

鸡体内早期胚胎发育的研究

Early Embryonic Development in Chickens

高雯, 蔡中涛, 孙红艳, 左其生, 张亚妮, 李碧春*

动物科学与技术学院/江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 扬州大学, 扬州, 江苏

*通讯作者邮箱: yubcli@yzu.edu.cn

引用格式: 高雯, 蔡中涛, 孙红艳, 左其生, 张亚妮, 李碧春. (2022). 鸡体内早期胚胎发育的研究. *Bio-101* e1010953. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010953.

How to cite: Gao, W., Cai, Z. T., Sun, H. Y., Zuo, Q. S., Zhang, Y. N. and Li, B. C. (2022). Early Embryonic Development in Chickens. *Bio-101* e1010953. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010953. (in Chinese)

摘要: 【原理】早期胚胎发育通常是指从受精卵起到胚胎出离卵膜的一段过程。鸡的胚胎发育过程分为体内和体外两个阶段。体内是蛋形成过程中的胚胎发育, 在鸡体内的输卵管中进行。产出体外后, 胚盘在合适的温度和湿度条件下继续发育产生新的个体。鸡体内早期胚胎发育过程是随不同的时龄呈现动态变化, 但是观察该过程需要杀鸡取卵 (蔡中涛, 2006)。【目的和方法】为建立鸡体内早期胚胎发育规律的判断依据和标准, 本实验通过解剖法和显微观察法对鸡产蛋后不同时间段内输卵管或子宫中发育的受精卵进行了观察和记录。【结果】结果显示: 受精卵的第一次分裂发生在产蛋后 5 h (0-0.5 h 子宫龄), 桑葚期形成在产蛋后 11.5 h (6-6.5 h 子宫龄)、囊胚期形成在产蛋后 15.5 h (10-10.5 h 子宫龄)。根据胚盘形态发育的变化, 可将鸡胚体内发育过程分为两个时期: 距前一个蛋产出后 5.5 h (0-1 h) 至 15.5 h (10-10.5 h 子宫龄) 为鸡胚卵裂期, 期间形成 6-7 层细胞的胚层; 距前一个蛋产出后 17.5 h (12-12.5 h 子宫龄) 至明区形成期, 即为鸟类的囊胚期, 胚盘中央形成透明的明区, 周围形成不透明的暗区。【结论】本研究从时间顺序上系统地研究了鸡体内早期胚胎发育过程的形态变化、群体动态及发生的明显发育事件, 为发育生物学和鸡胚胎的遗传操作提供了理论及实践依据。

关键词: 鸡, 胚胎发育, 卵裂期, 囊胚期

材料与试剂

1. 粘附载玻片（PCI 系列）（江苏世泰实验器材有限公司，世泰，产品目录号：80313-7161-16）
2. 正常产蛋乌骨鸡母鸡（江苏省家禽研究所）
3. Rossman 固定液（北京华越洋生物，华越洋，产品目录号：WG06773）
4. 无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，沪试，产品目录号：1009218）
5. 正丁醇（国药集团化学试剂有限公司，沪试，产品目录号：10005218）
6. 氯化钠（国药集团化学试剂有限公司，沪试，产品目录号：10019318）
7. 中性树胶（北京索莱宝科技有限公司，Solarbio，产品目录号：G8590）
8. 0.75%氯化钠（见溶液配方）
9. 70%（80%、90%）无水乙醇（见溶液配方）

