

胚胎干细胞研究动态

编者按 20世纪末,克隆羊“多利”问世、成体干细胞分化“可塑性”的发现和人类胚胎干细胞(ES和EG细胞)体外建系成功这三大生命科学的重大成就,开创了干细胞研究和应用的新局面。干细胞也成为全世界范围内在新世纪之初的研究热点。

本期我们特约了两篇原文已分别发表于我国细胞生物学领域中进入美国科学引文索引(SCI)和科学引文索引-扩展版(SCIE)全英文学术刊物《CELL RESEARCH》(细胞研究)今年第3期和第4期的译文,题名分别为“中国小型猪胚胎生殖细胞培养和建系”及“体细胞起源的人胚胎干细胞”。中国小型猪胚胎生殖细胞建系成功表明我国已有了自己特色的、能在体外冻存和大量扩增的、便于基因操作的猪胚胎干细胞系,而且是不同性染色体的“龙凤”两株细胞系。这对发展我国猪源生物反应器、育种和医学领域异种器官移植以及干细胞生物学特性等的应用基础研究创造了条件。我国从大熊猫体细胞核植入去核的兔卵母细胞发现可支持重构胚的发育开始,经过三年多时间,又成功地培养了体细胞起源的人胚胎干细胞,这一成果证明利用非人哺乳类卵母细胞可对人体细胞核进行重编程(reprogramming),并能发育到囊胚阶段;从这种重编程的囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)中,又可分离培养出具有自我更新和分化成三胚层细胞能力的ES细胞。尽管人们对这种经异种核移植途径制备的人ES细胞存有质疑,但这种实验体系和技术路线可能是用来进一步探讨着床前胚胎的发育,包括重编程、核质关系、全能性、分化和遗传印迹,以及治疗性克隆等种种问题的途径之一。

这两篇研究论文标志着我国在胚胎干细胞领域的某些研究项目已取得重大进展,有着重要的理论和应用意义,在国内外同行中有很大的影响。为使国内更多的细胞生物学工作者了解这些工作,经作者和《CELL RESEARCH》编辑部同意,将上述两篇论文的中译本同时刊登于本期的“胚胎干细胞研究动态”栏目,以飨读者。

中国小型猪胚胎生殖细胞的培养和建系

丛笑倩* 杜忠伟** 芮荣*** 李秀兰 包林平 吴军 鲍世民**** 姚鑫
(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所胚胎干细胞实验室 上海 200031)

摘要 首次报道分别从28天和27天中国小型猪胚胎生殖嵴的原始生殖细胞培养和建立了两株胚胎生殖细胞系(embryonic germ cells, EG cells),各命名为BPEG1和BPEG2。根据它们的生长形态、细胞专一性标志以及体内、外分化等特征,证明了它们具有多能性的特性。这些猪EG细胞具有潜在的应用前景。

临床同种异体移植成功和供体器官的短缺致使人们试用动物器官作为替代人体器官的治疗材料^[1]。尽管有一些主要免疫学屏障仍需克服,但近来认为猪的细胞、组织和器官是人体异种移植的最理想动物来源^[2],特别小型猪被认为是诸如心脏等一些器官,从大小和生理学角度考虑,是最合适的供体器官。因此,有必要开展大量的临床基础研究,其中包括建立猪胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)和胚胎生殖细胞系。

