

台灣土雞生殖細胞中 *vasa* 基因的表現分析⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 劉瑞珍⁽²⁾ 戴謙⁽³⁾ 劉振發⁽²⁾
陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：95 年 2 月 9 日；接受日期：95 年 4 月 11 日

摘要

本研究目的在應用反轉錄－聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析台灣土雞組織 *vasa* 基因的 mRNA 表現。同時將 *vasa* 基因之 PCR 產物進行 DNA 序列分析，以確認 *vasa* 基因表現之正確性。將台灣土雞之睪丸、卵巢、始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs)、胸肌、心臟與肝臟等組織，應用套組萃取樣品的 mRNA 後，進行反轉錄以合成互補 DNA，再設計引子分析樣品中 *vasa* 基因的表現，同時以 *Gapdh* 基因做為分析之陽性對照。不同樣品之 cDNA 利用引子進行預先擴增後，再以 nested 引子進行第二次即時 PCR (real-time PCR) 偵測。試驗結果顯示，*vasa* 僅表現在生殖細胞譜系的睪丸，卵巢與 PGCs，而不表現在其他不同臟器組織。本研究結果顯示，*vasa* 基因的表現具有組織專一性，可作為鑑定台灣土雞生殖細胞譜系的特異分子標記。

關鍵詞：生殖細胞、即時聚合酶連鎖反應、*vasa* 基因。

緒 言

不論是哺乳動物或禽類，了解生殖細胞的分化特性及分子調控機制，有利於胚的發育生物學研究或遺傳資源之保存與應用。在家禽，由於缺乏良好的特異性分子標記，要探討家禽生殖細胞譜系 (lineage) 的緣起與其分化調控機制相當困難，因此對禽類早期胚內始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) 的緣起並不十分清楚。VASA 蛋白是屬於 DEAD-box 家族 ATP- 依存 (ATP-dependent) 的 RNA 解螺旋酶 (helicase) 成員，其構造具有演化保留性，部分脊椎動物的 *vasa* 基因已經被研究 (Fujiwara *et al.*, 1994; Komiya *et al.*, 1994; Komiya and Tanigawa, 1995)，而斑馬魚基因體中類似果蠅 *vasa* 的同源基因已經被選殖到，並已做為魚類生殖細胞起源之研究 (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997)。果蠅的 *vasa* 基因具有母方效應 (maternal-effect)，若發生基因突變將使得具有極性的前驅生殖細胞產生缺陷 (Hay *et al.*, 1988)。*vasa* 基因的 mRNA 在卵母細胞質中分佈均勻，卻特異性的表

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1315 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國科會南部科學園區管理局。

(4) 通訊作者，E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw。

現在生殖細胞譜系的胞質內；到了胚胎後續發育階段，*vasa* 僅表現在生殖細胞之中（Lasko and Ashburner, 1998）。

雞之 PGCs 因外形較大、細胞核偏一邊，與其他體細胞形態不同。PGCs 之細胞質內且含有豐富的肝醣，故應用 PAS（periodic acid-Schiff）溶液可將 PGCs 染成暗紅色。應用對 PGCs 具有特異性的細胞表面抗原，例如 EMA-1 或 SSEA-1 等單株抗體進行免疫細胞染色，可將 PGCs 加以區分（Ginsburg and Eyal-Giladi, 1989）。

分析早期動物胚內特定基因表現的方法中，反轉錄－聚合酶連鎖反應（reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR）是可行的技術之一。本研究應用 RT-PCR 技術，分析台灣土雞之生殖細胞與不同組織中 *vasa* 與長駐基因 *Gapdh* 的表現，同時進行 DNA 序列分析以確認 *vasa* 的表現，供做為家禽生殖細胞譜系或 PGCs 長期培養與鑑定時的重要參考指標。

材料與方法

I. 台灣土雞組織樣品之採集

本試驗所需之組織樣品係以經行政院農業委員會畜產試驗所動物實驗管理小組審核通過的實驗操作程序進行，在以人道的方式將 27 週齡畜試土雞公雞與 8 週齡母雞犧牲後，分別採集睪丸與卵巢，並採集胸肌、心臟、肝臟等組織樣品。樣品採集後隨即置入液氮中急速冷凍供萃取 mRNA 之用。

