

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01808067.7

[51] Int. Cl.

A01K 67/02 (2006.01)

A61D 19/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 2 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1240272C

[22] 申请日 2001.2.15 [21] 申请号 01808067.7

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 15 [33] US [31] 60/182,432

[32] 2000. 2. 16 [33] US [31] 60/182,969

[86] 国际申请 PCT/US2001/005071 2001.2.15

[87] 国际公布 WO2001/060978 英 2001.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.15

[71] 专利权人 OVO 生物科学公司

地址 美国乔治亚州

[72] 发明人 A·沃藤 T·坎特雷尔

审查员 程晋美

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 26 页

[54] 发明名称

壳内鸟卵的卵内活化以及使产出的壳内鸟卵受精的方法

[57] 摘要

本发明涉及鸟类繁殖领域。具体地本发明提供一种在壳内活化卵的方法。本发明也提供孵出了存活雏鸟的壳内活化卵的方法。

1. 一种从产出的未受精壳内鸟卵中产生存活雏鸟的方法，其中卵包含由膜包围的卵黄和卵子，该方法包括活化卵子及孵化鸟卵直至孵出雏鸟。
- 5 2. 权利要求1的方法，其中，鸟卵来自鸡。
3. 权利要求1的方法，其中，鸟卵来自火鸡。
4. 权利要求1的方法，其中，多个卵基本上被同时活化。
5. 权利要求4的方法，其中，至少20个卵被活化。
6. 权利要求1的方法，其中，活化是通过诱导鸟卵的单性生殖
- 10 进行的。
7. 权利要求6的方法，其中，单性生殖是通过穿透卵黄膜进行诱导的。
8. 权利要求7的方法，其中，穿透使用针头完成的。
9. 权利要求1的方法，其中，活化是通过递送含有置于生理上
- 15 可接受的载体中的鸟类精子的精子样品至卵中而完成的。
10. 权利要求9的方法，其中，卵和精子来自同一物种的成员。
11. 权利要求9的方法，其中，载体为精液。
12. 权利要求9的方法，其中，载体为稀释的精液。
13. 权利要求12的方法，其中，稀释的精液含有缓冲盐溶液和
- 20 精子补充剂。
14. 权利要求10的方法，其中，精子样品被递送到包围卵黄的膜附近。
15. 权利要求14的方法，其中，精子样品被递送到位于胚盘附近的膜区域附近。
- 25 16. 权利要求10的方法，其中，精子样品被递送到膜的下面。
17. 权利要求10的方法，其中，将膜进行处理，以便允许精子使卵受精。
18. 权利要求10的方法，其中，鸟类物种选自鹌鹑、鸭、火鸡、雉、鸵鸟、鹅及美洲鸵。
- 30 19. 权利要求10的方法，其中，鸟类物种为鸡。
20. 权利要求10的方法，其中，精子样品包含从一只以上鸟获得的精子混合物。

21. 权利要求 10 的方法, 其中, 通过穿透卵壳在卵壳上开口, 将精子样品引入卵中, 从而完成精子样品的递送。
22. 权利要求 21 的方法, 其中, 用针头完成穿透和引入。
23. 权利要求 21 的方法, 其中, 开口被密封。
- 5 24. 权利要求 23 的方法, 其中, 开口用粘合剂密封。
25. 权利要求 10 的方法, 其中, 多个卵基本同时受精。
26. 权利要求 25 的方法, 其中, 至少使 20 个卵受精。
27. 权利要求 25 的方法, 其中, 至少使 50 个卵受精。
28. 权利要求 10 的方法, 其中, 卵为鸡卵, 卵的孵化时间持续 21
10 - 23 天。
29. 权利要求 10 的方法, 其中, 孵化期的约 1-18 天的孵化温度为约 99.5°F, 从第 19 天起至孵出雏鸟的孵化温度为约 98.5 °F。
30. 权利要求 10 的方法, 其中, 从孵化的第一天直到孵出雏鸟, 采用 80% 的湿度。
- 15 31. 权利要求 10 的方法, 进一步包括在孵化期接种胚胎。
32. 使产出的壳内鸟卵受精的方法, 其中该卵包含由膜所包围的卵黄, 该方法包括:
- a) 获得精子样品, 其中含有置于生理上可接受的载体中的鸟类精子; 和
- 20 b) 将精子样品递送到卵中, 以便使卵受精。
33. 权利要求 32 的方法, 其中, 卵和精子来自同一物种的成员。
34. 权利要求 32 的方法, 其中, 载体为精液。
35. 权利要求 32 的方法, 其中, 载体为稀释的精液。
36. 权利要求 35 的方法, 其中, 稀释的精液包含缓冲盐溶液和
25 精子补充剂。
37. 权利要求 32 的方法, 其中, 精子样品被递送到包围卵黄的膜附近。
38. 权利要求 37 的方法, 其中, 精子样品被递送到位于胚盘附近的膜区域附近。
- 30 39. 权利要求 32 的方法, 其中, 精子样品被递送到膜的下面。
40. 权利要求 32 的方法, 其中, 进一步包括处理膜, 以便增加受精。

41. 权利要求 33 的方法，其中，鸟类物种选自鹌鹑、鸭、火鸡、
雉、鸵鸟、鹅及美洲鸵。

42. 权利要求 33 的方法，其中，鸟类物种为鸡。

43. 权利要求 32 的方法，其中，精子样品包含从一只以上鸟获
5 得的精子混合物。

44. 权利要求 32 的方法，其中，通过穿透卵壳在卵壳上开口，
将精子样品引入卵中，从而完成精子样品的递送。

45. 权利要求 44 的方法，其中，用针头完成穿透和引入。

46. 权利要求 44 的方法，其中，开口被密封。

10 47. 权利要求 46 的方法，其中，用粘合剂密封开口。

48. 权利要求 32 的方法，其中，多个卵基本同时受精。

49. 权利要求 48 的方法，其中，至少使 20 个卵受精。

50. 权利要求 48 的方法，其中，至少使 50 个卵受精。

壳内鸟卵的卵内活化以及使产出的壳内鸟卵受精的方法

发明背景

5 发明领域

本发明涉及鸟卵活化领域。具体地本发明涉及在壳内活化卵的方法。本发明也涉及孵出了存活雏鸟的壳内活化卵的方法。

背景技术

10

传统的繁殖方法

典型的家禽工业主要采用以下两个体系中的一种进行繁殖：

15

地面繁殖方案 (Floor Breeding Program): 第一个体系被叫作“地面繁殖”方案，它用于生产全部商业可孵化卵的绝大部分。在本体系中，将雄鸟以 10-15% 的比例简单地加入雌鸟群中。尽管地面繁殖体系的效率差，但仍然是目前产生可孵化卵的低成本体系，因为它比竞争体系 (competing system) 要求更低的劳动量。其平均孵化率从肉仔鸡饲养场 (broiler breeder) 的 83% 到产卵鸡饲养场 (layer breeder) 的 92%。尽管许多年来，地面繁殖体系是家禽工业的主流，但它仍然有许多局限性。

20

大小与繁殖能力：地面繁殖方法对繁殖火鸡根本行不通，因为商用的火鸡品种要经过严格挑选，而不能自然交配，以便增加肌肉产量。同样，对肉仔鸡的繁殖也有同样的趋势。经过挑选以增加肉仔鸡大小，就会损害交配和受精能力。预计随着体重的增加，受精能力将逐渐下降。这就意味着给家禽生产商带来进退两难的境地，因为受精能力的降低直接会给他们的盈亏结算线带来负面影响。

25

无效废物的除去：自然交配必须在固体的地板上进行，以避免使鸟受伤。这种设计要求不能使用自动废物清除系统，而要求在连续的鸟群间使用手工清除。这就会增加劳动量和提高成本，而降低了对设施的生产性使用。

30

卵的生产和质量：因为卵在收集之前与鸟群一起留在室内，所以卵经常污染有污物及排泄物等，降低了其孵化率。此外，一般有 3-5 % 的卵直接产在室内的地板上，而不是在提供的产卵箱里，这些卵必

须被丢弃。

无效空间和设备利用：将雄鸟和雌鸟放在同一室内，要求安装独立的喂养和供水系统，因为每种性别有不同的营养和生产需求。同时，也要求安装产卵箱和自动卵收集系统。所有这些设备占用了室内有限的地板空间。基于这些原因，地板饲养较堆积笼系统（stacked cage system）而言，不能有效的利用室内空间和设备。

