

## 鸡胚胎干细胞分离方法和培养体系的优化\*\*★

张曼玉<sup>1</sup>, 陈志胜<sup>2</sup>, 计慧琴<sup>2</sup>, 陈胜峰<sup>2</sup>, 刘本杰<sup>1</sup>, 邓衔柏<sup>1</sup>, 王丙云<sup>2</sup>, 袁立<sup>3</sup>, 江青艳<sup>4</sup>

### Optimization of separation methods and culture system of chicken embryonic stem cells *in vitro*

Zhang Man-yu<sup>1</sup>, Chen Zhi-cheng<sup>2</sup>, Ji Hui-qin<sup>2</sup>, Chen Sheng-feng<sup>2</sup>, Liu Ben-jie<sup>1</sup>, Deng Xian-bo<sup>1</sup>, Wang Bing-yun<sup>2</sup>, Yuan Li<sup>3</sup>, Jiang Qing-yan<sup>4</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Embryonic stem cells are undifferentiated permanent cell line derived from inner cell mass cells and primordial germ cells of animal's early embryos. Chicken embryonic stem cells are derived from the blastodermal of a X-stage embryo.

**OBJECTIVE:** To optimize the separation method and *in vitro* cultural system of chicken embryonic stem cells.

**METHODS:** The X-stage chicken embryos were isolated by using a small square of filter paper with a hole punched in the center, and the blastodermal cells were isolated by using the hair loop. STO cells were used to make feeder layer; at the same time, BRL-CM and cytokine were also used for chicken embryonic stem cells *in vitro* cultural system.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The filter paper loop and the hair loop could obtain complete the blastoderm, and the successful percentage was 75%-85%. The colony formation rate was about 50%. After culture in the BRL-CM + feeder layer + cytokine culture system, the passage of CES cells is the seventh generation; BRL-CM + feeder layer + cytokines, cultured chicken embryonic stem cells could passage to the 25th generation. Isolated chicken embryonic stem cells were in an undifferentiated state detected by alkaline phosphatase staining and SSEA-1 staining. The findings indicate that this experiment not only optimized the isolation method of chicken embryonic stem cells to obtain complete and pure embryos, but also further improved the *in vitro* culture system of chicken embryonic stem cells.

Zhang MY, Chen ZC, Ji HQ, Chen SF, Liu BJ, Deng XB, Wang BY, Yuan L, Jiang QY. Optimization of separation methods and culture system of chicken embryonic stem cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(45): 8429-8433. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

**背景:** 胚胎干细胞是从动物早期胚胎的内细胞团或原始生殖细胞分离出来的具有发育全能性的一种未分化的无限增殖细胞系。而鸡胚胎干细胞则是从X期鸡胚的胚盘分离而来。

**目的:** 优化鸡胚胎干细胞分离方法和离体培养体系。

**方法:** 采用滤纸纸环-发环的方法从X期鸡胚分离胚盘细胞,并采用STO细胞作为饲养层和大鼠肝细胞(BRL)条件培养基(CM)+细胞因子作为离体培养体系对分离的胚盘细胞进行培养。

**结果与结论:** 滤纸纸环-发环法获得的完整胚盘率为75%~85%,克隆形成率约为50%。BRL-CM+饲养层培养体系,鸡胚胎干细胞可传至7代,而BRL-CM+饲养层+细胞因子培养体系,鸡胚胎干细胞可传至25代。分离到的鸡胚胎干细胞,经碱性磷酸酶染色、SSEA-1染色鉴定,表明鸡胚胎干细胞处于未分化状态。提示,实验不仅优化了鸡胚胎的分离方法,获得完整且杂质少的胚盘,而且进一步优化了鸡胚胎干细胞体外培养体系。

**关键词:** 鸡; 胚胎干细胞; 分离; 培养; 细胞因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.015

张曼玉, 陈志胜, 计慧琴, 陈胜峰, 刘本杰, 邓衔柏, 王丙云, 袁立, 江青艳. 鸡胚胎干细胞分离方法和培养体系的优化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8429-8433. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

