



Идентификация примордиальных зародышевых клеток (PGC) кур пушкинской породы с помощью ПЦР в реальном времени

Ольга Юрьевна Баркова, Татьяна Александровна Ларкина, Анна Алексеевна Крутикова, Григорий Карапетович Пегливанян

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»

Аннотация: Примордиальные зародышевые клетки (*primordial germ cells, PGC*) являются клетками-предшественниками зрелых гамет. Возможности использования PGC птиц для получения трансгенных птиц, а также для сохранения многих видов диких и домашних птиц еще больше повысили интерес к выделению и культивированию этих клеток. В первые дни в среде культивирования, кроме PGC, содержится большое количество форменных элементов крови, которые затрудняют идентификацию PGC и последующую работу с ними. При правильном культивировании к 21 дню остаются только PGC, а клетки крови деградируют. Возникает необходимость идентификации PGC для дальнейшего научно-практического использования. В данной работе была проведена идентификация PGC в культуре клеток с помощью анализа экспрессии 11 специфических примордиальных генов с помощью ПЦР в реальном времени в трех культурах: культуре нативных PGC, культуре PGC, обработанных бусульфаном, и контрольной культуре клеток фибробластов. Результаты анализа экспрессии специфических генов в этих трех культурах подтверждают присутствие PGC и развитие их в культуральной среде.

Ключевые слова: куры, примордиальные зародышевые клетки, культивирование, экспрессия генов.

Для цитирования: Баркова, О.Ю. Идентификация примордиальных зародышевых клеток (PGC) кур пушкинской породы с помощью ПЦР в реальном времени / О.Ю. Баркова, Т.А. Ларкина, А.А. Крутикова, Г.К. Пегливанян // Птицеводство. – 2023. – №1. – С. 10-15.

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-1-10-15

Введение. Примордиальные зародышевые клетки (*primordial germ cells, PGC*) являются клетками-предшественниками зрелых гамет, способными передавать всю генетическую информацию организма следующему поколению. Возможность использования PGC птиц как для получения трансгенных птиц с помощью методик TALEN или CRISPR/Cas, так и в качестве модели для исследования развития зародышевой линии, а также для сохранения многих видов диких и домашних птиц еще больше повысили интерес к этим клеткам.

Пути миграции PGC в эмбрионах птиц отличаются от пути их миграции у млекопитающих [1], что дает им огромное преимущество для

дальнейшего исследования половых клеток, поскольку их можно выделить на разных стадиях эмбрионального развития. У эмбрионов птиц PGC первоначально обнаруживаются в виде рассеянного рисунка в области pellucida на X стадии развития по Эяль-Гилади и Кочав [2]. Между этапом X и этапом HH 2 по Гамбургеру-Гамильтону [3] PGC перемещаются пассивно с общим движением эмбриональных клеток; на стадии HH 4 они активно переходят на экстраэмбриональный зародышевый серп [2,3]. Впоследствии, между стадиями HH 9 и 12, PGC перемещаются в кровеносные сосуды, где циркулируют через кровотоки эмбриона и окончательно оседают на генитальном гребне.

В литературе описаны различные методы выделения PGC из эмбриональной ткани и кровеносных сосудов, включая сортировку клеток, активируемую флуоресценцией (FACS), и магнитно-активируемую сортировку клеток (MACS) с использованием PGC-специфических антител [4].

Бусульфан, введенный в куриные яйца на стадии X по Эяль-Гилади и Кочав [2], успешно элиминирует эндогенные PGC в эмбрионах, что значительно увеличивает долю донорского потомства [5]. Бусульфан (1,4-бутандиолдиметансульфонат) – это алкилирующий агент с высокой цитотоксичностью по отношению к зародышевым клеткам, включая PGC



и сперматогониальные стволовые клетки (SSC) в семенниках мышей, крыс и птиц. Бусульфан нарушает процесс репликации молекулы ДНК, что индуцирует повреждение и опосредованный апоптоз зародышевых клеток путем потери сигнального пути c-kit/SCF, клеточного механизма, необходимого во многих типах клеток зародышевой линии. Интересно, что бусульфан цитотоксичен не только для PGC ранних эмбрионов, но также для циркулирующих PGC в кровеносных сосудах, что может использоваться для получения более высокого процента трансгенных птиц путем обработки эндогенных PGC бусульфаном. Однако мало что известно о клеточных реакциях PGC после их обработки бусульфаном [5,6].