仪器设备

1. 奥林巴斯研究级显微镜（奥林巴斯株式会社，奥林巴斯，BH2）

实验步骤

1. 将经过人工授精的产蛋母鸡单笼饲养。于每日清晨六点开始仔细观察并记录每一只母鸡产蛋的精确时间。在产前一个蛋后的不同时间点收集受精卵，即在 4 h、5 h、5.5 h、6 h、6.5 h、7.5 h、8.5 h、9.5 h、10.5 h、11.5 h、12.5 h、13.5 h、14.5 h、15.5 h、17.5 h、19.5 h、21.5 h、22.5 h 和 23.5 h 分别将鸡处死（处死前，先用手伸入鸡泄殖腔内检查是否有蛋），剖腹，从输卵管或子宫中取出发育的受精卵，每个时间点取 3 个蛋。
2. 将取出的蛋放入培养皿中，用镊子去除表面的蛋壳、壳膜和卵白等物质，滴加 Rossman 固定液于胚盘上，10 min 后取出胚盘，放入 40 °C、0.75% 的生理盐水中漂洗以去除附着的卵黄颗粒。接着，将蛋置于 Rossman 固定液中固定 20 分钟后，再依次放入 70%、80%、90%、100% 的无水乙醇中逐级脱水，每次脱水时长约 1 h。最后，将蛋置于正丁醇中透明过夜，取出蛋后迅速用中性树胶封片，显微镜观察、记录、拍照。

结果与分析

产蛋周期长的母鸡每隔 25-26 h 就排一枚卵，卵的主要组成是卵黄和位于上方直径约 2-3 mm 的盘状细胞质，细胞核位于其中。排出的卵在输卵管喇叭口受精，之后经过 5 h 的下行进入子宫，期间卵被子宫不同区域腺体分泌的蛋清和壳膜逐渐包裹，并在子宫肌肉蠕动作用下围绕长轴以 10-15r/h 的速度旋转 20 h，最后在软壳膜上沉积钙，形成硬壳后产出。在通过鸡输卵管和子宫的整个过程中，受精卵完成分裂发育，这一过程被称之为鸡胚胎体内早期发育的时期。在本实验中，按照受精卵分裂过程中的形态变化标准及受精卵在输卵管和子宫中停留的时间来分，共分为二个阶段：卵裂阶段（第一阶段）；明区形成阶段（第二阶段）。结果如下：

1. 卵裂阶段

a. 产蛋后 4 h（0 h 子宫龄）：

此时，受精卵位于输卵管峡部，卵黄被一层浓蛋白包裹，胚盘上没有分裂沟（图 1）。

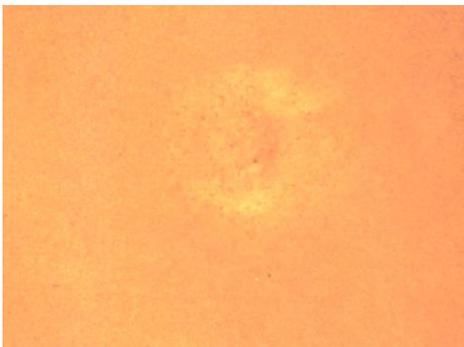


图 1. 产后 4 h(HH1)受精卵（200X）

b. 产蛋后 5 h（0-0.5 h 子宫龄）：

受精卵的大部分位于输卵管峡部，小部分已经进入子宫部，胚盘中央出现一条分裂沟。由于鸡卵是极端的端黄卵，卵黄特别多，因此分裂只限于核所在的区域，下面的卵黄不分裂。此时的分裂沟是纵裂，分裂沟穿过胚盘中心部分，形成两个不完全分开的分裂球（图 2）。

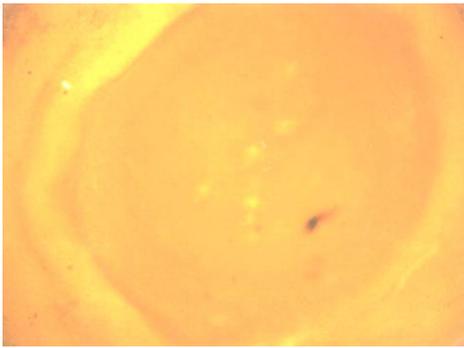


图 2. 产后 5 h 受精卵 (400X)

c. 产蛋后 5.5 h (0-1 h 子宫龄) :

此时, 受精卵的一半在输卵管的峡部, 一半在输卵管子宫部, 已经形成一层不结实的厚壳膜, 卵黄外、壳膜内的蛋白质非常浓稠, 呈粘胶状。整个胚盘犹如一个很大的细胞, 直径约 $1,350\ \mu\text{m}$, 胚盘中央出现第二次分裂, 分裂沟与第一次垂直, 形如十字形, 分裂成四个不完全的分裂球 (图 3、4)。

