鸡胚原壳体外培养研究*

郝志明, 马文芝, 祁茂铜, 闵亨辉
(天津农学院 动物科学系, 天津 300384)

[摘　要]　以种蛋原壳为鸡胚体外培养的孵化蛋壳, 就开孔位置、开孔大小以及鸡胚胚龄对鸡胚体外培养效果的影响进行了研究。结果表明: (1) 小头侧面开孔明显优于小头顶端开孔($P < 0.01$), 小头侧面开孔的已孵化 3 d 鸡胚的孵化率为 80.0 %, 而小头顶端开孔的则只有 60.0 %; (2) 随着开孔直径的增加, 鸡胚孵化率呈下降趋势, 开孔直径为 0.5, 1.0 和 1.5 cm 时的孵化率分别为 80.0 %, 30.0 % 和 16.7 %; (3) 在小头侧面开孔且孔直径为 0.5 cm 时, X 期鸡胚和已孵化 3 d 鸡胚的体外培养孵化率差异达极显著水平($P < 0.01$), 已孵化 3 d 鸡胚的体外培养孵化率为 80.0 %, X 期鸡胚的孵化率则为 0。

[关键词]　鸡胚; 体外培养; 胚龄; 存活率; 孵化率
[中图分类号]　S831.3+2　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1671-9387(2005)09-0035-04

早在 1896 年, Assheton 等就曾试图将鸡胚放在玻璃器皿中培养。然而, 直到 20 世纪 80 年代, 鸡胚体外培养技术才逐步得以建立。1984 年, Ono[1] 将孵化 2.5 d 的鹌鹑胚胎转移到鸡蛋壳内培养, 有 3 % 的鹌鹑孵出。1988 年, 英国人 Perry[2] 在综合前人研究的基础上, 从鸡输卵管膨大部后段获得单细胞受精卵, 将胚胎发育的子宫期及 1～3 d 和 3～22 d 的体外期, 分别在 3 个不同的培养系统中连续培养, 成功地孵化出雏鸡, 孵化率为 7 %, 从而建立了三期培养体系。近些年随着转基因技术的发展, 以禽类输卵管为生物反应器生产活性蛋白技术蕴藏巨大商业价值, 转基因鸡体外培养技术也得到充分重视, 这方面研究报道明显增多。Rowlett 等[3]、李赞东等[4]、张文昌[5]、李善刚等[6]、李海昌[7]、李碧春等[8]、郝志明等[9]、Ono 等[10]、Naito 等[11] 分别对 3 日龄胚胎、X 期胚胎和受精卵的体外培养进行了研究, 都取得了不同程度的进展。

然而在上述研究中, 大多数都采取了转壳进行体外培养的方式。转壳的方式一方面要找双黄蛋或其他形式的大蛋壳, 另一方面转蛋过程会对禽卵结构产生一定程度的破坏, 从而对禽卵体外培养产生影响。本研究则采取不转壳进行体外培养的方式, 就开口的位置、大小以及胚龄对鸡胚原壳体外培养效果的影响进行了研究, 旨在为禽类胚胎生物工程技术的发展提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　种　蛋

由天津市西青区大梁庄兴华养鸡场提供。

1.2　试验设备

超净工作台(AIR TECH), 由苏宁集团安泰公司制造; 恒温恒湿培养箱(LRH-150-SH), 由广东医疗器械厂制造。

1.3　试验方法

1.3.1　超净工作台消毒　操作全过程在超净工作台上进行。试验前, 将所用种蛋、器械和试剂等置于超净工作台上, 紫外线照射 30～60 min 消毒。

1.3.2　蛋壳表面消毒　取出已孵化 3 日龄种蛋和未孵化(X 期胚胎)种蛋, 用棉签蘸取医用酒精, 由上向下擦拭消毒, 确保整个蛋壳表面均被擦拭并晾干。

1.3.3　开　口　在孵化 3 日龄的种蛋和未孵化种蛋的小头顶端或侧面用消毒后的手术刀片打孔, 孔径分别为 0.5, 1.0 和 1.5 cm。

1.3.4　封　口　预先用新鲜商品蛋剥好直径稍大的蛋壳皿, 并浸泡于加有青霉素和庆大霉素的生理盐水中, 封口时, 用滤纸吸干蛋壳皿表面的液体, 然后盖在种蛋的开口处, 用自配封口胶进行封口。确保封闭严实, 不外漏。

1.3.5　孵　化　将种蛋钝端朝上放入恒温恒湿培养箱内进行孵化。孵化温度 37.8 ℃, 相对湿度

* [收稿日期]　2005-03-24
[作者简介]　郝志明(1963-　), 男, 陕西绥德人, 副教授, 硕士, 主要从事动物胚胎生物工程研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