Разработка систем культивирования PGC – важнейший этап для дальнейшего их использования в научно-практической деятельности. В первые дни в среде культивирования, кроме PGC, содержится большое количество форменных элементов (клеток) крови, которые затрудняют идентификацию PGC и последующую работу с ними. При правильном культивировании к 21 дню остаются только PGC, а клетки крови деградируют. Система долгосрочного культивирования куриных PGC была впервые успешно разработана Ван де Лавуаром с соавт. в 2006 г. [7]; было показано, что bFGF играет существенную роль в пролиферации и выживаемости куриных PGC через митоген-активируемый белок киназу (MEK) и киназу, регулируемую внеклеточным сигналом (ERK), помогает поддерживать активность теломеразы, что вносит вклад в развитие зародышевой линии культивируемых PGC в течение длительного периода времени и их миграционную активность. PGC кур, выде-

ленные из эмбриональной крови, могут быть пролиферированы в течение длительного времени в комплексных культуральных средах, содержащих куриную сыворотку, фетальную бычью сыворотку (FBS), фактор роста фибробластов 2 (FGF2) и среду, кондиционированную клетками печени буйвола (BRL), сохраняя при этом специфичность клонов и их способность к передаче зародышевой линии [8]. Сообщалось, что FGF2, инсулин и активин необходимы для пролиферации куриных PGCs, что позволяет эффективно выращивать и размножать PGC как самцов, так и самок кур [9].

Целью данной работы являлась идентификация PGC в культуре клеток путем анализа экспрессии специфических примордиальных генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в следующих системах культивирования: PGC, PGC, обработанных бусульфаном, и контрольных клеток фибробластов.

Материал и методика исследований. Для проведения работ были отобраны яйца ($n=21$) кур пушкинской породы мясояичного типа продуктивности биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ. PGC кур отбирались на 3-4 сутки инкубации из дорсальной аорты эмбрионов (стадия HH 14). Яйца инкубировали в лабораторном инкубаторе (ИФХ-250НС, Россия) с периодической сменой положения при 37-38°C и относительной влажности 65-70%. В скорлупе выпиливалось отверстие диаметром 10-15 мм, и через полученное отверстие под бинокуляром с помощью микроинъектора Narishige IM-11-2 осуществлялся отбор PGC. Клетки культивировали 21 день при 37°C с 4% CO₂ в инкубаторе HF-90 (Китай) в базовых средах. В эксперименте использовались три системы культивирования: 1) фи-

бробласты кур (в качестве внешнего контроля); 2) нативные PGC; и 3) PGC из эмбрионов, обработанных бусульфаном, на базовой среде KnockOut DMEM/F-12 без L-глутамин (Gibco, ThermoFisher) с добавлением следующих компонентов в расчет на 500 мл среды: натрия пируват 1M (Applichem), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X (Millipore) – 2,5 мл, Human Activin A Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) – 25 нг/мкл, Human FGF-basic (FGF-2/bFGF) Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) – 10 нг/мкл, Chicken Serum (Gibco, Thermo Fisher) – 2%, 2-меркаптоэтанол (NF, VWR) – 3,9 мкл, антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher) до 1X. Введение бусульфана в эмбрионы осуществляли в свежеснесенные яйца перед закладкой в инкубатор, через отверстие в скорлупе диаметром 5-7 мм; под бинокуляром с помощью микроинъектора (Narishige IM-11-2, Japan; диаметр иглы 30 мкм) вводили суспензию бусульфана в диметилформамиде (75 мкг бусульфана в 250 мкл ДМФА) непосредственно в желток. Каждые 2 дня проводилась замена половины культуральной среды. Отношение живых и мертвых клеток оценивали при помощи красителя трипановый синий (0,5%) по стандартной методике. Количество клеток определяли на автоматическом счетчике клеток TC20 (Bio-Rad, США).