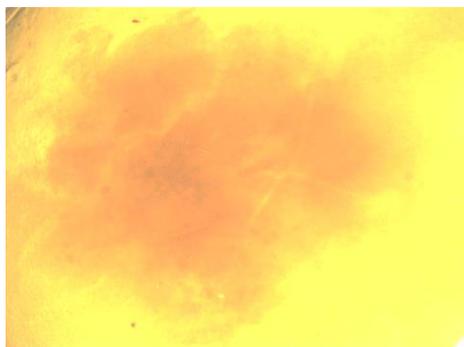


图 3. 产后 5.5 h 受精卵 (200X)



图 4. 产后 5.5 h 受精卵 (400X)

d. 产蛋后 6 h (1 h 子宫龄) :

受精卵大部分位于子宫部, 已可见 3 次卵裂, 8 细胞期。细胞位于同一平面上, 但看不出细胞之间有明显的界限, 只看见分裂沟, 在未分裂的细胞质上存在较大的液泡 (空泡)。在这个分裂期内, 分裂是在垂直于第一次分裂沟的基础上, 再发生了两次分裂。

e. 产蛋后 6.5 h (1-1.5 h 子宫龄) :

此时的受精卵已经全部位于子宫, 厚壳膜上还未有钙质沉积。整个胚盘直径约 $1,800\ \mu\text{m}$ 。中央已可见 4 次分裂, 约 12-16 个卵裂球。有分裂球的区域直径约

850 μm 。分裂的细胞很不规则，直径大小在 16-20 μm ，仍位于同一平面上（图 5）。

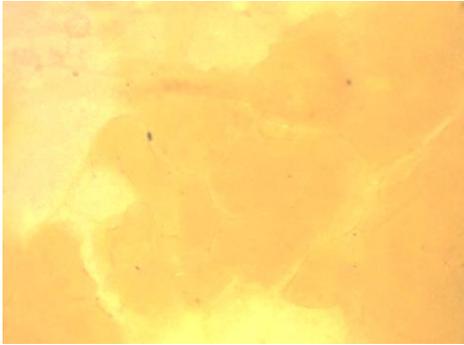


图 5. 产后 6.5 h 受精卵（400X）

此期的中央细胞由于分裂沟的水平伸展而开始与卵黄分开，纵横交错的分裂沟逐渐在交叉的地方相遇汇合，形成一个个充满液体的不规则的分裂球。分裂沟从中央伸向周边。

f. 产蛋后 7.5 h（2-2.5 h 子宫龄）：

此时，整个胚盘约有 40 个卵裂球，中间部分的卵裂球较小，约有 20 个，分裂沟较为明显，且多向延伸，然而周边卵裂球间的分裂沟并不明显。所有卵裂细胞只有一层，形状极不规则，有的呈四方形，有的呈梯形，有的呈三角形，直径约 15~20 μm ，处于同一平面上。分裂沟辐射延伸到胚盘边缘（图 6、7）。

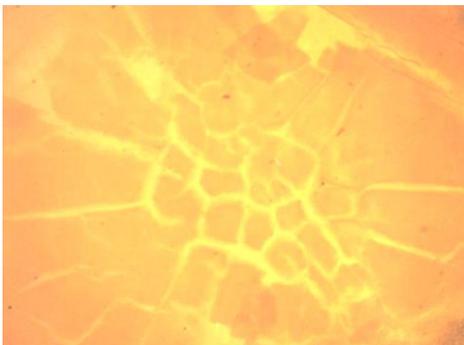


图 6. 产后 7.5 h 受精卵（200X）

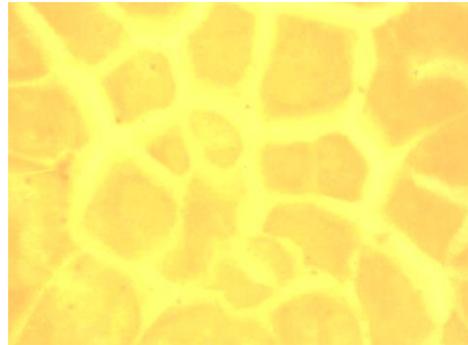


图 7. 产后 7.5 h 受精卵（400X）

g. 产蛋后 8.5 h（3-3.5 h 子宫龄）：

胚盘中央约有 64 个卵裂球，已分裂 6 次。分裂球直径约为 9~15 μm ，大小各异，形状不规则。整个胚盘的直径约为 3,300 μm ，中间分裂球区域的直径约为 1,500 μm ，分裂球与下面的卵黄分离，成为一层完整的细胞，称为中央细胞。周边分裂沟非常明显地呈辐射状（图 8）。胚盘外周的分裂球与卵黄仍然相连，称为边缘细胞。

