

家禽始基生殖細胞之冷凍保存⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 劉瑞珍⁽³⁾ 張家語⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：110 年 8 月 31 日；接受日期：111 年 3 月 28 日

摘 要

本試驗之目的在探討家禽始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 之冷凍保存方法，以了解利用超低溫方式冷凍保存家禽 PGC 之效果。試驗中分別探討以可程式降溫儀 (WEST-4400) 或簡易商用冷凍盒 (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container) 之不同冷凍設備，或在不同的雞血清 (chicken serum, CS) 添加濃度下 (10 – 90%)，以及不同的解凍方式 (A：解凍後以 3 倍體積逐滴加入含 10% CS 之 M199 (Medium 199)，B：直接添加含 10% CS 之 M199，C：直接添加含 0.5 M 蔗糖之 M199) 下對家禽始基生殖細胞之冷凍保存效果。結果顯示在以 M199 + 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) 為抗凍劑，冷凍體積為 1 mL/ 瓶時，配合使用可程式降溫儀每分鐘降 1°C 時，細胞存活率為 10 – 30%，優於每分鐘降 0.33°C 之存活率 (低於 10%)。若是利用商用簡易冷凍盒，每分鐘降 1°C 之降溫條件下，PGC 解凍後存活率為 47 – 54%，顯著優於可程式降溫儀的冷凍效果。冷凍保存液中不同雞血清含量對始基生殖細胞之存活率並未有顯著之影響。而冷凍之 PGC 最佳解凍方式則為於 38°C 快速解凍後，以 3 倍體積逐滴加入含 10% CS 之 M199 溶液。綜觀上述，利用 Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers 進行 PGC 冷凍保存似為簡便可行的方式。

關鍵詞：家禽、始基生殖細胞、冷凍保存。

緒 言

利用家禽作為藥用蛋白質或抗體之生產有其先天上的優勢，因為家禽之世代間距短，每隻雞平均年產 250 個蛋，基因轉殖家禽大量繁殖可行性高，而且每一個蛋的蛋白中含 3 g 以上的蛋白質，每個蛋黃可以含有 400 mg 的蛋黃免疫球蛋白 (immunoglobulin in yolk, IgY)，更因為蛋白或蛋黃中蛋白質純化的過程也相當清楚，另外用雞胚來生產疫苗供人類使用已實施多年，因此雞蛋是一個理想的藥用蛋白質生產來源 (Sang, 1994)。一些生技公司 (如美國 TranXenoGen 及 Avigenics) 也開始研究如何以家禽作為基因轉殖的對象，以生產各類昂貴的藥用蛋白質或抗體。

始基生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) 為精子與卵的前驅細胞，目前是家禽基因轉殖之研究者認為很具潛力的一種轉殖途徑。依 Eyal-Giladi and Kochav (1976) 對雞胚胎發育期之定義，在 X 期時，PGC 位於上胚葉 (epiblast) (Eyal-Giladi *et al.*, 1981; Karagenc *et al.*, 1996; Kagami *et al.*, 1997)。雖然 PGC 在 X 期之前的來源尚未有定論，但 PGC 會由胚盤之透明區 (area pellucida) 移行至下胚葉 (hypoblast)，並且可以移至胚體外的卵新月 (germinal crescent) 區，在性腺發育完成之前就已存在，然後 PGC 再由 germinal crescent 移到生殖脊 (gonadal ridges)。在移行當中的 PGC 及生殖脊上之 PGC 皆可以利用 PAS (Periodic Acid-Schiff stain) 染色法被確認，最後 PGC 移至生殖脊後就會發育為卵或精子。

一些學者曾利用 PGC 之轉殖作成家禽之生殖細胞系嵌合動物 (Petitte *et al.*, 1991; Tajima *et al.*, 1993; Naito *et al.*, 1994; Kagami *et al.*, 1997)。由於家禽 PGC 在由 X 期胚胎發育至生殖脊之間有在血液中移行之現象，因此可在此期間取得，亦可自生殖脊中取得。自上述取得之 PGC 若移植到另一胚胎血管中，則移入之 PGC 將可隨血流移行至該胚生殖脊中，而可獲得生殖腺嵌合之嵌合體 (germ line chimera)。如此等移入之 PGC 為轉基因者，則有機會獲得生殖細胞中具有該基因轉殖之家禽。

除了小鼠以外，雞是目前唯一以生殖細胞系嵌合來傳遞轉殖基因 (transgene) 的成功案例。家禽是探討胚胎發育

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2698 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組退休。

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

及基礎研究的良好模式，因為家禽早期之胚發育易於掌握與觀察 (Dieterlen-Lievre, 1997)。家禽亦為一種具潛力的生物反應器 (bioreactor)，如果可以對蛋白質表現加以操控，禽蛋會是將來在生產醫藥治療產品上，很有用的生物工另外如果能產生具有抗病或具有某一特殊性能的家禽品系，則將會對家禽經濟生產很有幫助 (Etches and Gibbins, 1997)。