死亡率和繁殖力：好斗的雄鸟爱相互打斗，导致较高的雄性死亡率。在室内地板饲养时，雄鸟的平均死亡率在 13%，而在笼养时仅为 2%。在交配期间，雄鸟对雌鸟的挑逗性攻击行为也会逐渐增加雌鸟的死亡率，降低繁殖力，以及缩短鸟的产卵周期。随着雄鸟逐渐变老，繁殖力开始下降。标准的解决办法就是用年轻的雄鸟充实鸟群，以增强受精能力。然而，这又开始了新一轮的攻击行为，引起繁殖力下降和死亡率增加。在室内地板养殖更容易引起鸟类疾病，因为经常接触带病原体的草垫和废弃物。

降低饲料转化率：运转一个有竞争力的家禽场的关键是控制饲料成本，比如饲料成本占肉仔鸡（broiler chick）饲养成本的 60%。在一项研究中，对于同样的产量而言，地板饲养的鸟比笼养的鸟要多消耗 20% 的饲料。产生这个差别的原因除了地板饲养的鸟具有较高水平的活动量外，还有较高水平群居相互作用。雄性比雌性要消耗更多的饲料，从饲料的消耗而言，因为地板饲养要保持更多的雄鸟，故地板饲养变得相对的低效率。

在繁殖方法上有限的灵活性：由于地板饲养方案中雄鸟和雌鸟处于一个大群体中，饲养者很难对种群进行先进的杂交和选择。因此，室内地板主要用作预选遗传种群以产生商用杂交品种的工具。

人工受精繁殖方案：另一种产生孵化卵的方法叫作人工受精（AI）。AI 被“繁殖金字塔（breeding pyramid）”顶部的“初级饲养者”广泛运用，但通常不会被处于金字塔底部的商业生产商所采用。初级饲养者是指此类公司，他们拥有并用杂交等方式改进优良纯种遗传品系，以产生最终商用产品——肉仔鸡、产卵鸡及火鸡。鸟的数量按指数式增加，就像你沿繁殖金字塔向下移动，从祖父种群、父辈种群到实际的商用鸟为止。在繁殖金字塔顶部的具有优良遗传组成的鸟类相当昂贵，然而在繁殖金字塔底部的鸟却不昂贵。因此，在不同的

水平采用不同的运行模式进行繁殖。

在 AI 系统中，雄性和雌性处于同一房间里，但在不同的笼子里。雌鸟的笼子里通常装 2-5 只雌鸟，而雄性笼子里只装一只雄鸟。AI 方案针对以上指出的地面繁殖房间的许多局限性。例如采用有笼子的
5 房间，废物的除去可进行自动化。所以房间要干净得多，很少有发生疾病的问题。产卵的方式也得到了改进，因为卵会滚出笼子而不会产在肮脏的地板上。设备和饲养空间可得到更有效的利用。死亡率因为群居攻击行为和疾病的减少而被降到最低。受精水平也因为繁殖过程中群居和身体相互作用的消除而保持更一致，饲料转化率增加了。最后，生产体系为先进的杂交和筛选增加了灵活性，这对于初级饲养者
10 而言，是改进遗传种群的性能，以保持市场竞争能力必须的。以上所列举的大多数优点，对进行商业水平繁殖的饲养者而言也是很重要的，但这些优点被致命的缺点所抵消，即用 AI 方法繁殖要求较高的劳动力成本。

AI 方案使用人工劳动取代家禽天生的性驱动力。工作人员必须从笼养的雄鸟手工收集精液，并以 7 天轮回对笼养的雌鸟进行受精。这些方法中所进行的操作要求较熟练的劳动力。因此，尽管 AI 方案在操作上是先进的，但对商业水平繁殖方案来说没有经济实用性。即使使用矮小的雌鸟（一种具有相同的卵生产量而可减少 30% 的饲料消耗量的创新），对于商业水平繁殖的饲养者来说，也不能补偿用 AI 方
20 案增加的劳动力成本。

繁殖过程

在排卵期，鸟类卵母细胞含有一个胚盘，其含有雌性原核和黄色的卵黄物质。胚盘和卵黄由卵母细胞膜所包围，叫做卵膜。围绕卵膜为卵周层（PL），也被称为内卵周层（IPL）。卵膜和 IPL 之间的空间被叫作卵周隙，有颗粒细胞横贯。一旦卵母细胞从鸟类的滤泡释放出来，就被称为卵子。卵子移动进入输卵管，而后被吞入漏斗，如果在此遇到精子，便完成受精作用。
25

随着卵子进入后漏斗，外卵周层（OPL）就会包围卵子。这层膜可防止多精受精作用（多精受精是一种致命的情况，是指在胚盘处多个精子结合并穿过卵子）。然后鸟卵被额外的多层卵带及厚和薄的卵
30

清层所包围。当卵子移动到峡部时，两层壳膜沉积下来，小的碳酸钙晶体便沉积在上面，因此开始形成卵壳。

以上事件在受精后的前几个小时内发生。尔后卵子移动到子宫，在接下来的 18-20 小时中，钙壳便彻底形成了。然后卵进入阴道，保留几分钟后从阴道排除或被产出。此时，如果卵已受精，包含的胚胎有大约 40,000-70,000 个细胞。(Johnston, "In Vitro Sperm Binding, Penetration, and Fertilization of Recently Oviposited Chicken Eggs," December 1988, Clemson University); Olsen, M. W., J. Morph. 70: 413-533: 1942); Etches et al., in Methods in Molecular Biology, vol. 62 Recombinant Gene Expression Protocols, Ed. R. Tuan, Humana Press, Inc. Totowa, NJ, pp. 433-450: 1997); Petitte et al., in Manipulation of the Avian Genome, Ed. Etches et al., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 81-101: 1993).

15

基因转移

长期以来，将目标基因直接插入鸟类的生殖系以补充传统的选择程序一直是鸟类遗传学家们的一个目标。这条路线在哺乳动物已经取得了巨大进步，其早期胚胎可获得，原核可见，可插入外源 DNA。产生转基因鼠、牛、绵羊及山羊已成为大规模商业操作的常规程序。相反，在鸟类，早期胚胎不易获得，原核也不明显，使得对卵内早期胚胎中的基因组进行操作几乎是一个不可逾越的目标。

经过遗传修饰的鸟的开发很大程度要求获得早期的多能性胚胎细胞。因为胚胎的最早期发育在雌性的输卵管，只有将雌性体内的胚胎取出，才可能将外源 DNA 引入胚胎，这要求杀死雌性鸟类。而且，将早期胚胎培养以使其完成孵化是一个相当繁琐的方法，孵化后的成活率仅 10% 左右。Sang et al., in Manipulation of the Avian Genome, Ed. Etches et al., CRC Press, Boca Raton FL, pp. 121-133 (1993).

本发明提供了一种在壳内活化产出卵的方法，并从壳内孵化出存活雏鸟，因此叫做卵内活化，从而从根本上改进了鸟类的生物学。这些方法给地面繁殖和人工受精提供了一种可选择的方法，从而可大大提高家禽生产的效率。这些方法也便于得到早期鸟类胚胎，使得更容易开发转基因的鸟类。

发明概述

本发明涉及鸟类繁殖领域。尤其是本发明提供了在壳内活化鸟卵的方法。本发明也提供了解化出存活雏鸟的壳内活化鸟卵的方法。

本发明也提了在发育早期所产出的鸟卵。

5 发明详述

本发明所使用的词，“一个 (a, an) 或此 (the)” 指的是“一个或多个”。比如“一个”卵意思可以是“一个或一个以上卵”。“此”也意味着“一个或一个以上卵”。

10 本发明中，“活化”意思是产出的未受精卵或卵母细胞胚胎发育的启动。下文提出了许多形式的活化。产出卵的壳内活化过程此处称作“卵内活化”(IOA)。

本发明提供了活化壳内鸟卵(其中, 鸟卵包含由膜包被的卵黄和卵子)的方法, 也包括使卵子活化。本发明也涉及意料之外而惊人的发现, 即未经受精的产出鸟卵经过壳内活化后可孵出存活雏鸟。本发
15 明中, 壳内鸟卵被叫做产出卵, 也即是从鸟的阴道里排出的带有碳酸钙外壳的卵。鸟卵的排出叫做“产卵”。因此, 在这里所提及的“壳内卵”或“产出卵”是同一个意思。

当鸟卵产出时, 含有一个硬的、钙化的外壳。壳内含有卵黄, 含有支持胚胎生长发育的营养。这里的“胚胎”指的是在卵受精过程中,
20 由雄性原核和雌性原核融合产生的一种正在发育的有机体。尽管一个受精的(单细胞)卵子可被叫做胚胎, 单细胞胚胎在此也被特称为受精卵。