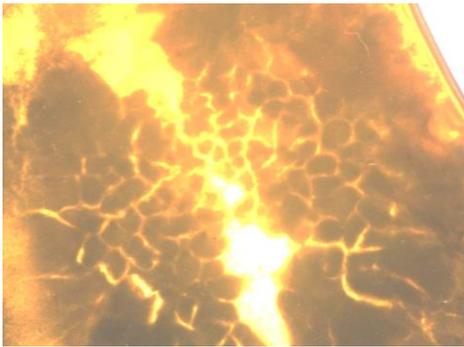


图 8. 产后 8.5 h 受精卵（200X）

h. 产蛋后 9.5 h（4-4.5 h 子宫龄）：

胚盘卵裂球数约 120 个，卵裂区域直径为 2,600 μm ，分裂球大小规则，中间较小，约 10~12 μm ，周边较大约为 16~20 μm ，并呈各种形状（图 9、10）。此时，细胞分裂不但在水平面上，而且在垂直面上。

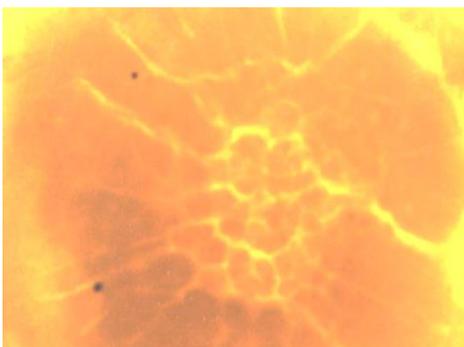


图 9. 产后 9.5 h 受精卵（200X）

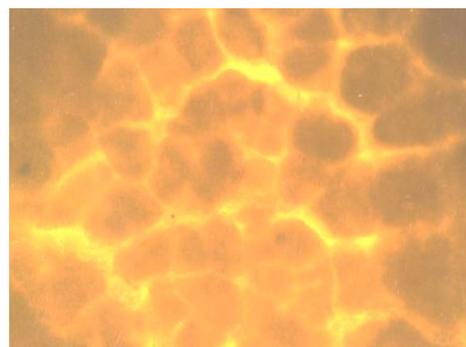


图 10. 产后 9.5 h 受精卵（400X）

i. 产蛋后 10.5 h（5-5.5 h 子宫龄）：

此时约有 185 个卵裂球细胞，但还只是一层细胞。细胞大小明显分为三圈，中心部分的细胞较小，直径约 6 μm ，次周边的细胞较大且形状不规则，直径约 11

μm ；最边缘一圈是更大的细胞在未染色的情况下，750 倍镜下可见细胞质内充满卵黄颗粒（图 11、12），整个胚盘的细胞质已经完全分裂开。

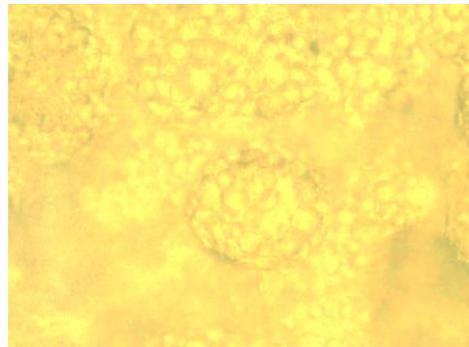
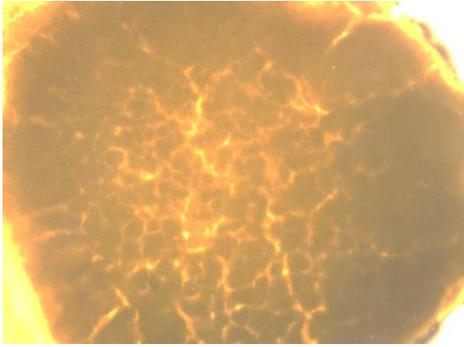


