

ICS 65.020.30

CCS B 43

团 体 标 准

T/CAAA XXX-XXXX

家禽遗传资源保护技术规程 鸡原始 生殖细胞

Technical specifications for Conservation of Poultry Genetic
Resources—Chicken Primordial Germ Cells

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国畜牧业协会发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：扬州大学、全国畜牧总站、江苏省家禽科学研究所、浙江省农业科学院、浙江省畜牧技术推广与种畜禽监测总站、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、浙江光大农业科技发展有限公司、广西金陵家禽育种有限公司、江苏立华牧业股份有限公司、浙江振鸣禽业有限公司、广西富凤农牧集团有限公司、如东县狼山鸡种鸡场、扬州翔龙禽业发展有限公司、扬州市廷丰农牧发展有限公司。

本文件主要起草人：李碧春、牛英杰、杜桂林、陈国宏、韩威、王德前、应永飞、左其生、靳锴、陈继兰、孙研研、刘瑶、隋鹤鸣、刘莉君、易振华、黄超、程立力、娄起华、韦宗海、余洋、张吉发、张钰、李冰、翟飞。

家禽遗传资源保护技术规程 鸡原始生殖细胞

1 范围

本文件建立了鸡原始生殖细胞遗传资源保护操作流程，规定了工作区条件、基本要求、鸡原始生殖细胞采集、培养、冷冻保存和活体复原的技术要求，描述了鸡原始生殖细胞鉴定和档案记录的方法。

本文件适用于鸡原始生殖细胞的收集、培养、保存、复原和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5458 液氮生物容器

GB/T 14174 大口径液氮容器

GB/T 20014.10 良好农业规范 第10部分：家禽控制点与符合性规范

GB/T 40454 家禽孵化良好生产规范

NY/T 33 鸡饲养标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡原始生殖细胞 chicken primordial germ cell

从鸡胚盘（EGK.X期）、生殖新月区（HH 6期~8期）、血液（HH 13期~16期）或性腺（HH 25期~32期）中分离采集的、具有分化为成熟生殖细胞（精子或卵子）能力的生殖干细胞。

3.2

受体 recipient

接受原始生殖细胞（primordial germ cell, PGCs）注射的鸡胚胎及孵化后的“代孕”鸡，宜选用内源性生殖细胞缺陷鸡作为受体。

4 技术流程

鸡 PGCs 遗传资源保护的技术流程包括 PGCs 采集、培养、冷冻保存和活体复原。技术流程见图 1。

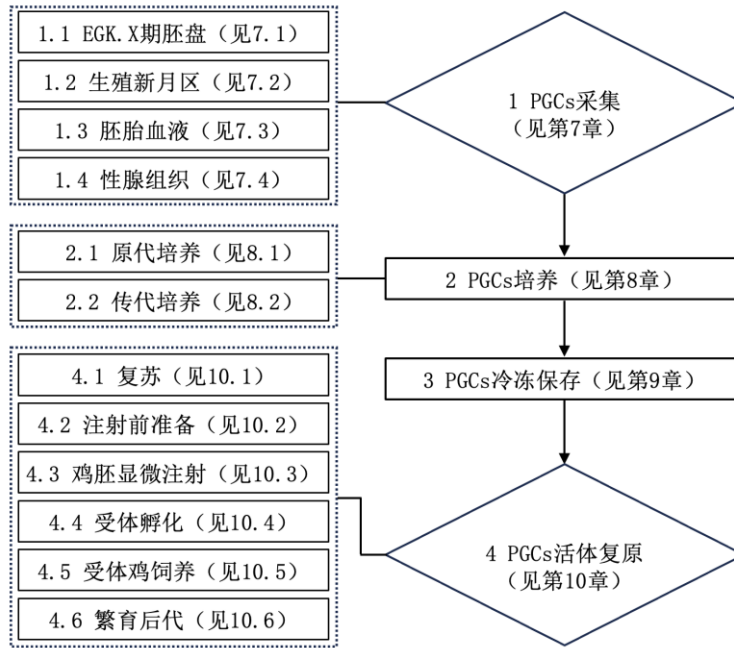


图1 技术流程图

5 工作区条件

无菌室洁净度应达到万级，超净工作台洁净度应达到百级。

6 基本要求

6.1 供体来源

- 6.1.1 《国家畜禽遗传资源品种名录》中所列的品种或配套系。
- 6.1.2 具有特殊表型变异的品系，如多趾、匍匐性状等突变群体。
- 6.1.3 培育的近交系和特定性状专门化选育品系。
- 6.1.4 商业化纯系。

