

部分去壳后不同封口方法对鸡胚发育的影响^{*}

何光余, 李碧春, 孙怀昌, 肖小璐, 秦 洁, 吴俊红

(扬州大学 畜牧兽医学院, 江苏 扬州 225009)

[摘 要] 将348枚预孵24~28 h的种蛋分成8组, 部分去壳后分别以不同方法封口, 研究其对鸡胚存活率及出雏率的影响。结果表明: 蛋壳膜+ 封口胶(封口后连续3 d注射抗生素)、蛋壳膜+ 封口胶、封口胶+ 药棉、蛋壳膜+ 石蜡、蛋壳膜+ 蛋壳粉+ 石蜡5种封口方法对鸡胚的发育在19日龄前差异不显著($P > 0.05$); 前4组的出雏率分别为9.6%, 5.1%, 4.4%, 2.4%。蛋壳膜、蛋壳膜+ 蛋壳粉+ 蛋清、蛋壳膜+ 蛋壳粉3种封口方法对鸡胚发育在19日龄前较差, 与前5组比较差异显著($P < 0.05$)。8种方法比较, 前5种封口方法对用显微注射法制备转基因鸡更具有应用潜力。

[关键词] 鸡胚; 孵化率; 转基因鸡; 体外培养; 去壳; 封口

[中图分类号] Q954.4; S831.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0074-03

20世纪90年代以来, 转基因鸡技术取得新进展的工作基础得益于鸡胚胎体外培养方法的建立。但是, 种蛋去壳大大降低了孵化率, Speksnijder等^[1]报道的孵化率一般为6%~9%, 对方法进行改进后, 得到32%的孵化率。而在国内, 贾彦征等^[2]报道, 去壳后用蛋壳膜+ 保鲜膜封口, 种蛋孵化率为3.6%。刘士寻等^[3]研究表明, 开口后使用医用消毒膜封口, 孵化率为2.5%~5%。为了弄清影响鸡胚体外培养孵化率的因素, 进一步提高孵化率, 本研究对种蛋部分去壳后采用8组不同封口方法进行比较, 旨在探索提高鸡胚体外培养最适方法, 为后继的嵌合体鸡的制作^[4]和转基因鸡的研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试种蛋为中国农业科学院家禽研究所实验禽场提供的苏禽-96, 孵化器为北京健雏牌控制仪-II型孵化器。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋壳膜的制备 取新鲜鸡蛋若干, 用体积分数0.2%的新洁尔灭溶液浸泡灭菌5 min, 取出, 无菌条件下在蛋的气室端敲一小孔, 让其内容物流出, 再慢慢敲碎蛋壳, 去壳, 留膜, 要求膜尽量完整, 将膜

在高压灭菌过的蒸馏水中漂洗, 使其内容物洗净, 最终将膜浸泡于含抗生素的生理盐水中, 放于4℃冰箱中待用。

1.2.2 预处理 将新生种蛋用体积分数0.2%的新洁尔灭溶液浸泡灭菌5 min后, 预孵24~28 h。

1.2.3 去 壳 在无菌条件下将预孵化24~28 h的种蛋依次用碘酊和体积分数75%的酒精擦拭消毒蛋壳。用镊子在锐端偏下方轻轻敲开一直径0.5~1.0 cm的切口, 用肉眼观察, 在发育良好的鸡胚内滴入注射用青霉素和链霉素溶液。

1.2.4 封 口 分别设8个试验组和1个对照组: 蛋壳膜+ 封口胶, 且封口后连续3 d注射抗生素; 蛋壳膜+ 封口胶; 封口胶+ 药棉; 蛋壳膜+ 石蜡; 蛋壳膜+ 蛋壳粉+ 石蜡; 蛋壳膜; 蛋壳膜+ 蛋壳粉+ 蛋清; 蛋壳膜+ 蛋壳粉; 对照组不进行任何处理直接消毒后放孵化箱孵化。

1.2.5 孵 化 8个试验组孵化条件一致, 钝端向上。前18 d孵化温度为37.8℃, 相对湿度为55%, 翻蛋角度 $\pm 45^\circ$ ^[5], 间隔2 h; 后期适当凉蛋, 后3 d停止翻蛋, 落盘, 孵化温度为37.2~37.5℃, 相对湿度为65%。孵至20 d时, 在封口处用针尖扎几个小孔, 以利于鸡雏呼吸。孵化过程中, 详细记录活胚数, 并解剖死胚。

1.2.6 统计方法 试验数据采用 t -检验进行差异

* [收稿日期] 2002-09-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30170678)

[作者简介] 何光余(1977-), 女, 江苏睢宁人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

[通讯作者] 李碧春(1963-), 女, 陕西大荔人, 副教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程研究。