尽管卵内活化可在产出卵在室温维持两周后进行, 但活化刚产出的卵会得到最好的结果。在优选实施方案中, 在卵产出后的 0-96 小时内进行活化。在更加优选的实施方案中, 在卵产出后的 0-72 小时内进行活化。甚至还要更加优选的实施方案中, 在卵产出后 0-48 小时内活化。在高度优选的实施方案中, 在卵产出后 0-24 小时内活化。因此, 最好对产出的卵尽快进行活化。然而准确的时间限制取决于所产卵是在什么样条件下保存的, 如什么样的温度和湿度等。如果让未
30 受精而产出的卵冷却前进行活化, 将会提高活化效果。

在本发明的方法中, 壳内鸟卵活化的方法是通过机械破坏卵或递送一个生物样品、如含有一个或多个精子、细胞或核的样品到产出的

卵中。可用以下一些方法将卵破坏或递送生物样品。这些方法允许将样品递送至壳内，包括（但不局限于）用酸溶液等或电穿孔的方法溶解卵壳的一个区域，以及诸如用针或解剖刀等工具穿透卵壳或使其产生缝隙，从而使卵壳有一开口。

- 5 在将样品递送到壳内之前，为了防止对鸟卵的污染，递送样品或破坏卵子所要穿透的卵壳某一区域的表面应该进行消毒。任何和递送生物样品的方法相适应的方法都可用来对卵壳进行消毒处理，包括（但不局限于）消毒剂 IOFEC-20[®]和 3% 的过氧化氢。可将卵壳上将要被穿透的位点用消毒剂擦洗或喷洒，或者将鸟卵浸泡在含有消毒剂的容
10 器中进行处理。

- 如上所述，可用小刀或针等工具在卵壳上作一个开口，所用的工具最好是无菌的。例如，在一个两步法中，首先用小刀或其它的锐器在卵壳上开一个小孔。第二步，用注射器的针头将样品通过小孔注入到卵内。将样品引入到卵壳内也可用其它的方式，包括（但不局限于）
15 使用移液管，例如微移液管等。在一步法中，用注射器的针头直接刺破卵壳，将所吸取的样品注入到卵内。因此，“开口”可包括由针形成的小孔。当然，本领域普通技术人员能选择适用的针头，其规格大小足以使所有的样品都能通过针头。在一种实施方案中，所用的针头要是最小规格的，从而将样品完整的递送到卵壳内，而且，针头要足
20 够的坚韧，以便足以穿过钙质的卵壳。另外，可用一个单独的针头在卵壳上作一个开口。在典型情况下，可使用 30 号（gauge）到 16 号的针头。在一个具体的实施方案中，使用 22 号的针头。

- 可在卵壳上能使卵活化的任何区域开口，但通常在胚盘附近卵壳的某一区域开口。尽管可将鸟卵进行处理，以便将胚盘置于卵的不同
25 位置，但刚产出卵的胚盘一般位于覆盖卵黄附近的气室的卵壳的大末端。一旦卵壳上已作了开口，优选用针头或移液管等通过气室将样品注入到位于气室下面的膜（内层壳膜）下。

- 为了防止卵的污染和胚胎的死亡，最好将壳上的开口密封。可用非毒性的粘合剂直接将卵壳的开口密封。或者，将卵壳的碎片作为补
30 丁将开口关闭，也可用非毒性粘合剂将碎片粘到卵壳上。在一个具体实施方案中，所用非毒性粘合剂为 Elmer's[®]胶水。在另一实施方案中，粘合剂为一种聚硅酮密封剂。进一步，也可用任何“组织胶水”密封

卵壳。“组织胶水”是外科手术过程中用来将组织结合起来的无菌、非毒性粘合剂。

用本发明所述方法来活化的鸟卵由选自以下一组的鸟类产出：
鸡、鹌鹑、火鸡、雉、鸵鸟、鸚鵡、鵝、孔雀、松鸡、美洲鸵、鸚鵡、
5 鸡尾鸚鵡、美冠鸚鵡、长尾小鸚鵡、以及其它的具有商业价值的鸟类。

本发明提供了壳内活化鸟卵的方法，其中，卵包含由膜包围的卵黄。本发明也提供了解化存活雏鸟的方法。

按照本发明所述方法将鸟卵活化后，将卵进行孵化处理，直到孵出存活雏鸟。本领域的技术人员应该知道孵化特定种受精鸟卵的时间和优选条件。以下为许多种鸟的孵化周期：鸡-21天，鹌鹑-23天，
10 Corunix 鹌鹑-17-18天，雉-23天，火鸡-28天，鸭-28-33天，鵝-28-30天，长尾小鸚鵡-18天，鸚鵡-28天，鸽-14天，八哥-14天，雀-14天，纽扣鹌鹑 (Button Quail) -16天，峡谷鹌鹑 (Valley Quail) -21-22天，天鹅-30-37天。和天然受精卵的孵化相比，用本发明所述方法对受精卵进行孵化时，其区别仅在于孵化
15 时间可以延长，以便包括受精卵产出前在雌鸟体内所保留的时间。在一个优选实施方案中，鸡卵的孵化周期可持续21-23天。本领域普通技术人员将容易确定孵化某一特定种鸟卵的最佳温度，典型的温度为95°F-100°F。鸡卵在约99.5°F进行孵化。在一个更加优选的实施方案中，当接近孵出点时，鸡卵的孵化温度应降低。因此，在当前的
20 优选实施方案中，在孵化鸡卵的1-18天，在99.5°F进行孵化，从19天开始在98.5°F下进行孵化至孵出雏鸡。

本领域所熟知，要使鸟卵孵出雏鸟，其孵化的湿度水平是很重要的。因此，卵孵化时典型的湿度为75%-90%。优选孵化湿度为约80%。
25 %。更优选地，在接近孵出点时，孵化卵的湿度水平将升高。因此，在一个优选实施方案中，鸡卵孵化时，从1-18天，在80%的湿度下孵化，19天以后在85%的湿度孵化至孵出雏鸡。在一个特别优选的实施方案中，在孵化的1-18天，在99.5°F和80%的湿度下孵化卵，从第19天开始，在98.5°F和85%的湿度下孵化至孵出雏鸡。正如在本领域所熟知的，在孵化期间，翻动鸟卵有利于促进胚胎的生长。
30

进一步优选在商用的孵卵箱里孵化鸟卵。商用孵化器 (hatcher) 调节器 (setters) 由许多公司生产，包括 PAS Reform, Jamesway,

Chickmaster, Buckeye, Cumberland, Petersime, Humidaire Incubator Co. 等等。优选在孵出之前约三天, 将卵从调节器孵卵箱 (setter incubator) 移到孵化器孵卵箱 (hatcher incubator) 中。孵化篮 (hatcher basket) 可使卵置于雏鸟更易破壳出来的位置。该篮也允许雏鸟在孵出后立即走动, 这对于雏鸟的发育和成活是必要的。

在另一实施方案中, 本发明提供一种产出的鸟卵, 其中含有天然胚胎, 此胚胎含有的细胞少于 40,000 个, 能发育成为存活雏鸟。“天然”意思是正在生长的, 活着以及产生于它来源的地方。因此, 天然胚胎指的是其发育和孵出时同雌鸟的原核形成所处卵壳相同的胚胎。

因此, 胚胎是从天然的卵子遗传下来的。当天然受精卵产出时, 典型的正在发育的胚胎含有 40,000-70,000 个细胞。然而, 本发明所指的卵在产出后, 在壳内完成受精。因此, 本发明中, 卵中正在发育的胚胎, 其孵化期间的细胞数有时不足 40,000 个。实际上, 当活化鸟卵时, 本发明的卵中的胚胎仅有一个细胞, 即受精卵。随着鸟卵中胚胎的生长, 正常的细胞分裂发生了, 细胞数量也增加。因此, 本发明所提供的活化的、产出的鸟卵, 在孵化的某一时间将有以下细胞数的胚胎: 例如 1,100, 1,000, 10,000, 20,000 30,000, 或 40,000, 以及细胞数位于这些之间的胚胎。两种商业上优选的鸟卵是鸡和火鸡的卵。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种壳内鸟卵, 其含有一个细胞数少于 40,000 (例如 30,000, 20,000, 10,000, 1,000, 100 和 1 (受精卵)) 的胚胎, 其中, 胚胎能够发育成存活雏鸟, 卵壳上有一个小于 4 厘米的开口。在另一个实施方案中, 卵壳上的开口小于 2 厘米。在另一个实施方案中, 卵壳上的开口小于 1 厘米或 0.5 厘米。在另一个实施方案中, 卵壳上的开口小到仅能容纳一个 22 号针头。因此, 开口可能是以下大小之间的任何大小, 最小的开口仅允许注入样品或破坏卵子的工具, 最大到小于将体外 (在壳外) 受精的卵放回壳内所要求的孔。“开口”意味着鸟卵产出后的某个时间, 在壳上开的一个孔。对开口鸟卵的理解也包括随后又被密封的鸟卵。例如, 用针头刺一个孔, 并将样品注入, 而后又将开口密封的鸟卵, 甚至密封以后, 都是在有开口鸟卵的定义范围之内。对鸟卵而言, 胚胎可能是天然的或非天然的。“非天然”包括那些从某一卵子发育, 但对产出此