已经证明。小鼠ES细胞能参与正常胚胎和胎鼠的发育^[3,4]。过去十年,为使小鼠的基因组导入

* 通讯作者:丛笑倩。E-mail: escg@sunm.shcnc.ac.cn

** 现在地址: Waisman Center-University of Wisconsin T603, 1500 Highland Ave, Madison I 53705. USA.

E-mail: zdu@wisc.edu

*** 现在地址:南京农业大学兽医学院,江苏, 210095.

E-mail: rra@njau.edu.cn

**** 中国科学院上海实验动物中心,上海,200233.

所希望的遗传变化,ES细胞基因打靶技术已经成为常规操作^[5]。在猪中建立类似小鼠的ES细胞系统对制备异种移植所需、但缺乏不希望抗原的转基因动物是非常有用的。然而,许多工作者已得到的猪ES细胞虽具有多能细胞的一些典型特征,但都是短期培养而未能建成稳定的细胞系^[6]。至今,从猪着床前胚胎唯一成功建系的ES细胞,并在体内证明其多能性的是Chen等人的工作,但迄今未见后续报道^[7]。在胚胎中发育并形成配子的原始生殖细胞(PGCs)是建立多能干细胞系的另一来源途径。在体外适当的条件下,从小鼠PGCs培养的EG细胞在形态学和发育特征上极类似于ES细胞^[8-10]。从猪PGCs试图建立多能EG细胞系以及将PGC细胞或短期培养的EG细胞注射入受体胚泡,然后移植入假孕母猪,可获得活的嵌合体猪,但未获得生殖系传递的子代^[11,12]。然而,Mueller等人用PCR和印迹法证明,在一只嵌合体猪的生殖腺组织中存在所注射的EG细胞^[13]。这表明,像小鼠一样,有可能实现猪EG细胞的生殖系传递。但需要指出的是所有这些作者在他们的工作中用的是普通家猪。另外,在缺乏稳定的猪ES细胞系的情况下,近年来通过体细胞核移植技术克隆猪已获得一些成功,例如,制备Gal-基因剔除的克隆猪^[14]。然而,由于诸如猪体细胞核在卵细胞质中进行基因重编程中往往产生表观遗传学变化和体细胞进行同源重组效率低等原因,建立稳定的猪ES细胞或EG细胞系仍是十分必需的。

本文从中国小型猪培养、建立了两株EG细胞系。通过碱性磷酸酶和SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4及转录因子Oct-4等免疫组织化学染色检验了EG细胞的特征。进行了体内、外分化实验分析其多能性。结果表明这两株猪EG细胞是多能的,能够产生三个胚层的分化细胞。早期传代的EG细胞连同STO细胞冻存,融化后生长形态和多能性的特征并无明显改变。

材料和方法

1. 原始生殖细胞(PGCs)分离

本文实验用猪是一类中国小型猪,源于中国科学院上海实验动物中心1994年从西双版纳引进,同年开始近亲繁殖和饲养,2000年提供本文实验。大约6个月龄小母猪选为胚胎的供者。在妊娠26-28天屠杀动物,并从子宫剖取胚胎,分离胚胎的生殖嵴,每一胚胎的两个生殖嵴合并。PBS

洗涤。用细玻璃针弄碎。以含0.02% EDTA和0.25%胰蛋白酶(PBS液或含1mg/ml dispase(Sigma)的PBS液分别在37℃消化5 min或10-15 min。此后,加入含1%胎牛血清的PBS,离心,800g,5 min。沉淀重悬于1 ml PEGCM(porcine EG cells culture medium)。其组成是含15%小鼠ES细胞培养用胎牛血清(FCS, BRL/GIBCO), 1 mmol/L L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 1×10^{-4} mol/L α -mercaptoethanol, 25 ng/ml rhbFGF, 40ng/ml rhSCF, 10 ng/ml rhLIF(生长因子均购自Sigma), 100U/ml penicillin, 0.5mg/ml streptomycin的培液。

2. PGCs培养

STO饲养层细胞由Piedrahita教授提供^[11]。STO细胞用前通过含10% FCS和10 μ g/ml mitomycin C(Sigma)的DMEM液在37℃处理2小时灭活。在预先铺有0.1%明胶的四孔培养板(Nunc, Roskilde, Demark)中,每孔滴入 1.5×10^5 STO细胞,隔天STO细胞贴壁后再将一枚胚胎两个生殖嵴的0.5 ml PGCs细胞悬液加入每一孔中。培养物用PEGCM液维持在38℃、5% CO₂、95%空气的培养箱。隔天换培液。EG细胞集落和小细胞团用胰蛋白酶或dispase消化,然后用微吸管吹打或细玻璃针机械分开,供进一步换入有新鲜饲养层细胞的四孔板内培养,早期传代的EG细胞被冻存。

3. 猪EG细胞的特征

(1) 碱性磷酸酶(AKP)组织化学染色 按许新等人方法^[15]对早期传代的EG细胞作AKP活性测定。用NBT(nitrobluetetrazolium)和BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate,均购自Sigma)作为AKP的底物。阳性染色为黑紫色。