Для идентификации PGC в трех изучаемых культурах клеток был проведен анализ экспрессии специфических примордиальных генов в реальном времени. Клетки, промытые 0,1M фосфатного буфера (pH=7,0), лизировали реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя и замораживали при -20°C. Обратную транскриптазу MINT (Евроген, Россия) использовали



Таблица 1. Праймеры, использованные для анализа PGC

Ген	Полное название гена	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Размер ампликона	Номер в NCBI
<i>DDX4</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4)	TGTTATACAAGCAGGGCGGG	TTGCTGCTTTTGAAGGCAC	133	NM_204708.3
<i>DAZL</i>	Deleted in azoospermia-like (DAZL)	TGGAACAGAAGACGTCACGG	TCATACTCCACTGAGCAGCC	182	NM_204218.2
<i>OCT4</i>	POU domain class 5 transcription factor 3 (POU5F3)	GTTGTCCGGTCTGGTTCTG	CTGTAGCCCTGGGATGTCAC	149	NM_001309372.2
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)	CGAGCTCTGCACATGAAGGA	TACCCCGTTCGTCATGGTAT	138	NM_205188.3
<i>NANOG</i>	Homeobox protein NANOG (NANOG)	ACTACTACTGGCCCTCTCCG	AGTGGCAGAGTCTGGGTAT	167	NM_001146142.2
<i>SALL4</i>	Spalt-like transcription factor 4 (SALL4)	TCCGCCCAATGGGGTAATTT	TGGAGCTCATTTCGCCATCT	208	NM_001080872.2
<i>PIWIL1</i>	Piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 (PIWIL1)	TCCATCTGAACAGCGCAAT	GGTCATGGAATCCCGACGA	185	NM_001098852.2
<i>PIWIL2</i>	Piwi-like RNA-mediated gene silencing 2 (PIWIL2)	TCCACGGTCGACATGAACTG	ATGGTTCGCACGTAGGTCTC	173	XM_040689385.1
<i>CXCR4</i>	C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4)	CTTCCTGGGTCCAAGTTCA	GCAAGGAAAGCGTTAGCTG	164	NM_204617.3
<i>PRDM14</i>	PR/SET domain 14 (PRDM14)	TTCGTTTTGTCTGGAGGAGGG	CTGCGTTAACAACACGGCG	187	ENSGALE00000466677 XM_013101163
<i>PRDM1</i>	PR/SET domain 1 (PRDM1)	GACCGTGCTCAGAAGGAAA	AGGTAACAGAGGTAGCGGCT	157	XM_003641038.5
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	TGATGCCCCCATGTTTGTGA	GATGGCATGGACAGTGGTCA	166	NM_204305.2
<i>RSP17</i>	Ribosomal protein S17 (RPS17)	TCCAAAGGACTTCGACCTGC	CATTTTAGGGATGCGCGTGG	196	NM_204217

для синтеза первой цепи кДНК с одноцепочечной матрицы РНК. В табл. 1 приведены праймеры к генам, проявляющим специфическую экспрессию, свойственную только PGC кур. В качестве референсного образца использовали эмбриональные фибробласты. В качестве эндогенного контроля использовали два референсных гена домашнего хозяйства кур, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и RSP17 (ribosomal protein S17).

Реакцию ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборе Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Амплификация кДНК и детекция сигнала (40 циклов) проведена в следующем режиме: 95°C – 5 мин; 95°C – 20 сек; 59°C – 20 сек; 72°C – 30 сек (этап сбора данных). Результаты получены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Результаты исследований и их обсуждение.