鸡胚胎干细胞(chicken embryonic stem cells, CES Cells)是指从鸡X期胚胎的胚盘细胞(BDCs)分离而来的经体外培养后仍具有无限增殖和分化全能性的细胞。因此,胚胎干细胞在理论上包括鸡的全部遗传信息,并且具有使这些信息在合适的时间、空间表达的能力。CES细胞不仅为研究胚胎早期发育和分化提供了一个模型<sup>[1]</sup>,而且为一种通过对基因组的遗传操作制备转基因鸡提供了有效载体,在胚胎发育基础、转基因禽类的生产以及家禽育种等方面具

有巨大的应用前景<sup>[2-3]</sup>。

目前仅在小鼠上获得真正意义上的胚胎干细胞,即具有参与生殖系传递能力的胚胎干细胞。1990年, Petitte等<sup>[4]</sup>从X期鸡胚明区分离得到的胚盘细胞能够发育为所有的体细胞组织<sup>[3]</sup>,且可作为受体胚胎的生殖种系。随后许多学者进行了大量相关研究,欲从胚盘细胞分离培养可长期传代的CES细胞系,但至今仍没有获得真正意义上的CES细胞<sup>[5-11]</sup>。目前,CES细胞主要由X期胚盘细胞和原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)两种途径分离,但前者获得的胚胎干细胞性腺嵌合低,而后者获得EG细胞操作复杂,均限制了胚胎干细胞的培养和应用<sup>[12]</sup>。

<sup>1</sup>Veterinary College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Veterinary Department, College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Biomedicine, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China; <sup>4</sup>College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Zhang Man-yu ★, Studying for master's degree, Veterinary College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China  
Linyizhangmanyu @163.com

Correspondence to: Deng Xian-bo, Master, Associate professor, Master's supervisor, Veterinary College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China  
xbdeng@scau.edu.cn

Correspondence to: Wang Bing-yun, Doctor, Professor, Master's supervisor, Veterinary Department, College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, Guangdong Province, China  
bywang63@163.com

Supported by: the National 973 Program of China, No. 2009CB941600\*, the National Natural Science Foundation of China, No. 31072101\*

Received: 2011-05-06  
Accepted: 2011-06-18

本实验采用滤纸纸环-发环的方法从X期鸡胚分离胚盘细胞, 并采用STO细胞作为饲养层和大鼠肝细胞(BRL)条件培养基(CM)+细胞因子作为离体培养体系对分离的胚胎干细胞进行培养, 以期找到适合鸡胚胎干细胞的高效分离方法与最佳培养体系, 为建立可无限增殖的鸡胚胎干细胞系提供试验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞观察实验。

**时间及地点:** 实验于2009-11/2011-02在佛山科学技术学院(北院)生物技术研究中心完成。

**材料:**

**实验动物、细胞系及试剂:**

试剂及仪器	来源
鸡受精蛋(麻黄鸡)	广东省食品企业集团有限公司南海种禽有限公司
STO(鼠胚成纤维细胞系)	武汉大学保藏中心(中国典型培养物保藏中心)
大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell, BRL-3A 细胞)	中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
Knockout-DMEM、β-巯基乙醇、L-谷氨酰胺、2.5 g/L 胰蛋白酶-0.05% EDTA 溶液、双抗、碱性成纤维细胞生长因子、干细胞生长因子	Invitrogen 公司
胎牛血清、高糖 DMEM、PBS	Gibco 公司
非必需氨基酸、核苷、DMSO、明胶等	Sigma 公司
白血病抑制因子	Millipore
BCIP/NBT 染色液	上海生工
丝裂霉素 C	Merk

**实验方法:**

**BRL细胞条件培养基的制备**<sup>[11-12]</sup>: 参照 van de Lavoie and Mather-Love, 孟春花等<sup>[13]</sup>的方法, 加以改进。BRL细胞铺满后, 加入条件培养基, 培养3 d, 收集培养液, -20 °C 储藏; 再重复2次, 共3次收集。在-20 °C 储藏, 使用前0.22 μm微孔滤膜过滤。获得的BRL-CM用于配制CES细胞完全培养基: 含体积分数80% BRL细胞条件培养基、体积分数10%FBS、2 mmol/L 谷氨酰胺、1x核苷、1x非必需氨基酸、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、1 000 IU/mL LIF、10 μg/L 碱性成纤维细胞因子、5 μg/L干细胞因子, 最后用KNOCKOUT™DMEM培养基补充到100%。