卵的壳不是天然的那些胚胎。两种商业上优选的鸟卵来自鸡和火鸡。另外，本发明提供了一种产出的鸟卵，其含有一个胚胎和一个天然的卵黄，其中，胚胎的细胞数少于 40,000, 30,000, 20,000, 10,000, 5,000, 1,000 或 100，以及介于 1-40,000 之间。从这些卵孵出的
5 雏鸟都有正常的核型和正常的发育。

产出本发明卵的鸟类可能选自例如鸡、鹌鹑、鸭、火鸡、雉、鸵鸟、鸚鵡、鹅、孔雀、松鸡、美洲鸵、鸚鵡、鸡尾鸚鵡、美冠鸚鵡、长尾小鸚鵡、天鹅、鸽、以及其它一些有商用价值的鸟类。在一个商业上优选的实施方案中，鸟卵来自适用于本发明所提供方法的一些鸟
10 类物种，选自鸡、火鸡、鹅、鸭子、鹌鹑和雉等。在一个更优选的商业性实施方案中，通常采用鸡卵。本方法也能有效地用于动物园的鸟类物种，如帮助保护濒临灭绝的鸟类。

本发明所提供的方法也适用于爬行动物卵的卵内活化。爬行动物卵和鸟卵一样，包含卵黄和雌性原核，产出时也受到卵壳的保护。一个
15 未受精而产出的爬行动物卵，也可按照本发明所提供的方法进行壳内活化。

在这里所描述的卵内活化方法也可以与其它卵内活化方法相结合使用。例如，胚胎可在活化后进行接种 (vaccination)。这些接种方法在本领域是熟知的。作为选择，如果接种不会妨碍胚胎的发育，
20 这样的接种可和卵内活化同时进行。

另外，卵内活化可自动进行，以便多个卵同时被活化（例如通过注入方式活化）。因此，可将 50, 100, 200, 300 或更多个卵同时活化。

所产出的未受精卵可用下文提出的多种特定的方法进行活化。上文所描述的活化方法是通过象受精、单性生殖及核转移的方式完成的。因此，正如下文所述，所转移的、用于活化未受精卵的样品可能是含有样品物质的精子。
25

受精

30 本发明提供了一种使壳内鸟卵受精的方法，其中，该卵包含由膜包围的卵黄，该方法包括获得含有置于生理上可接受的载体中的鸟精子的精子样品及递送精子样品到卵中使其受精的方法。使所产壳内卵

受精的过程被称为“卵内受精”(IOF)。

可用本领域工作人员所熟知的方法从鸟类的精子样品中获得精子，例如本领域工作者所熟知的腹部按摩法。用这种方法也可以将含有精子、精液或透明流体的射出物（精液）收集起来。透明流体是一种当阴茎肿胀时通过淋巴管递送到阴茎表面的淋巴样的流体。鸟类的精子也可以从本领域技术人员所熟知的商业来源得到。

在一个实施方案中，精子样品中的精子是从某一只鸟取得的。在另一个实施方案中，精子样品中的精子是一只以上鸟的精子混合物。当将一只以上鸟的精子混合物用于本发明所述的方法时，使卵受精成功的可能性可以增加，因为如果某一只鸟的精子是不育的，其它鸟的精子很可能具有使卵受精的能力。

在一个优选的实施方案中，精子样品含有从同一种鸟取得的精子，用此精子样品使与精子供体雄鸟同种的雌鸟的卵受精。本发明也考虑使一种鸟的精子与另一种鸟的卵受精（如果此精子能使卵受精）。

然而，特别优选的是，精子应在其收集后的 30 分钟内使用，另外，如果精子能够保持使卵受精的能力，较老的，甚至是以前冷冻过的或者冻干的精子都可以按照本发明的方法使用。如果要使精子在收集 30 分后使用，优选和精子补充剂（extender）结合使用（见下文所述）。

如上文所述，精子样品也包含有生理上可接受的载体。此处所述“生理上可接受的载体”是一种让精子保持运动能力和存活力的流体。生理上可接受的载体的例子包括（但不局限于）：未变化的精液、精液（精子固有的或添加的）、透明流体（精子固有的或加入的）、缓冲盐溶液、精子补充剂，以及它们的组合。载体优选包括精子补充剂，在本领域也被叫做稀释剂。正如上文所述，当精子收集后 30 分钟内不使用，使用时最好加入精子补充剂。M.R. Bakst, In Manipulation of the Avian Genome, R.J. Etches and AM. Verrinder Gibbons, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 15-28: 1993). 此处的精子补充剂是一种生理上可接受的载体，将其用来稀释精子样品，使精子样品的体积增加，以降低精子样品中精子的浓度。优选地，精子补充剂的组合物除了延长精子的保存期限外，还将稀释精子，以使用使收集的精子量使更多的卵受精。关于精子补充剂组合物的例子、所建

议的稀释比例、最佳的贮存时间和条件、以及商用的补充剂来源可从 Bakst 的报道中找到 (“Preservation of Avian Cell: In: Poultry Breeding and Genetics, R.D. Crawford; ed.) Elsevier, New York, pp 91-108: 1990)). 其它一些在家禽工业上常用的稀释剂为 Lago 配方鸟类精子补充剂(由 Hygeia Biological Laboratories 生产)、Semaide 火鸡补充剂: 由 Poultry Health Laboratories in Davis California 生产)、Beltsville 家禽精子补充剂 Semen Extender: 由 Tri Bio Laboratories, Inc. in State College, Pennsylvania 生产)。在一个优选的实施方案中, 精子补充剂为 Avidiludent (由 IMB, 10 rue Georges, Clemenceau, BP 81, 61302 1'Aigle, France 生产)。在另一个实施方案中, 精子样品可以含有精子和精液。另外, 精子样品可能含有精子和用生理上可接受的载体稀释的精液, 所述载体包括(但不局限于)缓冲盐溶液和精子补充剂。

精子样品也可由本领域技术人员所熟知的方法制备, 包括用缓冲盐溶液或精子补充剂等溶液洗涤从一只或多只鸟获得的精液, 离心所得溶液, 除去上清, 以及用一体积的缓冲盐溶液或精子补充剂等溶液重悬所洗涤过的精子。本领域的技术人员很容易理解如何用适当体积的溶液重悬精子, 以获得想要的浓度。例如, 离心并除去上清后, 将沉积精子称重, 精子的数量可通过已知的鸟精子的重量值进行估计。然后用适量体积的溶液重悬精子, 以获得所需要的浓度。作为选择, 除去上清后的精子可以重悬, 然后再离心, 以便测定沉积精子的体积 (Johnston, 1998)。随后, 可用 Maeza 和 Buss 公式计算精子的浓度。 (Poultry Sci. 55: 2059: 1976))。

典型的, 鸡精液中精子的浓度为 $3 \sim 8 \times 10^8$ 个/ml, 火鸡为 $8 \sim 15 \times 10^8$ 个/ml, 珍珠鸡(guinea fowl)为 $4 \sim 8 \times 10^8$ /ml, 北京鸭为 $0.2 \sim 6 \times 10^8$ /ml。人工受精时的标准精子数量为 1×10^8 /50 μ l 精液。在本发明的方法中, 由于将精子直接置于雌性原核旁边, 故用来使卵受精的精子比通常要少得多。因此, 本发明的方法中也可用少到只有一个精子的情况。实际上, 本发明能够使用的精子浓度范围很大。在一个实施方案中, 将鸡精液用等体积的 Avidiludent 稀释, 然后将大约 0.01 ml 的这种精子样品注入卵内。因此, 大约一百万个精子可沉积在雌性原核的旁边。

