



第一章 鸡胚培养法

第一节 概 况

1911年Rose和Murphy首先应用鸡胚培养研究肉瘤病毒（Rous肉瘤）的繁殖，直到1938年Goodpasture和Burnet等应用鸡胚繁殖病毒、Cox应用卵黄囊培养立克次体后，鸡胚培养技术才广泛应用于病毒和立克次体的研究。

鸡胚胎是正在发育中的机体，许多病毒和立克次体都能在鸡胚上繁殖，至今它仍然是正黏病毒最敏感的宿主之一。

鸡胚培养法的优点：鸡胚组织分化程度低，可选择适当途径接种，病毒易复制，感染病毒的膜和液体含大量病毒；鸡胚是个整体，有神经血管的分布及脏器的构造；鸡胚来源充足，操作简单，通常是无菌的，对接种的病毒不产生抗体。

鸡胚培养法的缺点：除产生痘疱的病毒及能引起鸡胚死亡的病毒外，一般的病毒通常不使鸡胚产生特异性的感染指征，必须利用第二个指示系统来测定病毒的存在；卵黄中含有来自母体的抗家禽病原体抗体，某些细菌（如沙门菌和类胸膜肺炎菌）、衣原体和病毒（新城鸡瘟病毒、禽脑脊髓病毒和Rous肉瘤病毒）能够从感染的母鸡传递到鸡胚；普通鸡胚常有白血病病毒；在鸡食物中加入抗生素，特别是四环素，母鸡吃后会传递给鸡胚，鸡胚就会产生对立克次体和衣原体感染的抵抗。

第二节 接种技术

鸡胚培养法是用来培养某些对鸡胚敏感的动物病毒的一种方法，此方法可用于进行多种病毒的分离培养，毒力滴定，中和试验，以及抗原和疫苗的制备等。

鸡胚培养技术比组织培养容易成功，也比动物接种来源容易，无饲养管理及隔离等的特殊要求，且鸡胚一般无病毒隐性感染，同时它的敏感范围很广，多种病毒均能适应，因此，是一种培养动物病毒的常用方法。

一、材料准备

9~11日龄鸡胚，孵卵箱，病毒储存液，无菌PBS液（pH 7.2），检卵灯，开卵器，

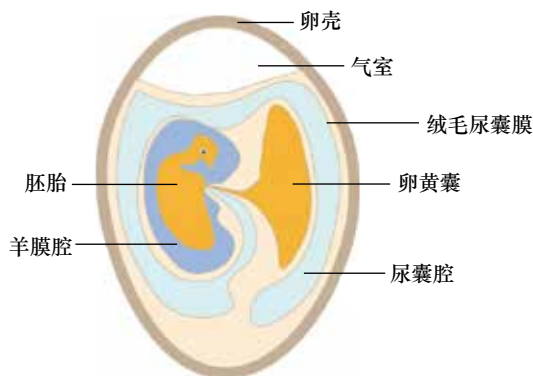


图 1.1 约 10 日龄鸡胚的结构示意图

卵盘，70%~75%乙醇，2.5%碘酒，一次性注射器，蜡或胶水，10 ml 试管和试管架，10 ml 移液管，无菌镊子。

二、鸡胚的选择与孵化

1. 鸡胚的结构与功能

鸡胚是由三个胚层发育起来的，即外胚层、中胚层和内胚层，它们构成胚胎的组织与器官。约 10 日龄鸡胚的结构见图 1.1。

鸡胚最外层为石灰质之卵壳，上有气孔，以行气体交换。下层为壳膜，它的功能是使气体分子和液体分子在内外两个方面进行交换，因此在孵育鸡胚时需要一定的湿度和气流。气室的功能是呼吸和调节压力。

壳膜之下为血管丰富的绒毛尿囊膜，外为绒毛膜系，由外胚层形成，内为尿囊膜，由内胚层形成，两膜之间的血管和神经为中胚层。绒毛尿囊膜起着胚胎呼吸器官的功能，氧气的交换是经膜内血管通过卵壳孔进行的，尿囊腔是胚胎的排泄器官，内含有尿囊液，起初为透明液体，是单纯的生理盐水溶液，之后尿囊液中的尿素盐迅速增加，胚胎发育到第 12 天以后，尿囊液开始变得浑浊，主要是由尿酸盐类物质引起的。因此，在制备流感病毒尿囊液抗原时，通常用盐水透析后至 4℃ 备用，以防沉淀发生。尿囊液量在鸡胚发育的第 11~13 天最高，平均为 6.0 ml，在发育的第 7~12 天呈弱碱性，后随量减少和尿酸盐积聚变成酸性，其 pH 在 6.0 以下。

羊膜为胚胎最内层包被，是由外胚层组成的。羊膜腔盛有羊水，胎体浸泡于其中。羊水在起初是单纯的生理盐水，后来蛋白质含量增加，羊水量平均为 1 ml。附着于胚胎的是卵黄囊，卵黄膜由内胚层细胞组成，囊中有卵黄，为胚胎之养料。卵白位于卵之锐端，为胚胎发育晚期之养料。