**STO饲养层细胞的制备:** STO细胞铺满后,

PBS洗2遍后加入含10 mg/L丝裂霉素C的培养液, 37 °C 孵育2.0~2.5 h。去掉培养基, PBS充分洗涤STO细胞4~6次, 以确保完全去除丝裂霉素C。胰酶消化约30 s, 制备单细胞悬液; 调整细胞至合适浓度, 接种于明胶包被的培养板中, 培养箱中培养, 24 h后可使用。观察, 若发现细胞过稀则补加丝裂霉素C处理过的细胞, 以保证细胞铺成单层, 能连成一片而没有间隙。同时, 饲养一大批STO细胞, 用终浓度为10 mg/L的丝裂霉素C处理过, 冷藏保存。

**鸡胚X期胚盘细胞的分离**<sup>[11, 14]</sup>: 参照 van de Lavoie and Mather-Love和戴建明等的方法, 并加以改进。使用纸环+发环法来分离获得胚盘细胞。取新鲜的种蛋(每次约10枚), 浸洗消毒。通风橱中, 打开鸡蛋, 鉴别胚胎在蛋黄上的位置, 将胚胎置于蛋黄上面; 用眼科剪剪破胚盘上部的浓蛋清, 将蛋清刮除干净, 露出干燥的蛋黄膜。将一小片中央穿孔的滤纸放置到蛋黄上, 直径约为5 mm, 使胚胎显露在孔的中央, 即可原位鉴定出鸡胚; 剪取胚盘, 浸入PBS中洗涤。使用发环操作胚盘, 除去蛋黄, 得到明区细胞。进一步清洗胚盘细胞。加入200 μL CES细胞培养基, 不使用胰蛋白酶消化, 直接吹打。将胚盘尽量吹散, 制成细胞悬液, 不必吹打到单细胞, 接种到丝裂霉素C处理过的STO饲养层细胞上<sup>[15]</sup>。尽量保持培养板平衡, 以避免细胞分布不均匀。置37 °C、培养箱中培养, 每24 h换液1次。

**CES细胞的培养与传代:** 观察胚胎干细胞的生长情况, 选择细胞集落生长良好, 隆起明显, 边缘清晰, 形态未分化的集落进行初次传代; 从培养板的一个孔中收集培养基用来传代, 等量分到2个新的孔中, 占最终容积的30%~50%。用无钙、镁PBS小心的清洗1次。谨慎的添加PBS以免松动和过早的除去CES细胞。加入新鲜的无钙、镁PBS, 37 °C 养箱孵育细胞8~10 min。在显微镜下观察, 细胞出现轻度的向上漂浮; 细胞集落边缘会呈现白色, 显的粗糙, 可见细胞集落与饲养层稍分开。去掉PBS。加入培养基, 吸管收集所有的细胞, 适度的吹打获得小细胞团, 将细胞分到2个新的孔中。或者用口吸管将边缘漂起的细胞集落吸出, 离心, 去上清。机械研磨, 再加胰蛋白酶, 消化2.0~3.0 min, 机械吹打。离心, 细胞移入ES细胞培养液中, 细胞团可分散为小细胞团悬液, 每24 h换液一半。

**CES细胞的鉴定**<sup>[12-16]</sup>: 参照安静, 戴建明和孟春花等<sup>[13-15]</sup>的方法。

<sup>1</sup> 华南农业大学兽医学院, 广东省广州市 510642; <sup>2</sup> 佛山科学技术学院生命科学院动物医学系, 广东省佛山市 528231; <sup>3</sup> 厦门大学生命科学院生物医学系, 福建省厦门市 361005; <sup>4</sup> 华南农业大学动物科学学院, 广东省广州市 510642