利用始基生殖細胞注射法生產嵌合家禽時，必須由孵化至 stage 26 – 27 之家禽胚胎生殖脊或由 stage 13 – 15 的家禽胚胎背大動脈中取出 PGC，分離後注入另一胚胎。每次操作均需配合受精及孵化狀況之微量改變 (如個體發育狀況、冷藏條件、氣溫變化或受精率高低等等)，常會發生 PGC 供應胚與接受胚時間配合之困難，或是操作時間過久之困擾。因此若能將 PGC 冷凍保存，則可以在有適當之接受胚時解凍 PGC 並進行注入。若是配合 PGC 體外培養系統之建立，將有助於含特定基因之生殖腺嵌合家禽之產生。此外，由於 PGC 同時帶有來自父母雙方的遺傳組成，如能藉由 PGC 之冷凍保存及轉殖來繁衍後代，將會是另一種理想的保存禽類遺傳組成方法。

家禽 PGC 之冷凍保存相關研究不多，Naito *et al.* (1994) 及 Tajima *et al.* (1998) 曾以二甲基亞砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 為冷凍保護劑以傳統緩慢降溫冷凍法來冷凍保存雞之 PGC，並在解凍後注入另一雞種後得到生殖細胞系嵌合之嵌合體。惟其並未嚐試利用其他抗凍劑或較簡便之快速冷凍方法來冷凍保存雞之 PGC，因此本研究擬探討利用各種方式冷凍保存雞之 PGC，以瞭解利用超低溫冷凍保存家禽 PGC 之效果，除做為未來提供產生家禽之生殖細胞系嵌合體之細胞來源外，並提供保存禽類遺傳組成之方法。

材料與方法

I. 試驗方法

(i) 始基生殖細胞之採集

本試驗使用之方法係參酌 Liou *et al.* (2012) 所敘述之方法，簡述於下：以孵化至第 29 – 31 階段 (Hamburger and Hamilton, 1951) 之畜試土雞胚胎為材料，將胚胎用鑷子取到裝有 15 – 20 mL HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Cat. 24020-117) 的 100 mm 組織培養皿中，移除頭部，再移到另一裝有 15 – 20 mL HBSS 的組織培養皿中，在解剖顯微鏡下移去其它內臟，取出附有白色性腺的一對完整中腎 (mesonephros) 移至不含鈣鎂離子的 PBS (phosphate buffered saline, HyClone, Cat.SH30256.01) 中，PBS 液面剛好蓋過中腎。之後再用鑷子取出性腺移至裝有 10 mL Trypsin-EDTA (0.25%) 的離心管中，以 Pasteur pipette 吸放方式進行混合置 38°C 水浴 10 分鐘，重複兩次，共 20 分鐘。之後以 800 × g 離心 5 分鐘，用 5 mL HBSS 清洗一次，再以 800 × g 5 分鐘離棄上清液，以 100 μL HBSS 懸浮細胞，再加入 900 μL 含有 10% 雞血清 (chicken serum, CS, Gibco, Cat.16110-082) 的 16% Ficoll (Cas. No:26873-85-8, Sigma Aldrich) 混合後，上層緩慢加入 200 μL 之 6.3% Ficoll，經 800 × g 離心 30 分鐘後，會有兩層密度不同的溶液分界，小心吸取約上層溶液至含有 10% CS 的 M199 (Medium199, Gibco, Cat.11150-059) 中，以 800 × g 離心 5 分鐘後，再清洗一次，之後用血球計數器，計算始基生殖細胞的數目及冷凍前存活率。

(ii) PGC 冷凍保存液之配製

以 M199 為基礎溶液，每 1 mL 冷凍保存液溶液中含有 10% DMSO (Cas. No:D8418, Sigma Aldrich) 及 10、30、50、70 及 90% 的 CS。

(iii) 冷凍步驟

1. 可程式降溫儀 (WEST-4400, ISE, Inc. USA) 冷凍保存步驟：

取懸浮於 M199 之新鮮 PGC 50,000 個，放入 1.8 mL 冷凍小管中並將其放置於 0°C 冰上，先加入定量 CS (10 – 90%) 並以 M199 調整最後體積為 0.9 mL，再加入 DMSO 0.1 mL 使最終濃度為 10%，立刻移至 WEST-4400，自 4°C 降到 -35°C (每分鐘降 0.33、1 或 2°C)，當溫度下降到 -35°C 持續維持 10 分鐘，再將冷凍小管直接放入液態氮中保存。

2. 簡易商用冷凍盒 (Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers, Thermo Fisher Scientific Inc.) 方式：

取懸浮於 M199 之新鮮 PGC 50,000 個，放入 1.8 mL 冷凍小管中放置於 0°C 冰上加入定量 CS (10 – 90%)，並以 M199 調整最後體積為 0.9 mL 加入 DMSO 0.1 mL 使最終濃度為 10% 立刻放入預先裝有異丙醇作為冷媒的 Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers 移到 -80°C 超低溫冷凍櫃中，貯存至少 4 小時候，再將冷凍小管移到液態氮中保存。本方法 PGC 冷凍之前處理流程與 WEST-4400 冷凍保存步驟相同，不同處僅在於本方法在移入液態氮中保存前，先將冷凍小管置放於裝有異丙醇作為冷媒的 Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers 並移到 -80°C 超低溫冷凍櫃中，貯存至少 4 小時。