Количество живых клеток (средние значения ± стандартная ошибка) в различных системах культивирования на 21 день в расчете на 1 млн./мл среды составило в культуре фибробластов $2,37 \times 10^7 \pm 0,01 \times 10^4$, процент живых PGC 89%; в культуре PGC $0,34 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$, процент живых 26%; в культуре PGC с бусульфаном $2,08 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$, процент живых 42%. Достоверность различия сравниваемых значений (по t-критерию Стьюдента) составила $p \leq 0,01$.

Анализ экспрессии генов (см. список в табл. 1) в реальном времени проведен модифицированным методом количественного ПЦР, называемым полуколичественной ПЦР (пкПЦР, semi-quantitative PCR). Он часто используется для сравнения экспрессии нескольких генов. В данном случае измеряют количество накопленного продукта только в одной точке –

после остановки реакции, методом полуколичественного анализа мРНК в присутствии экзогенной мРНК (эмбриональные фибробласты) в качестве стандарта. В этом методе используется ко-обратная транскрипция и ко-амплификация (ко-ОТ-ПЦР) целевой и стандартной мРНК. Эта процедура позволяет сравнивать транскрипты с использованием паттерна транскрипции генов домашнего хозяйства, как правило, имеющих постоянную ровную экспрессию, таких как GAPDH и RSP17, и обычно используемых как внутренний стандарт. Получены значения относительно количественного определения экспрессии генов (RQ), которые группируются по образцу.

Экспрессия почти всех исследуемых генов в фибробластах была на порядок, а то и на несколько порядков ниже, чем в культурах PGC и PGC, обработанных бусульфаном.

Специфические маркерные гены DDX4 и DAZL экспрессиру-

вались в PGC на уровне $RQ=2,14$ и $RQ=78664$ соответственно; в PGC, обработанных бусульфаноном – $RQ=206,7$ и $RQ=4051$; в клетках фибробластов – $RQ=4,087$ и $RQ=1,508$ (рис 1). DAZL – специфичный для зародышевой линии РНК-связывающий белок, хорошо изученный у позвоночных видов из-за его роли в мейотической прогрессии и поддержании плюрипотентности зародышевых клеток. Используя ген DAZL кур в качестве маркера зародышевой плазмы, Lee с соавт. заметили, что aberrантная экспрессия DAZL влияет на пролиферацию PGC, экспрессию важных генов и апоптоз *in vitro*, предполагая, что данный ген играет роль в целостности зародышевых клеток кур [10].

Гены плюрипотентности SOX2 и NANOG имели экспрессию (RQ) в клетках PGC на уровне 4196 и 14,863; в PGC, обработанных бусульфаноном – 73,395 и 33,83; в клетках фибробластов – 4,36 и 0,28.

OCT4 (также известный как POUV и POU5F3) имел высокую экспрессию в PGC ($RQ=981,5$) и низкую – в PGC, обработанных бусульфаноном ($RQ=1,79$) и фибробластах ($RQ=1,432$). Доказано, что гены POU5F1 и SOX2 необходимы для спецификации PGC, и что POU5F1 и NANOG необходимы для выживания мигрирующих и гонадных PGC; в отсутствие POU5F1 или NANOG эти PGC удаляются путем апоптоза [11]. Ген PRDM1 имел сверхвысокие уровни экспрессии у PGC ($RQ=32520$) и PGC, обработанных бусульфаноном ($RQ=27187$) и низкие уровни экспрессии у фибробластов ($RQ=2,654$). Доказано, что PRDM1 является критическим геном для спецификации PGC и играет ключевую роль в поддержании и надлежащем развитии мигрирующих, а также гонадных PGC. При отсутствии экспрессии PRDM1 в мигрирующих PGC на 9,5