图 11. 产后 10.5 h 受精卵（200X）

图 12. 产后 10.5h 受精卵（400X）

j. 产蛋后 11.5 h（6-6.5 h 子宫龄）：

基本同 10.5 h，胚盘中间部分的分裂均匀，细胞直径在 4~7 μm 之间。周边的细胞较大。中间部分的细胞约有 2 层，均匀致密，像哺乳动物胚胎的桑椹期，发育过程类似于哺乳动物胚胎的发育（图 13）。

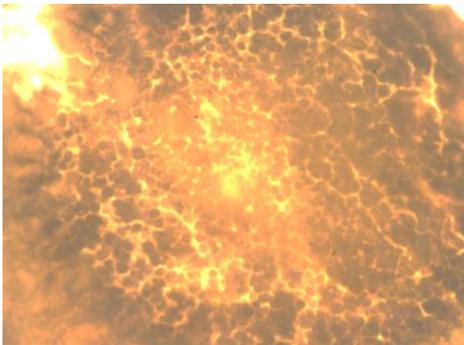


图 13. 产后 11.5 h 受精卵 200X

k. 产蛋后 12.5 h（7-7.5 h 子宫龄）：

约 300~400 个卵裂球，囊胚期开始，中央部分的细胞较小，形状不规则，约 5~6 μm ，而且周围的细胞较大，约 8~10 μm ，最边缘的细胞更大，约 8~10 μm ，是分裂沟的延伸，胚盘直径约 3,000 μm 。此期细胞界限明显，且能清楚地看见一个个分裂球。在此期可获取胚胎单个细胞分裂球（图 14）。

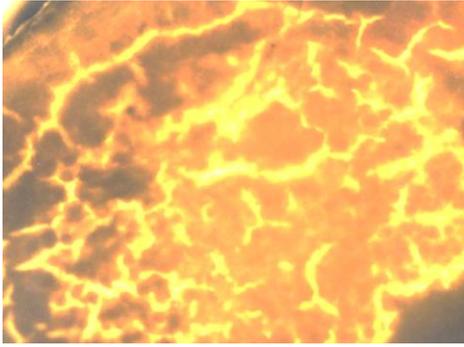


图 14. 产后 12.5 h 受精卵 400X

l. 产蛋后 13.5 h (8-8.5 h 子宫龄) :

约 800-1,000 个卵裂球，中心区增厚出现二层细胞，细胞直径约 $2\ \mu\text{m}$ ，形状较为规则，次周边细胞直径约 $6\ \mu\text{m}$ ，最边缘的细胞经过分裂后，已形成约 $12\ \mu\text{m}$ 大小不规则的细胞。此时，可获取更多的单细胞分裂球（图 15）。

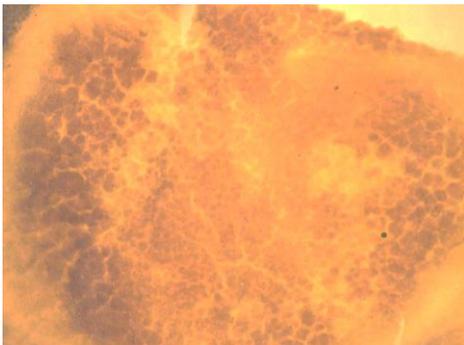


图 15. 产后 13.5 h 受精卵 200X

m. 产蛋后 15.5 h (10-10.5 h 子宫龄) :

此时，约有 2000 个卵裂球细胞，胚盘周边较薄，而中间区域明显地增厚，厚约 6~7 层细胞，中央区域的分裂球直径大小约为 $3\sim 5\ \mu\text{m}$ ，周边区域的细胞直径大小约为 $10\ \mu\text{m}$ 。整个胚盘上细胞分裂沟均匀分布在胚盘的尾端，细胞开始向前端扩散，胚盘此时无显著的明暗区之分（图 16）。胚胎横切面切片观察，此时胚盘分裂已有 7 个细胞层，可明显地看到 3 层细胞组成的上胚层（图 17）。此时，细胞层开始与卵黄间分开，类似于哺乳动物的早期囊胚。