(iv) 解凍方式

PGC 細胞於液態氮中冷凍保存一個月後，進行解凍。

1. 解凍方法 A：

依 Avarbock *et al.* (1996) 之方式進行，解凍步驟減述如下：冷凍小管自液態氮中取出放入 38°C 水浴槽內解凍，約 2 分鐘內完全解凍，將冷凍小管內容物移入 15 mL 離心管中，再逐滴加入含 10% CS 之 M199 溶液，邊加邊搖動離心管，加入的量約 3 倍冷凍液體積，以 800 × g 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入 2 mL 含 10% CS 之 M199 溶液，再以輕拍方式細胞打散成懸浮狀。隨後以 800 × g 離心 5 分鐘，去除上清液。以 trypan blue exclusion 方法計算存活率。

2. 解凍方法 B：

同 A 之方法，但改將細胞解凍後，直接加入 5 mL 之含有 10% CS 的 M199 溶液 800 × g，5 分鐘離心後。以 trypan blue exclusion 方法計算存活率。

3. 解凍方法 C：依 Kasai *et al.* (1980) 方法進行

同 A 之方法，但在解凍之細胞中直接加入 5 mL 之含 0.5 M 蔗糖之 M199 溶液，於室溫下靜置 2 分鐘，以 800 × g，5 分鐘離心，去除上清液，再加入 2 mL 含 10% CS 之 M199 溶液，再以輕拍方式將細胞打散成懸浮狀，隨後以 800 × g，5 分鐘離心，去除上清液。利用 trypan blue exclusion 方法計算存活率。

(v) 存活計數

由於 trypan blue 可透過死亡細胞之細胞膜而將細胞染成藍色，故常被用於判別細胞之死活。解凍離心後的細胞液取 10 μL 和 10 μL 0.4% trypan blue (Cat. 15250061, Thermo Fisher Scientific Inc.) 溶液混合後，用血球計數板 (hemacytometer) 計算 5 個 0.1 mm³ 體積內，活的細胞數和死亡的細胞數及其總數，得知其存活率。

$$\text{冷凍前或解凍後之存活率 (\%)} = \frac{\text{存活的 PGC}}{\text{存活的 PGC} + \text{死亡的 PGC}}$$

$$\text{冷凍解凍處理後之存活率 (\%)} = \frac{\text{解凍後之存活率 (\%)}}{\text{冷凍前之存活率 (\%)}}$$

II. 試驗處理

(i) 以 WEST-4400 在不同冷凍速率對土雞 PGC 冷凍保存之效果

如試驗方法中 I (iii) 1. WEST-4400 冷凍保存步驟搭配不同濃度之 CS (10、30、50、70 及 90%)，分別比較每分鐘降 0.33、1 或 2°C 之效果。解凍方式，如試驗方法中 I. (iv) 1. 解凍方法 A 所述。

(ii) 不同冷凍方式對土雞 PGC 冷凍保存之效果

同樣冷凍速率下，比較 WEST-4400 或 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 之冷凍保存效果。WEST-4400 之操作方式如試驗方法 I. (iii) 1. 中所述，惟冷凍降溫速率為每分鐘降 1°C。Nalgene Cryo 1°C Freezing container 之冷凍方式如 I. (iii) 2. 中所述。解凍方式，如試驗方法中 I. (iv) 1. 解凍方法 A 所述。

(iii) 冷凍保存液中不同雞血清含量對土雞 PGC 冷凍保存之效果

在稀釋液中分別加入不同之 CS (10、30、50、70 及 90%)，以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式加以冷凍保存並比較其效果。解凍方式，如試驗方法中 I. (iv) 1. 解凍方法 A 所述。

(iv) 不同解凍方法對 PGC 冷凍保存之效果

以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式，冷凍保存液中 CS 含量為 70% 之條件下，比較三種不同解凍方法的影響。

III. 統計分析

不同處理間細胞存活率以變方分析的 GLM 方法 (SAS, 2005) 分析。存活率先以 arc sine 轉換後再進行比較，並以 P < 0.05 判定為具有顯著差異。

結果與討論

I. 以 WEST-4400 在不同降溫速率對土雞 PGC 冷凍保存之效果

試驗結果顯示，以 WEST-4400 之冷凍方式來冷凍保存土雞 PGC 時，不論是每分鐘降 0.33、1 或 2°C，解凍

後 PGC 之存活率皆偏低 ($< 20\%$)，且保存液中添加 CS 濃度亦沒有影響 (圖 1)。不同的降溫速率 -0.33°C 、 -1°C 與 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的存活率分別為 $1.6 - 4.9\%$ 、 $3.9 - 15.6\%$ 和 $5.6 - 14.9\%$ 。因此以 WEST-4400 的冷凍方式，在上述 3 種不同降溫的降溫速率是以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上的存活率較好， $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 效果較差。

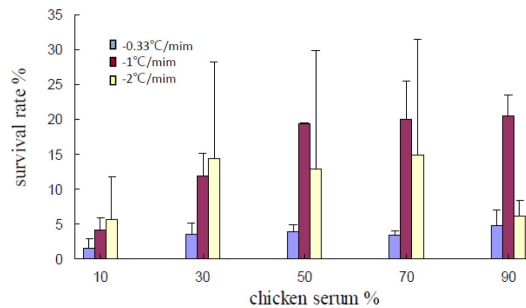


圖 1. 可程式降溫儀 (WEST-4400) 不同冷凍速率及雞血清濃度對家禽始基生殖細胞冷凍解凍後存活率之影響。

Fig. 1. The effects of cooling rate and chicken serum concentration on the survival rate of primordial germ cells frozen by automatic cooling facility (WEST-4400).