II. PGCs 的採集

利用雞胚 PGCs 於 X 期胚胎發育階段在血液中移行至生殖脊之特性，應用顯微操作方法，自 X 期雞胚之背大動脈採血並分離 PGCs。收集的 PGCs 經過磷酸緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）清洗後置入含細胞溶解液（lysis buffer, 含 0.8% Igepal；Sigma, USA）及 1 U/μl recombinant RNasin ribonuclease inhibitor（Promega, Madison, USA），放入液氮中急速冷凍，再貯存於 -70℃ 或 -196℃ 液氮中，以供後續萃取 mRNA 之用。

III. 樣品的 mRNA 萃取與反轉錄

自 -70℃ 冷凍櫃或 -196℃ 液氮取出樣品，利用 Quick Prep Micro mRNA 套組（Amersham, UK）萃取 mRNA，而後進行 RT-PCR。RT-PCR 的反應體積為 10 μl，內含樣品 mRNA、RT 緩衝液、SuperScript II RNase H⁻-Reverse Transcriptase（Invitrogen, CA）、Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 引子（Invitrogen, CA）、DTT 及 RNasin（Promega, USA）。反應條件為 42℃ 維持 1 h。製備之 cDNA 即可供 PCR 預先擴增之用。

IV. 預先擴增 PCR

參考 NCBI 中 *vasa* (*Gallus gallus* CvH mRNA, Accession No. AB004836) 與 *Gapdh* (*Gallus gallus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Accession No. NM_204305) 的 cDNA 序列設計預先增殖的引子。其中 *vasa* 之 forward 引子的序列設計為 5'-GAGGAGCAGGCGTGGATGGCTAACT-3'，reverse 引子則設計為 5'-GCCCAAAGATGCCAGGAAGTCTT-3'，預期之產物長度為 367 bp。*Gapdh* 引子序列 forward 引子：5'-CCGTTGACGTGCAGCAGGAA-3'、reverse 引子：5'-ATGTTGCTGGGGTCACGCTC-3'，預期產物為 283 bp。PCR 儀器使用 iCycler（Bio-Rad, USA）。

PCR 反應液中含有 0.4 μ M 引子、10 \times PCR buffer 與 *Taq* DNA 聚合酶等。PCR 反應體積 25 μ l。PCR 條件為 denaturation 94°C 3 min，之後為 10 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 30 sec。接著為 20 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 45 sec，而後為 10 循環之 94°C 1 min、54°C 50 sec、72°C 1 min，最後為 72°C 5 min extension；反應後維持於 4°C。

V. 即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)

利用初次 PCR 產物進行第二次 nested 之 real-time PCR。使用 SYBR 為螢光染劑。Real-time PCR 使用 ABI PRISM 7900HT 序列偵測系統 (Applied Biosystems, USA) 進行擴增偵測。PCR 反應液使用 25 μ l 之 1 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 進行。引子用量為 200 nM。分析 *vasa* 的 nested 引子序列 forward 引子：5'-CAGATTACCTTGCAGCCTTTCTTT-3' 與 reverse 引子：5'-CTGTTCCCTATCTCCATGAATGC-3'。分析 *Gapdh* 的 nested 引子序列 forward 引子：5'-TGACAAGTCCCTGAAAATTGTCA-3' 與 reverse 引子：5'-CAAGGGTGCCAGGCAGTT-3'。反應分別以睪丸、卵巢、PGCs 及各組織的 cDNA 做為模板。real-time PCR 的條件為 10 次 50°C 2 min、95°C 10 min 循環，而後為 40 次 94°C 15 sec、62°C 1 min 循環。結果由 PCR 擴增曲線判定結果。

VI. DNA 片段回收與選殖

利用膠體回收套組 (Qiagen, GmbH) 將睪丸與 PGCs 初次預先擴增的 *vasa* PCR 產物回收並進行 DNA 序列分析。

VII. DNA 序列分析與比對

回收自睪丸與 PGCs 的 *vasa* 基因產物利用序列分析儀 (ABI 3730, Applied Biosystems Inc., CA) 進行 DNA 序列分析。DNA 序列資料利用 Vector NTI (Infor Max Inc, USA) 進行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，以了解 *vasa* 基因之正確性。