(2) 阶段专一性胚胎抗原表达 发育早期阶段专一性胚胎抗原SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4单克隆抗体购自The Developmental Studies Hybridoma Bank developed and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowacity, IA52242。免疫组织化学染色的常规操作按Solter和Knowles的SSEA-1染色法^[16]。上述抗体均用含1% BSA的PBS 1:10稀释。EG细胞首先用含10%胎牛血清的培液移至铺有1%明胶的盖玻片上,3-4天后细胞贴附于盖玻片,用1% (w/v)多聚甲醛在室温固定15 min,其后,用甲醇在-20℃固定5 min。PBS洗涤两次后,滴加1% BSA复盖EG细胞,处理30 min以封阻非特异性染色。然后,分别加第一抗体,在37℃温育1 h。继之盖玻片用兔抗小鼠IgG-FITC标志物在室温温育30 min。免疫组织化学染色用荧光显微镜观察。

(3) 转录因子Oct-4的表达 Oct-4是位于未分化干细胞,如ES、EG、PGCs和EC(embryonal carcinoma)细胞的核内。由上海生工生物工程技术有限公司合成Oct-4多肽^[17],我实验室自制兔抗Oct-4多肽抗血清。免疫组织化学染色同SSEA抗原染色。兔抗Oct-4抗血清1:20稀释。羊抗兔IgG-FITC标志物购自Dake公司。

4. 核型分析

按 Mueller 等人法略加改良^[12]。在 18-20 代的 EG 细胞用 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid (Sigma) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 处理 5 h。PBS 洗涤细胞后, 0.25% 胰蛋白酶消化去除 STO 细胞, 800g 离心 5 min。此后, 低渗、固定、EG 细胞染色体的染色和分析均按常规。

5. 体内、外分化

EG 细胞用 PEGCM 液悬浮培养 4-5 天能形成拟胚体 (embryoid bodies, EBs)。收集 EBs, 放置于铺有 0.1% 明胶的四孔培养板或盖玻片上, 含 10% FCS 和 $1 \times 10^{-7} - 10^{-9}$ mol/L 维甲酸 (retinoic acid, RA) 的 DMEM 液用于培养和诱导 EBs 分化 7 天。观察其分化潜能, 并用专一性标志的免疫组织化学染色验证分化细胞的类型。神经细胞类型单抗试剂盒购自 Boehringer Mannheim Biochemica, 包括神经元的 NF160、星形细胞的 GFAP 和成纤维细胞的 fibronectin 等。抗甲胎蛋白多抗购自 Dake 公司, 用于从 EBs 分化的内胚层细胞的鉴定。免疫组织化学染色操作过程同上。

体内分化实验是将第 10 代后的约 1×10^6 猪 EG 细胞接种于裸鼠两腋部的皮下。4-5 周后, 取出肿块, Bouin 氏液固定、切片和 HE 染色。

6. 扫描电镜和透射电镜观察

猪和小鼠的 EG 细胞分别接种于明胶铺底的盖玻片上, 作为扫描电镜样品。离心收集一团 EG 和 STO 细胞作为透射电镜样品。电镜样品制备按常规。分别用 HITACHI S450 扫描电镜和 EM OPTON 902 透射电镜完成样品观察。

结果和讨论

1. EG 细胞培养和建系

为得到较纯的 PGCs, 剖取中国小型猪的单个胚胎的胚胎生殖嵴, 尽可能与其他组织分开, 制成含 PGC 细胞或小细胞团的悬液, 接种于 STO 细胞饲养层上 5-7 天, 开始长出 EG 细胞集落。但有时在饲养层上会发现污染有中肾组织 (图 1 A)。此后, 用胰蛋白酶或 dipase 消化原代 EG 细胞集落, 并接种于新鲜灭活的 STO 细胞饲养层上。再培养 7-10 天后, 可看到大量 ES 细胞样形态的岛状集落 (图 1 B), 但是, 猪 EG 细胞集落是圆的、比小鼠 ES 和 EG 细胞的集落较扁平 and 较不透明。在一些传代中, EG 细胞集落可出现自发分化 (图 1 C)。EG 细胞一般一周传代一次。这样, 从 13 只小母猪获得的 37 个胚胎, 我们建立了二株猪 EG 细胞系, 分别来自 28 天和 27 天的胚胎的生殖嵴 PGCs, 各命名为 BPEG1 和 BPEG2。这二株细胞已连续传代 20 余代或超过 10 个月, 仍然保持其早期特征性的生长性质: 即类似于小鼠 ES 或 EG 细胞的巢状生长形态