II. 不同冷凍方式對 PGC 冷凍保存之效果

本試驗分別以 WEST-4400 每分降 1°C 或 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式比較在不同的雞血清濃度添加下進行冷凍保存對 PGC 解凍後之存活率影響。結果顯示 PGC 在不同的血清濃度下，利用 WEST-4400 以每分降 1°C 的冷凍方式，PGC 解凍後之存活率為 $14 - 31\%$ ；以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式，PGC 解凍後之存活率為 $47 - 54\%$ 。結果兩種不同冷凍方式解凍後 PGC 之存活率，是以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式有較好的存活率 (圖 2)。若以保存液中含固定血清濃度 (70%)，以 WEST-4400 及 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 冷凍設備進行冷凍保存土雞 PGC 時，結果如圖 3 所示。WEST-4400 方式其存活率平均值為 $30.8 \pm 3.1\%$ ，而 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式之存活率為 $54.7 \pm 4.4\%$ ，兩者有顯著差異 ($P < 0.001$)，此二結果皆顯示在此試驗之保存條件下以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 冷凍效果比 WEST-4400 方式為佳。

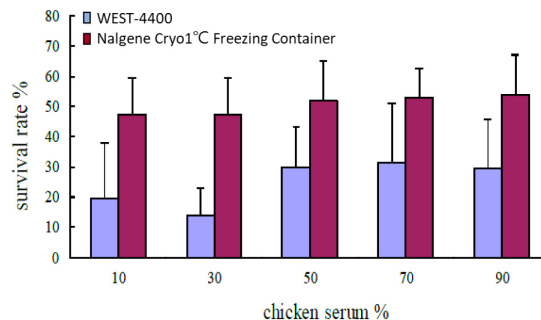


圖 2. 不同雞血清濃度下，不同冷凍設備對家禽始基生殖細胞冷凍解凍後存活率之影響。

Fig. 2. The effects of freezing facility on the survival rate of primordial germ cells with different chicken serum concentration.

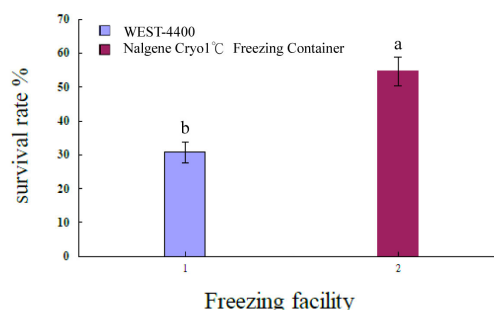


圖 3. 70% 雞血清濃度添加下，不同冷凍設備對家禽始基生殖細胞冷凍解凍後存活率之影響。

Fig. 3. The effect of freezing facility on the survival rate of primordial germ cells with 70% chicken serum. ab: Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

III. 冷凍保存液中不同雞血清含量對 PGC 冷凍保存之效果

在試驗處理 (I) 及 (II) 中雖然所探討之目的不同，但皆曾以不同 CS 濃度的保存液來作比較，其結果也有相似的結果，雖然 CS 含量在 50% 以上有較高之活率，但差異皆未達顯著標準 (圖 4)。

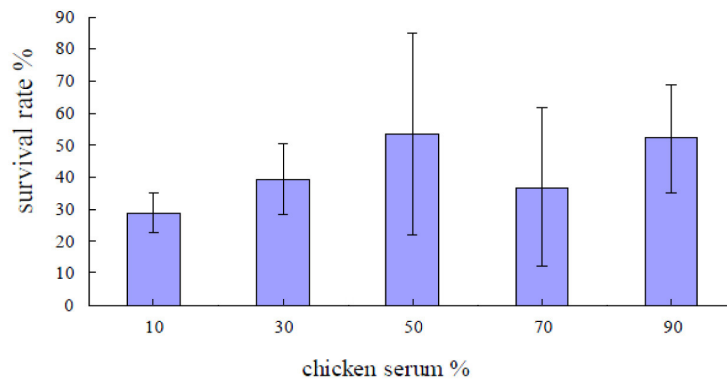


圖 4. 不同雞血清濃度對家禽始基生殖細胞冷凍解凍後存活率之影響。

Fig. 4. The effects of chicken serum content on the survival rate of primordial germ cell after frozen and thawed.

