

介绍鸡胚体外无壳培养方法*

陈 一 平**

(福建师范大学生物系发育生物学研究室)

鸡蛋作为生物学的实验材料,其历史已经相当悠久。鸡蛋取材方便,孵化条件简单,且一年四季都有新鲜材料可取,是胚胎学,发育生物学教学、科研的良好材料。但鸡胚在壳内发育,观察、实验又有其不便之处。鸡胚体外无壳培养可以克服这些缺点。在胚胎学教学上,它有利于直观教学,学生可以直接观察鸡胚发育过程,观察胚胎与胚胎外膜的关系,胚胎的行为及循环模式,确定胚胎结构等。在实验胚胎学和发育生物学实验及科研方面,可以克服传统的“开窗法”所带来的种种不便,易于进行各种鸡胚的外科手术,如切除肢芽、破坏神经管、尿囊绒膜移植等,对于发育的行为学、畸胎学及生理学研究,也是一种良好的方法。也有人把鸡胚无壳培养技术应用于肿瘤诱导的血管形成^[3],中枢神经组织的培养^[4],尿囊绒膜壁对 Ca^{++} 的吸收和转运^[5],以及 Ca^{++} 对鸡胚的骨化及器官发育的影响等研究^[1,7,8]。

鸡胚体外无壳培养方法,最早见于施勒辛格尔(Schlesinger)的报道^[6],当时只能使鸡胚存活 10—12 天。经过近 20 年来许多学者的努力,现已能使鸡胚在无壳情况下存活至第 21 天。由于这方面的工作国内尚未见到报道,国外所报道的方法大体上有聚乙烯小袋法^[9]、塑料培养皿法^[2]、玻璃杯法等,其基本原理及方法都大同小异。现结合我们的工作,在这里将此方法作一介绍。

材料与 方法

1. 材料的准备 取受精的新鲜鸡蛋,置于温度为 37°C ,相对湿度为 60—70% 的孵化箱中孵育,孵育 3 天(72 小时)后取出,用浸有 70%

酒精的棉花擦拭鸡蛋外壳,凉干后备用。取消毒过的 1.5×9.5 厘米玻璃培养皿及 2.5×12 厘米玻璃培养皿(带盖)数付(根据需要),在小的培养皿内加 10 毫升左右预温的霍厄德(Howard)氏生理盐水 (NaCl 7.2 克; KCl 0.37 克; $\text{CaCl}_2 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$ 0.17 克 (0.23 克); 蒸馏水 1000 毫升),为了防止污染,也可加入 100 单位/毫升的庆大霉素。

2. 破壳 先用小镊子、锯片或刀片沿蛋壳的横轴锉出或割出 $4/5$ 长的小裂缝,在无裂缝处沿蛋的纵轴贴上一块宽为 1—2 厘米,长 3—4 厘米的胶布,在其对面裂缝的两旁各沿纵轴贴上一块宽为 1—2 厘米,长 6—7 厘米的胶布(胶布的一端与裂缝边缘齐,另一端留下一段),将无裂缝处朝上,静置 1 分钟左右,待胚胎移至上方。然后用两手的大姆指按住无裂缝处,两手的中指和食指各夹一边的一段胶布,把鸡蛋提起,平移至小培养皿的上方,贴近培养皿,两手轻轻把胶布往两边一拉,蛋的内容物即可完整地流入培养皿中。胚胎要朝上,否则不能存活。

3. 培养 把小培养皿放入大培养皿内,在大培养皿内加入一薄层的蒸馏水,以保持湿度,盖上大培养皿的盖子,置于孵化箱中培养,温度调至 37°C 。

结果与 讨论

在所培养的 63 个鸡胚中,其存活情况见表 1。

* 本文蒙丁汉波教授热忱指导,特此致谢。

** 现在工作单位: 中国科学院上海细胞生物学研究所。

表 1 无壳培养下鸡胚存活情况

存活时间(天)	鸡胚存活量	存活百分率
5	63	100%
7	55	87%
9	47	75%
11	36	57%
13	22	35%
15	14	22%
16	9	14%
17	5	8%
18	1	2%