显著性分析。

2 结果和分析

不同封口方法的鸡胚胎孵化存活率、孵化率结果见表 1。由表 1 可见, 胚龄 5 d 时, 8 个组的存活率差异不显著 ($P > 0.05$); 胚龄 9 d 时, , 组都已夭亡, 其他组仍有存活, 6 组间存活率差异不显著 ($P > 0.05$); 第 18 天时, 组已全部死亡, , , 和 组的存活率也有大幅度下降, 但差异不显著 ($P >$

0.05), 其中 , , 和 组的孵化率分别为 9.6%, 5.1%, 4.4%, 2.4%, 组第 20 天时全部死亡; 无处理对照组的孵化率为 81.8%, 对照组的孵化率极显著高于处理组 ($P < 0.01$)。第 组的孵化率稍高, 可能是由于封口后 3 d 注射抗生素, 降低了蛋内污染, , 和 组由于封口材料的不同, 孵化率有所差别; , , 3 组的封口材料通透性较强, 膜易干裂, 胚胎失水多, 早期死亡较多, 但样本数量少也可能是原因之一。

表 1 不同材料封口鸡胚胎孵化的存活率和孵化率

Table 1 The chicken embryos viable rates and birthrates with different sealing materials																				%
组别 Group	存活率 Viable rates																			孵化率 Birthrate
	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d		
(n= 95)	46.8	42.6	40.4	35.1	34.0	34.0	31.9	31.9	30.9	30.9	29.8	29.8	25.5	20.2	11.7	9.6	9.6	9.6	9.6	
(n= 98)	54.1	53.1	36.7	36.7	33.7	31.6	22.4	22.4	22.4	21.4	19.4	19.4	18.4	16.3	10.2	5.1	5.1	5.1	5.1	
(n= 45)	44.4	42.2	40.0	35.6	33.3	28.9	26.7	26.7	24.4	24.4	20.0	20.0	15.6	13.3	11.1	6.7	4.4	4.4	4.4	
(n= 41)	43.9	41.5	36.6	36.6	34.1	34.1	34.1	26.8	26.8	22.0	22.0	19.5	17.1	17.1	12.2	7.3	2.4	2.4	2.4	
(n= 44)	45.5	43.2	38.6	38.6	36.4	31.8	25.0	20.5	20.5	18.2	15.9	13.6	11.4	11.4	11.4	6.8	0		0	
(n= 9)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	0													0	
(n= 8)	50.0	37.5	37.5	25.0	12.5	0													0	
(n= 8)	37.5	37.5	25.0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	0				0	
对照组 Normal (n= 22)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	95.5	90.9	90.9	90.9	90.9	86.4	86.4	81.8	81.8	

注: n 表示样本数。
Note: n stands for number of sample

从表 1 可以看出, 整个孵化过程有 2 个死亡高峰, 分别为 1~ 4 日龄和 16~ 19 日龄, 特别是 1~ 4 日龄。在正常孵化温度、湿度条件下, 导致死亡的原因可能为 3 个方面: 开窗处理使外膜受到破损, 改变了鸡胚发育的内环境, 降低了鸡胚抵御外来细菌侵染和一些物理化学变化的能力; 封口材料的通透性与未开窗的不同, 对气体交换、水分交换均有影响; 在 16~ 19 日龄出现第 2 个死亡高峰是由于此间胚胎由尿囊绒毛膜的吸收转至肺呼吸, 需要相应的高 CO₂ 低 O₂ 内环境因子刺激胚胎肺呼吸的启动^[6,7], 生理变化大, 需氧量大, 此时胚胎容易死亡。

3 讨 论

(1) 从本试验结果可以看出, 处理组的孵化率极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 表明部分去壳对孵化率具有显著的负向效应, 不同封口方法对鸡胚的存活率及孵化率具有一定的影响。在 1~ 4 日龄时出现了胚胎的第 1 个死亡高峰期, 原因有可能是此期的胚胎非常弱, 容易受内、外环境的影响, 另外由于部分去壳处理使外膜受到破损, 从而降低了鸡胚抵抗外来细菌侵染的能力。封口后注射抗生素降低了污染机会, 提高了孵化率, 孵化率也高于未进行注射