在本发明的一个方法中，将精子样品递送到卵，使壳内的鸟卵受精。精子样品的递送可用上文描述的方法完成。精子在其最宽点大约0.5 μm ，长度为100 μm 。因此，在一个更加优选的实施方案中，用一个内径至少10 μm 的针头进行注射。在一个实施方案中，注射完后，
5 针头仍可留在卵壳里。许多将疫苗注入卵的针头和方法都可用于或适合于精子的递送。

可在能影响有效受精的卵壳的任何位置开口，但是典型的情况下，在胚盘附近的卵壳某一区域开口。尽管可将卵壳进行处理，以便将胚盘置于鸟卵的不同区域，新产卵的胚盘大多位于覆盖卵黄的气室的卵壳的大末端。一旦在卵壳上开了一个口，优选通过引入针头、移
10 液管等将精子样品通过气室递送到位于气室下面的膜（内壳膜）下。精子的数量可以增加或减少，这取决于给予精子的地点和形式。在一个更加优选的实施方案中，将精子样品用针头注入鸟卵内。在天然情况下，要使卵的受精取得成功，精细胞必须穿透内层卵周膜并和卵膜
15 融合。如果用 IOF，在成功受精之前，精细胞也必须穿透外层卵周液膜。为了增加受精效率，可以处理 OPL 或卵黄膜。任何可使 OPL 或卵黄膜更易被穿透的处理都可以被采用，例如非毒性的酸、蛋白水解酶、或物理的磨损等。

在一个实施方案中，用针头、移液管等以约15°的角度推进至卵
20 壳内，并穿透衬在卵壳内的膜。在一个本发明所提供的方法中，针头、移液管等推进通过气室，直到达到内层的壳膜。一个练习使用本发明方法的人应知道，当针头或移液管进一步推进受到轻微阻碍时，表明针头或移液管已达到壳膜。随着针头或移液管的尖端轻微推进，来自膜的阻力消失，针头或移液管的尖端刚好穿过膜。然后，精子样品被
25 递送到了卵内靠近膜的某一区域，也即是胚盘的附近。因此，精子可以刚好被递送到膜的下面，这个方法叫做细胞质内精子注射法（ICSI）。常规的精子样品的体积可少至0.005 ml，或大到0.10 ml。一个典型的精子样品体积为大约0.01 ml。

为了防止卵的污染和胚胎的死亡，卵壳上的开口优选用上文所述
30 的方法密封。本发明的方法可使许多鸟类物种所产的卵受精，所述鸟类物种选自鸡、鹌鹑、鸭、火鸡、雉、鸵鸟、鸚鵡、鵝、孔雀、松鸡、美洲鸵、鸚鵡、鸡尾鸚鵡、美冠鸚鵡、以及其它一些具有商业价值的

鸟类。

本发明也提供了一种使壳内鸟卵受精的方法，其中，所述卵含有一个由膜包围的卵黄；也提供了孵化出存活雏鸟的方法，包括获得含有置于生理上可接受的载体上的鸟精子的精子样品，并将精子样品递送到卵使其受精，并且孵化卵并从卵孵出存活雏鸟。此处“获得”包括利用预制备和预递送的精子样品。

按照本发明上文所述方法将精子样品递送到卵内以后，按上文所述方法将卵进行孵化，直到孵出存活雏鸟。

正如上文所述，本发明的方法也可用于爬行动物卵的卵内受精。爬行动物卵和鸟卵一样，也含有卵黄和雌性原核，当其产出时也受到卵壳的保护。一个未受精的爬行动物卵产出后，也可用本发明所述方法进行壳内受精，尤其是将含有一个或多个同种爬行动物精子的精子样品，通过卵壳上的开口递送到未受精的产出卵的壳内，并递送到雌性原核附近的卵黄上，在此处发生受精作用。

另外，卵内受精可自动进行，以便多个卵同时受精，例如采用注射技术。因此，50，100，200，300或更多的卵可同时被注射。

单性生殖

在本发明的一个实施方案中，所产未受精卵的活化采用单性生殖诱导。此处的单性生殖是指在没有雄性配子的情况下，由雌性的配子单独产生胚细胞的过程。

在一个优选方案中，所产未受精卵用单性生殖进行的活化可通过穿透包围卵黄（卵黄膜）和胚盘的膜的方式进行诱导，例如直接用25号针头刺破卵壳并进入卵内，穿透包围卵黄的膜。最好避免使卵黄破裂。因此，对包围卵黄的膜的穿透和破坏可启动卵子的活化。需要指出的是，其它一些能破裂包围卵黄的膜的机械方式也可以用。例如激光，包括非热能的YGA（钇铝石榴石）激光，可用来破坏包围卵黄的膜，而在此方法中并不使用针头。

有证据表明，胞质中 Ca^{2+} 浓度短暂的增加启动卵发育。胞质中 Ca^{2+} 浓度可通过直接注入 Ca^{2+} 到卵内或使用携带 Ca^{2+} 的离子载体如A23187的方式人为地增加。这使得目前所测试过的所有动物的卵都得到了活化（Alberts 1983）。通过注入 Ca^{2+} 螯合剂EGTA防止 Ca^{2+} 浓度的增加，

从而可抑制受精后卵的活化。因为胞质中 Ca^{2+} 浓度的增加是短暂的，仅在受精后持续 2-3 分钟，很明显，它不能直接调节卵活化后期所观察到的各种事件，包括 DNA 和蛋白质的合成等。相反， Ca^{2+} 浓度的增加只是启动了各种发育事件的整个顺序；当 Ca^{2+} 浓度处于高水平时，卵内一定会发生一些更加持久性的改变。

尽管有关卵活化的机理还不完全为人们所理解，很明显，精子只是启动了卵内的一个预设程序。精子本身并不是必须的。卵可以被许多非特异性的物理或化学处理活化。这些方法通常被认为提高了细胞内的 Ca^{2+} 浓度 (Rickord and White, 1992)。例如用针刺的方式可活化蛙卵 (Alberts, 1983)。小鼠卵母细胞可用如下的方式活化：暴露于无 Ca^{2+} - Mg^{2+} 的培养基 (Surani and Kaufman, 1977)、含透明质酸酶的培养基 (Graham, 1970)、暴露于乙醇 (Cuthbertson)、 Ca^{2+} 载体或螯合剂 (Steinhardt et al., 1974; Kline and Klinge, 1992)、蛋白质合成抑制剂 (Siracusa et al., 1978) 以及电刺激 (Tarkowski et al., 1970) 等。有人报道用乙醇 (Nagai, 1978)、电刺激 (Ware et al., 1989)、暴露于室温 (Stice and Keefer, 1992)、以及将电刺激和环己酰亚胺相结合使用 (First et al., 1992; Yang et al., 1992) 等方式活化牛的卵母细胞。这些方法可用来活化产下的未受精鸟卵。

用单性生殖进行卵内活化的一个应用就是快速生产种禽的纯的近交系。目前，工业实践包括使用纯合母系的不同组合已生产出商业上独特的鸟类。一直有人在努力获得、提高和维持这些品系。用单性生殖的方式，一个雌性的配子能经过诱导发育成存活雏鸟，而不需要来自雄性的遗传贡献。所产生的雏鸟在每一个等位基因完全是纯合的。因此，纯合品系可在一代中产生，而不是今天所要求的多轮近交。而且，不需要用鸟群来产生纯合品系，而只需要用某一个优良的个体。因为在某一繁殖种群中，一些个别鸟的表现比一般的要好，所以，用这种方法可以使商业上的最佳遗传性状进入最终的商业产品。

30

核转移

核转移 / 细胞微操作技术可被用来活化产出的未受精的产出鸟卵。因此，本发明的一个单独考虑的实施方案涉及到了将含细胞核或

“核质 (nucleoplasts)” 的流体悬液进行递送的方法。核质可用先进的离心方法大规模的产生。据测定, 在许多物种, 如绵羊、奶牛和小鼠, 从某一个细胞分离的核质可以被插入到另一个去核的细胞中, 以便产生相同的, 克隆的个体。此处所用的“核转移”是指插入一个核, 也即核质, (或者处于细胞中, 或者独立于细胞的核), 到一个天然核无效 (例如通过取出或切除) 的细胞中的过程。这里所描述的方法允许生产商有效地将优良遗传品系繁殖成商用的鸟类, 并作为发展自动化核转移仪器平台的基础。

实现这个方法所要求的主要的步骤如下:

(1) 开发合适的细胞系及培养核质供体的条件; (2) 显现并取出或切除鸟卵和 / 或受精卵; (3) 供体核的分离; (4) 将供体核转移到卵内 (胞质)。可引起胚胎发育的重构卵的活化也可能受影响。