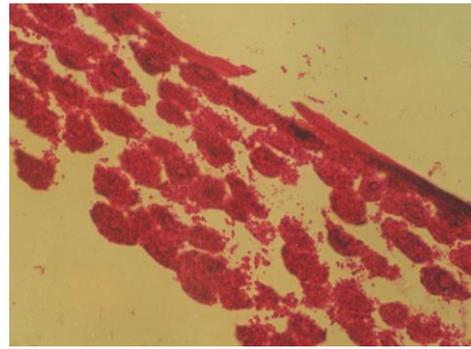
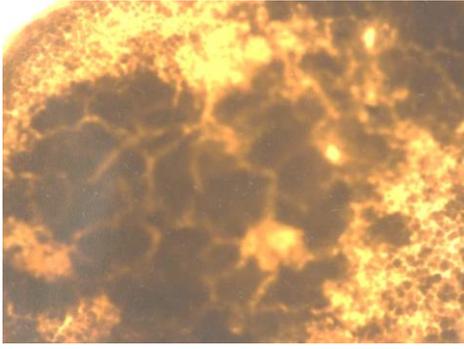


图 16. 产后 15.5 h 受精卵 400X 图 17. 产后 15.5 h 受精卵 400X (横切面)

2. 明区形成阶段

a. 产蛋后 17.5 h (12-12.5 h 子宫龄) :

此时胚盘开始出现明暗区之分。明区已经扩展到尾端两边，形成镰刀样区域，直径约 2,450 μm ，整个周边变为暗区，直径约为 400 μm 。明区中的细胞大小趋于均匀，直径约 4 μm 。尽管将显微镜倍数放大至 400 倍，但仍较难分清细胞间的界限 (图 18)。胚胎横切面切片观察，可见上胚层已有 3 层细胞紧密联系在一起，整个胚胎有 8 层细胞 (图 19)。

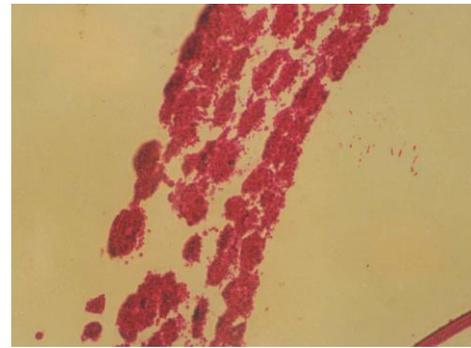
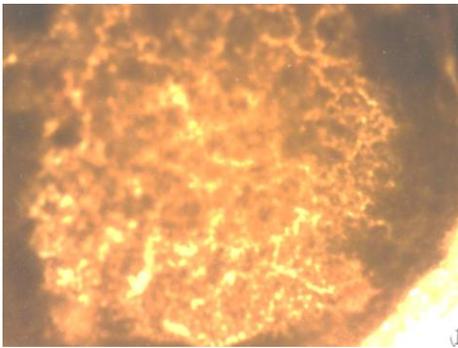


图 18. 产后 17.5 h 受精卵 200X 图 19. 产后 17.5 h 受精卵 400X(横切面)

b. 产蛋后 19.5 h (14-14.5 h 子宫龄) :

此时，肉眼可见胚盘有明显的明暗区之分，暗区直径约 400 μm ，明区直径约为 3,900 μm 。明区有 2 层细胞，细胞大小比 17.5 h 更趋均匀，直径约 2 μm ，透光率明显增强，但靠近卵黄层的地方仍有大的细胞不均匀地分布于整个胚盘 (图 20)。

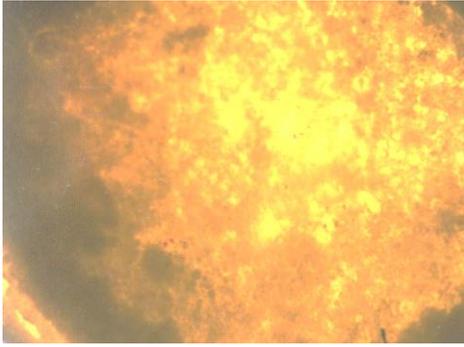


图 20. 产后 19.5 h 受精卵 200X

c. 产蛋后 21.5 h (15-15.5 h 子宫龄) :