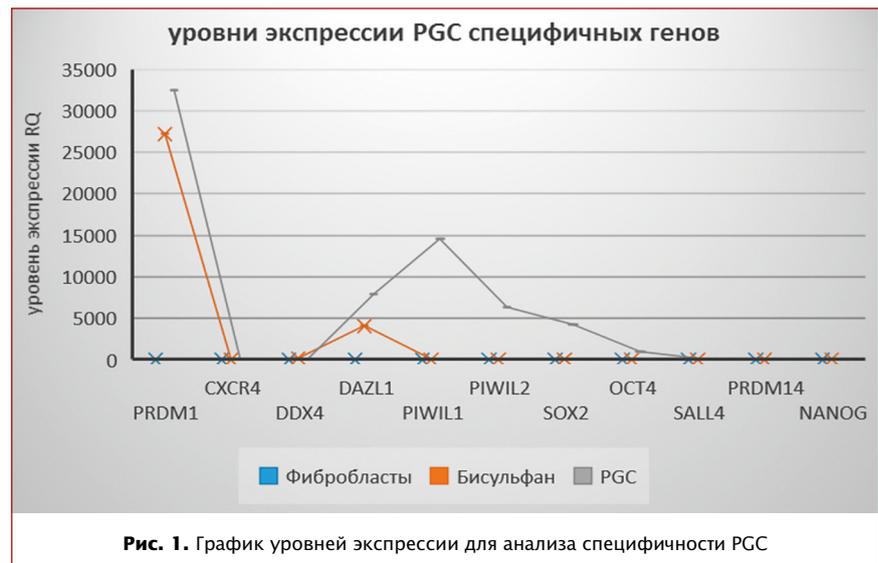


Рис. 1. График уровней экспрессии для анализа специфичности PGC

или 10,5 сутки, а также мужских и женских гонадных PGC на 11,5 сутки транскрипционная программа нарушалась и, в конечном итоге, данные PGC уничтожались путем апоптоза. Таким образом, PRDM1 является транскрипционным фактором, который постоянно требуется для всего процесса развития PGC. Три транскрипционных фактора – PRDM1, PRDM14 и TFAP2C – создают программу транскрипции для развития PGC и вносят свой вклад в работу сложной схемы транскрипции основных транскрипционных факторов плюрипотентности, POU5F1, SOX2 и NANOG [12].

Специфический зародышевый ген SALL4 экспрессировался во всех клетках: в фибробластах ($RQ=3,644$), в PGC, обработанных бусульфаноном ($RQ=19,044$) и в нативных PGC ($RQ=8,34$). Белок цинкового пальца Spalt-like 4 (SALL4) является критическим фактором транскрипции для плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках (ESC). Он также участвует в формировании различных органов у мышей и людей. Сообщалось о важной роли SALL4 в спецификации PGC мышей. Спецификация PGC сопровождается активацией программы

стволовых клеток и репрессией программы соматических клеток в клетках-предшественниках. Условная инактивация SALL4 во время спецификации PGC приводила к уменьшению количества PGC в эмбриональных гонадах. SALL4 и PRDM1, как известно, связаны с репрессорным комплексом гистоновой деацетилазы; предполагается, что SALL4 супрессирует программу соматических клеток, возможно, за счет рекрутирования репрессорного комплекса в сочетании с PRDM1, следовательно, это важно для спецификации PGC [13].

PIWIL1 и PIWIL2, которые относятся к PIWI-подобному семейству и играют решающую роль в куриных зародышевых клетках, были сверхэкспрессированы в нативных PGC ($RQ=14531$ и $RQ=6274$ соответственно), в PGC, обработанных бусульфаноном ($RQ=1,66$ и $RQ=23094$), а в фибробластах наблюдался сравнительно низкий уровень экспрессии ($RQ=1,015$ и $RQ=3,1$). Данные гены являются специфичными для PGC и используются для подтверждения наличия PGC в культуре клеток [12].