张曼玉★, 女, 1986年生, 山东省临沂市人, 汉族, 华南农业大学兽医学院在读硕士, 主要从事干细胞研究。  
linyizhangmanyu@163.com

通讯作者: 邓衍柏, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 华南农业大学兽医学院, 广东省广州市 510642  
xbdeng@scau.edu.cn

并列通讯作者: 王丙云, 博士, 教授, 硕士生导师, 佛山科学技术学院生命科学院动物医学系, 广东省佛山市 528231  
bywang63@163.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)45-08429-05

收稿日期: 2011-05-06  
修回日期: 2011-06-18  
(20110406005/W·W)

**主要观察指标:** ①鸡胚盘细胞分离的效率。②条件培养基与细胞因子对CES细胞培养效果的影响。③鸡胚盘细胞的生长观察。④CES细胞生长情况和鉴定结果。

**统计学分析:** 由第一作者应用SPSS 13.0统计软件进行统计分析, 指标以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

## 2 结果

**2.1 鸡胚盘细胞分离的效率** 实验比较了纸环法、发环法和药勺法等方法在分离胚盘时的效果。药勺法操作较难将胚盘从蛋黄中完全分离出来, 且易于丢失胚盘; 发环法分离胚盘操作复杂, 分离出胚盘成功率低; 单独使用纸环法, 取得的胚盘细胞杂质较多; 纸环+发环法联合使用时, 易于取得完整的胚盘, 且胚盘上几乎不附着蛋黄, 操作熟练, 成功率极高。见表1。

表1 不同分离方法对胚盘分离效率的影响  
Table 1 Effect of different separation methods on blastoderm separation efficiency

Blastoderm separation method	Average rate of embryos (%)
Filter paper wreath+hair wreath	75-85
Filter paper wreath	60-70
Hair wreath	35-45
Spoon isolation	35-45

**2.2 条件培养基与细胞因子对CES细胞培养效果的影响** 用含LIF等细胞因子的CES细胞完全培养液和不含细胞因子的培养液, 在STO细胞饲养层上培养鸡胚胎干细胞, 观察克隆生长情况。两种培养体系的细胞克隆数在第5代最多, 随后呈下降趋势。不含细胞因子的完全培养液只能将CES细胞培养到第7代, 而添加细胞因子的完全培养液可将CES细胞培养至25代; 添加细胞因子的培养体系的CES细胞克隆数明显多于未添加细胞因子的。见表2。

表2 条件培养基与细胞因子对CES细胞克隆培养的影响  
Table 2 Effect of conditioned medium (CM) and cytokines on chicken embryonic stem (CES) cell clones culture ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Number of CES cell clones	CES cell complete medium with 80%BRL-CM	CES cell complete medium with cytokines and 80%BRL-CM
Passage 4	20.3±2.2	37.9±8.7 <sup>a</sup>
Passage 5	23.3±4.5	45.6±6.7 <sup>a</sup>
Passage 6	15.4±6.7	40.5±5.1 <sup>a</sup>
Passage 7	9.8±4.2	32.2±3.9 <sup>a</sup>
Passage 8	0	28.4±2.5 <sup>a</sup>
Passage 25		7.3±2.8

*P* < 0.05, vs. CES cell complete medium with 80%BRL-CM

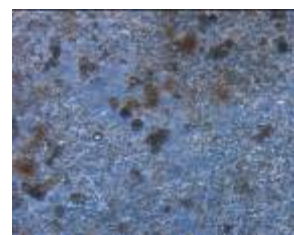
**2.3 鸡胚盘细胞的生长观察** X期鸡胚, 在蛋黄上放置一白色滤纸纸片且中间有一约5 mm直径的孔, 可原位

鉴定出鸡胚, 见图1。

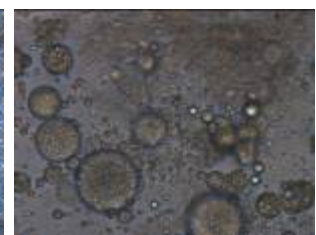


Figure 1 Isolation of stage X embryo by filter paper wreath method  
图1 纸环法分离X期鸡胚