結果與討論

本研究應用 RT-PCR 分析自性成熟之台灣土雞的睪丸、卵巢、PGCs、胸肌、心臟與肝臟組織中是否有 *vasa* 基因 mRNA 的表現。組織樣本以套組萃取其 mRNA，利用 RT-PCR 以反轉錄成為 cDNA；再設計引子分析樣品中 *vasa* 基因的表現，同時以 *Gapdh* 之基因表現做為陽性對照。不同樣品之 cDNA 利用引子進行預先擴增後，進行電泳分析，發現的所有組織均可以擴增出長 283 bp 的 *Gapdh* 基因產物 (圖 1A)。而 *vasa* 基因僅在生殖細胞譜系的睪丸、卵巢與 PGCs 中擴增出 367 bp 的 PCR 產物，未表現在肌肉、心臟或肝臟等非生殖細胞譜系的組織 (圖 1B)。為了確認生殖細胞譜系中的 *vasa* 產物是否正確，將電泳膠體上自睪丸與 PGCs 樣品經預先擴增所獲的 367 片段，應用膠體回收套組純化並進行 DNA 序列分析，並連線 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 將所得之 DNA 序列進行 BLAST 比對。結果顯示本研究所得之睪丸與 PGCs 的 *vasa* 基因序列與已發表之家禽 *vasa* mRNA 序列具有高度相似性 (Accession No. AB004836) (圖 2)。為了確認初次 PCR 產物之正確性，故使用初次 PCR 的產物做為模板，設計 nested 引子進行第二次的即時 PCR 分析。結果由初次 PCR 後產物的電泳分析 (圖 1) 顯示與即時 PCR 產物之擴增曲線 (圖 3B) 相符，確認 *vasa* 確實僅表現在睪丸、卵巢與 PGCs，而未表現在肌肉、心臟或肝臟 (圖 3B)。而陽性對照的 *Gapdh* 則表現在所有的組織樣品 (圖 3A)。 *Gapdh* 為常駐基因，提供本研究的陽性對照，證明各樣

品之 mRNA 萃取、cDNA 合成及 PCR 分析流程的正確性。由上述之研究結果證明 *vasa* 的表現具有生殖細胞與 PGCs 專一性，故可作為鑑定家禽生殖細胞或 PGCs 的特異性分子標記之用。

目前，有關 *vasa* 與相關基因的分子功能並不十分清楚，推測 VASA 蛋白可結合標的 mRNA 而參與生殖細胞分化的決定，如同參與調控果蠅胚胎形成、體節發育的轉譯共同調節因子 *Oskar* 與 *Nanos* 之轉譯作用的開始 (Hay *et al.*, 1990; Lasko and Ashburner, 1990)。透過基因反序 RNA 的顯微注射，證實 *Caenorhabditis elegans* *Vasa* homolog (*Glh*) 是生殖細胞染色體分離時不可獲缺的調控因子 (Gruidl *et al.*, 1996)。在 32 細胞期的非洲爪蟾蜍 (*Xenopus*) 胚，顯微注射抗-VASA 的抗體，致使蝌蚪期的 PGCs 數目降低 (Ikenishi and Tanaka, 1997)。顯示 *vasa* 基因家族是生殖細胞發育所必需，並在演化過程中保留下來。

孵化前後雞胚內 PGCs 變化一直為生殖研究的重點。家禽的 PGCs 最早在卵新月區 (germinal crescent) 被辨識出來。PGCs 是精子與卵子的前驅細胞，X 期之前的雞胚 PGCs 會由胚盤的透明區移行至下胚層，之後 PGCs 遷移到新的靜脈血管內並運輸到生殖脊 (gonadal ridges) 的周邊。雞胚中 PGCs 的檢出，可利用 PAS 染色，或應用細胞表面抗原進行免疫細胞染色而由外型加以區分。*vasa* 是調控生殖細胞發育的重要因子，表現具有專一性，故能做為生殖細胞譜系或 PGCs 鑑定上的有利分子標記。*vasa* 基因的選殖可供家禽生殖譜系細胞的分子標記研究用。Tsunekawa 等人 (2000) 應用 PCR 從雞睪丸 cDNA 庫選殖長為 2,985 bp 類似果蠅的 *vasa* 基因，稱為 *Cvh* (chicken *Vasa* homolog)。