70 %, 转蛋角±45°, 人工翻蛋, 5～6 次/d。

1.3.6 观 察 分别在孵化的第 3, 7, 10, 12, 15 和 18 d, 通过照蛋器观察胚胎的胎膜、血管、胚体等, 以此来判断鸡胚的存活以及胚胎的发育情况。

1.4 数据处理

试验数据用百分数表示, 并用 t 检验进行组间差异的显著性检验。

2 结果与分析

2.1 开口部位对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

试验以 3 日龄鸡胚为研究对象, 分别在已孵化 3 日的种蛋小头顶端和侧面打开直径为 0.5 cm 的小孔进行体外培养, 结果见表 1。

表 1 开口部位对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

Table 1 Effect of drilling point on eggshell on *in vitro* culture of 3d chicken embryos in primary eggshells %

开口部位 Drilling point	试验蛋数 Eggs	存活率 Viable rates						孵化率 Hatching rate
		3 d	7 d	10 d	12 d	15 d	18 d	
小头顶端 At the top of acute end	30	100 (30/30)	96.7 (29/30)	90.0 (27/30)	90.0 (27/30)	90.0 (27/30)	86.7 (26/30)	60.0 (18/30)
小头侧面 At the side of acute end	25	100.0 (25/25)	100.0 (25/25)	96.0 (24/25)	96.0 (24/25)	96.0 (24/25)	92.0 (23/25)	80.0 (20/25)

由表 1 可以看出, 小头顶端开口和小头侧面开口的孵化率有极显著差异($P < 0.01$), 小头侧面开口的孵化率高达 80.0 %, 而小头顶端开孔的孵化率仅有 60.0 %。但对 18 日龄前的存活率, 2 种开孔部位并没有明显差异($P > 0.05$)。

2.2 开孔大小对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

在上述试验结果的基础上, 对 3 日龄种蛋小头的侧面分别开直径为 0.5, 1.0 和 1.5 cm 的孔, 研究开孔大小对鸡胚体外培养的影响, 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 随着开孔直径的增大, 鸡胚体外培养的孵化率呈现明显下降的趋势。开孔直径 0.5, 1.0 和 1.5 cm 时的孵化率分别为 80.0 %, 30.0 % 和 16.7 %, 开孔直径 0.5 cm 组极显著优于 1.0 cm 组和 1.5 cm 组($P < 0.01$), 1.0 cm 组显著优于 1.5 cm 组($P < 0.01$)。从死亡情况来看, 1.0 cm 组和 1.5 cm 组有共同之处, 2 组死亡高峰主要发生在开口后4 d内和 18 日龄以后的出雏过程中, 开口后4 d 内的存活率均下降了 30 %, 最后 3 d 存活率分别下降了 23.3 % 和 40.0 %; 而 7 日龄到 18 日龄的 11 d 内存活率则分别下降了16.7 % 和 13.3 %。

表 2 开孔大小对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

Table 2 Effect of diameter of the hole on eggshells on *in vitro* culture of 3d chicken embryos in primary eggshells %

开口直径/cm Diameter of the hole	试验蛋数 Eggs	存活率 Viable rates						孵化率 Hatching rate
		3 d	7 d	10 d	12 d	15 d	18 d	
0.5	25	100.0 (25/25)	100.0 (25/25)	96.0 (24/25)	96.0 (24/25)	96.0 (24/25)	92.0 (23/25)	80.0 (20/25)
1.0	30	100.0 (30/30)	70.0 (21/30)	66.7 (20/30)	60.0 (18/30)	56.7 (17/30)	53.3 (16/30)	30.0 (9/30)
1.5	30	100.0 (30/30)	70.0 (21/30)	66.7 (20/30)	60.0 (18/30)	56.7 (17/30)	56.7 (17/30)	16.7 (5/30)

2.3 胚龄对鸡胚体外培养的影响

在种蛋小头侧面开孔且其直径为 0.5 cm 时, 对未孵化(X 期鸡胚)和已孵化 3 d 的种蛋进行体外培养试验结果(表 3)表明, X 期鸡胚极不宜进行体外培养, 在同等条件下, 3 日龄鸡胚的体外培养孵化率高达 80.0 %, 而 0 日龄鸡胚的孵化率为 0, 两者差异显著($P < 0.01$)。从死亡动态来看, 0 日龄鸡胚的死亡主要集中于胚胎发育的前半期, 在 12 日龄之前, 鸡胚的存活率下降达 87.1 %。

表 3 胚龄对鸡胚体外培养的影响

Table 3 Effect of embryo age on *in vitro* culture of chicken embryos in primary eggshells %