(nests), AKP 染色阳性。在第 21 代的一个集落中, 也发现其专一性标志 SSEA-3 抗原和 Oct-4 蛋白仍然能分别与其各自抗体起反应。传代早期和晚期的冻融 EG 细胞通过生长形态、专一性标志和体外分化实验都证明其确实维持着多能性 (资料未显示)。

虽然本文所述猪 EG 细胞培养物的性质与多能干细胞相一致, 但其再培养的种植率比大多数小鼠 EG 和 ES 细胞的培养低得多。这种现象可能是猪 EG 细胞生长有一套复杂的内外因素所致, 包括其有较强的相互黏附性, 难以解离; 较低的增殖率以及易受同一培养物中分化细胞的影响。

在小鼠 EG 细胞原代培养中, 需要用 3 种生长因子, 包括 rhLIF、rhSCF 和 rhbFGF^[8,15], 但当小鼠 EG 细胞在 STO 饲养层建系后, 在 EG 细胞传代中却不再需要 SCF 和 bFGF。本文在猪 PGC/EG 细胞培养中, 常用上述 3 种生长因子。然而, 我们也发现在最初的猪 PGCs 培养物中, PGCs 在不加生长因子的 STO 饲养层上也能增殖, 正如 Shim 等人 and Piedrahita 等人的报告一样^[11,12]。

2. 猪 EG 细胞的特征

AKP 染色是鉴定 EG 细胞未分化状态的常规方法之一。早期传代的猪 EG 细胞集落 AKP 染色强阳性 (图 1 D)。分别用 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 抗体进行免疫荧光染色反应, EG 细胞集落也显示阳性染色。然而, SSEA-1 抗体染色的强度 (图 1 F) 相比于 SSEA-3 和 SSEA-4 (图 1 G, H) 却弱得多。SSEA-1 是发现于小鼠 EC、ES 和 PGCs 细胞表面的胚胎抗原。本文在猪 EG 细胞检有 SSEA-1 抗原类似于 Takagi 等人^[18] 和 Mueller 等人^[13] 的发现。因此, SSEA-1 对猪 PGCs 和长期培养的 PGCs 仍是一个良好的标志。然而, Takagi 等人并没有发现 SSEA-3 和 4 抗原在猪 PGCs 中表达; 而 Mueller 等人也没有分析 SSEA-3 和 4 抗原。我们知道, SSEA3 和 4 是存在于人 EC 细胞^[19]、猴 ES 细胞^[20] 和人 ES 及 EG 细胞^[21,22]。在本文小型猪 EG 细胞中, SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 抗原同时表达, 似乎表明 EG 细胞表面糖基化可能在猪的不同品种中是有差别的, 或者更可能猪 PGCs 和 EG 细胞表面的糖蛋白表达方式在进化上更接近于人类, 这种差别需要进一步研究。

Oct-4 是一种转录因子, 是存在于哺乳动物中的细胞全能性 (totipotency) 标志之一^[23]。小鼠发育期间, Oct-4 基因仅在多能性的胚胎细胞, 如分裂