6.2 数量

- 6.2.1 每个鸡品种（品系）应从不低于 30 个家系的鸡胚中采集和培养 PGCs，每个家系应建立不低于 2 个细胞系，雌雄各半。
- 6.2.2 若家系数量低于 30 个，应从全部家系的鸡胚中采集和培养 PGCs，每个家系应建立不低于 2 个细胞系，雌雄各半。
- 6.2.3 若无家系记录，每个鸡品种应建立不低于 60 个细胞系，雌雄各半。

6.3 健康状况

采集 PGCs 的种蛋或早期胚胎来源种群的健康状态应良好，无传染性 & 遗传性疾病，并符合《种用动物健康标准》的要求。

7 PGCs 采集

7.1 EGK. X 期胚盘

7.1.1 供体种蛋产出 24 h 内经 75%乙醇消毒后, 在蛋壳钝端敲开一直径 1.5 cm² cm 的小孔, 暴露胚盘。

7.1.2 去除蛋清, 将灭菌干燥滤纸环置于胚盘上, 沿环外缘剪下胚盘, 转移至 PBS 缓冲液中。

7.1.3 在体视显微镜下冲洗去除卵黄颗粒, 并将清洗后的胚盘转移至含 200 μL~300 μL PGCs 培养基的离心管中, 用移液器吹打制成单细胞悬液。

7.1.4 采用 300 g 离心 4 min, 弃去上清液, 加入 300 μL~400 μL PGCs 培养基重悬细胞。将细胞悬液转移至 48 孔板中, 每孔直接种来源于单个鸡胚的细胞。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

7.2 生殖新月区

7.2.1 供体种蛋参照 GB/T 40454 孵化 18 h~23 h 至 HH 4 期~6 期。

7.2.2 用 75%乙醇消毒后, 在蛋壳钝端敲开一直径 1.5 cm² cm 小孔, 暴露胚体。去除蛋清后, 将灭菌干燥滤纸环置于胚胎上, 确保胚胎前部位于环内, 沿环外缘剪下胚胎, 转移至 PBS 缓冲液。

7.2.3 在体视显微镜下冲洗去除卵黄颗粒, 并将清洗后的胚胎转移至含 200 μL~300 μL PGCs 培养基的离心管中, 吹打制成单细胞悬液。

7.2.4 采用 300 g 离心 4 min, 弃去上清液, 加入 300 μL~400 μL PGCs 培养基重悬细胞。将细胞悬液转移至 48 孔板中, 每孔直接种来源于单个鸡胚的细胞。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

7.3 胚胎血液

7.3.1 供体种蛋参照 GB/T 40454 孵化 50 h~55 h 至 HH 13 期~16 期。

7.3.2 用 75%乙醇消毒后, 在蛋壳钝端敲开一直径 1.5 cm² cm 的小孔, 暴露胚体。在体视显微镜下定位鸡胚背主动脉。用连接口吸管的显微玻璃针从背主动脉采集 1 μL~3 μL 血液。

7.3.3 将血液转移至含 300 μL~400 μL PGCs 培养基的 48 孔板中, 每孔直接种来源于单个鸡胚的细胞。

7.3.4 更换玻璃针后继续采集其余胚胎, 采集完毕后, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

7.4 性腺组织

7.4.1 供体种蛋参照 GB/T 40454 孵化 4.5 d~7.5 d, 至 HH 25 期~32 期。

7.4.2 用 75%乙醇消毒后取出胚体, 在体视显微镜下去除腹部覆盖器官, 暴露中肾, 用精细镊子从中肾内侧取下稍不透明的性腺, 转移至预先装有 300 μL PBS/BSA 溶液的离心管中。

7.4.3 收集性腺后每管加入 200 μL Accutase 酶, 37 °C 水浴消化 7 min。

7.4.4 用移液器吹打组织制成单细胞悬液, 采用 300 g 离心 4 min, 弃去上清液。每管加入 300 μL~400 μL PGCs 培养基重悬细胞, 接种至 48 孔板中, 每孔直接种来源于单个鸡胚的细胞。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。若体细胞多, 培养 3 h~5 h 待体细胞贴壁后, 轻轻晃动培养板, 收集未贴壁细胞及上清液, 转移至新孔中继续培养。