2. 活胚选择

- (1) 用照卵灯检测鸡胚，标记出鸡胚的气室与尿囊的界限、胚胎的位置。
- (2) 如果鸡胚是死胚、没有受精、有裂痕、发育不全或表面有好多渗水孔，应弃掉。
- (3) 如何判断鸡胚的状态。

1) 血管：活胚血管清晰，死胚模糊、成淤血带或淤血块。

2) 胎动：活胚有明显的自然运动，死胚无胎动。

3) 绒毛尿囊膜发育界限：密布血管的绒毛尿囊膜与鸡胚胎的另一面形成明显的界限。

必须结合以上三个方面来观察鸡胚的状态，如果胚胎活动呆滞或不能主动运动、血管模糊扩张或折断沉落、绒毛尿囊界限模糊，则可判断胚胎濒死或已经死亡，应弃掉。

三、接种途径

对流感病毒常用的接种途径主要有4种，分别是尿囊腔接种、羊膜腔接种、卵黄囊接种和绒毛尿囊膜接种，具体步骤如下所示。

1. 尿囊腔接种

尿囊腔接种广泛应用于流感病毒、流行性腮腺炎病毒和新城疫病毒的适应和传代培养，这些病毒被注射到尿囊腔后，可在内皮细胞中复制，复制的病毒被释放到尿囊液中，因此在尿囊液中含有大量的病毒。接种方法如下：

(1) 取9~11日龄鸡胚，在检卵灯上照视后，用铅笔划出气室与胚胎的位置，并在胚胎面与气室交界之边缘上约1 mm处避开血管做一标记，即为注射点。

(2) 将鸡胚竖放在卵杯上，钝端向上。用2.5%碘酒及75%乙醇分别消毒气室部的蛋壳，并用开孔器钻开一直径约2 mm的小孔，此操作勿损伤壳膜。

(3) 再次用2.5%碘酒消毒钻孔区，以擦去蛋壳碎粒，并用1 ml注射器吸取待接种的病毒液0.1~0.2 ml，将针头刺入孔内，经尿囊膜入尿囊腔，注入病毒液。

(4) 用2.5%碘酒消毒后，再用石蜡熔化封孔，于33~35℃孵卵器孵育48~72小时（培育时间应根据病毒种类及收获的材料何时使用而定），每日用检卵灯照检，于接种后24小时内死亡者为非特异性死胚，应弃去。

接种方法如图1.2所示。

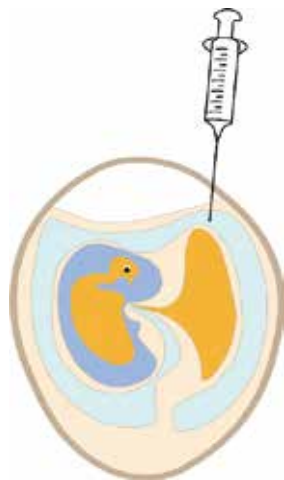


图1.2 鸡胚尿囊腔接种示意图

2. 羊膜腔接种

羊膜腔接种主要应用于从临床材料（如患者咳嗽液等）中分离流感病毒等。这种接种途径可直接感染羊膜腔的内胚层，也可被鸡胚咽下或吸入，引起全胚胎感染。另外，病毒也可被排泄到尿囊腔中，使尿囊腔中含有大量的病毒。因此，在用羊膜腔接种分离病毒时，除可收获羊水以外，还可收获尿囊液。接种方法如下：

(1) 将10~12日龄鸡胚在检卵灯上照视，划出气室范围，并在胚胎最靠近卵壳的一侧做记号。

(2) 用2.5%碘酒及75%乙醇分别消毒气室部位的蛋壳，并用开孔器在气室顶端钻出一约10 mm×6 mm的长方形裂痕，注意勿钻破壳膜。

(3) 用2.5%碘酒再次消毒钻孔区后，用灭菌的眼科小镊子除去长方形卵壳和外蛋壳膜，并滴加灭菌液体石蜡1滴于下层壳膜上，使其透明，以便观察胚胎的位置。

(4) 将注射器刺向胚胎的腭下胸前，以针头拨动下颚及腿，当进入羊膜腔内时，可看到鸡胚随针头的拨动而动，此时可注入0.1~0.2 ml病毒液。





图 1.3 鸡胚羊膜腔接种示意图

（1）取5~8日龄鸡胚（此时卵黄囊大，易接种，且有较大的表面积供病原体繁殖），于检卵灯上划出气室和胚胎的位置，垂直放置在卵架上，钝端朝上，并用2.5%碘酒和75%乙醇消毒气室端。

（2）用开孔器在气室中央的卵壳上钻一小孔，勿损伤壳膜，用带有6号针头的1 ml注射器将样品从小孔处沿胚的纵轴迅速刺入约3 cm，注入0.2~0.5 ml待接种的病毒于卵黄囊内，随后用胶带或熔化的石蜡封孔。