Ген CXCR4 не показал экспрессию в PGC и PGC, обработанных бусульфаноном. При проведении





повторного эксперимента с целью исключения технической ошибки результат подтвердился, только для PGC уровень экспрессии составил 0,22, а для фибробластов – 0,98. Возможно, почти полное отсутствие экспрессии этого гена в PGC связано с отсутствием миграции по кровеносному руслу эмбриона, поскольку предыдущие исследования показали, что рецептор 4, связанный с G-белком (CXCR4), экспрессируется мигрирующими PGC, которые достигают гребня половых органов во время циркуляции по кровеносному руслу эмбриона кур [14].

Заключение. Полученные данные по экспрессии специфических эмбриональных генов развития, в том числе и транскрипционных факторов, подтверждают присутствие и развитие PGC в культуральной среде. Несмотря на то, что обработка бусульфамом по нескольким источникам [5,6] должна вызывать повреждение ДНК в клетках-мишенях, что приводит к выключению всех клеточных механизмов и разрушению клеток и должно останавливать рост PGC, уровни экспрессии специфических генов в обработанных бусульфамом

PGC оставались достаточно высокими, особенно по генам PRDM1, PIWIL2 и DAZL1, но были ниже, чем у нативных PGC, что может быть отнесено на счет недостаточной концентрации или недостаточного длительного воздействия бусульфана на культуру PGC. Данное явление требует дополнительных исследований, поскольку противоречит общеизвестным данным.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №20-76-10006, <https://rscf/project/20-76-10006/>.

Литература / References

1. Niewkoop, P. Primordial Germ Cells in the Chordates / P. Niewkoop, L. Sutasurya. - Cambridge Univ. Press, 1979.
2. Eyal-Giladi, H. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick / H. Eyal-Giladi, S. Kochav // Dev. Biol. - 1976. - V. 49. - No 2. - P. 321-337; doi 10.1016/0012-1606(76)90178-0.
3. Hamburger, V. A series of normal stages in the development of the chick embryo / V. Hamburger, H.L. Hamilton // J. Morphol. - 1951. - V. 88. - No 1. - P. 49-92.
4. Jung, K.M. Size-dependent isolation of primordial germ cells from avian species / K.M. Jung, Y.M. Kim, T. Ono, J.Y. Han // Mol. Reprod. Dev. - 2017. - V. 84. - No 6. - P. 508-516; doi 10.1002/mrd.22802.
5. Kim, Y.M. *In vivo* enrichment of busulfan-resistant germ cells for efficient production of transgenic avian models / Y.M. Kim, K.J. Park, J.S. Park, K.M. Jung, J.Y. Han // Sci. Rep. - 2021. - V. 11. - P. 9127; doi 10.1038/s41598-021-88706-6.
6. Lee, H.C. Compensatory proliferation of endogenous chicken primordial germ cells after elimination by busulfan treatment / H.C. Lee, S.K. Kim, T.S. Park, D. Rengaraj, K.J. Park, H.J. Lee, S.B. Park, S.W. Kim, S.B. Choi, J.Y. Han // Stem Cell Res. Ther. - 2013. - V. 4. - No 6. - P. 136; doi 10.1186/scrt347.
7. Van de Lavoie, M.C. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells / M.C. Van de Lavoie, J.H. Diamond, P.A. Leighton, C. Mather-Love, B.S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L.T. Hooi, T.M. Gessaro, S.E. Swanberg, M.E. Delany, R.J. Etches // Nature. - 2006. - V. 441. - No 7094. - P. 766-769; doi 10.1038/nature04831.
8. Lee, H.C. Wnt/beta-catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells *in vitro* / H.C. Lee, S. Lim, J.Y. Han // Sci. Rep. - 2016. - V. 6. - P. 34510; doi 10.1038/srep34510.
9. Miyahara, D. Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2 / D. Miyahara, I. Oishi, R. Makino, N. Kurumisawa, R. Nakaya, T. Ono, H. Kagami, T. Tagami // J. Reprod. Dev. - 2016. - V. 62. - No 2. - P. 143-149; doi: 10.1262/jrd.2015-128.
10. Lee, H.C. *DAZL* expression explains origin and central formation of primordial germ cells in chickens / H.C. Lee, H.J. Choi, H.G. Lee, J.M. Lim, T. Ono, J.Y. Han // Stem Cells Dev. - 2016. - V. 25. - No 1. - P. 68-79; doi: 10.1089/scd.2015.0208.
11. Campolo, F. Essential role of *Sox2* for the establishment and maintenance of the germ cell line / F. Campolo, M. Gori, R. Favaro, S. Nicolis, M. Pellegrini, F. Botti, P. Rossi, E.A. Jannini, S. Dolci // Stem Cells. - 2013. - V. 31. - No 7. - P. 1408-1421; doi 10.1002/stem.1392.
12. Chen, Y.C. *In vitro* culture and characterization of duck primordial germ cells / Y.C. Chen, S.P. Lin, Y.Y. Chang, W.P. Chang, L.Y. Wei, H.C. Liu, J.F. Huang, B. Pain, S.C. Wu // Poult. Sci. - 2019. - V. 98. - No 4. - P. 1820-1832; doi 10.3382/ps/pey515.