8 PGCs 培养

8.1 原代培养

8.1.1 培养 1 d~2 d 后可见典型 PGCs，直径一般介于 15 μm ~20 μm ，呈悬浮或半贴壁生长。每 2 d~3 d 更换 1/3~1/2 体积的 PGCs 培养基。

8.1.2 换液时，将培养板在超净工作台内静置 5 min~7 min，用移液枪从液面最上层轻轻吸走上清液，避免吸到下层细胞，弃去 1/3~1/2 原培养基后，加入等量新鲜预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PGCs 培养基。

8.1.3 连续培养 30 d~60 d，待细胞汇合度 80%~90% 时传代。

8.2 传代培养

8.2.1 48 孔板中细胞汇合度达 80%~90% 时，用移液枪轻柔吹打孔板底部，使细胞脱离，转移至 24 孔板继续培养。

8.2.2 在 24 孔板或更大孔板培养期间换液时，应将细胞从培养板底部吹起并转移至离心管。若细胞聚团形成大团块，宜使用细胞滤器过滤。

8.2.3 采用 300 g 离心 4 min 后，弃去上清液，加入新鲜预热的 PGCs 培养基，轻柔吹打制成单细胞悬液，按 1:2~1:3 的比例接种于新孔板。

8.2.4 后续根据细胞生长情况换液传代，待汇合度达 80%~90% 时进行传代或冻存。

9 PGCs 冷冻保存

9.1 待 PGCs 汇合度达 80%~90% 时收集细胞，加入操作液制成单细胞悬液，细胞密度宜控制在 1×10^6 个/毫升。

9.2 向细胞悬液中逐滴缓慢加入等体积冻存液，边加边轻轻混匀，用吸管将 1 mL 细胞悬液分装至规格为 2.0 mL 的无菌冻存管中，严密封口。

9.3 冻存管标记品种、细胞名称、细胞系编号、冻存日期。用于集中存放冻存管的储存盒标记品种、细胞名称、管数、制作单位。

9.4 将标记好的冻存管立即移入程序降温冻存盒，置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中冻存 8 h~12 h。初步冻存后，迅速将冻存管转移至预先标记好的储存盒中，并立即移入液氮中长期保存。

9.5 贮存容器应符合 GB/T 5458、GB/T 14174 的要求。

9.6 每个细胞系应冻存不少于 5 管，细胞密度应不低于 5×10^5 个/毫升。

10 PGCs 活体复原

10.1 复苏

10.1.1 将 PGCs 冻存管从液氮中取出，快速投入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴并迅速摇晃解冻，待管内冰块即将消失时移至室温溶解。

10.1.2 随后将 PGCs 悬液缓慢转移至含 10 mL 操作液的离心管中，轻轻吹打混匀。

10.1.3 采用 300 g 离心 4 min，弃去上清液，加入 0.8 mL~1 mL PGCs 培养基重悬细胞，接种至细胞培养板，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。

10.2 注射前准备

待细胞汇合度达 80%~90% 时，制成悬液并计数。离心后弃去上清液，加入操作液调整细胞密度至 3000 个/微升~5000 个/微升，加入适量固绿 FCF 溶液至终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