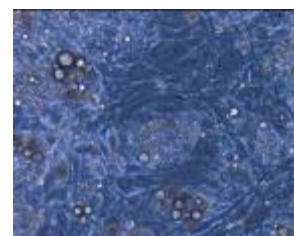
镜下观察胚盘细胞, 有单个细胞, 也有粘连在一起的小细胞团; 胚盘细胞形状规则, 呈圆形或椭圆形; 大小不均匀, 有的体积很大是小胚盘细胞的两三倍, 细胞表面粗糙; 还有很多脂滴以及糖原, 可见一些形状怪异的细胞和破裂的胚盘细胞, 甚至可见胚盘细胞不断释放出一些颗粒, 见图2a, b。第1周内的培养, 细胞形态会改变, 细胞会变的相对较小, 有一个很大的细胞核和一个突出的核仁。这些细胞很大且有很多糖原, 有一些在培养的第1周内就会损失掉。X期胚盘细胞培养24 h后会出现克隆, 见图2c, 48 h后克隆较明显, 多呈圆形或椭圆形, 细胞间隙不明显甚至观察不到单个细胞。三四天克隆生长明显, 五六天克隆进一步生长增大, 克隆立体感强, 边缘清晰, 多呈鸟巢状、葵花状等, 见图2d。



a: Blastodermal cells (×100)



b: Blastodermal cells (×400)



c: Blastodermal cells cultured for 1 d on feeders (×100)

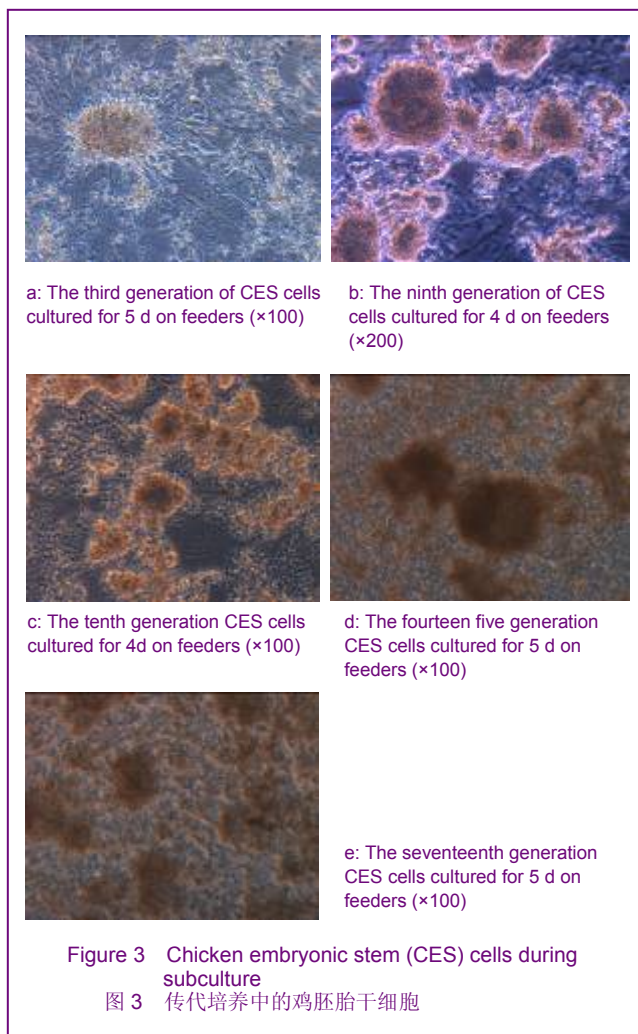


d: Blastodermal cells cultured for 5 d on feeders (×200)