注: 存活时间包括在壳内的 3 天。

从表 1 看, 全部鸡胚都能存活至孵化 5 天(包括在壳内 3 天, 下同)(见图 1), 87% 的鸡胚能存活至孵化 7 天。随着培养时间的推延, 鸡胚存活数逐渐减少, 至孵化 17 天时, 有 5

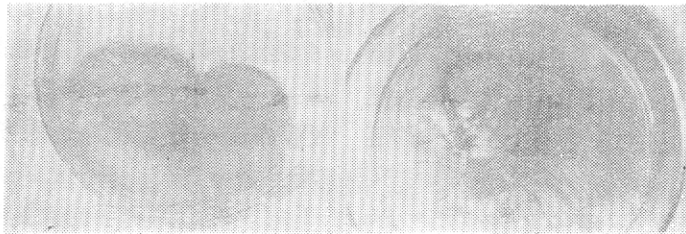


图 1 无壳培养下孵化 5 天(包括在壳内 3 天)的鸡胚;

图 2 无壳培养下孵化 17 天的鸡胚。孵化时间均包括在壳内的 3 天。

制, 无壳培养时卵与培养皿接触的位置不能进行气体交换, 气体交换面积减少一半左右; (5) 无壳培养时的后半阶段, 鸡胚不能象在壳内孵化那样, 分别通过增加和减少气室中的 CO_2 和 O_2 来刺激肺呼吸。

在我们的实验中, 培养器采用玻璃培养皿, 其优点是取材方便, 易于观察。当然, 玻璃培养皿作为无壳培养的培养器是否有利于鸡胚的存活, 尚有待于进一步研究。所采用的破壳方法, 虽然较费时间, 但切口整齐, 不易割破卵黄膜, 亦无震动, 成功率较高, 可以减少因卵黄膜受损所造成的浪费。

此外, 每次观察和实验时间不宜过长, 亦不能使其温度下降过低, 并要防止污染。

个鸡胚存活(见图 2), 至孵化 18 天时, 仅有 1 个鸡胚存活。由于用普通孵化箱培养鸡胚, 因而存活率较低。若有 CO_2 培养箱更好, 将 CO_2 浓度调至 5% 左右, 会提高鸡胚成活率及延长鸡胚存活时间。据邓恩(Dunn)报道, 若用 CO_2 培养箱培养鸡胚, 则能使 86% 的鸡胚存活至孵化 13 天, 5% 的鸡胚存活至第 20 天, 从而提高无壳情况下鸡胚的存活率。

在无壳培养中, 影响鸡胚进一步发育的原因可能有: (1) 于孵化 15 天时尿囊绒膜仍不能全部包围鸡胚, 因此, 影响卵清蛋白的吸收; 而在壳内发育时, 于孵化 11—12 天就完成这一发育步骤; (2) 由于鸡胚发育过程中, 蛋壳提供了鸡胚发育所需的 75—80% 的钙离子, 而在无壳培养中, 鸡胚得不到足够的钙离子, 因此, 影响其骨化作用; (3) 无壳培养时鸡胚所处的温度和湿度有所差异; (4) 气体交换受到限

参 考 文 献

- [1] 渡边一雄, 井村加奈代 1983 卵壳外培養によるトリ胚の発生——生存率, 形態, 生长速度, 化骨に対する卵殼の意義。動物学雑誌。92(1): 64—72.
- [2] Auerback R. et al. 1974 A simple procedure for the long-term cultivation of chick embryos. *Develop. Biol.* 41(2): 391—394.
- [3] ————— 1975 Tumor-induced angiogenesis: Lack of inhibition by irradiation. *Int. J. Cancer.* 15(2): 241—245.
- [4] Corner M. A. et al. 1973 Extended survival of the chick embryo in vitro. *Experientia.* 29(4): 467—468.
- [5] Dunn, B. E. 1974 Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo. *Poultry Sci.* 53(1): 409—412
- [6] ————— 1976. Growth of the chick embryo in vitro. *Poultry Sci.* 55(3): 1067—1071.