10.3 鸡胚显微注射

10.3.1 受体鸡胚参照 GB/T 40454 孵化 50 h~55 h 后,从蛋壳端钝敲开一直径 1 cm~1.5 cm 的小孔,暴露胚体。

10.3.2 在体视显微镜下检查胚胎发育时期,选取 HH 13 期~HH 16 期胚胎进行注射。

10.3.3 用连接口吸管或气泵的注射针吸取 PGCs 悬液,注射 1 μ L~2 μ L 至鸡胚背主动脉。

10.3.4 用透气医用胶带封口,蛋壳上标记注射日期、细胞系等信息。

10.4 受体孵化

10.4.1 注射后的受体鸡胚钝端朝上,置于 37.6 $^{\circ}$ C~38.2 $^{\circ}$ C、50%~60%相对湿度条件下孵化。

10.4.2 每 2 h 翻蛋 1 次,每 7 d 用照蛋器检查,淘汰死胚并记录。

10.4.3 孵化 18 d 后落盘,单个胚蛋装入网兜,内置卡片记录蛋壳标记信息,落盘后停止翻蛋。

10.4.4 孵化 21 d 出雏,取出雏鸡佩戴翅号,记录翅号及对应的注射时间、细胞系、出雏时间、鸡胚健康状况等信息。

10.5 受体鸡饲养

应符合 GB/T 20014.10、NY/T 33 的规定。

10.6 繁育后代

受体鸡性成熟后单笼饲养,记录笼号及对应的出雏日期、翅号等信息。设计配种方案,采用人工授精方式配种,收集种蛋并进行孵化,后代应符合供体鸡的品种外貌和分子特征。

11 PGCs 的鉴定

11.1 细胞形态特征

在倒置光学显微镜下观察并记录培养细胞的形态及生长状况,典型 PGCs 呈悬浮生长,细胞核圆形且偏离细胞中心,核浆比高,直径一般为 15 μ m~20 μ m。

11.2 细胞性别鉴定

提取培养获得的鸡 PGCs 基因组 DNA,采用 PCR 扩增 CHD1 基因(上游引物:5'-TGCAGAAGCAATATTACAAG-3';下游引物:5'-AATTCATTATCATCTGGTGG-3')。扩增产物经 1.5%~2%琼脂糖凝胶电泳分离并检测条带。结果判定标准:雄性样本 481 bp 处呈现单一特异性条带,雌性样本 326 bp 和 481 bp 处各呈现一条特异性条带。

11.3 特异性标记检测

应满足以下条件:

a) 过碘酸希夫染色结果:细胞质呈紫红色,细胞核不着色或着色较浅;

b) mRNA 检测结果:细胞应表达多能性基因(如 *POUV*、*NANOG*)、生殖标记基因(如 *DDX4*、*DAZL*)及细胞迁移相关基因(如 *CXCR4*);

c) 免疫荧光染色结果:细胞应表达多能性蛋白(如 *POUV*、*NANOG*)、生殖标记蛋白(如 *DDX4*、*DAZL*)。

11.4 核型分析

应具有正常二倍体核型：雄性含 38 对常染色体及 1 对 ZZ 性染色体，雌性含 38 对常染色体及 1 对 ZW 性染色体。

12 档案记录

包括供体鸡来源、PGCs 采集方法、细胞系信息、冻存数量、制作单位、出入库档案、鉴定方法、受体鸡信息等。记录表格参见附录 B。

附录 A

(资料性)

试剂的配置

A.1 PBS/BSA 溶液

称取 0.01 g BSA，溶解于 10 mL 的 PBS 中，用 0.22 μm 的滤器过滤，密封后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

A.2 PGCs 培养基

禽类 KO-DMEM 基础培养基（250 mOsm/kg、12.0 mM 葡萄糖、无钙）中加入以下成分：1 \times B-27、2.0 mM GlutaMax、1 \times 非必需氨基酸、0.1 mM β -巯基乙醇、1 \times 核苷、1.2 mM 丙酮酸钠、0.2% 卵白蛋白、0.2% 肝素钠、0.2% 鸡血清、25 ng/mL 激活素 A、4 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子-2，用 0.22 μm 的滤器过滤后分装，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

A.3 操作液

DMEM 培养基中加入 2.0 mM GlutaMax 和 10%~20% 的 FBS，用 0.22 μm 的滤器过滤、分装，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

A.4 冻存液

在操作液中加入体积分数为 20% 的二甲基亚砜，混匀后即得冻存液。

A.5 固绿 FCF 溶液

称取 100 mg 固绿 FCF，溶解于 10 mL 水中，用 0.22 μm 的滤器过滤后分装，密封后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

附录 B

(资料性)

PGCs 冷冻保存记录资料

PGCs 冷冻保存记录信息见表 B. 1

表 B. 1 PGCs 冷冻记录表

供体来源：_____品种：_____细胞名称：_____制作单位：_____

胚胎编号	采集时期	采集部位	代次	冻存日期	冻存数量(支)	密度	存储盒号	盒内位置	提漏号	液氮罐号	备注

PGCs 出入库记录信息见表 B. 2

表 B. 2 PGCs 出入库记录表

品种：_____细胞名称：_____制作单位：_____

冻存管号	代次	入库日期	入库数量(支)	存放位置	出库日期	出库数量(支)	用途	领用人	剩余数量(支)	备注

参 考 文 献

- [1] 《国家畜禽遗传资源品种名录》 畜资委办[2025]18号
 - [2] 《种用动物健康标准》 中华人民共和国农业农村部公告 第574号
-