核质供体细胞。在幼鸟中, 胚胎干细胞和原始生殖细胞保持着全能性, 可用于鸟的 NT 程序中。用这种方式产生的克隆鸡在用于某些家禽繁殖方面是相当有价值的。

作为选择, 体细胞系对于其它家禽繁殖方案可能具有某些优点。一个在选择体细胞型时要考虑的因素就是体细胞进行“重新设计 (reprogramming)” 的能力。为了便于核质对所有胚胎细胞系有所贡献, 从而导致胚胎的正常发育, 可采用重新设计。培养的胚胎成纤维细胞 (CEF) 已被广泛用于哺乳动物, 由于其容易培养和遗传操作, 因而产生了很好的结果。在鸟类体系中, CEFs 可用于体细胞的核转移。另外, 胚胎来源的胚盘细胞 (BCs) 已被培养, 并可以使用。另一个可用作鸟类核转移平台的细胞类型为鸟的 B 细胞。

用鸟 B 细胞的一个优点是其能进行高水平的重组。这个能力相当重要, 因为它能使外源的 DNA 掺入鸟基因组的过程变得有效得多。从而将对任何供体细胞系进行的体外修饰掺入到所得到的鸟的基因组中。进行测试, 已鉴定出最优的细胞类型。例如, 从这些细胞类型中产生核质并将其转移到鸟的细胞质 (受体细胞)。导致最高水平胚胎存活率的细胞类型可被引入标准的技术平台。

在哺乳动物, 尽管主要是卵用于核转移, 但用卵和受精卵都已成功地进行了核转移。对于标准的核转移程序, 一般在引入供体的核之前, 将现存的核取出或切除。鸟卵较大, 供体核和受体核之间的距离

很大，因此不严格要求取出受体细胞的核。然而，目前优选去核。

由于有浓稠的卵黄颗粒，使得在光学显微镜下鸟卵细胞核的显现很大程度上无效。因此，目前选择的鸟卵去核的方法使用了核的荧光标记法。可以使用已知的荧光核染料如 Hoescht 33342 (二-苯甲酰胺) 和 DAPI (4'6-二脒基-2-苯基吲哚)，因为它们可以使核及其相关 DNA 显现。

可除去核的两个标准方法；(1) 通过玻璃微移液管取出核或 (2) 用激光切除核。目前，这两个用于核微操作的方法都在使用。激光类型和波长可凭经验确定。通过任何一种方法使胞质中荧光区域的消失，表明核已被除去。在这个时期不仅要取出核 DNA，而且优选取出纺锤体形成结构。

有许对因素影响核转移后的发育，包括要求重构胚胎以维持正常的倍数性。当对一个开始分化细胞的核进行转移时，基因表达的模式将从分化的细胞型的模式重新设计到早期胚胎细胞型的模式。细胞周期改变的实验表明：发生这个过程的效率受到供体和受体细胞周期阶段的影响。

从对哺乳动物的实验表明，在重构的胚胎中，当 DNA 开始复制时，会受到供体细胞和受体细胞周期阶段的影响。由于细胞质中减数分裂促进因子 (MPF) 的影响，受体细胞会产生更大的影响 (Barnes et al., 1993; Campbell et al., 1993)。在复制期间纺锤体形成时，MPF 的活性增加，在减数分裂中期 II 仍保持在高水平。将核转移到含高水平 MPF 的细胞质时，不管供体细胞核周期阶段如何，都会导致核膜的裂解、染色体浓集、核膜的重新形成和 DNA 复制等。相反，当核转移到具有低水平 MPF 活性的卵母细胞时，核决定是否进行 DNA 复制 (Campbell et al., 1993, 1994)。这项工作使我们相信有两种作用：(1) 在细胞周期的特定阶段对基因表达进行重新设计有更大机会；(2) 转移到相类似细胞周期阶段，会产生益处。

据表明，当供体细胞核处于细胞周期的 G0 和 G1 期时，胚胎的发育可得到增强。将去核卵母细胞和处于 G0 期的乳腺细胞融合，经过发育得到绵羊多利 (Dolly)。同样，在小鼠中，用处于 G0 期和 G1 期的 Cumulus 细胞成功的进行了体细胞的核转移 (Wakayama, et al, 1998)。然而，用非静止供体细胞的核产生了克隆牛 (Cibelli et al,

1998)。这表明，在家禽中成功进行核转移的必需条件要凭经验确定。处于细胞周期不同阶段的细胞都可用于确定最佳的实验方案。供体核递送可通过供体细胞和去核卵/受精卵的电融合及直接将供体核注入到去核卵的方式进行。由于鸟卵体积大，注射较容易，故将供体核直接注入鸟卵将是核转移的最佳方法。当将核转移到减数分裂中期II停止的卵子时，一般要求人工活化卵子。可在核转移后的许多时间间隔进行活化，如从核转移后的同时到几个小时内进行活化都可以。可通过测定这些相同的参数来确定最佳的活化时间。

可设计一个自动高通量系统来执行该过程。这有可能完全消除一个被称为倍增繁殖(multiplication breeding)的家禽工业的一方面。典型地，在倍增繁殖方法中，从纯种系通过祖父系、父系到最终商用的鸟类，需要几个世代。进行此过程需要大量的鸟。用核转移进行IOA，可从某一只优良的鸟繁殖出最终商用的鸟类。净效应是用一种非常高效的繁殖方式产生大量遗传上优良的鸟类。而且，用于核或细胞转移的细胞可以无限期的贮存，直到终端用户需要某一个特殊的商业产品为止。另一个同样重要的好处就是，可以产生一群完全单性的鸟类。例如烤子鸡生产商可能只需要雄性的鸟类，以加快生长速率，然而蛋生产商更倾向于全部要雌鸟。

20 基因转移

本发明也提供了一种产生含异源核酸的鸟胚胎的方法，包括用本发明所公开的方法使鸟卵活化，受精，并引入异源核酸到鸟卵中。此处所述的核酸包括(但不局限于)DNA、cDNA、RNA、mRNA及反义RNA。核酸可能是单链、双链或多链的。异源核酸可以包括鸟类物种的非天然核酸，以及在鸟细胞或核中被引入位置不能正常表达的核酸。

当鸟卵用IOA的方式活化后，可在发育胚胎的任何阶段进行处理，以控制一些或所有胚胎细胞的遗传组成。对鸟的转基因最有价值的便是早期胚胎。IOA允许了异源核酸的种系转移，因为这允许尽可能早的将异源核酸引入早期鸟胚胎。例如，这种对发育中胚胎的遗传操作可产生转基因鸟，其包含的遗传物质能用于调节内源性DNA及其表达，并产生可制造具有商业价值蛋白的细胞。

按照几个已知的方法，本领域技术人员可将某一核酸转移到鸟类

基因组。(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Lennette et al., Manual of Clinical Microbiology, 14th Ed., Amer. Soc. For Microbiology, Washington, D.C., 1985; Sambrook et al.,
5 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Antisense RNA and DNA, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988); Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. Alan R. Liss, Inc., New York
10 (1987); Centers for Disease Control Laboratory Manual, U.S. Department of Health, Education, and Welfare Pub. No. 79-8375, p. 75, Centers for Disease Control, Atlanta, GA; Fundamental Virology, 2nd Ed. Bernard N. Fields and David M. Knipe, Chief Eds., Raven Press: New York, 1990)。将遗传物质转移到鸟类基因组的例子包括(但不局限于)鸟白血病组织增生病毒(ALV)转导介
15 导的基因转移、转座子介导的基因转移、胚盘细胞介导的基因转移、原始生殖细胞介导的基因转移及核转移等。将异源核酸引入胚胎可在活化事件发生的同时进行,例如在精子样品引入卵的同时或在胚胎发育的后期进行。

20 目前用来产生转基因鸟的标准方法就是产生包含异源 DNA 插入片段的复制缺陷型 ALV 病毒来源的转导颗粒。因为此颗粒在鸟体内没有复制能力,故没有在鸟或人体引起病毒血症或疾病的危险。用此处所描述的方法,可将转导颗粒直接引入含有早期鸟胚的产出卵中。例如,可在胚胎上方开一个孔,直接将转导颗粒引入胚中的胚下腔。然后将
25 开口密封,把鸟卵放于孵卵器中让其发育。

另一个将异源核酸引入鸟类基因组的方法为转座子介导的基因转移。转座子是指能够在宿主基因组中转座和移动的遗传元件。在鸟类中没有已知的转座子。然而,实验表明,从其它来源的转座子,经重新构建,也能在鸟的基因组中起作用。可将这些转座子工程化,作为
30 有用的核酸载体系统,从而将某些基因插入鸟类基因组。

