

文章编号: 1007-7847(2000) 02-0147-04

鸡胚部分去壳离体培养的效果与发育观察

曹志贱, 肖兵南, 燕海峰, 戴求仲, 吴晓林

(湖南省畜牧兽医研究所, 中国湖南 长沙 410131)

摘要: 将 25 枚产后不到 24 h 的种蛋, 依次用碘酒和 70% 酒精擦拭消毒处理, 去掉其钝端外壳三分之一, 然后用保鲜膜密闭封口, 并以 25 枚正常种蛋作为对照, 按常规方法进行孵化. 重复实验 3 次. 第 1 次孵化, 实验组的孵化率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 仅为 44%; 第 2 次孵化, 两组的孵化率比较接近 (分别为 72% 和 80%); 第 3 次孵化, 实验组的孵化率 (76%) 稍低于对照组 (88%). 3 次孵化的平均孵化率, 实验组和对照组分别为 64% 和 84%. 胚胎的发育观察结果表明, 实验组和对照组的胚胎发育差别始于鸡胚发育的第 12 d, 并且, 实验组鸡蛋发育到第 18 d 时鸡胚的死亡率明显增加, 说明去壳处理对于鸡胚的发育有一定的影响. 与鸡胚的完全换壳离体培养相比, 部分去壳的方法操作比较简单, 切实可行.

关键词: 鸡; 胚胎; 离体培养; 发育

中图分类号: Q954.4; S831.3 文献标识码: A

Effect of Partially-deshielded *In Vitro* Culture of Chicken Embryos

CAO Zhi-jian, XIAO Bing-nan, YAN Hai-feng, DAI Qiu-zhong, WU Xiao-lin
(Hunan Institute of Animal and Veterinary Sciences, Changsha 410131, Hunan, China)

Abstract: A total of 25 fresh eggs from ISA B-380 P. S. layers were collected within 24 hours after laying. One-third of the eggshell was carefully removed from the obtuse end of each egg after disinfection, and sealed up again with sterilized artificial membrane. Another 25 intact breeding eggs were used as controls. All 50 eggs were incubated under normal conditions (37.8 °C, 65% RH). Similar experiment was repeated three times. In the first experiment, the hatchability for the partially shielded group was only 44%, significantly lower than that of the control. The second experiment, however, indicated similar hatchabilities between the partially deshelled and the intact groups (72% vs 80%). The hatchability of the treatment group (76%) was a little bit lower than that of the control group in the third experiment. Average hatchabilities for both groups were

收稿日期: 2000-03-08

基金项目: 中捷政府间科技合作基金资助项目(98-41-22)

作者简介: 曹志贱(1972-), 男, 湖南人, 武汉大学生命科学院硕士研究生; 肖兵南(1949-), 男, 湖南人, 研究员; 燕海峰(1968-), 男, 湖南人, 助理研究员; 戴求仲(1970-), 男, 湖南人, 四川农业大学动物科技学院博士研究生; 吴晓林(1964-), 男, 湖南人, 副研究员, 博士, 项目主持人.

64% and 84% respectively. Observation of the development of chicken embryos revealed the negative effect of partial deshelling on embryo development. Obvious difference between the treatment and the control occurred on 12 days of incubation, and with dramatic increase of mortality observed on days 18 for the partially deshelled eggs. With partial deshelling, physical injury and infection could be minimized as compared with that in complete replacement of the eggshell, and because partial deshelling is simple in operation, this method could be one of choices for *in vitro* culture of chicken embryos in practical applications.

Key words: chicken; embryos; *in vitro* culture; development

家禽类的卵是一个独立的营养系统,可以不依赖于母体而完成其发育过程,这与哺乳动物具有明显的差别.关于家禽胚胎发育方面的研究较多. Rowlett 和 Simkiss^[1]、M. M. Perry^[2]、Naito and Perry^[3]、Naito 等^[4]、李赞东等^[5]、以及杜立新等^[6]先后进行了不同程度的鸡胚的换壳培养,并获得成功.完全离体体外培养,即从鸡的输卵管膨大部分取出合子体外培养至出鸡需要 22 d^[1],比常规孵化鸡胚时间(21 d)多 1 d.鸡胚离体培养的成功,方便了人们直接研究鸡胚的整个发育过程,以及药物、放射线等其它物理化学因素对鸡胚发育的影响^[7],尤其是为家鸡转基因研究生产“目的鸡”提供了切实可行的途径.由于鸡胚换壳操作不可避免地使鸡胚或多或少地出现损坏,造成鸡胚非自然因素的死亡,同时鸡胚的换壳操作会增加鸡胚受污染的机会,报导的孵化率偏低.