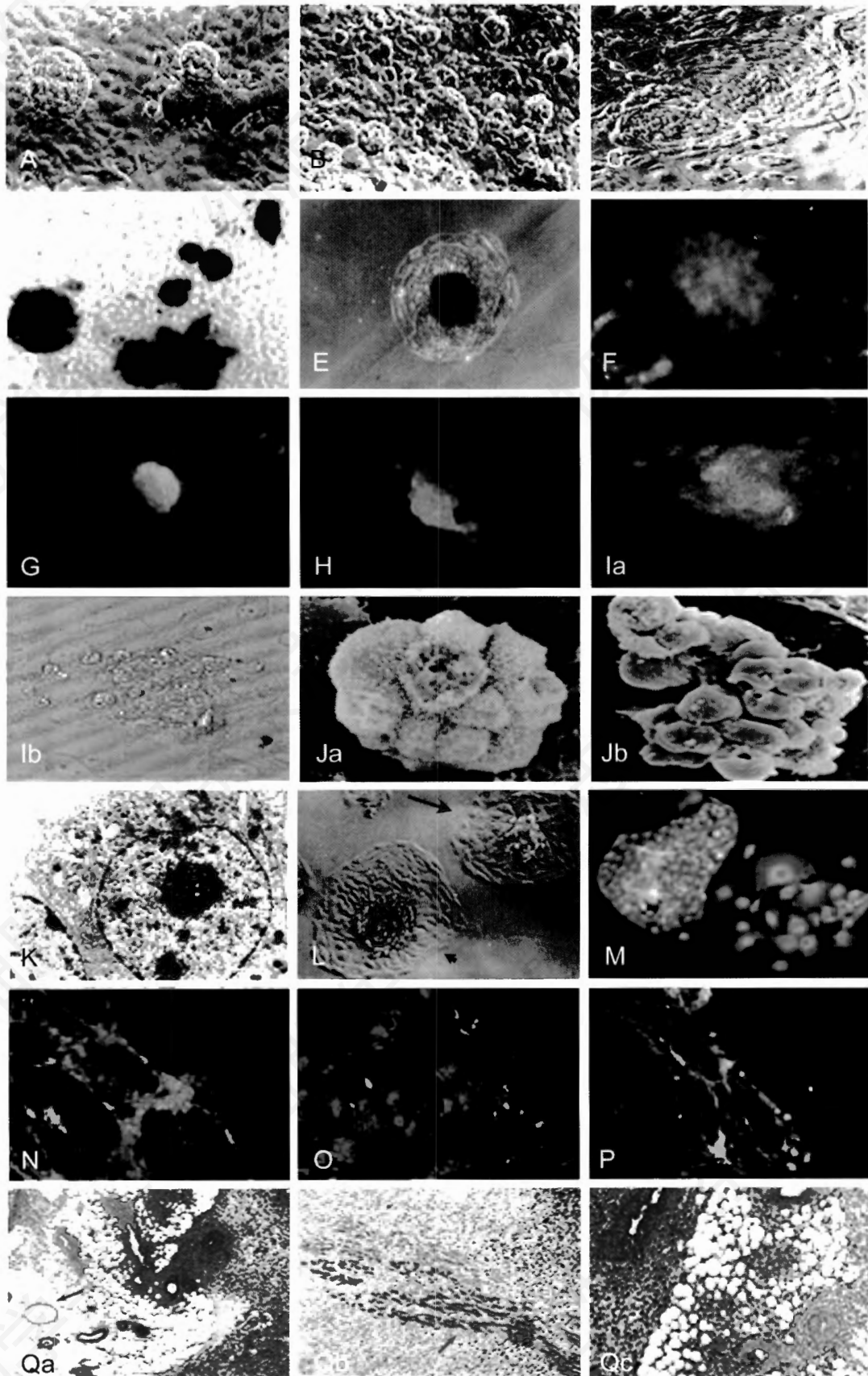


图 1

- (A) 自 28 天胚胎生殖嵴体外培养 7 天后发育的原代 EG 细胞集落。注意与 EG 细胞小集落相连的中肾组织。相差 $\times 200$
- (B) 在 STO 饲养层上第三代的多个 EG 细胞集落。相差 $\times 200$
- (C) 第 5 代 EG 细胞集落自发分化为成纤维样细胞(箭头)。相差 $\times 200$
- (D) 第 3 代 EG 细胞集落 AKP 阳性染色。 $\times 200$
- (E) 第 10 代 EG 细胞的一个胚体中心未分化 EG 细胞显示 AKP 阳性染色,周围分化细胞为 AKP 阴性。 $\times 200$
- (F) 第 5 代 EG 细胞集落 SSEA-1 免疫荧光染色阳性。 $\times 480$
- (G) 同上,第 10 代 EG 细胞集落 SSEA-3 免疫荧光染色阳性。 $\times 200$
- (H) 同上,第 10 代 EG 细胞集落 SSEA-4 免疫荧光染色阳性。 $\times 200$
- (I) 第 5 代 EG 细胞集落 Oct-4 蛋白染色阳性(Ia)及其相应对照(Ib)。相差 $\times 200$
- (J) 同样放大倍数的扫描电镜照片示猪 EG 细胞(Ja)大小,类似小鼠 EG 细胞(Jb)。 $\times 1500$
- (K) 透射电镜照片示一个猪 EG 细胞。 $\times 9000$
- (L) 猪 EG 细胞的 EBs 贴附于盖玻片上 5 天,分化为上皮样细胞(箭)和成纤维样细胞(箭头)。相差 $\times 200$

下列 4 图(图 1M-1P)示第 12-14 代 EG 细胞集落的 EBs 体外分化。用 $1 \times 10^{-7} - 10^{-9}$ mol/L RA 处理 5 天,再贴附于培养皿 5-10 天,用不同的专一性抗体染色。