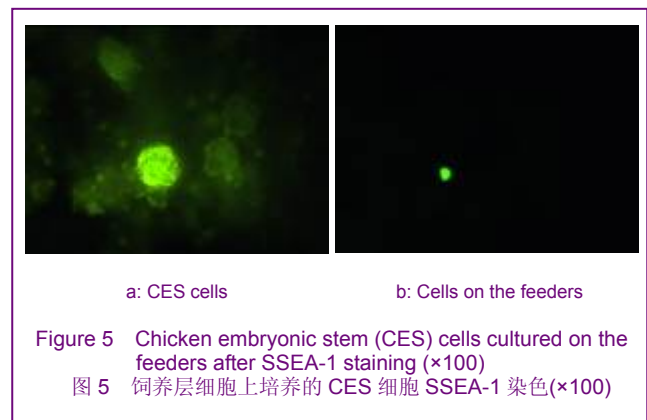
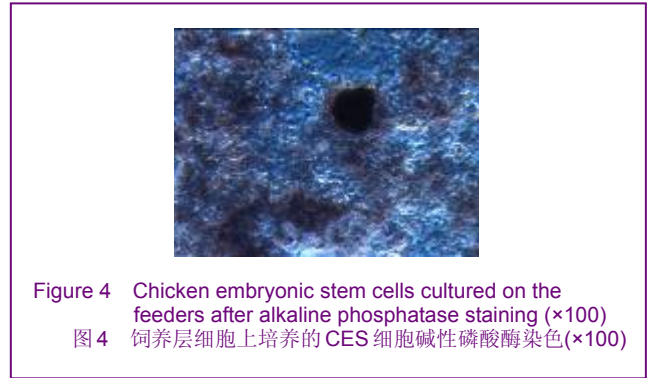
Figure 2 Chicken blastodermal cells  
图2 鸡胚盘细胞

**2.4 CES细胞生长情况和鉴定结果** 胚盘细胞接种后, 约需1周的培养, 方可看见CES细胞; 单个CES细胞在形态学上类似于mES细胞; 有一个大的细胞核和一个显著地核仁。培养板上, 细胞之间大的空腔, 说明CES细胞生长良好; 这些空腔先前是被STO饲养层细胞铺满,

但随着CES细胞的生长, STO细胞被CES细胞推开。实验中CES细胞逐渐习惯STO饲养层, 细胞集落呈现出一较为固定的形状, 且集落形状有些类似mES细胞, 见图3a。实验发现, CES细胞分化时会停止生长, 分化的细胞比CES细胞更为紧密坚固的附着在饲养层上。获得的CES细胞克隆, 立体感强, 呈鸟巢状, 细胞集落与饲养层界限清晰, 细胞连接紧密, 界限不清; 细胞集落上附着有大量的卵黄颗粒(镜下呈棕黑色颗粒)。多个克隆连接长成一片时, 会形成多种形态, 并不规则。随CES细胞传代次数增多, 细胞克隆趋向于鸟巢状, 见图3b~e)。



成功取得的完整胚盘, 接种到24孔板, 1个胚盘/孔, 其中约有50%的胚盘细胞可形成CES细胞克隆。实验中, 采用BRL-CM+饲养层培养体系, 来培养CES细胞时, 细胞可传代到六七代, 继续传代, 则大部分CES细胞处于分化状态; 采用BRL-CM+饲养层+细胞因子培养体系时, 观察到CES细胞可传代到25代。加细胞因子的培养体系, CES细胞克隆形成率明显高于未加细胞因子的体系。CES细胞克隆进行AKP染色呈蓝紫色, 已分化的细胞及饲养层细胞不着色, 见图4; CES细胞进行SSEA-1染色呈阳性反应, 细胞发出黄绿色荧光, 饲养层细胞及已分化细胞均呈阴性, 见图5a, b。



### 3 讨论

维持CES细胞未分化状态培养, 需要注意CES细胞生长培养的细节, 除此之外还要有来自经验的判断, 如判断何时传代、加培养基。每一培养都有其特异性, 时时的监测和警惕对维持CES细胞健康培养是必须的。Smith等<sup>[17]</sup>用BRL-CM阻止了无饲养层条件下培养ES细胞的自发分化。1994年, Petite以STO细胞为饲养层, 用BRL-CM培养CES细胞, 细胞在体外连续培养20代仍可保持ES细胞的诸多特性<sup>[18]</sup>。

