embryo at embryonic day 9 (half bright field, 200×); E. The effluent cell in the chicken embryo at embryonic day 9 (half bright field, 200×); F. The intestine of the chicken embryo at embryonic day 10 (half bright field, 100×); G. The yolk sac of the chicken embryo at embryonic day 11 (dark field, 200×); H. The heart of the chicken embryo at embryonic day 13 (half bright field, 100×); I. The kidney of the chicken embryo at embryonic day 13 (half bright field, 100×); J. The liver of the chicken embryo at embryonic day 14 (half bright field, 100×); K. The spleen of the chicken embryo at embryonic day 15 (dark field, 100×); L. The head of the chicken embryo at embryonic day 16 (dark field, 100×); arrows indicated the positive cells