IV. 不同解凍方法對 PGC 冷凍保存之效果

冷凍保存液中含固定 CS (50%) 含量，以 Nalgene Cryo 1°C Freezing Container 方式進行 PGC 冷凍保存，同時比較不同解凍方式對 PGC 冷凍保存效果之影響，結果顯示，以 A 解凍法 (於 38°C 解凍後以 3 倍體積逐滴加入含 10% CS 之 M199 溶液) 為最佳 (圖 5)，平均存活率 $48.2 \pm 4.8\%$ ，B 解凍法 (於 38°C 解凍直接加入含 10% CS 之 M199 溶液) 其解凍後平均活率為 $35.8 \pm 2.1\%$ ，C 解凍法 (於 38°C 解凍直接加入含 0.5M 蔗糖之 M199 溶液) 解凍後平均存活率為 $38.3 \pm 1.4\%$ 。此結果提示 A 解凍法顯著地優於 B 及 C 法 ($P < 0.05$)，B 法與 C 法則無差異，因此以 3 倍體積逐滴加入的解凍處理有較高的存活率。

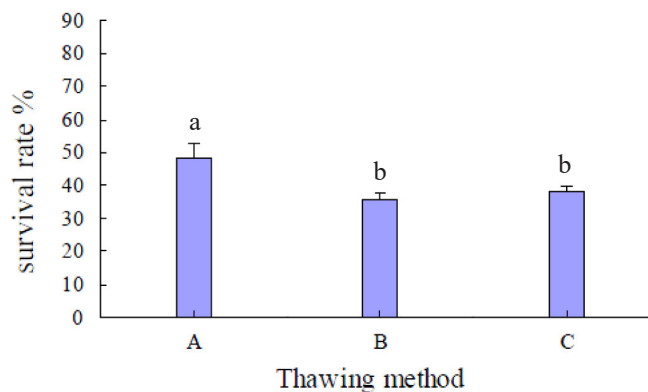


圖 5. 不同解凍方式對對家禽始基生殖細胞冷凍解凍後存活率之影響。

Fig. 5. The effects of thawing methods on the survival rate of primordial germ cells. A: after thawing, add M199 containing 10% CS dropwise at 3 times the volume, B: directly add M199 containing 10% CS, C: directly add M199 containing 0.5 M sucrose.

^{ab}: Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

以 WEST-4400 的冷凍程序來看， $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降溫速率，所得到的結果存活率都很低。可能的原因為此冷凍程序的起始溫度是 4°C ，假設植冰 (seeding) 的溫度是 -6°C ，從 4°C 降到 -6°C ，需要花上 30 分鐘，因此 PGC 必須暴露在 DMSO 下長達 30 分鐘，這麼長的時間應該會對細胞造成傷害，雖然這時已在低溫條件，DMSO 對細胞的傷害較低 (Pickering *et al.*, 1991)。如果以降溫速率為 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，從 4°C 降到 -6°C ，只需要花上 10 分鐘，暴露在 DMSO 中的時間縮短，對 PGC 造成傷害亦減少，這可從結果反映出存活率有逐漸的提高而得到證明。在使用 WEST-4400 做降溫的動作時，並沒有做植冰的動作，這樣使得此程序會在較低的溫度中進行自發的植冰 (spontaneous nucleation) 造成致死的傷害 (Trounson, 1990)。

於本研究中進行土雞 PGC 的保存測試過程，對每一組冷凍條件及解凍條件來說，各種不同的血清濃度對存

活率沒有統計上顯著的差異。不同的作者提出使用 90% 的 FBS (fetal bovine serum) 來冷凍豬或羊 PGC (Mueller *et al.*, 1999; Kuhholzer *et al.*, 2000)，也有作者用 10% CS 來冷凍雞的 cPGC (circular primordial germ cell) (Naito *et al.*, 1994) 或 gPGC (gonadal primordial germ cell) (Tajima *et al.*, 1998)，只有 Naito *et al.* (1994) 提到解凍後的存活率，其他的作者並沒有，因此我們無法得知到底那個血清濃度對冷凍解凍的存活率效果較好，所以比較了五組不同濃度的雞血清，結果並無顯著的差異。為何血清濃度的高低並不影響存活率，以 90% 雞血清來說，細胞外界是高張溶液，細胞在冷凍過程可以脫水的較完全，細胞較容易存活 (Mazur, 1984)，可是細胞存活率對其他的雞血清濃度，並無太大差異，可見在本試驗處理下，雞血清濃度改變所造成之效果對細胞存活率並不是主要的影響因素。Rizoset *et al.* (2003) 發現以不含血清之培養液冷凍牛胚時對細胞反而較有利，作者認為血清之添加，其中脂肪等成分會改變牛胚葉細胞之細胞膜微細構造，進而影響其抗凍性，甚至影響後續培養時各種基因表現。Pugh *et al.* (1998) 曾以含不同濃度胎牛血清之培養液和不同濃度牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 之培養液冷凍牛胚，比較牛胚冷凍解凍後培養之效果，發現以添加胎牛血清比對照組添加牛血清白蛋白顯著較差，推測其原因為血清之添加會改變胚胎細胞膜之通透性，或因為血清中脂肪會有過氧化 (peroxidation)，影響細胞膜的安定性。雖然本試驗土雞 PGC 之冷凍保存效果評估方法不同，無法觀察其後續培養的影響，是否會因保存液中含有大量血清脂肪而影響 PGC 細胞膜微細構造，進而影響其冷凍解凍後之存活率則有待探討。但顯然地，由於提供培養液添加用雞血清中成分之不穩定，添加血清之冷凍處理結果變異大，因而未有顯著性，此一現象表示 PGC 或胚胎之冷凍保存可能不宜如一般實驗室用細胞系冷凍保存之使用高濃度之血清，因為必須考慮其對後續培養的影響。