本实验中, 当仅用BRL-CM培养CES细胞, 未加外源因子, BRL-CM在短期传代中也能很好的维持CES细胞全能性及核型正常; 添加外源因子后, CES细胞可延长培养到25代左右。可知, BRL-CM能提供分化抑制因子, 对CES细胞的体外培养有一定作用, 但要维持CES细胞的无限增殖和未分化状态, 只依靠BRL-CM提供的少量生长因子是不够的, 必须添加多种外源因子, 抑制细胞分化的同时还要促进细胞分裂增殖。

目前维持胚胎干细胞体外培养最有效的方法是采用饲养层细胞, 鸡和小鼠的初期胚胎成纤维细胞并不支持CES细胞的生长<sup>[19]</sup>。虽然CES细胞逐渐适应BRL细胞, 但相较于BRL细胞, CES细胞更加依附于STO细胞, 这使CES细胞传代困难。偶然极少的一些STO细胞虽经丝裂霉素C处理过, 却仍能继续生长。CES细胞相对于过度生长的STO细胞, 其增殖不够快; 最终, 在培养中

STO细胞会变为主要的细胞类型。因此,制备好的饲养层要密切观察是否还在继续生长。丝裂霉素C的处理时间要把握好,STO细胞是2~2.5 h;丝裂霉素C若清洗不净会对CES细胞产生毒害作用,因此操作中用无钙、镁的PBS清洗4~6次以保证无残存的丝裂霉素C。另外,STO细胞死亡时释放的细胞碎片和废物也会影响ES细胞的生长,不易获得纯的ES细胞进行遗传操作。高度集中的STO细胞会阻碍CES细胞的生长;太稀的饲养层,不能连成一片,空隙过多,不利于CES细胞贴壁附着,影响细胞克隆的形成,所以制备饲养层时,使细胞尽可能均匀的遍及培养板;状态良好的饲养层,是铺成单层的、连接成片的细胞。利用STO细胞制备的饲养层可很好的支持CES细胞生长。

细胞传代的比例和时间是影响细胞传代的重要因素。由实验可知,当CES细胞高密度接种且以小的细胞团来传代时,可很好地维持。在这种条件下,CES细胞每24 h就会加倍。培养细胞至80%~90%的汇合时,可按1:2的比例传代,这意味着每天都要传代。传代的比例可以改变,在不平坦的平皿培养且有分化现象。本实验采用1:1比例传代。当培养过于密集,到下1天以1:2的比例传代太过稀疏时,以2:3的比例传代;有时,CES细胞非常密集,实验就按1:3的比例传代。胰蛋白酶是影响CES细胞的另一重要因素。细胞传代时,胰蛋白酶的作用时间不能太长,反复使用胰酶,会引发分化。CES细胞是非常敏感的,且易分化;传代后,原培养板有一些CES细胞会不可避免的遗落下来,仍然附着在饲养层上,仍要添加新鲜培养基到以前的培养板,健康的CES细胞集落才会恢复生长。Van de Lavoie等<sup>[11]</sup>将发展这个方法作为一后援对策,保证CES细胞的备用细胞源。换液方式与次数也会影响CES细胞。鸡胚胎干细胞生长速度快,每天需换液1次,最好是半换或2/3换液。血清是影响SEC细胞体外培养的另一重要因素。实验中,STO细胞和BRL细胞的培养采用体积分数10%血清,BRL细胞条件培养基含体积分数5%血清,CES细胞培养基含体积分数15%血清;制备BRL细胞条件培养基、建系和维持ES细胞所使用血清为同一批次。支持鼠胚胎干细胞(mES细胞)生长的血清可能并不支持CES细胞的生长,在使用前需要评估,鸡血清也取代不了FBS。

总之,培养体系是CES细胞不分化且能长期培养的关键因素。邹清雁等<sup>[20]</sup>利用添加碱性成纤维细胞因子,LIF等因子的培养液,在鸡成纤维细胞饲养层上培养鸡胚盘细胞,将类ES细胞传至9代。本实验不仅优化了鸡胚胎的分离方法,获得完整且杂质少的胚盘,而且进一步优化了CES细胞体外培养体系,为建立能无限增殖的细胞系提供了试验依据,为发展和研究CES细胞以及生产转基因鸡奠定基础。