- (M) EB 及其伸展的内胚层细胞显示 AFP 免疫荧光阳性染色。 $\times 200$
- (N) EB 及其分化的成纤维样细胞显示 fibronectin 免疫荧光阳性染色。 $\times 200$
- (O) 神经元样细胞显示 NF 160 免疫荧光阳性染色。 $\times 200$
- (P) 星形细胞样细胞显示 GFAP 免疫荧光阳性染色。 $\times 200$
- (Q) 猪 BPEG1 细胞在裸鼠皮下长出的畸胎瘤组织学切片: $\times 100$
(Qa)腺体样结构(箭)和神经管样结构(箭头);
(Qb)肌肉组织(箭头);
(Qc)神经管样结构(箭)和脂肪细胞(箭头)。

球、胚泡的 ICM、上胚层、原始生殖细胞和大多数生殖细胞。因此,也是未分化干细胞,如 ES 和 EG 细胞的专一性标志。本文猪 EG 细胞显示较强的 Oct-4 染色反应。图 1Ia 和图 1Ib 表明猪 EG 细胞集落能与 Oct-4 抗体起免疫荧光反应。在这些细胞分化后,Oct-4 基因表达迅速下调和消失。

BPEG1 和 BPEG2 两株猪 EG 细胞系分别在第 18 代和第 20 代以后进行核型分析。两株细胞染色体数目表明是正常核型,BPEG1 是雌性 38XX; BPEG2 是雄性 38XY,未见异常核型。图 2 和图 3 分别显示这两株猪 EG 细胞分裂相中期的展片和核型。

从电镜观察,猪 EG 细胞的大小类似于扫描电镜中的小鼠 EG 细胞。但是,猪 EG 细胞显然彼此更具黏附性(图 1Ja、Jb)。透射电镜观察证明,猪 EG 细胞的细胞质结构较简单,类似小鼠胚胎干细胞,有伸展的线粒体、核糖体,较高的核质比例(图 1K)。

3. 体内外分化

猪 EG 细胞以悬滴或在明胶铺底的孔内培养 4-5 天,形成简单胚体(EB):外层由内胚层细胞组成,内核是未分化的 AKP 染色阳性的 EG 细胞(见

图 1 E)。这些 EBs 贴壁生长 5 天,EG 细胞分化为几种类型细胞,通常为上皮样和成纤维样细胞(图 1 L)。EBs 用 RA 诱导后贴壁培养,EG 细胞可分化为由专一性标志证明的三胚层类型的细胞,如内胚层细胞(图 1 M)、成纤维样细胞(图 1 N)、神经元样细胞(图 1 O)和星形细胞样细胞(图 1 P)。猪 EG 细胞接种裸鼠两腋部皮下,4-5 周后,瘤块经组织学检查,发现含有多种类型细胞,包括肌肉、腺体、神经管样结构和未分化的 EG 样细胞(图 1 Q a、Q b、Q c)。结果表明,猪 EG 细胞是多能的,类似小鼠的 EG、ES 细胞,在体内能形成畸胎瘤。

综上所述,归结为下列几点:(1)两株猪 EG 细胞系的生长形态学类似小鼠 ES 和 EG 细胞,并在连续传代中直至 20 余代仍保持着这种形态学特征。传代早、晚期冻存的 EG 细胞解冻后,也都维持着其生长特性、专一性标志,未改变其体外分化的多能性质。(2)这些 EG 细胞的生化和免疫组织化学特性,包括阳性 AKP 染色、细胞表面存在 SSEA 抗原以及全能性标志蛋白 Oct-4 的表达,都指出它们是干细胞。(3)EG 细胞的 EBs 体外分化结果和裸鼠中形成畸胎瘤都验证了它们具有多能的分化特性。因

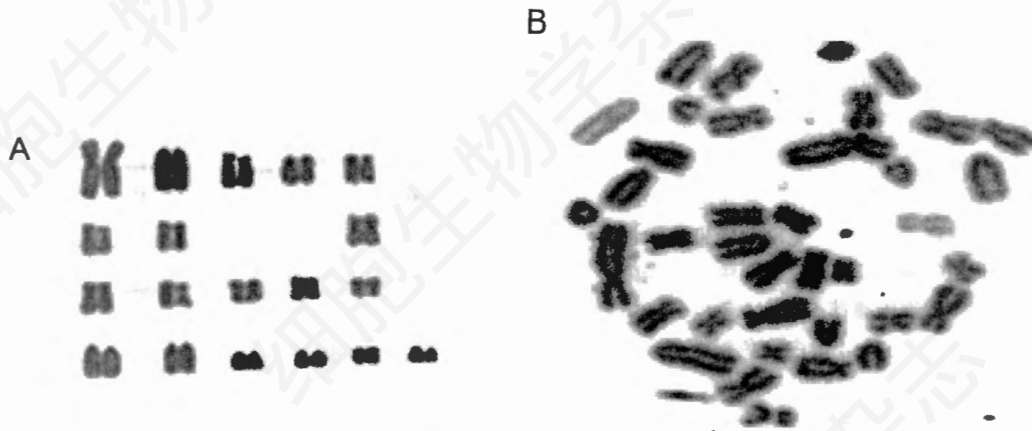


图2 猪 BPEG1 细胞的正常核型, 38 XX 雌性(A)和其分裂相中期展片(B)

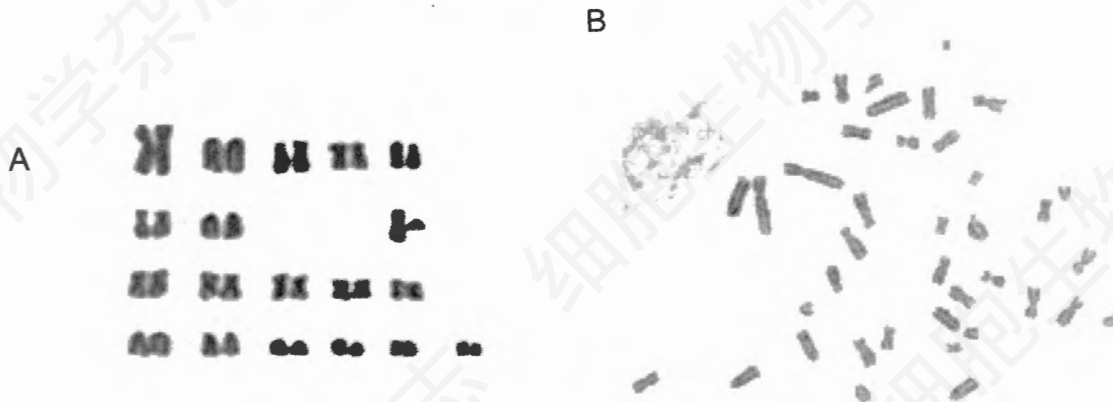


图3 猪 BPEG2 细胞的正常核型, 38 XY 雄性(A)和其分裂相中期展片(B)

此,除了确证其能够形成嵌合体和生殖系传递的实验以外,我们首次初步建立了两株中国小型猪EG细胞系,可用于进一步的基础研究。

本工作期间,最使我们困惑的是猪EG细胞的种植率很低。本文开头就已指出这是一个非常复杂的问题。干细胞自我更新的调节是近来研究的热点,甚至在小鼠ES细胞也是如此^[24]。我们认为,探讨猪干细胞这一问题的途径之一是从猪的体细胞或基因工程改造的猪体细胞中找出更好的饲养层细胞,以提供比目前所用小鼠STO细胞更为适合猪EG细胞生存和增殖的微环境。如能做到这一点,则有可能发展更好的细胞培养体系,以提高猪EG细胞或甚至ES细胞的种植效率。当我们手头能拥有大量EG细胞时,就可以研究许多问题。例如,我们很想知道SSEA抗原在猪EG细胞自我更新或分化中的功能;令人更感兴趣的是探讨对猪EG细胞遗传操作的可能性;或甚至建立稳定的猪ES细胞系及其遗传操作的可能性。

总之,本文成功地从中国小型猪PGCs建立和

特化了两株EG细胞系。讨论了这些细胞系对未来基础研究可能的利用。

致谢: 本工作受国家自然科学基金(No. 39993430)资助;感谢J A Piedrahita 博士惠赠STO细胞。

施涓康译自《Cell Research》, 2003, 13 (3):195-202.