冷凍保存溶液為高張且非生理性，一般用於細胞保存之 10% DMSO 溶液其容積滲透濃度約為 1.4 Osm/L，細胞置於該溶液時會迅速脫水，而 DMSO 則緩慢滲透入細胞以重新達成平衡，如此造成細胞內外滲透壓差異可能使體積瞬間變化而導致細胞活性喪失。因此以 DMSO 作為細胞冷凍保存液時，通常在解凍後會立即潤洗或稀釋，因為該冷凍保存劑對冷凍後解凍之細胞仍可能造成傷害。由本研究進行土雞 PGC 冷凍後解凍之存活率結果顯示，以 A 解凍方法：使用三倍體積逐滴加入解凍法 (Avarbock *et al.*, 1996)、離心兩次的操作方式存活率最高。最可能的原因為等張溶液是緩慢加入，對高張溶液的細胞內部造成的滲透壓衝擊不會太大，細胞較不會脹破，且因離心兩次，DMSO 清洗較完全降低 DMSO 對細胞的毒性，因此存活率較高。由於逐滴加入，邊加邊搖離心管且又離心兩次較煩瑣，因此嘗試改用解凍後直接加入 5 mL 含 10% CS 的 M199、離心一次的方法，結果雖然比 WEST-4400 高，可是仍比逐滴加入來得低。推測可能是一次加足等張培養液，細胞滲透壓衝擊太大造成細胞死亡所致。

Kasai *et al.* (1980) 報告指出，再解凍過程中為了避免滲透壓衝擊 (Mazur, 1988)，採用直接加入 5 mL 含有 0.5 M sucrose 的 M199 進解凍；因為 Sucrose 大分子可在細胞外製造高滲透壓的環境，降低水分回流進入細胞的速度，以減少細胞水腫的傷害，故直接加入含 0.5 M sucrose 之 PBS，PGC 在解凍過程時，仍然能保持脫水狀態，一直到下一步以 PBS 移去 DMSO 過程時才會回到原來之體積，如此一來可避免大量水分在短時間進入細胞，成滲透壓急遽改變及細胞受 DMSO 毒害導致細胞死亡。但本試驗中發現直接加入 5 mL 含有 10% CS 的 M199 和直接加入 5 mL 含有 0.5 M sucrose 的 M199，所得的存活率是沒有顯著差異的。是否因為 Kasai (1980) 使用之方式為快速冷凍，細胞內冰晶含量與本試驗處理每分降 1°C 時不同以致效果不同，有待澄清。

本實驗只有初步的存活率測試，至於存活下來的 PGC，可否可在體外進行進一步的培養，或是可以注射到胚胎產製性腺嵌合家禽仍需待進一步測試。因為冷凍保護劑 DMSO，可能會造成細胞骨架 (cytoskeleton)、微小管 (microtubule) 和紡錘體 (spindle) 的改變 (Picton *et al.*, 2000)，造成胞器和分子在細胞內部運輸的改變影響 PGC 的分化、分裂和染色體。

家禽 PGC 的分離可自胚發育到 stage 10 – 12 時 (約在入孵後 30 – 32h)，透過血液循環系統中經由抽取背大動脈血液進行分離，由此階段自血液中分離的 PGC 稱為循環始基生殖細胞 (circulating PGC, cPGC)。另外亦可在發育到 stage 25 – 28 之胚胎性腺中分離，於此階段自性腺分離的 PGC 稱為性腺始基生殖細胞 (gonadal PGC, gPGC)。因自 stage 12 – 15 胚胎抽血方式分離 cPGC 較不容易，且每個胚胎能取得的 cPGC 數量亦較少，以 Zhao *et al.* (2003) 報告指出自 stage 12 – 15 雞胚胎分離 cPGC 的數目為 $83.3 \pm 6.5 - 135.6 \pm 6.9$ (每胚胎可抽取到血液為 3 – 8 μL ，cPGC 含量為 $10.7 \pm 0.8 - 23.5 \pm 1.7/\mu\text{L}$)，且有胚胎間與品種間的差異。相對的由 stage 25 – 28 之胚胎性腺中分離 gPGC 比較容易，且每胚胎能分離的 gPGC 數量也較多，每個胚胎可分離 706 – 800 個 gPGC (Allioli *et al.*, 1994; Mozdziak *et al.*, 2005)。Kim *et al.* (2004) 自 1×10^6 之混合胚胎性腺組織細胞中分離可獲得 $7,400 \pm 1,300$ 個 gPGC。為求得較多數量的 PGC，本研究是取發育到 stage 25 – 28 之胚胎性腺分離 gPGC，進行冷凍保存測試。1994 年 Naito 等人以分離自 stage 10 – 12 的 cPGC，進行冷凍有非常成功的存活率，其新