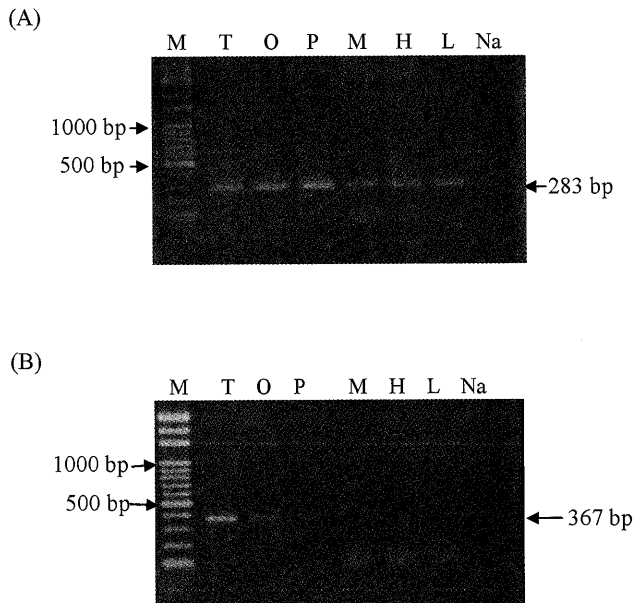


圖 1. 台灣土雞的睪丸 (T)、卵巢 (O)、始基生殖細胞 (P)、胸肌 (M)、心臟 (H) 與肝臟 (L) 中 *Gapdh* (A) 及 *vasa* (B) mRNA 之表現分析電泳圖。M 為 100 bp 標記。Na 為陰性對照。

Fig. 1. Electrophoresis analysis of *Gapdh* (A) and *vasa* (B) PCR products amplified from testis (T), ovary (O), primordial germ cells (P), muscle (M), heart (H), and liver (L) in Taiwan Native Chicken. M: 100 bp ladder marker. Na: negative control.

	1	50
AB004836	(1) ATGGAGGAGGACTGGGACACGGAGCTGGAGCAGGAGGCGGCAGCGGCTTC	
vasa-testis	(1) -----	
vasa-PGCs	(1) -----	
Consensus	(1)	
	51	100
AB004836	(51) CCAGGGGCGTTCTGAGGAGCAGGCGTGGATGGCTAACTCTGGCAGACCA	
vasa-testis	(1) -----GGGGGAA	
vasa-PGCs	(1) -----GGTCGGACA	
Consensus	(51) GG GGG AA	
	101	150
AB004836	(101) ACAGCCCATCCCTCCGCTTCTCCAGCAGACCAAGCAGCCCCCTGTCTGGC	
vasa-testis	(8) AC--GCCATCCCTCCGCTTCTC-AGCAGACCAAGCAGCCCCCTGTCTGGC	
vasa-PGCs	(11) AC--GCCATCCCTCCGCTTCTC-AGCAGACCAAGCAGCCCCCTGTCTGGC	
Consensus	(101) AC GCCATCCCTCCGCTTCTC AGCAGACCAAGCAGCCCCCTGTCTGGC	
	151	200
AB004836	(151) TTCCCAGGCAGACCAAACAGCCCCCTCTTTGGCTTTAGTCAGAATAAAGG	
vasa-testis	(55) TTCCCAGGCAGACCAAACAGCCCCCTCTTTGGCTTTAGTCAGAATAAAGG	
vasa-PGCs	(58) TTCCCAGGCAGACCAAACAGCCCCCTCTTTGGCTTTAGTCAGAATAAAGG	
Consensus	(151) TTCCCAGGCAGACCAAACAGCCCCCTCTTTGGCTTTAGTCAGAATAAAGG	
	201	250
AB004836	(201) CTCACTTGGTGCTAATGAAGGACTTAACAGAAGTCTGCCTGTGCAGCATG	
vasa-testis	(105) CTCACTTGGTGCTAATGAAGGACTTAACAGAAGTCTGCCTGTGCAGCATG	
vasa-PGCs	(108) CTCACTTGGTGCTAATGAAGGACTTAACAGAAGTCTGCCTGTGCAGCATG	
Consensus	(201) CTCACTTGGTGCTAATGAAGGACTTAACAGAAGTCTGCCTGTGCAGCATG	
	251	300
AB004836	(251) ACATTGGAGGATATTCTGGGAGCAGAGAGTCTGTTGTACGTCAAAACAGA	
vasa-testis	(155) ACATTGGAGGATATTCTGGGAGCAGAGAGTCTGTTGTACGTCAAAACAGA	
vasa-PGCs	(158) ACATTGGAGGATATTCTGGGAGCAGAGAGTCTGTTGTACGTCAAAACAGA	
Consensus	(251) ACATTGGAGGATATTCTGGGAGCAGAGAGTCTGTTGTACGTCAAAACAGA	
	301	350
AB004836	(301) GAAAGATCAACCAGTGACTAGATTGGTAGAGGGAGGAGTTCTGGAAGCAG	
vasa-testis	(205) GAAAGATCAACCAGTGACTAGATTGGTAGAGGGAGGAGTTCTGGAAGCAG	
vasa-PGCs	(208) GATGATCAACCAGTGACTAGATTGGTAGAGGGAGGAGTTCTGGAAGCAG	
Consensus	(301) GAAGATCAACCAGTGACTAGATTGGTAGAGGGAGGAGTTCTGGAAGCAG	
	351	400
AB004836	(351) AGATTTTCAAGAGAGGAACTCTGCAAATGATCCTGGTATGCAAGATCAAG	
vasa-testis	(255) AGATTTTCAAGAGAGGAACTCTGCAAATGATCCTGGTATGCAAGATCAAG	
vasa-PGCs	(258) AGATTTTCAAGAGAGGAACTCTGCAAATGATCCTGGTATGCTAGATCAAG	
Consensus	(351) AGATTTTCAAGAGAGGAACTCTGCAAATGATCCTGGTATGCAAGATCAAG	
	401	450
AB004836	(401) GTTTTAGAAGAGTTCCTGGCATCTTTGGGCAAGCAAGTGTTTAACAGT	
vasa-testis	(305) GTTTTAGAAGAGTTCCTGGCATCTTTGGGCCA-----	
vasa-PGCs	(308) GTTTTAGAATAGTTCCTGGCATCTTTGGGCAATT-----	
Consensus	(401) GTTTTAGAAGAGTTCCTGGCATCTTTGGGCCA	