本研究旨在通过对部分(三分之一)去壳离体培养的鸡胚发育过程的观察,探讨提高离体培养鸡胚孵化率的方法,以期为后继的转基因鸡研究提供参考.

1 材料与方 法

供试种蛋来自湖南省畜牧兽医研究所蛋鸡祖代场饲养的伊莎 B-380 父母代种蛋,孵化器采用上海实验仪器厂生产的恒温恒湿培养箱,保鲜膜从 Sigma 公司订购.

在无菌的条件下,将新产不到 24 h 的伊莎 B-380 父母代种蛋依次用碘酒和 70% 酒精擦拭消毒处理,然后在其钝端用已经消毒处理好的眼科剪小心地将蛋壳的三分之一去掉,使鸡蛋的钝端产生一个直径约 3 cm 的开口,再用无菌、透气的保鲜膜封口密闭,把处理好的伊莎 B-380 父母代种蛋置于用高锰酸钾熏蒸消毒的恒温恒湿培养箱中进行孵化.孵化条件为前 18 d 温度是 37.8℃,相对湿度是 65%~70%,后 3 d 的温度为 37.6℃,相对湿度为 60%.孵至 20 d 时,在保鲜膜上用针尖扎几个小孔以便有适量的空气进入,有利于鸡雏的呼吸.出雏前几小时将无毒薄膜去掉^[4].孵化期间定期检查胚胎的发育情况.

2 结果与分析

第 1 次孵化,实验组的孵化率显著低于对照组($P < 0.05$),对照组的孵化率为 84%,而实验组只有 44%.第 2 次孵化,两组的孵化率比较接近(分别为 72%和 80%),差异不显著($P > 0.05$).第 3 次孵化,实验组的孵化率稍低于对照组($P < 0.05$),分别为 76%和 88%.3 次孵化的平均孵化率,实验组和对照组分别为 64%和 84%,差异显著($P < 0.05$).孵化率统计结果见表 1.

表 1 实验组和对照组鸡胚发育对比

Table 1 A comparison of chicken embryo development between *in vitro* culture and normal hatching

孵化天数/d Cultured days		活胚数 Number of embryos alive											孵化率 Hatchability(%)	
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20		21
第 1 次	对照组	25	25	25	25	24	24	23	23	23	23	21	21	84.0 ^a
	实验组	25	25	25	25	24	23	19	18	17	17	13	11	44.0 ^b
第 2 次	对照组	25	25	25	25	24	23	23	22	22	21	20	20	80.0 ^a
	实验组	25	25	25	25	25	24	21	21	21	21	19	18	72.0 ^a
第 3 次	对照组	25	25	25	25	24	24	24	23	23	22	22	22	88.0 ^a
	实验组	25	25	25	25	24	24	23	22	21	21	19	19	76.0 ^b

注: a, b- 上标字母不同者差异显著($P < 0.05$).



图 1 部分去壳离体培养组新出壳鸡雏

Fig. 1 A newly hatched chick from *in vitro* culture

胚胎的发育观察结果表明, 实验组和对照组的胚胎发育差别始于鸡胚发育的第 12 d. 也就是说, 实验组鸡胚发育进入 12 d 后, 实验组鸡胚的死亡数增加速度快于对照组, 并且, 实验组鸡蛋发育到第 18 d 时鸡胚的死亡率急剧增加. 由此观之, 去掉鸡蛋钝端蛋壳的“离体培养”对鸡胚的发育有一定的影响. 图 1 为去壳培养 21 d 后刚刚出壳的雏鸡, 它们在外观和生活力方面与正常孵化的鸡胚和雏鸡没有明显的区别.