胚龄/d Embryo age	试验蛋数 Eggs	存活率 Viable rates					孵化率 Hatching rate
		3 d	7 d	12 d	15 d	18 d	
0	31	67.7 (21/31)	51.6 (16/31)	12.9 (4/31)	6.5 (2/31)	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)
3	25	100.0 (25/25)	100.0 (25/25)	96.0 (24/25)	96.0 (24/25)	92.0 (23/25)	80.0 (20/25)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨　论

3.1　开口位置对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

鸡胚体外培养时需要将种蛋蛋壳打开, 而打开后的蛋壳切口部位在翻蛋过程中极易与发育中的胎膜粘连, 造成胎膜破裂, 胚胎死亡。李赞东等[4]、李碧春等[8]在分析鸡胚体外培养的影响因素时都认为, 胎膜与蛋壳切口的粘连是鸡胚体外培养的主要影响因素之一。本试验在设计时已考虑到此原因, 鸡胚在原壳体外培养孵化时, 种蛋的大头要朝上, 若开孔于种蛋的大头, 孵化期间翻蛋时不可避免地会出现胎膜与蛋壳切口的粘连, 再加上翻蛋时大头的摆动幅度大, 因此很容易将幼嫩的胎膜拉破; 而开口于小头, 虽然胎膜也会与蛋壳切口粘连, 但在翻蛋过程中小头的摆动幅度小, 而且当胎膜发育到小头时胎膜与蛋壳的接触面积已很大, 接触也较为牢固, 可能在翻蛋过程中小头的胎膜并未受到牵拉, 因此对鸡胚体外培养的影响较小。从本试验结果来看, 即使在人工翻蛋情况下, 这种方法也有非常好的孵化效果, 小头侧面开孔的孵化率高达 80.0%, 几乎与完整种蛋的孵化率接近。本试验所采用的方法与其他研究者采用的方法有很大的不同, 截止目前, 还未见到相同方法的报道。为了防止胎膜与蛋壳切口的粘连以及翻蛋时的牵拉, 其他研究工作者只是将原蛋壳换成大蛋壳, 使胚胎与蛋壳切口有一定的距离, 并且翻蛋时还要控制翻蛋的角度, 绝对避免胎膜与蛋壳切口的粘连, 这种方法虽被大多数人所认可, 但由于转蛋过程中使卵受到了损伤, 且孵化期间翻蛋角度受到了限制, 因此孵化效果并不理想, 从 Rowlett 和 Simkiss[3], 李赞东等[4]及张文昌[5]的研究来看, 其孵化率在 20.0%～52.0%。因此, 可以说鸡胚原壳培养不仅能够成功, 而且具有良好的孵化效果。

从 18 日龄鸡胚的存活率来看, 小头顶端开孔和小头侧面开孔并没有明显的差异, 但在孵化的最后 3 d, 小头顶端开孔组死亡率明显高于小头侧面开孔组, 从而使 2 组间的孵化率出现差异。18 日龄后鸡胚处于出雏期, 因此可以说, 小头顶端开口不利于鸡胚的出壳, 这可能是由于小头顶端开口影响了胎膜在小头顶端的合拢, 以及最后卵黄的吸收而使雏鸡较弱不能破壳所致。

3.2　开孔大小对 3 日龄鸡胚体外培养的影响

由于以前研究[3～5]多采用转壳的办法进行鸡胚体外培养, 这种方法蛋壳的切口直径一般在 2 cm 左右, 以使蛋黄能够顺利转出和转入。本研究由于不转壳, 因此开孔可以小一些以减少开孔的影响。本试验设计了 0.5, 1.0 和 1.5 cm 3 种开孔直径, 从试验结果看, 开孔直径以 0.5 cm 最好, 随开孔直径增大, 鸡胚的孵化率呈现极显著下降趋势。分析开孔直径 1.0 cm 组和 1.5 cm 组的死亡时间后发现, 这 2 组鸡胚的死亡主要集中于开口后和出壳前不久, 开口后不久死亡高的原因可能是由于蛋壳开口大, 封口胶不够理想, 致使封口过程中反复颠倒试验蛋, 从而造成胎膜与切口的粘连牵拉所致, 对此可通过改善封口胶质量、提高封口技术加以解决; 而对出壳前不久的死亡, 则可能是由于开口太大, 严重影响了营养(包括钙)的吸收, 阻碍了鸡胚的发育成熟。经对未出壳死胚的解剖观察, 发现蛋壳开孔处有完整的胎膜覆盖, 但该处胎膜上血管稀少, 有些卵黄吸收不完全。

3.3　胚龄对鸡胚体外培养的影响

本试验结果表明, 胚龄对鸡胚体外培养有极其显著的影响。3 日龄鸡胚非常适合体外培养, 而 0 日龄鸡胚则不可用于体外培养。这一结果与 Dunn 和 Boone[12]的研究结果极为相似。在孵化期间, 0 日龄鸡胚绝大部分在孵化的前半期死亡, 死亡的主要原因不可能是卵结构的破坏和微生物的污染, 也不可能是胎膜与蛋壳切口的粘连, 因为鸡胚未进行转蛋, 也未发现死亡鸡胚中有微生物存在的迹象, 由于开孔在小头侧面, 且开孔直径只有 0.5 cm, 因此胎膜与切口的粘连造成胎膜破裂的可能性也不大。对真正影响 0 日龄鸡胚体外培养的因素, 尚有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Ono T. Mineral conter of quil embyos cultured in mineral-rich and mineral-tree condition[J]. Poultry Science, 1984, 63: 159- 166.