此外,另一个将异源核酸引入鸟胚胎的方法为胚盘细胞基因转移法。可从 X 期胚胎(产出受精卵的胚胎阶段)取得胚盘或其它早期细

胞, 可将这些细胞注回到其克隆、生长和产生嵌合幼鸟的受体胚胎中。

“嵌合”幼鸟由来自两个不同遗传系的细胞组成。将分离不久的胚盘细胞引入受到辐射的宿主胚胎, 它们具有形成所得到的鸟的所有组织, 包括生殖系(产生精子和卵并因此产生下面所有世代的细胞)的能力, 用本领域技术人员的所有熟知的各种方法, 将胚盘细胞培养并用 DNA 转染, 以试图产生转基因禽类。

因此, 可将胚盘细胞或胚胎干细胞(ES)注入卵内受精的胚胎, 以产生嵌合体家禽。然后这些嵌合体家禽经过杂交, 假定它们具有胚盘或 ES 细胞的生殖系转移, 可以建立原始的注入细胞克隆。

此外, 原始生殖细胞介导的基因转移可用于产生转基因鸟。随着发育胚胎的生长, 某些细胞会形成生殖系而产生精子和卵。这些原始生殖细胞(PGCs)迁移到发育生殖腺的生殖嵴, 并处于静止状态, 直到雏鸟性成熟。一个进行鸟类基因转移的方法就是, 分离这些 PGCs, 对它们进行遗传操作, 并放回正在形成的胚胎, 让其继续发育。这个技术性的方法在其发展程度和潜在应用方面可比得上胚盘细胞基因转移法。原始生殖细胞和胚盘细胞一样, 当注入受体胚胎时, 也可促进的形成生殖系。

本发明的另一个方面包括递送液体制剂到鸟卵中, 以提供关于个别雏鸟的基因型状态或组成的重要信息。例如, 可将 DNA 和/或 RNA 探针递送到鸟胚胎, 以便通过性别或其它基因型对胚胎分类。这些探针特异性结合其靶序列, 以提供关于鸟类遗传组成的特异信息。用许多荧光、放射性或化学发光分子标记探针, 可得到用于测定基因型状态的高度可靠的技术。作为选择, 对于抗体和其它蛋白质, 可和报告分子一样, 以同样的方式使用。

利用本发明将核酸掺入单细胞卵母细胞和早期胚胎的方法, 可将外源 DNA 掺入所繁殖鸟的所有或大多数细胞中。然而, 在一个可选择的实施方案中, 本发明也适合将这些核酸和核酸载体递送到后期的胚胎中。目前, 一个产生转基因家禽的方法包括将病毒颗粒注入到正发育鸟胚胎的胚下腔中。另一个应用便是鸟胚胎中, 某一个特定基因产物的瞬时表达。可以将核酸制剂递送到鸟胚以产生基于卵/或动物的生物反应器系统。蛋白质、抗原和抗体也可递送到胚胎, 以影响基因的表达。

本发明所描述的卵内活化方法也可和其它的卵内活化方法结合使用。例如，可在卵受精后接种胚胎。作为选择，如果疫苗不会妨碍胚胎的发育，可在进行卵内受精的同时进行接种。

5

自动化

IOA 可实行自动化，以便使多个卵同时受精，如采用注射技术等。因此，可同时注射 50、100、200、300 或更多的卵。本领域技术人员都清楚，本发明的方法很容易进行大规模的工业化操作，以实现对新产出鸟卵活化的自动化。因此，为了实现 IOA 过程的自动化，以前用来免疫产出受精卵的方法可进行改进以引入精子样品、核，或单性生殖等。

本领域技术人员应理解，自动化卵处理技术被世界范围的许多独立发明者同时开发出来。现今的技术包括将液体物质注入到含胚鸟卵的高通量体系。具体的例子包括注入疫苗以改善所产生鸟的免疫状态，注入病毒以制备可用于动物和人的疫苗，注入蛋白质以影响雏鸟的健康等等。另一个用于家禽生产的自动化体系，可用来对死亡和存活雏鸟进行检测，其原理是基于用不同的光源照射，或检测卵台（egg flat）中两邻近鸟卵之间的温度差别。总的说来，这些技术代表着当今在本领域的发展状态。然而，有必要建立一个更加先进的特别适于鸟类繁殖者技术平台，本发明就是针对和满足这一需要。

最近在精子保存方面所取得的技术进展，结合 IOF 技术，使得家禽繁殖工业朝着更有效的管理模式方面发展。可将下文所述的几个重要遗传技术结合起来，创造出真正的多用途平台，以实现家禽繁殖技术的自动化。

为了进行 IOA 操作，例如 IOF，如用自动化模式，将包括两个步骤。第一步，计算加入机器的精子样品中精子细胞的数量，或包含供转移物质的细胞或细胞核的样品中精子细胞的数量。此任务可用集成的分光光度计（有时叫做密度计）完成，类似于市场上 Chino California 公司及其它公司出售的动物繁殖系统（Animal Reproduction Systems）。这个任务也用流式细胞仪来完成。从这些仪器分析中所得到的数据信息可以传到中央处理器或其它分析系统，以决定所用精液和精子补充剂（稀释液）、细胞或核物质的最佳体积。

这个信息被传送到一个流体分散装置，将适量体积的流体分散到卵注射装置或类似系统的中央流体贮存器中。

5 第二步，中央处理器激活卵注射装置，以适当的角度，递送适量体积的稀释精子样品或含某物质制剂的细胞或细胞核样品到未受精卵特定的深度，完成 IOA 过程，如 IOF。注射过程包括用管状打孔器在卵壳上穿孔，插入注射针头，使其通过卵壳膜及卵黄膜，以递送样品制剂。

卵注射装置设计可以类似于工业上由 Embrex, inc., Merck Inc 及其它一些公司制造并生产的设备。作为例子，在此引用一个叫做
10 “High Speed Automation Injection System for Avian Embryos” 的专利作为参考 (U.S. Patent No. 4,903,635)。正如专利所揭示的那样，此设备为鸟胚胎的高速自动化注射系统，可将流体物质，尤其是接种用的流体注入鸟卵内。此设备包括吸入装置，在注射前，可将卵在接触处的表面支起，而不是向前推。因此，这台设备提供了分离
15 的装置和设备用于在卵壳上开口，然后用流体物质注射鸟胚胎，或周围环境，避免使用针头或打孔器穿透卵壳并将流体物质传到卵的内部。正如本领域所熟知的，本发明也提出了用一个针头穿透卵壳，并递送流体物质。其它一些专利也揭示了将流体物质注入卵内的方法，包括 U.S. Patent Nos. 5,900,929, “Method and Apparatus for
20 Selectively Injection of Poultry Eggs”; 5,772,342, “Ovo Antibiotic and Microbial Treatment to Diminish Salmonellae Populations in Avians”; 5,699,751, entitled “Method and Apparatus for in Ovo Injection”; 5,438,954, entitled “Method and Apparatus for Early Embryonic in Ovo Injection”; 5,339,766, “Method of
25 Introducing Material into Eggs During Early Embryonic Development”; 5,176,101, “Modular Injection System for Avian Embryos”; 5,158,038, “Egg Injection Method, Apparatus and Carrier Solution for Improving Hatchability and Disease”; 以及 5,136,979, “Modular injection system for avian embryos,”
30 所有这些专利仅供参考。在一个 IOF 的最简单实施方案中，使用这些设备时，用精子代替抗原，将注射的深度调节到刚好能完成 IOF。

对于 IOA 过程，如 IOF，可设计出能对送到孵化站后的活化，如

受精鸟卵进行高通量操作的系统。有利地，本发明的 IOF 在直接受精过程中，要求使用比平常少得多的精子，以便在某些繁殖方案中显著降低所使用的雄鸟的数量，从而简化操作。将现有的雄鸟集中喂养，将产生的足够新鲜的精液送到孵卵站，使工业上每年产生的成千上万的鸟卵受精。所使用的雄鸟越少，繁殖工作者可仅用优良品种进行受精，从而在鸟类繁殖上取得更快的遗传学进步，从而改进其品系。另外，通过消除或显著减少雄鸟的数量可对工业繁殖内部结构进行再合理化。例如，一个有效得多的商业孵卵操作方法可直接代替传统的孵卵设施，因为只需要未受精卵就足够了。在人工受精方案中，雌性大约要占 95-98%，可以不需要手工受精，减少约 95% 以上和手工受精相关的劳动力。