圖 2. 台灣土雞睪丸與 PGCs 分析 *vasa* 基因的 PCR 產物回收後之 DNA 序列分析與 BLAST 比對。

Fig. 2. DNA sequences and BLAST analysis of *vasa* PCR-products amplified from testis and PGCs of Taiwan Native Chicken.

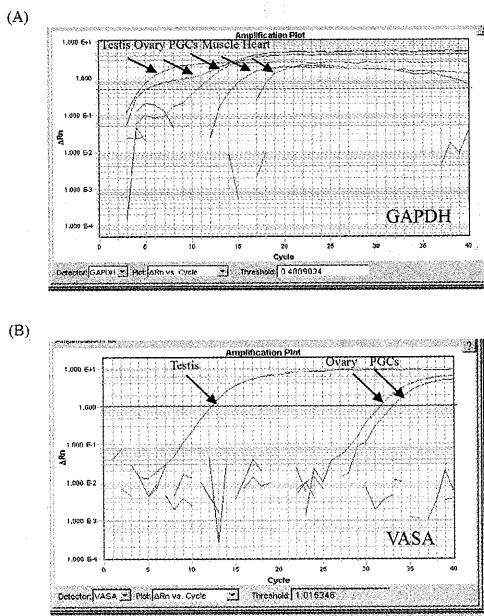


圖 3. 土雞睪丸、卵巢、始基生殖細胞 (PGCs)、肌肉與心臟組織中 *Gapdh* (A) 及 *vasa* (B) 之初次 PCR 產物做為模板進行 nested 即時 PCR 分析的擴增曲線。

Fig. 3. The nested real-time PCR amplification plots of *Gapdh* (A) and *vasa* (B) from testis, PGCs, muscle and heart of Taiwan Native Chicken.