的同处理第 组。表明孵化过程中的灭菌条件对鸡胚胎有重要影响作用。
(2) 18~ 19 日龄是死亡的第二个高峰, 其中除生理变化大及去壳造成的物理损伤和应激外, 钙源供给上的差异可能也是其中的一个主要原因。在鸡胚的发育过程中, 80% 的钙来自鸡蛋壳, 而此试验将蛋壳去掉了一部分, 鸡胚后期发育死亡的增加很可能与缺钙有关^[7,8]。因此在不影响转基因操作的情况下, 开口应尽可能小。
(3) , , 组存活率明显低于 , , , 组, 其中 , , 组封口材料的通透性比 , , , 组都强, 到第 5 天时, 多数蛋壳膜就已开裂, 蛋清流出, 造成蛋内水分和营养的流失以及污染的加重, 失水严重。在解剖死胚时发现, 胚胎与蛋壳膜发生粘连, 表明这可能是造成胚胎死亡的一个重要原因。因此在第一批试验后这 3 组就未继续再做。
(4) 第 组封口方法通透性相比 , , 弱, 但因其比较薄, 解剖死胚时发现胚与封口粘连情况较多; , 两组使用了石蜡封口, 相对也抑制了水分散发的速度; 组用蛋壳膜+ 封口胶, 一定程度防止胚盘的粘连, 又抑制了水分的蒸发, 得到了 9.6% 和 5.1% 的孵化率; , 组孵化率分别为

4 4%, 2 4%, 这一结果与贾彦征等^[2]、刘士寻等^[3]利用蛋壳膜+ 保鲜膜、医用消毒膜封口孵化率达 3 6% 和 2 5%~ 5% 相近。但与曹志贱等^[9]直接用无菌、透气的保鲜膜封口平均孵化率达 64% 相比, 本试验的孵化率还比较低。这可能是由于操作不熟

练, 经验不足, 导致死亡率高。因此, 在以后试验中有待于进一步研究降低鸡蛋开窗对鸡胚盘细胞的应激和不利影响, 为下一步转基因鸡的制备提供操作更简便、更可行的试验依据。

[参考文献]

- [1] Speksnijder G, Ivarie R. A modified method of shell windowing for producing somatic or germ line chimera in fertilized chicken eggs[J]. Poultry Science, 2000, 9: 1430- 1433
- [2] 贾彦征, 熊一力, 刘光泽, 等. 鸡胚培养与嵌合体鸡的制备[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(5): 93- 94
- [3] 刘士寻, 燕海峰, 肖兵南, 等. 鸡蛋开窗法导入供体胚盘细胞对家鸡胚胎发育的影响研究[J]. 生命科学研究, 2001, 5(3): 270- 274
- [4] Maeda T, Yamakawa Y, Masuda K, et al. Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs[J]. British Poultry Science, 1997, 38(3): 241- 244
- [5] 李碧春, 赵东伟, 陈国宏, 等. 鸡胚胎代用蛋壳及异体移植孵化的初步研究[J]. 西北农业学报, 2001, 10(2): 17- 21
- [6] Petitte J N, Clark M E, Llug G, et al. Production of somatic and germ line chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells[J]. Development, 1990, 108: 185- 189
- [7] 刘旭光. 鸡胚胎操作技术[J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(1): 47- 48
- [8] Ono T, Murakami M, Mochii K, et al. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching[J]. Development Biology, 1994, 16(1): 126- 130
- [9] 曹志贱, 肖兵南, 燕海峰, 等. 鸡胚部分去壳离体培养的效果和发育观察[J]. 生命科学研究, 2000, 4(2): 147- 150

Effect of partially deshelled culture of chick embryos with eight sealing methods

HE Guang-yu, LI Bi-chun, SUN Hua-i-chang, XIAO Xiao-jun, QIN Jie, WU Jun-hong

(College of Animal Science, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: A total of 348 fresh eggs of Suqin-96 layers were divided into 8 groups after having being hatched for 24- 28 hours. Each egg was ripped a 0.5- 1.0 cm hole and the windows of each of the 8 groups were sealed with different shields, and observed the effect on chicken embryos survival rate and hatchability. The results were as follows: the 5 treated groups/sealing materials were: eggshell membrane + wrap film (injecting antibiotic for successive 3 days after sealed); eggshell membrane + wrap film; wrap film + cotton; eggshell membrane + sealing wax; eggshell membrane + egg shell powdery remnant + seaking wax. The survival rates of these 5 treated groups were not significantly different ($P > 0.05$) before the 19th day. The hatchabilities of the first 4 treated groups were 9.6%, 5.1%, 4.4%, 2.4% respectively. The left 3 groups sealing materials were: eggshell membrane; eggshell membrane + egg shell powdery remnant + egg white; eggshell membrane + eggshells powdery remnant. The developments of these 3 groups' embryos were not good before the 19th days, and significantly lower than the first 5 groups ($P < 0.05$). Compared with the 8 treatments, the first 5 treatments could be choosed for production of transgenic chicken in practical applications.

Key words: chicken embryos; birthrate; transgenic chick; *in vitro*; partially-deshelled; sealing