鮮分離所得的 cPGC 於冷凍前的存活率可達 100%；經使用 Bicell freezing vessel (與 Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers 之原理相同) 冷凍後，解凍的存活率約 94%。在 gPGC 冷凍研究 Moore *et al.* (2006) 嘗試比較收集不同胚胎數量 (5、10 和 20 個胚胎) 的 gPGC 混合後分別將其裝填 0.5 mL 麥管進行冷凍測試，結果指出解凍後的回收量，以麥管中裝填 20 個胚胎所分離的 gPGC 回收到的數量顯著高於 5 個胚胎。但是解凍後 gPGC 的死亡數量卻是裝填 20 個胚胎為最高；僅管如此在解凍後存活率還是以裝填 20 個胚胎 $67.8 \pm 2.9\%$ 高於 5 個胚胎 $60.3 \pm 2.8\%$ ($P < 0.05$)，20 個胚胎的解凍後有較高的存活率可能是因為 gPGC 於冷凍過程中呈現聚集且維持懸浮的狀態 (Gomperts *et al.*, 1994; D'Costa *et al.*, 2001)。由上述所示 cPGC 冷凍解凍的存活率是高於 gPGC，推測可能與細胞的大小有關 gPGC 的大小直徑約為 $10 - 25 \mu\text{m}$ (Meyer, 1960) 略大於 cPGC $11 - 22.21 \mu\text{m}$ (Fujimoto *et al.*, 1976)。另外 gPGC 是由性腺組織分離而得，在分離的過程中必須以 Trypsin-EDTA (0.25%) 進行處理且進行多次的離心的操作，這些流程可能對 gPGC 造成傷害，導致解凍後細胞存活率降低。另外在相同冷凍體積下不同的 gPGC 的數量亦可能影響解凍後的存活率，Moore *et al.* (2006) 研究中以 0.5mL 麥管裝填不同胚胎數量 (5、10 和 20 個胚胎) 收集 gPGC，進行個別胚胎 gPGC 解凍後的存活率比較，是以每根麥管裝填 10 個胚胎進行凍存的存活率最高。顯示在相同體積下裝填的細胞數量是有一定的極限。在有限的文獻中有關雞 PGC 冷凍保存包括冷凍源自胚盤的胚葉細胞 (Kino *et al.*, 1997; Pokorny, 2002)、cPGC (Yasuda *et al.*, 1992) 與 gPGC (Naito *et al.*, 1994; Tajima *et al.*, 1998、2003、2004)，在這些研究中並沒有明確指出 PGC 冷凍保存的最佳方法。本研究冷凍解凍後的 gPGC 平均最高為 54%，是低於上述 Moore *et al.* (2006) 和 Naito *et al.* (1994) 的研究果，推測可能與上述原因有關。

結 論

本試驗使用兩種冷凍方式，一是使用可程式降溫儀 WEST-4400，使用的降溫速率有 $-0.33^\circ\text{C}/\text{min}$ ， $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 和 $-2^\circ\text{C}/\text{min}$ (因機器本身限制， -25°C 之後實際降溫速率只有 $-1.7^\circ\text{C}/\text{min}$)，結果 $-0.33^\circ\text{C}/\text{min}$ 的降溫速率，解凍存活率普遍都在 10% 以下， $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 則可達 10 – 30%。二是利用 Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers 每分降 1°C 的冷凍方式，其解凍後存活率顯著優於可程式降溫儀的冷凍效果，存活率為 47 – 54%。冷凍保存液中不同雞血清含量對 PGC 之存活率並未有顯著之效果。最佳解凍方式為 38°C 快速解凍，三倍解凍體積逐滴緩慢加入的方式。

參考文獻

- Allioli, N., J. L. Thomas, Y. Chebloune, V. M. Nigon, G. Verdier, and C. Legras. 1994. Use of retroviral vectors to introduce and express the β -galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev. Biol.* 165: 30-37.
- Avarbock, M. R., J. B. Clayton, and R. L. Brinster. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat. Med.* 2: 693-696.
- D'Costa, S. D., S. L. Pardue, and J. N. Petitte. 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poult. Biol. Rev.* 12: 151-168.
- Dieterlen-Lievre, F. 1997. Avian models in developmental biology. *Poul. Sci.* 76: 78-82.
- Etches, R. J., and A. M. V. Gibbins. 1997. Strategies for the production of transgenic chicken. *Methods Mol. Biol.* 62: 433-450.
- Eyal-Giladi, H. and S. Kochav. 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. *Dev. Biol.* 49: 321-337.
- Eyal-Giladi, H., M. Ginsburg, and A. A. Fabarov. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morph.* 65: 139-147.
- Fujimoto, T., T. Menomiya, and A. Ukeshima. 1976. Observation of the primordial germ cells in blood samples from the chick embryo. *Dev. Biol.* 49: 278-82.
- Gomperts, M., M. Garcia-Castro, C. Wylie, and J. Heasman. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120: 135-141.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton. 1951. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- Kagami, H., T. Tagami, Y. Matsubara, T. Harumi, H. Hanada, K. Maruyama, M. Sakurai, T. Kuwana, and M. Naito. 1997.