Cvh 與果蠅的 *vasa* 基因具有高度相似性，依據 DNA 序列轉譯的開放讀框 (open reading frame, ORF)，*CVH* 是由 663 個胺基酸組成，內含 8 個可能為 DEAD-box 家族成員的特異保留區。雞的 *VASA* 蛋白與大鼠、小鼠、斑馬魚及非洲爪蟾等脊椎動物的 *VASA* 比較，相似度分別達 52、50、49 與 45%。雞生殖細胞發育過程，*CVH* 僅表現在精細胞的細胞質，未表現在 Leyding 細胞與 Sertoli 細胞。當精原細胞發育成圓形精細胞時，*CVH* 蛋白質強烈表現，到了轉型成為伸長的精細胞期則表現降低。在成熟母雞的卵巢，*CVH* 分佈於未成熟的卵母細胞質，並強烈表現在周邊的初級卵子中，而隨著濾泡的生長 *CVH* 的表現逐漸減弱 (Tsunekawa *et al.*, 2000)。

雞的 *CVH* 是屬於 DEAD-box 的家族成員之一，由 DNA 推測其胺基酸的組成，認為 *CVH* 蛋白質含有 8 個 ATP-結合區、ATP 水解區、RNA 結合區與 RNA 去纏繞 (unwinding) 保留區 (Pause and Sonenberg, 1992; Pause *et al.*, 1993)。CVH 蛋白質的胺基酸序列在起始與結束處出現的 Trp-Glu-Asp (WED) 序列，或供 RNA 結合的 Arg-Gly-Gly (RGG) 序列，或 N-末端區的 RGR、RGA 或 RGP 等序列均為 *vasa* 家族成員的特有序列 (Kiledjian and Dreyfuss, 1992)。

在果蠅，已經確認 *Oskar*、*vasa*、*Nanos* 與 *Tudor* 等轉譯因子參與前驅生殖細胞與極細胞的形成 (Rongo and Lehmann, 1996) 作用，其中以 *vasa* 的研究較為詳盡。果蠅配子的 *vasa* 剔除，將造成卵母細胞分化異常等多種缺陷 (Lasko and Ashburner 1990; Tomancak *et al.*, 1998; Styhler *et al.*, 1998)。

包括小鼠、大鼠與人類等動物的類 *vasa* 基因經過分子選殖分析比較，顯示結構的高度保留性 (Raz, 2000)。vasa 的表現是動物生殖細胞譜系最可靠的分子標記。比對小鼠、大鼠與人類的 *vasa* 蛋

白質，3 種動物間胺基酸序列具有高度相似性。核心序列中有 ATP 結合、ATP 水解、RNA 結合、RNA 去纏繞等作用的保留區。種別間 VASA 蛋白質的細微差異在於 N 端約 1/4 處與 C 端延伸的 5-10 個胺基酸 (Schmid and Linder, 1991)。

小鼠胚的 PGC 於受精後 6.5 天 (dpc) 位於外胚層的近側邊，7.5 dpc 移到胚外中胚層的原條部後側，8.5 dpc 囊胚內 ICM 的幹細胞未測得 mouse *vasa* homolog (MVH) (Toyooka *et al.*, 2000)，9.5 -10.5 dpc 胚的腸系膜細胞可測到低量的 MVH 表現，PGCs 在 10.5 dpc 到達生殖脊，生殖細胞強烈表現 MVH，之後會持續表現直到減數分裂後的生殖細胞形成。*Mvh* 突變的小鼠出現繁殖性能的缺陷，雄性突變小鼠的睪丸無法產生精子，減數分裂前期即停止分化並步入細胞凋亡之途。PGC 的增殖顯著受到阻礙，顯示失去 *Mvh* 的功能將造成雄性小鼠生殖細胞在增殖與分化上的缺陷 (Tanaka *et al.*, 2000)。哺乳動物的精子生成，生殖細胞因細胞凋亡而刪除估計將致使原本可以成為成熟精子潛力的細胞數量降低 25-75%。因欠缺 *Mvh* 的小鼠睪丸所造成的細胞凋亡，顯示 *Mvh* 突變缺陷發生在精子生成早期。因此，*Mvh* 對於減數分裂前期起始細胞染色體的重新排列扮演關鍵的角色。

本試驗自畜試土雞採集睪丸、卵巢、PGCs、胸肌、心臟與肝臟等組織，萃取 mRNA 之後，進行反轉錄為 cDNA，供 *vasa* 與 *Gapdh* 二種基因的表現分析之用。利用更敏感精確的即時 PCR 分析，進一步確認基因的表現，證實可以提升家禽生殖細胞與 PGCs 檢測的準確性，可供做家禽生殖細胞譜系或 PGCs 長期培養與鑑定時的重要參考指標。