3 讨论与结论

3 次孵化实验中, 第 1 次的实验组孵化率极显著低于对照组, 仅为 44%. 其主要原因是: 1) 首次实验由于经验不足, 温度与湿度控制不准. 因此从第 2 次孵化开始, 我们采用电接点控温装置, 把温度的波动幅度控制在 0.5 以内, 并且湿度也控制在允许的范围; 2) 部分去壳使得外壳膜受到破损, 这就不可避免地使鸡胚抵御外来细菌等物理、化学因素的影响降低. 此后我们倍加小心操作, 保证鸡蛋外壳膜完好无损, 并把好种蛋和孵化消毒关, 将胚胎

感染病菌的机率降低到最小限度; 3) 首次孵化时的人工气室太小, 鸡胚在发育的后期, 本身的代谢产热增加, 保鲜膜的通透性不良、散热不畅。在实验过程中, 观察到了在保鲜膜的下面结有许多小水珠, 所以从第 2 次孵化起, 适当加大人工气室, 同时, 在孵化的后期又适当地降低温度(约 0.5 ℃), 并增加凉蛋的次数。

实验组平均 3 次孵化率显著低于对照组, 表明部分去壳对于孵化率具有显著的负向效应。其中除了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^[4, 8]。鸡胚的发育过程中 80% 的钙来自鸡蛋壳, 而在离体培养组三分之一的鸡蛋壳已被去掉, 鸡胚后期发育死亡的增加很可能与缺钙有关; Goto^[9]指出, 在培养过程中添加蛋钙粉可提高培养效果, 这主要是补充了部分钙等矿物质所致。另外, 发育的后期需要相应的高 CO₂ 低 O₂ 内环境因子刺激胚胎肺呼吸的启动^[10]。因此, 我们建议用 CO₂ 培养箱代替普通培养箱, 将 CO₂ 控制在 5% 左右, 此举可望提高胚胎的成活率, 延长成活时间^[11]。与鸡胚的完全换壳离体培养相比, 部分去壳的方法操作比较简单, 切实可行。并且, 由于部分去壳处理降低了实验过程中对鸡胚的物理伤害, 同时也降低了鸡胚感染病菌污染的机率, 得到的实验结果(孵化率)较为理想。因此, 我们认为, 部分去壳是一个值得提倡的鸡胚离体培养方法。

参考文献:

- [1] ROWLETT K, SIMKISS K. Explanted embryo culture: *in vitro* and *in vivo* techniques for domestic fowl[J]. Brit Poult Sci, 1987, 28(1): 91-101.
- [2] PERRY M M. A complete culture system for the chick embryo[J]. Nature, 1988, 331(6151): 70-72.
- [3] 李赞东, 杜国清, 周顺五, 等. 在代用蛋壳中孵化鸡胚[J]. 畜牧兽医学报(LI Zan-dong, DOU Guo-qing, ZHOU Shun-wu, et al. Incubating chicken embryos with replaced eggshells [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica), 1994, 25(6), 481-484.
- [4] NAITO M, PERRY M M. Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch [J]. British Poult Sci, 1989, 30(2): 251-256.
- [5] NAITO M, NIRASAWA K, OISHI T. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching[J]. J Exp Zoo, 1990, 254(3): 322-326.
- [6] 杜立新, 李善刚, 蒋满喜, 等. 鸡胚体外培养和嵌合体鸡的制备[A]. 傅衍. 中国动物遗传育种进展[C], 北京: 中国农业科技出版社(DU Li-xin, LI Shan-gang, JIANG Man-xi, et al. Cultured the chicken embryos *in vitro* and production of chicken chimeras [A]. FU Yan. Adv Anim Genet Breed China[C]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press), 1999. 251-256.
- [7] 张文昌. 鸡胚胎换壳培养[J]. 中国家禽(ZHANG Wen-chang. Incubating chicken embryos with replaced eggshells[J]. Chin Poult Sci), 1999, 13(6): 31-32.
- [8] 刘旭光. 鸡胚胎操作技术[J]. 中国畜牧杂志(LIU Xu-guang. Techniques for manipulating chicken embryo [J]. Chin J Anim Sci), 1998, 34(1): 47-48.
- [9] ONO T, MURAKAMI T, MOCHII M, et al. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching[J]. Develop Biology, 1994, 16(1): 126-130.
- [10] DUNN B E. Technique for shell-less culture of the 72-hours avian embryo[J]. Poult Sci, 1974, 53(1): 409-412.
- [11] GOTO K, TAKAHASHI Y, NAKANISHI Y, et al. Developmental study of the chick embryo *in vitro*[J]. Japan Poult Sci, 1988, 25(1): 27-33.