13. Yang, J.C. Stem cell gene *SALL4* suppresses transcription through recruitment of DNA methyltransferases / J.C. Yang, T.R. Corsello, Y. Ma // J. Biol. Chem. - 2012. - V. 287. - No 3. - P. 1996-2005; doi 10.1074/jbc.M111.308734.
14. Stebler, J. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12 / J. Stebler, D. Spieler, K. Slanchev, K.A. Molyneaux, U. Richter, V. Cojocar, V. Tarabykin, C. Wylie, M. Kessel, E. Raz // Dev. Biol. - 2004. - V. 272. - No 2. - P. 351-361; doi 10.1016/j.ydbio.2004.05.009.

Сведения об авторах:

Баркова О. Ю.: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; barkoffws@list.ru. **Ларкина Т.А.:** кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. **Крутикова А.А.:** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. **Пегливанян Г.К.:** аспирант, младший научный сотрудник. Статья поступила в редакцию 01.07.2022; одобрена после рецензирования 06.09.2022; принята к публикации 25.12.2022.

Research article

Identification of Primordial Germ Cells of Pushkin Chicken Breed in Cultures by RT-PCR Analysis of Expression of the Specific Genes

Olga Y. Barkova, Tatiana A. Larkina, Anna A. Krutikova, Grigoriy K. Peglivanyan

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Abstract. *Primordial germ cells (PGC) are the progenitor cells of mature gametes. The possibility of use of avian PGC to produce transgenic birds as well as to conserve many species of wild and domestic birds has further increased the interest in isolation and culturing of these cells. During the first days of the culturing the culture medium contains large amounts of blood cells in addition to PGC, which complicate the identification and subsequent application of PGC. With proper cultivation only PGC remain by day 21 while blood cells degrade. There is a need to reliably identify PGC for further scientific and practical use. In the study presented the identification of PGC was carried out by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the expression of 11 specific primordial genes in three cell cultures: native PGC, busulfan-treated PGC, and fibroblast cell culture used as the control. The results of the expression analysis in these cultures confirm the presence of PGC and their development in the culture medium.*

Keywords: chicken, primordial germ cells (PGC), cultivation, gene expression.

For Citation: Barkova O.Y., Larkina T.A., Krutikova A.A., Peglivanyan G.K. (2023) Identification of primordial germ cells of Pushkin chicken breed in cultures by RT-PCR analysis of expression of the specific genes. *Ptitsevodstvo*, 72(1): 10-15. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-1-10-15

(For references see above)

Authors:

Barkova O.Y.: Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer; barkoffws@list.ru. **Larkina T.A.:** Cand. of Biol. Sci., Junior Research Officer. **Krutikova A.A.:** Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer. **Peglivanyan G.K.:** Aspirant, Junior Research Officer.

Submitted 01.07.2022; revised 06.09.2022; accepted 25.12.2022.

© Баркова О.Ю., Ларкина Т.А., Крутикова А.А., Пегливанян Г.К., 2023