- The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 48: 501-510.
- Karagenc, L., Y. Cinnamon, M. Ginsburg, and J. N. Petitte. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 19: 290-301.
- Kasai, M., K. Niwa, and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fertil.* 59: 51-56.
- Kim, J. N., M. A. Kim, T. S. Park, D. K. Kim, H. J. Park, T. Ono, J. M. Lim, and J. Y. Han. 2004. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 81-87.
- Kuhholzer, B., A. Baguisi, and E. W. Overstrom. 2000. Long-term culture and characterization of goat primordial germ cells. *Theriogenology* 53: 1071-1079.
- Liou, J. F., J. W. Shiau, J. J. Tailiu, C. Tai, L. R. Chen, and M. C. Chang. 2012. Culture of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken embryonic fibroblast (CEF) cells conditioned medium and In vivo migration. *J. Anim. Vet. Adv.* 13: 2196-2203.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Amer. J. Physio.* 247 (Cell Physiology 16), C125-C142.
- Mazur, P. 1988. Stopping biological time: The freezing of living cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 541: 514-531.
- Meyer, D. B. 1960. Application of period acid-Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technology* 35: 83-89.
- Moore, D. T., P. H. Purdy, and H. D. Blackburn. 2006. A Method for Cryopreserving Chicken Primordial Germ Cells. *Poult. Sci.* 85: 1784-1790.
- Mozdziak, P. E., J. Angerman-Stewart, B. Rushton, S. L. Pardue, and J. N. Petitte. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84: 594-600.
- Mueller, S., K. PELLE, N. Rieger, H. Petznek, C. Lassnig, U. Luksch, B. Aigner, M. Baetscher, E. Wolf, M. Mueller, and G. Brem. 1999. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 54: 244-254.
- Naito, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J. Reprod. Fertil.* 102: 321-325.
- Petitte, J. N., M. E. Clark, and R. J. Etches. 1991. Assessment of functional gametes in chickens after transfer of primordial germ cells. *J. Reprod. Fert.* 92: 225-229.
- Pickering, S. J., P. R. Braude, and M. H. Johnson. 1991. Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization. *Hum. Reprod.* 6: 142-143.
- Picton, H. M., S. S. Kim, and R. G. Gosden. 2000. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *Br. Med. Bul.* 56: 603-615.
- Pugh, P. A., A. E. L. Ankersmit, L. T. McGowan, and H. R. Tervit. 1998. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology* 50: 495-506.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. de la Fuente, M. P. Boland, and P. Lonergan, 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications from blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68: 236-243.
- Sang, H. 1994. Transgenic chicken methods and potential applications. *Trends Biotechnol.* 12: 415-420.
- SAS Institute. 2005. SAS User's Guide: Statics. Version 9.1 Edition. SAS Inc., Cary, NC. USA.
- Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1993. Production of germ line chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Theriogenology* 40: 509-519.
- Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J. Exp. Zool.* 280: 265-267.
- Tajima, A., G. G. Barbato, T. Kuwana, and R. H. Hammerstedt. 2003. Conservation of a genetically selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PCG) isolated by filtration method. *J. Poult. Sci.* 40: 53-61.
- Tajima, A., T. Minematsu, and M. Ohara. 2004. Production of germ-line chimeras by the transfer of cryopreserved gonadal germ cells collected from 7- and 9-day old chick embryos. *J. Anim. Sci.* 75: 85-88.
- Trounson, A. O. 1990. Cryopreservation. *Br. Med. Bull.* 40: 695-708.
- Zhao, D. F., H. Yamashita, M. Matsuzaki, T. Takano, S. I. chi, Abe, M. Naito, and T. Kuwana. 2003. Genetic factors affect the number of circulating primordial germ cells in early chick embryos. *J. Poult. Sci.* 40: 101-113.

Cryopreservation of poultry primordial germ cells ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou ⁽²⁾ Jui-Jane Tailiu ⁽³⁾ Chia-Yu Chang ⁽²⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Aug. 31, 2021; Accepted: Mar. 28, 2022

Abstract

The purpose of this study is to investigate the cryopreservation method of poultry primordial germ cells (PGC), so as to understand the preservation effect of poultry PGC. To investigate the effects of (1) using different freezing instruments, automatic cooling facility (WEST-4400) or simple commercial freezing boxes (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container); (2) adding different concentrations (10 – 90%) of chicken serum; or (3) adopting of different thawing methods on the cryopreservation of poultry PGC, (A: after thawing, add M199 containing 10% CS dropwise at 3 times the volume, B: directly add M199 containing 10% CS, C: directly add M199 containing 0.5M sucrose). The results show that by using programmable cooler, the cell survival rate after thawing was 10 – 30% at a cooling rate of 1 °C/min, which was better than that of 0.33 °C/min. When the commercial simple freezing box is used and the temperature is reduced by 1 °C/min, the cell survival rate after thawing is significantly better than that of the programmable cooler, and the survival rate is 47 – 54%. The difference of chicken serum content in the cryopreservation solution exhibits no significant effect on the survival rate of PGC. The best thawing procedure of frozen PGC is rapid thawing (< 1 minute) in a 38°C water bath. In summary it is feasible to use Nalgene Cryo 1°C Freezing Container to freeze PGC.

Key words: Poultry, Primordial germ cells (PGC), Cryopreservation.

(1) Contribution No. 2698 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Retired from Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw.