

牛胚胎生殖细胞的分离与培养

葛秀国, 徐小明, 华进联, 杨继建, 窦忠英*

(西北农林科技大学 陕西干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100)

摘要: 以牛胎儿为材料, 从原始生殖细胞(PGC)分离培养出胚胎生殖细胞(EG), 并进行传代和鉴定, 对影响胚胎生殖细胞分离与培养的因素进行了探讨, 研究发现以共培养方式培养牛原始生殖细胞时, 原代培养都可以出现大量形态较好的EG细胞集落, 说明同源的体细胞可以很好地支持PGC的生长和增殖, 组织块培养细胞克隆数目较少, PGC很难增殖, 不能形成典型的集落, 传代也不理想, 只传了一代。同时比较了不同传代方法对牛胚胎生殖细胞细胞传代的影响, 发现消化+机械分离法和消化+吹打法都可以用于EG细胞的传代。消化+吹打法操作简单, 省时省力, 也能够很好的保持细胞的增殖活力。原代培养的牛原代胚胎生殖细胞进行了细胞表面标志抗原SSEA-1, 3, 4鉴定, 呈弱阳性。细胞体外培养可以分化为成纤维样细胞、上皮样细胞和类胚体。

关键词: 牛; 原始生殖细胞; 胚胎干细胞

中图分类号: S858. 27; S858. 23; Q813. 1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)12-1275-06

原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)是哺乳动物生殖细胞的祖细胞, 是继胚胎癌细胞和胚胎干细胞之后发现的又一种多能性干细胞, 1992年, Matsui等^[1]对小鼠PGCs长期培养, 建立了胚胎生殖细胞(Embryonic germ cell, EG)系, 自此, 各国学者开始了PGCs用于胚胎干细胞的分离与培养。Cherny等^[2]和冯书堂等^[3]鉴别从29~35 d龄的牛和猪25~30 d的胎儿生殖嵴分离得到原始生殖细胞(Primordial germ cell, PGCs), 种植在细胞饲养层上, 7 d后发现大量的胚胎生殖细胞集落, 细胞呈AKP阳性, 可以自发分化为多种类型细胞。李松等^[4]将牛EG细胞传至15代, 经各种方法检测, 证明所分离的胚胎干细胞为多能性胚胎干细胞。但是, 在大家畜上, 用PGCs分离与培养干细胞的培养体系仍很不完善, 至今尚未见关于建立牛EG细胞无限系的报道。本研究探讨了牛原始生殖细胞的分离培养方法, 对影响PGCs分离与培养的因素进行了一些比较, 为进一步建立牛EG细胞系奠定了基础。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 昆明白品系小鼠6~8周龄, 购自中国人民解放军第四军医大学试验动物中心; 牛胎儿共49例, 从西安屠宰场收集, 在4℃下, 4 h内运回实验室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养液 基础培养液: DMEM(高糖)+10% NBS(或FBS)+0.1 mmol/L β-巯基乙醇+2 mmol/L 谷氨酰胺+0.01 mmol/L 非必需氨基酸+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素。

EG细胞培养液: 基础培养液(含10% FBS)+10 ng/mL SCF+10 ng/mL LIF+20 ng/mL bFGF+10 μmol/L Forskolin。

1.2.2 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的制备 断颈处死妊娠12~15 d小鼠, 无菌取出整个子宫角, 置入预先孵育过的无钙、镁的磷酸盐缓冲液(PBS)中。在超净工作台上, 从子宫中剥离出胎儿, 除去胎膜。将胎儿的四肢、内脏、头、尾除去, 取胎儿肌肉组织, 用无钙镁PBS清洗以彻底去除血污, 眼科剪充分剪碎组织。在剪碎的组织中加入适量细胞消化液, 37℃作用10~15 min。用等量细胞培养液中中和, 以终止消化。离散后的组织悬液, 用孔径为100 μm的滤纱过滤, 滤液经1 000 r/min离心5 min(10 mL离心管)。弃去离心管中的上清液, 用细胞培养液把细胞沉淀制成悬液, 记细胞数, 调整细胞浓度为 $(1\sim 2)\times 10^6$ /mL。在直径为9 cm的培养皿中, 加入1 mL细胞悬液, 再加入7 mL培养液, 震荡混匀

收稿日期: 2004-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070374; 302000137); 国家863项目(2002AA216161); 教育部重大项目(03160)

作者简介: 葛秀国(1977-), 男, 博士, 天津武清人, 主要从事动物胚胎工程研究。Tel: 029-87086743

* 通讯作者: 窦忠英, E-mail: Douzhongying@china.com

后,在 37 °C 5% CO₂、饱和湿度的条件下培养。45 min 后换液以去除尚未贴壁的杂细胞与死细胞,以后每 48 h 换液一次。挑选细胞连成一片、刚好铺满皿底生长旺盛的制作饲养层。在四孔板每孔加入 0.6 mL 明胶溶液,继续放在恒温台上 1~2 h,同时紫外灯照射。在铺细胞前 30 min 吸出明胶。将事先挑选活力好的细胞,吸去培养液,加入含丝裂霉素-C 5 ng/mL 的培养液,在培养箱中处理 2~3 h。吸去含丝裂霉素-C 的培养液,用无钙镁 PBS 冲洗 4~5 次,确保丝裂霉素完全除去。加入细胞消化液(0.25% 胰蛋白酶+0.04% EDTA)4 mL,作用 3~5 min 后,用等量细胞培养液终止消化,并用吸管吹打成单细胞悬液。把细胞悬液移入 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,把细胞沉淀用细胞培养液制成悬液,并调整细胞浓度为 5×10^5 /mL。在已经吸去明胶的四孔组织培养板中加入细胞悬液,每孔 0.6 mL。在 37 °C 5% CO₂、饱和湿度的条件下培养。

1.2.3 牛 PGCs 的收集 将从屠宰场取回的牛胎儿,用含青链霉素的生理盐水冲洗 4~6 次,在显微镜下无菌剥离生殖嵴(腺)或类似物。用无钙镁 PBS 清洗 2~3 次,剪碎,加入细胞消化液(0.25% 胰蛋白酶+0.04% EDTA 或 0.125% 胰蛋白酶+0.02% EDTA)4 mL,室温处理(5~15 min 或 15~25 min)。12# 注射针头轻轻吹打数次,用等量 ES 细胞培养液中和。用孔径为 100 μm 的滤纱过滤后,将细胞悬液移入 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min(10 mL 离心管),弃去上清液,用细胞培养液把细胞沉淀制成悬液。调整细胞浓度为 $(1\sim 2) \times 10^4$ /mL,接种在饲养层上。

培养原代的牛 PGCs 时,还采用了组织块培养法和共培养法。组织块培养法是将虹膜剪机械剪碎的生殖嵴培养于 6 孔组织培养板,每孔放 5~6 个组织块,先不加培养液,使其贴附 10 min 后,加入几滴培养液湿润一下,放入培养箱培养,1~2 d 后补加少量培养液,待组织块贴壁结实后,补足培养液。共培养法是不使用饲养层,直接将原始生殖嵴和周围组织一起消化,制成细胞悬液,在铺有明胶的四孔组织培养板中培养。

1.2.4 牛 EG 细胞的传代培养 原代培养 3~6 d 后,可形成典型的 EG 细胞集落。挑出形态较好的细胞集落,用 0.125% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化 3 min 后,将细胞集落离散成小的细胞团块。离

散集落的方法两种:①消化+吹打法,在消化液滴中消化,用吸尿管将其轻轻吹打碎;②消化+机械分离法,消化后,在实体显微镜下,以玻璃针机械分离细胞集落成小的团块。将分离好的细胞团块移到培养液中洗两遍,然后在新的饲养层上继续培养。EG 细胞集落传代后约 5~7 d,增殖到合适的大小且没有分化时,按照首次 EG 细胞传代的方法继续传代。

1.2.5 牛 EG 细胞的鉴定

1.2.5.1 形态学鉴定:倒置相差显微镜下观察细胞集落生长行为和形态特征。

1.2.5.2 AKP 染色:吸出培养液,无钙镁 PBS 清洗 3 次,4% 戊二醛室温固定 15 min,无钙镁 PBS 清洗 3 次,加入 AKP 染色液(0.2 mg/mL α 萘酚磷酸盐,1 mg/mL 坚固蓝,0.1 mol/L Tris 盐,调至 pH 值为 8.4),作用 15~30 min。再用无钙镁 PBS 冲洗 3 次,倒置显微镜下观察,照相。

1.2.5.3 体外分化试验:挑取典型的 EG 细胞集落,以消化液消化成单个细胞或小细胞团块,置于老化的饲养层或无饲养层上培养。

1.2.5.4 细胞表面标志抗原分析:以细胞表面标志抗原 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4 为一抗,对原代培养的 EG 细胞集落进行鉴定。参照免疫组化试剂盒说明的方法步骤为:

无钙镁 PBS 洗 3 遍;4% 多聚甲醛固定 10 min;Tris 盐洗 3 遍;5% 过氧化氢孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水洗 1 遍,无钙镁 PBS 浸泡 5 min;滴山羊血清封闭液(蓝),室温孵育 15 min,倾去勿洗;滴加适当比例稀释的一抗(1:100 稀释),37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜;无钙镁 PBS 冲洗 5 min × 3 次;滴加生物素化二抗工作液(黄色),37 °C 孵育 15 min;无钙镁 PBS 冲洗 5 min × 3;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(橙色),37 °C 孵育 15 min;无钙镁 PBS 冲洗 5 min × 3;配显色剂:烧杯中加入 6 mL 四蒸水,顺序依次加入 6 滴 B、C、A,混匀;显色剂显色:4 孔板每孔中加入 0.6 mL 的显色剂;蒸馏水冲洗,观察,照相。

2 结果

2.1 牛 PGCs 的分离、培养与观察

在实体显微镜下无菌剥离出牛胎儿生殖嵴/腺或类似物。分离出 PGCs 接种在饲养层上,倒置显微镜下观察,PGCs 呈圆形或椭圆形,比周围的体细胞大,核大胞质少。AKP 染色呈阳性。PGCs 生长

增殖的同时也不断地相互聚集。所形成的细胞集落具有典型的 EG 细胞集落形态, 隆起, 边缘整齐, 集落中细胞排列致密, 看不出明显的细胞结构。由于饲养层的老化或随着传代时间的延长, 细胞集落逐

渐失去了典型的 EG 细胞集落形态, 细胞间界限变得明显, AKP 染色呈弱阳性, 集落边缘变得不整齐, 有的集落中央发黑, 可能是 EG 细胞活力下降或分化的标志。见图 1~ 9。

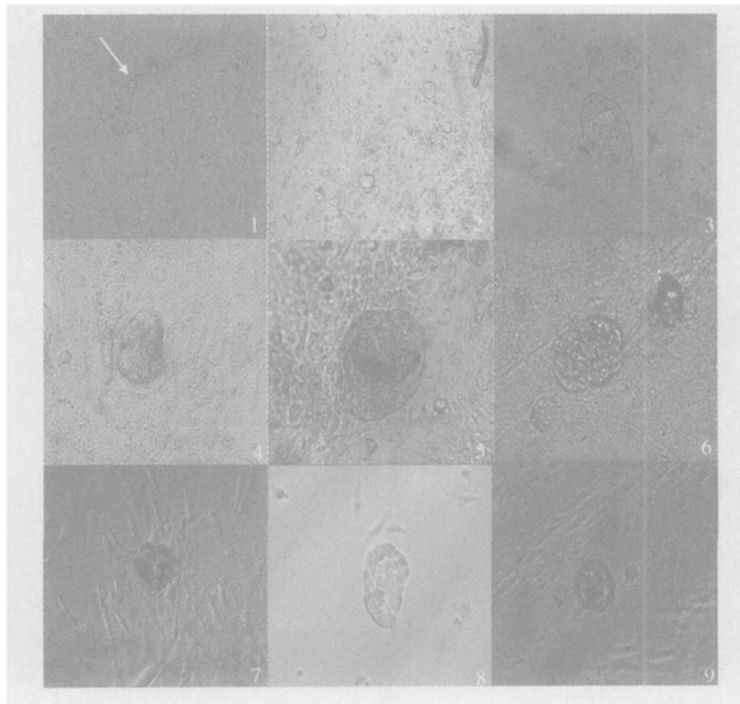


图 1 用组织培养法得到的原代的 EG 细胞集落

图 2 原代培养 1 d 的 EG, 集落还比较小

图 3 原代培养的较大的 EG 细胞集落

图 4~ 6 原代培养的细胞集落进行 SSEA-1, 3, 4 染色, 集落着色, 但不明显

图 7 原代培养的 EG 集落进行 AKP 染色, 集落着色明显

图 8 EG 细胞集落分化为上皮样细胞

图 9 EG 细胞集落分化为类胚体

Fig. 1 The colonies of EG cells with the method of tissue culture 50 ×

Fig. 2 The cultured goat EG cells colony on PMEF

after one day, and the colony of EG remains small 50 ×

Fig. 3 The bigger goat EG cells colony in primary culture 100 ×

Fig. 4~ 6 An Immunohistochemistry assay was carried out to characterize the colonies of bovine primordial germ cells, and expression of stage specific embryonic antigen 1, 3, 4 was detected, but the expression was feeble 100 ×

Fig. 7 The colony of EG cells cultured was stained for AKP 100 ×

Fig. 8 The colony of EG cells have differentiated

into epithelia like cells 100 ×

Fig. 9 The colony of EG cells different into embryoid body 100 ×

2.2 不同培养方法对牛 PGC 分离培养的影响

试验比较了 3 种培养方法对 2.6 cm (约 41 d)、2.9 cm (约 44 d) 和 1.8 cm (约 37 d) 3 只牛胎儿原

始生殖细胞分离培养的影响(见图 10, 11), 所用培养液为基础培养液, 以相同的方法传代。发现无论那种培养方法在原代培养时都能出现细胞集落, 但

组织块培养法出现的较少。传代结果表明,组织块培养法出现的集落不易传代;共培养法培养的原代EG细胞集落可以传代,说明这些细胞活力较好,但传代效果较差于饲养层法。

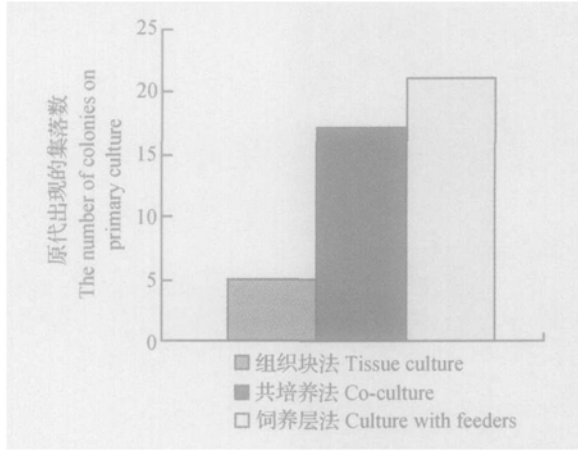


图 10 不同培养方法对牛 EG 细胞原代培养的影响
Fig. 10 Effect of different culture methods on primary culture of bovine EG cells

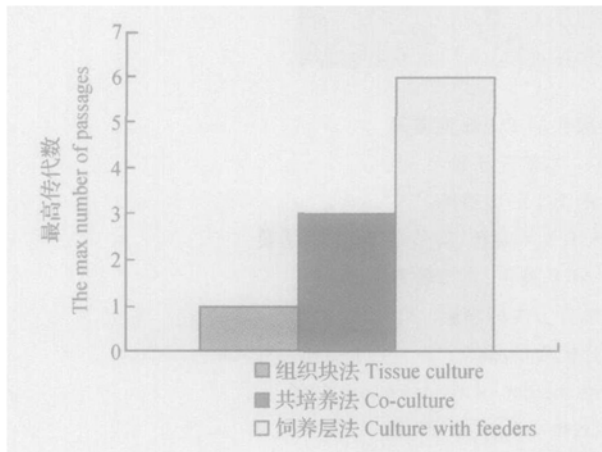


图 11 不同培养方法对牛 EG 细胞传代的影响
Fig. 11 Effect of different culture methods on the culture for passages of bovine EG cells

2.3 不同传代方法对牛 EG 细胞传代培养的影响

对原代出现的 EG 细胞集落,在适当的时间,用合适的方法进行传代是很重要的。当 EG 细胞集落增殖为一圆柱形细胞团时就可以在解剖镜下用剥离针挑出细胞集落,对其进行传代。试验通过对 4 例牛胎儿的原代集落传代,比较 2 种传代方法,发现都比较好,差异不显著($P > 0.05$)。但消化+吹打法操作简单,省时省力。在操作时,吹打力度是十分关键的,掌握好吹打的力度与时间,可以取得较好的传

代效果。见表 1。

表 1 不同传代方法对牛 EG 细胞分离培养的影响
Table 1 Effect of different methods of passage on the culture of bovine EG cells

传代方法 The method of culture for passages	平均传代数 Average of passages	最高传代数 The most passages
消化+机械分离 Digest + Physical disperse	4.5 ± 1.29^a	6 ^a
消化+吹打 Digest + Blowing disperse	4.25 ± 0.5^a	6 ^a

同列字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)

The same list with the same letter indicate no distinct different ($P > 0.05$)

2.4 牛 EG 细胞鉴定

2.4.1 AKP 染色 牛 EG 细胞集落着红色,呈阳性。饲养层细胞不着色,为阴性,见图 7。

2.4.2 体外分化试验 EG 细胞自发分化为简单类胚体、上皮样细胞、成纤维样细胞等,见图 8。

2.4.3 细胞表面标志抗原分析 对 SSEA-1、3、4 三种细胞表面标志抗原,都表现为弱阳性,见图 4~6。

3 讨论

3.1 不同培养方法对牛 PGC 分离培养的影响

关于不同发育阶段的尿生殖嵴复合物的组织块培养已经有一些报道^[5,6],组织块培养可以用于研究生殖细胞的增殖和分化,还可以用于理解配子发生的模式,如有丝分裂、基因印记以及生殖细胞和周围体细胞之间的信号转导等。Mayanagi 等^[7]用组织块法分离培养小鼠原代的原始生殖细胞,发现原始生殖细胞围绕在贴壁的性腺组织周围生长,活力较好。本研究也发现这一现象,但细胞克隆数目较少,PGC 很难增殖,不能形成典型的集落,传代也不理想,只传了一代。

共培养法是不使用饲养层,直接将原始生殖嵴和周围的组织一起消化,制成细胞悬液,在铺有明胶的 4 孔组织培养板中培养。李松^[4]在未添加任何细胞因子的前提下,将牛 PGC 与同源胎儿成纤维细胞共培养,平均传代数为 4.5 代。本研究中,共培养法原代获得的 EG 细胞克隆较多;EG 细胞传代的结果表明,有饲养层培养比无饲养层培养更利于牛 EG 细胞的传代培养;共培养法分离的原代 EG 细胞可

以传代,说明该方法分离的细胞活力较好,可能是同源的胎儿成纤维细胞具有促进 PGCs 生存的作用,但由于存在大量的成纤维细胞与干细胞夺取营养物质和存在空间,只有将 EG 细胞集落与成纤维细胞分开,才能有效传代。在原代培养时,快速生长的成纤维细胞将导致 EG 细胞集落生长缓慢、衰老和死亡,克服这些成纤维细胞的干扰将是十分重要的,本研究对共培养法培养的牛 EG 细胞传了 4 代。

3.2 不同传代方法对牛 EG 细胞传代培养的影响

要建立稳定传代的胚胎干细胞系,对原代出现的 EG 集落的传代是很重要的。胚胎干细胞传代的时间、消化液作用时间以及离散方式对传代能否成功很关键,尤其是最初的传代。单个 ES 细胞是很难形成克隆的,一般采用接种 100 个细胞左右的团块,容易形成新的集落。因此,传统上的也都采用消化+机械离散的传代方法。1992 年, Saito 等^[8]传代牛干细胞时,以 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化牛 EG 集落,然后用钨针将集落离散,传了 3 代。牛 ES 细胞对胰蛋白酶敏感,胰蛋白酶消化后很难形成新的集落,故传代时,需要将集落挑出,机械剥离^[9],而牛 EG 细胞集落前几代可以采用胰蛋白酶消化辅助机械剥离的方法进行分离,待稳定传代后可以用胰蛋白酶消化进行分离传代^[10]。目前,使用的 EG 细胞传代方法操作复杂烦琐,效率低,并且容易造成细胞损伤或分化或核型不稳定等,因此,EG 细胞传代方法还不是十分理想,人们正在寻求一些新的 EG 细胞分离传代方法。

为了更好地进行 EG 细胞的传代工作,试验比较了两种传代方法(消化+机械离散,消化+吹打)的效果,发现都可以用来传代。消化辅以机械分离的方法似乎更加可靠,只是操作起来十分麻烦,技术不熟练将导致细胞集落在消化液中时间的延长,使细胞活力下降。董晓^[11]传代猪 EG 细胞时,采用消化+吹打的方法,取得了较好的效果。本试验也发现消化+吹打法适合于干细胞传代,不但可以显著地减少操作的烦琐,节省时间,还能较好的保持细胞的增殖活力,可对细胞进行有效的传代。

3.3 牛 EG 细胞的鉴定

Lavoie^[12]认为原始生殖细胞一旦进入生殖腺,就不能只依赖碱性磷酸酶活性的检测来鉴定了,认为体细胞也可以表达碱性磷酸酶活性,可干扰对 PGC 的鉴定。为了更好地鉴定牛 PGC,试验引入了免疫组化方法,对牛 EG 细胞进行细胞表面标志抗

原的鉴定。

在附植前的小鼠胚胎几个发育阶段,都可以检测到细胞特定阶段抗原-1(SSEA-1)的存在^[13],在小鼠^[14]和猪^[15]也已报道了 SSEA-1 表达在迁移前和迁移后的原始生殖细胞。但 Choi^[16]在牛原始生殖细胞没有检测到 SSEA-1 的表达。对 SSEA-3, SSEA-4 呈阳性的细胞,已报道的有人 ES^[17]、EG^[18]和牛 ES 细胞^[19],目前还未见有关于牛的 EG 细胞表达 SSEA-3, SSEA-4 的报道。本研究以 SSEA-1, 3, 4 抗体为一抗,对牛原代 EG 细胞集落进行了免疫组化染色,发现细胞着色不明显,呈弱阳性,但证明了细胞可以表达细胞表面标志抗原 SSEA-1, 3, 4。但这时的细胞可能还处于 PGC 向 EG 细胞分化的过程中,表达的程度较弱说明了只有部分细胞表达细胞表面标志抗原,阳性的细胞可能是 EG 细胞,也可能是 PGC 细胞,这还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Matsui R, Hogan B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell, 1992, 70(5): 841~ 847.
- [2] Cherny R A, Stokes T M, Merein J, et al. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells[J]. Reprod Fert Dev, 1994, 6(5): 569~ 575.
- [3] 冯书堂,董晓,刘立新,等.猪原始生殖嵴细胞(pGCs)建系因素的研究[J].畜牧兽医学报,2004,35(5):477~ 480.
- [4] 李松,窦忠英,华进联,等.影响牛胚胎干细胞分离克隆因素的研究[J].生物技术通报,2002,3:35~ 39.
- [5] Mackay S, Smith RA. Mouse gonadal differentiation *in vitro* in the presence of fetal calf serum[J]. Cell Differentiation and Development, 1989, 27: 19~ 28.
- [6] Tomaselli K J, Hall D E, Flier L A, et al. A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin[J]. Neuron, 1990, 5: 651~ 662.
- [7] Mayanagi T, Ito K, Takahashi J. Association of culture of mouse urogenital complexes in media containing rodent sera with the appearance of primordial germ cell-like cells[J]. Reproduction, 2003, 125, 519~ 526.
- [8] Saito S, Strelehenko N, Niemann H. Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages [J]. Roux's Archives of Development Biology,

- 1992, 201: 134~ 141.
- [9] Lee C K, Scales N, Newton G, et al. Isolation and initial characterization of primordial germ cell-derived cells from goat, rabbit and rats [J]. *Asian Aus Anim Sci*, 2000, 13(5): 587~ 594.
- [10] Cherny R A, Stokes T M, Merei J, et al. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells [J]. *Reprod Fert Dev*, 1994, 6(5): 569~ 575.
- [11] 董 晓. 猪胚胎干细胞(EG)建系影响因素的研究[D]. 北京: 中国农业大学. 2003.
- [12] Lavoit M C, Basrur P K, Betteridge K J, et al. Isolation and identification of germ cells from fetal bovine ovaries [J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 37: 413~ 424.
- [13] Viswanathan S, Benatar T, Rose-John S, et al. Ligand/receptor signaling threshold (LIST) model accounts for gp130-mediated embryonic stem cell self-renewal responses to LIF and HIL-6 [J]. *Stem Cell*, 2002, 20(2): 119~ 138.
- [14] Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, et al. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos [J]. *Development*, 1994, 120(1): 135~ 41.
- [15] Thomson L A, Axelman D S, Thomson J A, et al. Embryonic stem cells lines derived from cultured human primordial germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13 726~ 13 731.
- [16] Choi S J, Shim H, Anderson G B, et al. Short communication: lack of stage-specific embryonic antigen-1 expression by bovine embryos and primordial germ cells [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82: 516~ 519.
- [17] Tillmann S M. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos [J]. *J Anim Breed Genet*, 1996, 113: 413~ 426.
- [18] Shim H, Gutierrez A, Chen L R, et al. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells [J]. *Biol Reprod*, 1997, 57: 1 089~ 1 095.
- [19] Martin H, Kata H, Handyside A, et al. HPPT-deficient (lesch-myham) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cell [J]. *Nature*, 1987, 326: 292~ 295.

Isolation and Culture of Bovine Embryonic Germ Cells

GE Xiuguo, XU Xiaoming, HUA Jirlian, YANG Jirjian, DOU Zhongying*
 (Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest Sci-Tech University of
 Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The major object of this paper is to isolate and culture bovine embryonic germ (EG) cells derived from primordial germ cells (PGCs) as well as to identify the EG cells from various aspects. Some factors influencing the efficiency of the isolation and culture bovine EG cells have been discussed. When co-culture the EG cells with somatic cells, there will be some colony in primary culture, which maybe account for homologous somatic cells can sustain the EG survive and proliferation. When we use the tissue culture method, the colony of EG cells is very less and EG cells cannot proliferate effectively, as well as the passage culture. With 0.125% trypsinase + 0.02% EDTA disrupt gonad, comparing effect of different dispersal methods on the passage of the EG cells, the method of "digest + blowing disperse" was fine, which was simple and can save more time and labours and better to keep the activity of the EG cells. An Immunohistochemistry assay was carried out to characterize the colonies of bovine primory EG cells, and expression of stage-specific embryonic antigen SSEA-1, 3, 4 was detected, but the expression was feeble. The EG cells can differentiate into fibroblast-like cells, epithelia-like cells and embryoid body.

Key words: bovine; embryonic stem cell; primordial germ cell

* Corresponding author