致謝

感謝生理組李秀美小姐與周佳樂先生協助培養始基生殖細胞與採集試驗樣品，特致謝忱。

參考文獻

- Fujiwara, Y., T. Komiya, H. Kawabata, M. Sato, H. Fujimoto, M. Furusawa and T. Noce. 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 12258-12262.
- Ginsburg, M. and H. Eyal-Giladi. 1989. Primordial germ cell development in cultures of dispersed central disks of stage X chick blastoderms. *Gamete Res.* 23 : 421-427.
- Gruidl, M. E., P. A. Smith, K. A. Kuznicki, J. S. McCrone, J. Kirchner, D. L. Roussell, S. Strome and K. L. Bennett. 1996. Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 13837-13842.
- Hay, B., L. Jan and Y. Jan. 1988. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP dependent helicases. *Cell* 55 : 577-587.
- Hay, B., L. Jan and Y. Jan. 1990. Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 109 : 425-433.
- Ikenishi, K. and T. S. Tanaka. 1997. Involvement of the protein of *Xenopus vasa* homolog (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev. Growth Differ.* 39 : 625-633.
- Kiledjian, M. and G. Dreyfuss. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* 11 : 2655-2664.

- Komiya, T. and Y. Tanigawa. 1995. Cloning of a gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 : 405-410.
- Komiya, T., K. Itoh, K. Ikenishi and M. Furusawa. 1994. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 162 : 354-363.
- Lasko, P. F. and M. Ashburner. 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335 : 611-617.
- Lasko, P. F. and M. Ashburner. 1990. Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.* 4 : 905-921.
- Olsen, L. C., R. Aasland and A. Fjose. 1997. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66 : 95-105.
- Pause, A. and N. Sonenberg. 1992. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11 : 2643-2654.
- Pause, A., N. Methot and N. Sonenberg. 1993. The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell Biol.* 13 : 6789-6798.
- Raz, E. 2000. The function and regulation of *vasa*-like gene in germ-cell development. *Genome Biol.* 1 : reviews 1017.1-1017.6
- Rongo, C. and R. Lehmann. 1996. Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet.* 12 : 102-109.
- Schmid, S. R. and P. Linder. 1991. Translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases. *Mol. Cell Biol.* 11 : 3463-3471.
- Styhler, S., A. Nakamura, A. Swan, B. Suter and P. Lasko. 1998. Vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* 125: 1569-1578.
- Tanaka, S. S., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama and T. Noce. 2000. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes & Development* 14 : 841-853.
- Tomancak, P., A. Guichet, P. Zavorszky and A. Ephrussi. 1998. Oocyte polarity depends on regulation of gurken by Vasa. *Development* 125 : 1723-1732.
- Toyooka, Y., N. Tsunekawa, Y. Takahashi, Y. Matsui, M. Satoh and T. Noce. 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech. Dev.* 93 : 139-149.
- Tsunekawa, N. M. Naito, Y. Sakai, T. Nishida and T. Noce. 2000. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127 : 2741-2750.
- Yoon, C., K. Kawakami and N. Hopkins. 1997. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124 : 3157-3165.

Expression analysis of *vasa* gene in germ cells of Native Taiwan Chickens ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau ⁽²⁾, Lee-Ching Tsai ⁽²⁾, Jui-Jane Liu Tai ⁽²⁾, Jenn-Fa Liou ⁽²⁾, Chein Tai ⁽³⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾ ⁽⁴⁾

Received : Feb 9, 2006 ; Accepted : April 11, 2006

Abstract

The purpose of this study was to investigate the transcription of *vasa* gene in gonads, PGCs, and various organs collected from Taiwan native chickens. The mRNAs from samples were purified and the cDNA was obtained by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to measure the expression of *vasa* gene. In order to further verify these PCR products, the real-time PCR products specific to *vasa* was subjected to DNA sequencing. The expression of *Gapdh* housekeeping gene was detected for positive control. The results showed that the expression of *vasa* gene could only be detected in testes, ovaries and PGCs, but not in muscle, heart or liver of Taiwan Native Chickens.

The results demonstrated that RT-PCR technique was a valuable tool for the analysis of important genes in germline lineages. This system could be used in the development of reliable molecular markers for screening avian germ-cell lineage.

Key words: Germ-cells, Gene analysis, *vasa* gene.

(1) Contribution No. 1315 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Southern Taiwan Science Park Administration, National Science Council, Sinshih, Tainan 741, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding Author, Email: lrchen@mail.tlri.gov.tw