参 考 文 献

- [1] Yoo D, Giuliri A, Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine virus. *Canad. J Veteri-research* 2000; **64**:193-203.
- [2] Onions D., Cooper D. K. C., Alexander T. J. L., et al An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000; **7**: 143-155.
- [3] Bradley A, Production and analysis of chimeric mice. In *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical Approach*. Ed Robertson EJ. Oxford: IRL press; 1987: pp113-152.
- [4] Campbell KHS, Wilmut I, Totipotency or multipotentiality of culture cells: applications and progress. *Theriogenology*

- 1997; 47:63 - 72.
- [5] Hooper ML, Embryonal stem cells: Introducing planned changes into the animal germline. Chur. Swizerland; Harwood Academic publisher, 1992; pp1 - 23.
- [6] Gerfen RW., Wheeler MB, Isolation of embryonic cell-lines from porcine blastocysts. Anim Biotechnol 1995; 6:1 - 14.
- [7] Chen LR, Shiue YL, Bertolni L et al., Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. Theriogenology, 1999; 52:195 - 212.
- [8] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B. L. M., Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell 1992; 70:841 - 847.
- [9] Stewart C. L, Gali I., Bhatt H., Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ lines. Dev. Biol 1992, 161:626 - 628.
- [10] Xu X, Yu Y-S, Tsung H-C, Sugano S, Yan Y-C. The development fate of green fluorescent mouse embryonic germ cells in Chimeric embryos. Cell Research 1999, 9: 201 - 208.
- [11] Shim H., Gutierrez-Adan A., Chen L. R., BouDurant R. H., Behboodi E., Anderson G, B. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. Biol Reprod 1997; 57:1089 - 1095.
- [12] Piedrahita JA, Moore K, Ortama B, et al. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. Biol Repord 1998; 58:1321 - 1329.
- [13] Mueller S., Preller K., Rieger N., et al Chimeric Pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. Mol Reprod Dev 1999; 54:244 - 254.
- [14] Lai Liangxue, Koller-Simonds D, Park kwang-wook et al Production of α -1,3 galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science 2002; 295:1089 - 1092.
- [15] Xu x., Tsung H-C., Yan Y-C. Establishment and differentiation of murine EG cell lines derived from primordial germ cells. Acta Biologiae Exper. Sinica 1999; 32:251 - 263.
- [16] Solter D, Knowles BB, Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen(SSEA-1). Pro Natl Acad Sci USA 1987; 75:5565 - 5569.
- [17] Scholer H., S Ruppert., N Suzuki., K. Chowdhury., P Gruss New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4 Nature 1990; 344:435 - 439.
- [18] Takagi Y, Talbot NC, Rexroad CE, et al. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. Mol Reprod Dev 1997; 46:567 - 580.
- [19] Andrews PW, Oosterhuis JW, Damjanov I, Cell lines from human germ cell tumors. In "Teratocarcinomas and Embryonic stem cells: A practical Approach" Ed. Robertson EJ, Oxford: IRL press, 1987; pp 207 - 248.
- [20] Thomson J, Kalishman J, Golos T, Isolation of primates embryonic stem cell line. Proc. Natl. Acad. Sci: USA. 1995;92: 7844 - 7848.
- [21] Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145 - 1147.
- [22] Shambloott MJ, Axelman J, Wang SP, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. PNAS 1998; 95:13726 - 13731.
- [23] Pan GJ., Chang ZY., Hans R Schoeler., PEI DQ. Stem cell pluripotency and transcription Factor Oct-4. Cell Research 2002, 161:626 - 629.
- [24] Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. Cell Shr&Func 2001; 26:137 - 148.

上海实生细胞生物技术有限公司简介

上海实生细胞生物技术有限公司是隶属于中国科学院,系独立核算的综合性生物技术、生命科学领域的科研、教学用品的经营性公司。主要经销、代销国内外各类实验仪器、医疗仪器、化学试剂、消耗性材料、玻璃仪器、医疗器械,并专门供应实验室冷冻液氮等。

本公司承接国内外企业、单位或个人高新生物技术项目的开发、产品性能测试、技术转让、技术咨询,承办信息交流、产品展销学术交流、科研人员培训等业务。

本公司以原研究所部分人员加上招聘部分社会精英组成了人才队伍。以其雄厚的技术优势,严格的科学管理和良好的售后服务在全国各地赢得了广泛的信誉。

公司真诚希望与各界朋友继续真诚合作,为祖国科学教育事业的发展,为人类医疗事业做出贡献!

地址:上海市肇嘉浜路 532 号 邮编:200031 电话:021-64319290

传真:021-64313503

电子邮件:sscb@sunm.shnc.an.cn

Website: http://www.sscb.com.cn