胚盘明区、暗区十分清楚，中央只有一薄层细胞，暗区直径约为 600~700 μm ，整个胚盘中细胞大小均匀，直径约为 1.5~2 μm ，均呈球形（图 21）。

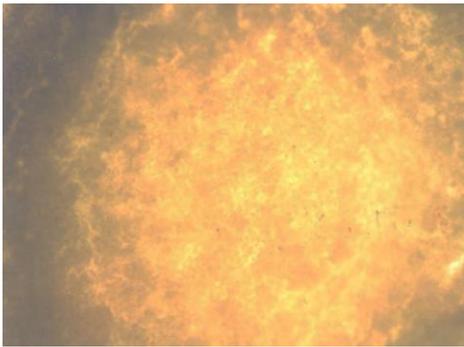


图 21. 产后 21.5 h 受精卵 200X

d. 产蛋后 22.5 h (16-16.5 h 子宫龄) :

基本同 21.5 h (图 22)，中间细胞均匀一致 (图 23)，且尚未进入分化期。

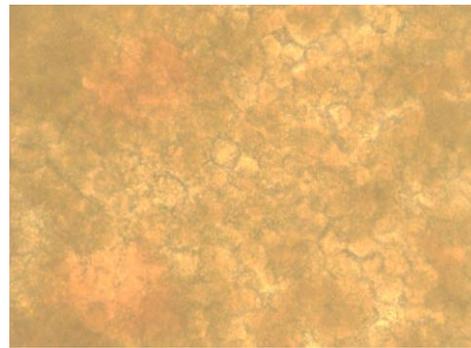
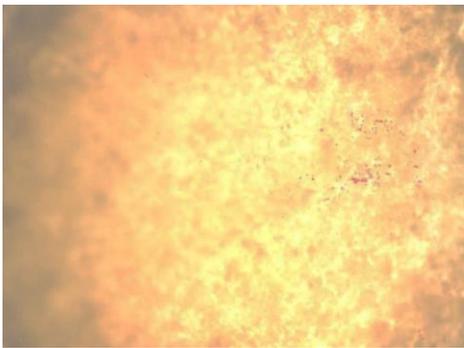


图 22. 产后 22.5 h 受精卵 200X

图 23. 产后 22.5 h 受精卵 400X

e. 新生蛋（19-19.5 h 子宫龄）：

胚盘直径约 3,950~4,000 μm ，暗区直径约 600~650 μm ，明区与暗区交界处有一个宽 350 μm 的单细胞隔离带。此时，明区中央细胞又增厚到 2~3 层，且增厚区呈圆形。分裂细胞更小，趋于均匀一致，直径约为 1~1.5 μm 细胞内含有丰富的脂滴；暗区宽度为 600-650 μm （图 24）。此时不仅是胚盘在体内发育的结束，而且是上胚层形成的开始，此时获取分裂球作转基因或制作嵌合体比较合适。

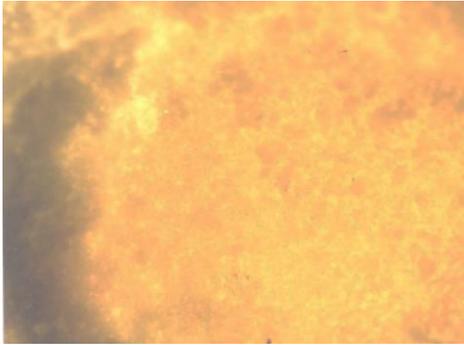


图 24. 产后 24-26h 受精卵 200X

溶液配方

1. 0.75%氯化钠

用称量天平称取 0.75 g 氯化钠，加少量蒸馏水搅拌溶解后定容至 100 ml，常温储存。

2. 70%（80%、90%）无水乙醇

将量取的 70 ml（80 ml、90 ml）无水乙醇加入 30 ml（20 ml、10 ml）的超纯水，混匀后常温储存。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金资助项目（31872341；31572390）、重点科研项目（2017YFE0108000）和江苏省优势学科的资助。

参考文献

1. 蔡中涛. (2006) 鸡早期胚胎发育规律和干细胞培养及其转基因的研究. 扬州大学硕士学位论文.