#### 4 参考文献

- [1] Stern CD. The chick: A great model system becomes even greater. *Dev Cell*. 2005; 8:9-17.
- [2] Laval F, Pain B. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Development*. 2010;52:101-114.
- [3] Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: A complimentary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev. Biol.* 1976;49: 321-337.
- [4] Petite J N, Clark M E, Liu G, et al. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*. 1990;108:185-189.
- [5] Etches RJ, Clark ME, Toner A, et al. Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture. *Mol Reprod Dev*. 1996;45:291-298.
- [6] Pain B, Clark M, Nakazawa H, et al. Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*. 1996;122:2339-2348.
- [7] Pain B, Chenevier P, Samarut J. Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. *Cells Tissues Organs*. 1999;165:212-219.
- [8] Petite JN. Isolation and maintenance of avian ES cells. In "Handbook of Stem Cells"(R. Lanza, ed.). Academic Press, San Diego. 2004:471-477.
- [9] Petite J, Yang Z. Culture of ESC - like cells from the chicken blastoderm. *Poult Sci*. 1993;72.
- [10] Petite JN, Liu G, Yang Z. Avian pluripotent stem cells. *Mech Dev*. 2004;121:1159-1168.
- [11] van de Lavoie MC, Mather-Love C. Avian Embryonic Stem cells. *Methods of Enzymology*. 2006;418:38-64.
- [12] Laval F, Acloque H, Bachelard E, et al. Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologu e) mediates the reprogramming of chicken stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol*. 2009;330(1): 73-82.
- [13] Meng CH, Zhang CS, Yang NN, et al. Xibao Shengwuxue Zazhi. 2008;30:532-536. 孟春花, 张传生, 杨娜娜, 等. 用BRL-3A条件培养基培养鸡胚胎干细胞的初步研究[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30:532-536.
- [14] Dai JM, He XH, Zhao WM, et al. Zhongguo Xvmu Zazhi. 2007; 43(19):15-19. 戴建明, 何先红, 赵文明, 等. 鸡胚胎干细胞的分离和培养[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(19):15-19.
- [15] Yang HY, Sun M, Tian ZQ, et al. Zhongguo Jiaqin. 2010;32(7):14-17. 杨海燕, 孙敏, 田智泉, 等. 鸡X期胚盘细胞分散培养与整胚培养比较初探[J]. 中国家禽, 2010, 32(7):14-17.
- [16] An J, Du LX. Dongwu Xuebao. 2003;49(5):698-703. 安静, 杜立新. 鸡胚胎干细胞的分离、培养与鉴定[J]. 动物学报, 2003, 49(5):698-703.
- [17] Smith AG, Hooper ML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol*. 1987;121:1-9.
- [18] Petite J, Yang Z. Method of Producing an avian embryonic stem cell culture and the avian embryonic stem cell culture produced by the Process. United States Patent. 1994;5:340,740.
- [19] Yang Z, Petite J N. Use of avian cytokines in mammalian embryonic stem cell culture. *Poult Sci*. 1994;73:965-974.
- [20] Zou QY, Zhang SL, Zheng QB, et al. Shanghai Shiyang Dongwu Kexue. 2000;20(4):206-209. 邹清雁, 张淑莲, 郑曲波, 等. 鸡胚胎干细胞饲养层培养体系的建立[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(4):206-209.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 国家 973 项目(2009CB941600)资助; 国家自然科学基金项目(31072101)资助。

**作者贡献:** 实验设计和实施为第一作者, 评估者为通讯作者。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**本文创新性:** 国内一般用全消化法或者挑克隆方法, 尚无使用 PBS 这一消化方法的。实验使用了 BRL 细胞条件培养基, 添加了细胞因子体系, 同时还使用了 STO 细胞作为饲养层。成功的将类鸡胚胎干细胞传代培养到 25 代。而国内传代到 10 代。