[2] Perry M M. A complete culture system for the chick embryo[J]. Nature, 1988, 311: 70- 72.

[3] Rowlett K, Simkiss K. Explanted embryo culture *in vitro* and *in vivo* techniques for domestic fowl[J]. British Poultry Science, 1987, 28: 91- 101.

[4] 李赞东, 杜国清, 周顺伍, 等. 在代用蛋壳中孵化鸡胚[J]. 畜牧兽医学报, 1994, 25(6): 481- 484.

[5] 张文昌. 鸡胚胎换蛋壳培养[J]. 中国家禽, 1991, 13(6): 31- 32.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[6] 李善刚, 杜立新. 鸡胚胎体外培养的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(2): 125- 128.
[7] 李海昌. 鸡胚的体外培养和转基因鸡的研究[D]. 北京: 北京农业大学, 1995.
[8] 李碧春, 赵东伟, 陈国宏, 等. 鸡胚胎代用蛋壳及异体胚盘移植孵化的研究[J]. 西北农业学报, 2001, 10(2): 17- 21.
[9] 郝志明, 卢 祺. X 期鸡胚简易体外培养方法的探索[J]. 天津农学院学院, 2003, 10(4): 36- 38.
[10] Ono T, Murakami M, Mochii K, et al. A complete culture system for avain transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching[J]. Development Biology, 1994, 16(1): 126- 130.
[11] Naito M, Nirasawa K, Oishi T. An *in vitro* culture method for chicken embryos obtained from the anterior portion of the magnum of oviduct[J]. British Poultry Science, 1995, 36: 101- 104.
[12] Dunn B E, Boone M A. Growth and mineral content of cultured chick embryos[J]. Poultry Science, 1997, 56: 622- 672.

Study on *in vitro* culture of chicken embryo in primary eggshell

HAO Zhi-ming, MA Wen-zhi, QI Mao-tong, MIN Heng-hui
(*Department of Animal Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin* 300384, *China*)

Abstract: The effects of embryo age, drilling point and the size of the hole on eggshells on *in vitro* culture of chicken embryos in primary eggshells were studied. The results show that hatching rate of the egg with the hole at the side of acute end (80.0 %) is better ($P < 0.01$) than that at the top of acute end (60.0 %); that hatching rates of eggs with the drilling holes in diameters of 0.5, 1.0 and 1.5 cm were 80.0 %, 30.0 % and 16.7 % respectively; and that hatching rates of chicken embryos of 3 days (80.0 %) is better ($P < 0.01$) than that of chicken embryos of 0 day.

Key words: chicken embryo; *in vitro* culture; embryo age; viable rate; hatching rate

《西北农业学报》2006 年征订启事

《西北农业学报》是教育部主管、西北农林科技大学和甘肃、宁夏、青海、新疆农(林)业科学院和新疆、青海畜牧(兽医)科学院及新疆农垦科学院联合主办的综合性农林牧业学术期刊。本刊立足大西北, 面向国内外, 主要刊登农学、林学、植(森)保、土壤肥料、节水灌溉、旱地农业、园艺、食品加工、贮藏、保鲜、畜牧兽医、农业机械、农田水利等学科在基础理论研究和应用技术理论研究方面具有创见的学术论文、领先水平的科研成果, 研究简报及有新意的综述性论文等。主要读者对象为农林牧业科技人员、农业院校师生及农业科技管理人员等。

《西北农业学报》于 1992 年创刊, 现为全国综合性农业科学类中文核心期刊、中国科技核心期刊和中国科学引文数据库核心期刊。已被国内外 20 多家数据库和文摘期刊固定转载或收录。

《西北农业学报》2006 年为双月刊, 逢单月 16 日出版, 大 16 开本, 184 页。国内外公开发行, 邮发代号 52-111; 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 代号 Q 4380。每期每册定价 15.00 元, 全年 6 期 90.00 元。全国各地邮局均可订阅, 亦可直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 陕西杨凌西北农林科技大学西林校区大铁 10 号信箱
邮政编码: 712100 联系电话: 029-87082760, 87082010
网址: http://xbnx.chinajournal.net.cn
E-mail: xbnx@chinajournal.net.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net