（3）置孵化箱内继续孵育3~8天，时间长短应根据病毒或立克次体的种类而定，每日翻卵2次，弃掉24小时内死亡的鸡胚。

接种方法如图1.4所示。

4. 绒毛尿囊膜接种

绒毛尿囊膜接种常用于牛痘病毒、天花病毒、单纯疱疹病毒的分离，因为这些病毒在绒毛尿囊膜上可形成肉眼可见的斑点状或痘疱状病灶。另外，病毒可在绒毛尿囊膜上进行滴定，因为感染性病毒颗粒的数目可以通过产生的斑和痘的数目来计算。该方法还可用于抗病毒血清的滴定试验，即在有抗体存在的情况下，痘疱形成受到抑制。接种方法如下：

（1）将孵育10~13日龄的鸡胚放在检卵灯上，用铅笔划出气室、胎位，并于与胚胎略近气室端的绒毛尿囊膜发育较好的卵壳上划一等边三角形，每边10 mm。

（2）用碘酒消毒气室顶端及绒毛尿囊膜记号处，并用开孔器在记号处的卵壳上开一三角形裂痕，不可弄破下面的壳膜，同时在气室顶端钻一小孔。

（3）用小镊子轻轻揭去所开小窗处的卵壳，露出壳下的壳膜，在壳膜上滴1滴生理盐水，用针尖循卵壳膜纤维方向小心地划破一隙，但注意切勿伤及紧贴在下面的绒毛尿囊膜。

（4）用针尖刺破气室小孔处的壳膜，再用橡皮乳头紧按气室小孔向外吸气，造成负压，此时盐水滴即可自裂隙流至绒毛尿囊膜上，从而使绒毛尿囊膜下陷而形成人工

（5）拔出针头，孔区用2.5%碘酒消毒，然后用沾有碘酒通过火焰的小块胶布将卵壳的小窗口封住，并于33~35℃孵卵器内孵育48~72小时，此过程要保持鸡胚的钝端朝上。

接种方法如图1.3所示。

3. 卵黄囊接种

卵黄囊接种主要用于虫媒病毒、衣原体及立克次体等的分离和繁殖。这些大的病原体主要在卵黄囊的内皮细胞中生长，且生长速度很快，立克次体在染色后也可看到。接种方法如下：

（1）取5~8日龄鸡胚（此时卵黄囊大，易接种，且有较大的表面积供病原体繁殖），于检卵灯上划出气室和胚胎的位置，垂直放置在卵架上，钝端朝上，并用2.5%碘酒和75%乙醇消毒气室端。



图 1.4 鸡胚卵黄囊接种示意图

气室。

(5) 用注射器通过卵壳的窗口滴0.05~0.1 ml病毒液于绒毛尿囊膜上,然后将鸡胚轻轻地旋转使接种物扩散到人工气室之下的整个绒毛膜尿囊膜上。

(6) 在卵壳的窗口周围涂上半凝固的石蜡,使成堤状,立即用消毒胶布封口。也可用揭下的卵壳封口,即将卵壳盖上,接缝处涂以石蜡,但石蜡不能过热,以免流入卵内。将鸡胚始终保持人工气室在上方的位置,33~35℃继续培养48~72小时。

接种方法如图1.5所示。



图1.5 鸡胚绒毛尿囊膜接种示意图

四、病毒收获

病毒的收获时间根据病毒不同而异,甲型流感病毒一般培养44~48小时即可进行收获,而乙型流感病毒培养72小时后进行收获。如果病毒是冷冻干燥标本进行传代,无论甲型还是乙型均培养72小时后才进行收获。

1. 具体操作步骤

(1) 鸡胚在收获前应4℃过夜或至少放置6小时,但不能放置时间过长(过长会引起散黄)。如急于收获也可置-20℃冰箱1小时左右。预冷的目的是将鸡胚冻死,使血液凝固,避免收获时流出红细胞,同尿囊液的病毒发生凝集,造成病毒滴度下降。

(2) 标记15 ml无菌离心管与相应的鸡胚编号一致。用70%~75%乙醇消毒鸡胚气室端。

(3) 用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳,在绒毛尿囊膜无大血管处穿破。用10 ml无菌移液管吸取鸡胚尿囊液置于相应的收集管中。用移液管刺破鸡胚羊膜,尽量吸取羊水放置于另外的管中。羊水较少时也可以将3个鸡胚的羊水合并。病毒通过胚胎机体后被排泄入尿囊腔,因此当羊水过少时,可用同胚少量尿囊液冲洗羊膜腔并吸取该洗液。

(4) 收获病毒培养液后的鸡胚在生物安全柜内装入密封袋,然后进行高压处理。

(5) 将鸡胚收获液3000 r/min离心5分钟去除血液和细胞后,可以立即进行后续试验,或冻于-80℃冰箱待以后试验使用。

2. 注意事项

(1) 不要在-20℃条件下保存病毒分离物,因为该温度条件下流感病毒极不稳定。

(2) 流感病毒分离操作严格按照生物安全规程的要求。禁止在同一实验室,同一时间接种未知临床标本和已知标准病毒。禁止在同一实验室,同一时间接种采自不同动物的标本。动物标本(如猪、禽等)必须与人的标本分别保存。

(郑丽舒)