通过核转移进行自动活化，人们可进一步改进鸟卵注射方法使其包含使天然核变得无效的方法。例如用微移液管取出或激光切除天然核或使其变得无效。

除了通过受精等方式对鸟卵的活化外，本发明还包括遗传分析、遗传操作和繁殖过程。本领域技术人员知道，这些手段目前是为实验室使用而设计，要求较高的技术水平，因此，目前不适于低利润的家禽养殖工业的常规使用。正如本发明所实现的那样，许多技术很适合掺入生产人员以及遗传学家和研究人员使用的完全自动化的操作平台。

本发明也设计了另外一些方法和步骤来递送各种液体制剂，以便 (a) 在卵内活化如 IOF 同时和/或之后影响鸟胚胎内基因的表达；和/或 (b) 提供有关鸟胚胎基因型状态的重要信息。递送装置可以类似上文所述的递送精液的卵注射装置。本发明可以用装精子的常规贮液器或独立于精子的贮液器，分别用不同的针头插入卵内注射每种流体，或用一个针头先后将流体注入卵内。

本发明也企图引入一种检测装置来进行各种基于基因和蛋白质的分析。这种装置的一个实施方案就是，用某一波长的光源，如激光，以及相应的在鸟卵中差别表达的染料作为某一基因型或生理状态的指示剂。例如，对于这个实施方案，可用荧光标记的性别探针、性别连锁的启动子和表达体系以及荧光标记的性别抗体等来分类鸟卵。

这个检测装置可以用一个 CCD 相机或其它合适的荧光信号检测器

来激活一个分类和/或鉴定装置。在另一个实施方案中,检测装置能用放射性的闪烁计数器和/或基于化学发光的方法达到以上同样的目的。然而,在另一个实施方案中,系统可以用“基因芯片”,基因微阵列和/或基因宏观阵列技术来达到检测的目的,例如由 Affymetrix 公司生产的基因芯片等。

正如本领域技术人员所熟知的,按基因型对鸟分类可用于生产活动中。用性别将鸟分类容许生产能力最佳化。即肉仔鸡工业需要雄性,而产卵鸡需要雌性。本发明也使遗传学家能够基于高速的自动化鉴定对鸟卵进行遗传筛选和基因型分析,产生更快的遗传学进步并开发出改进的家禽品系。

不管用哪种方法对基因型进行分类,另一种设计包括将鸟卵分为“活的”或“死的”。在这个方法中也考虑引入简单的光源和/或温度装置,如目前由 PAS Reform, Breuil 和 Embrex 公司生产的检测系统。关于本发明所描述的这一方面,引用 Embrex 公司的专利作为参考(美国专利 No. 5,900,929)。

和以下所述的分类设备相结合,本发明注射提供预定指标和其检测方法的流体制剂,从而建立一个用于各种分子检测应用的多用途平台。

在本发明的另一个实施方案中,引入了液体取样装置,以从鸟卵中获取液体样品。这个装置用一个真空管和取样针头相通,针头的尖端反复被各个鸟卵的液体部分包围,然后将液体取出。作为选择,此装置也可用类似 PE Biosystems 公司的 310 基因分析仪中所使用的电渗透梯度将流体样品吸到取样毛细管中。

为了最大程度利用以上所述装置,有必要在某些时候用许多技术来放大信号。一个放大检测信号的实施方案就是,引入一个集成热循环系统进行 DNA 扩增,如由 PE Biosystems, Hybaid MJ Research 及其它公司生产的热循环系统等。这个装置对于用基因芯片、微阵列、宏观阵列进行基因型分析时非常有用,即使不是必需的。

为了获得分析样品更详细的数据信息,可根据大小、分子量、电荷或其它的化学/物理性质分离样品分子。这种分离装置的一个实施方案就是电泳单位。例如可用一个类似于 PE Biosystems 公司生产的 310 基因分析仪中所使用的集成毛细管电泳单位来分离核酸和蛋白

质。本发明的这个实施方案还可用于对来自初级饲养者的家禽品系的鸟卵进行高通量基因型分析。

最后，从以上实施方案获得的数据，可用软件在中央处理器或其它设备中进行单个的或集中的处理，以评价卵在离开加工线时的价值和状态。经过评价后的卵可以标记、分类，以便输送到孵化篮或孵化盘进行孵化。可用类似于 Hewlett Packard 和 Epson 打印机上的喷墨装置对鸟卵进行标记。鸟卵的分类和输送可自动进行，用吸杯(suction cup)和传送带，将大批装卵的盘子从设备体输送到等待的运卵车上。该设备的这部分的装置可设计为类似于 Breuil, Kuhl Corporation, Pas Reform 和 Embrex 等公司制造的生产系统。

本发明所描述的设备平台也得益于某些现有的基因/蛋白质分析性能。将这些分析性能直接引入平台，可使这些方法以高速度和在工业规模上进行。本发明也描述了将这些分析性能直接用于商业化家禽工业的例子。

实施例

下面所列的实施例在于给本领域技术人员彻底公开和描述本发明所要求保护的方法是如何进行的，并且只是作为本发明的举例，并不限制发明者所认为的本发明的范围。本发明努力确保数字的准确性(例如数量，温度等)，但也应考虑一些错误和偏差。除非特别指出，份数是重量份，温度的单位为 $^{\circ}\text{F}$ ，压力为大气压或接近大气压。

实施例 1

1. 将新产的 43 个未受精的 Barred Rock 鸡的卵用 3% 的过氧化氢擦拭卵壳进行消毒，然后放在架子上。
2. 在受精前 1 小时内，在同一个上午，从 4 只相隔绝的 Rock 雄鸡获得精液，装入 Vacutainer® 小瓶中。
3. 将 4 只雄鸡的精液集中起来，和 1 ml 的 Avidiluent® 混合。
4. 用 1 号，22 号针头，将精液和 Avidiluent® 混合液吸入 1 ml 的注射器中。
5. 用针头在卵壳大而钝的末端开一个口，并将针头与卵壳表面成 15° 角通过开口。

6. 将针头通过气室，直到其尖端刚好穿透包围卵黄和胚盘的膜为止。
 7. 将一滴 0.05 ml 的精子样品注射到毗邻膜的卵黄的表面。
 8. 将附在注射器上的针头从卵中取出。
 - 5 9. 用一小片卵壳将注射器开的小口补上，用象 Elmer's glue®的胶水将补丁粘到卵壳上。
 10. 将鸟卵放在商用分度调节器中孵化，大约第 1-18 天时温度维持为 99.5°F，湿度为 80%。按照本领域所熟知及商用调节器所用的方法翻动卵。
 - 10 11. 到 19 天时，将卵转到商用的孵化器中，温度维持为 98.5°F，湿度为 80%，直到孵出雏鸡。
- 按照本发明的方法，对 43 个卵受精，10 天后，用常规的光源照射法检测哪些卵已成功受精。43 个中的 35 个卵已成功受精，其中 32 个被成功孵化成雏鸡，除一只外，其余都是健康的。因此，
- 15 用本发明的方法，所产的 43 个卵中，72% 能成功孵出存活雏鸡。

实施例 2

以下为来自商品化的产棕色卵的“Hy-Line Variety Brown”母鸡的数据：

- 20 1. 在早上 6:30 收集 270 个新产出的卵。
2. 将从雄性 Black Giant 收集到的精液，立即用稀释剂按 50:50 进行稀释。
3. 在精子收集后的 20 分钟内，将精子和卵送到实验室，进行实验。
4. 将卵分成两组，实验组和阴性对照组，每组 135 个。
- 25 5. 按照以前所述方法，用 10 μ l 的稀释精液注射实验用卵。
6. 阴性对照组不注射。
7. 如前所述，注射后的卵用聚硅酮密封剂密封，放入孵卵器孵化。
8. 5 天后检查生育力，并作记录。
9. 在实验组的 135 个卵中，有 35 个（24%）具有生育能力。对照
- 30 组中没有卵有发育的迹象。

实施例 3：单性生殖

1. 在早上收集 270 个新产的卵。
2. 卵被分成两组，实验组和阴性对照组，每组 135 个。
3. 通过卵壳和壳膜开一个 2-3 mm 的孔，以便能看见卵黄。
4. 轻轻的“刺”和 / 或穿透包围卵黄和胚盘的膜，注意不要破坏卵黄。(作为选择，可通过插入 25 号注射器针头穿透卵壳并进入卵黄，从而同时在卵壳上开口及穿透卵黄膜)。
5. 将处理过的卵用密封剂密封，并放入孵卵器孵化。
6. 在第 5 天时检查卵的发育情况，并在放回孵卵器前记录发育比例。
7. 允许卵继续发育，直到孵出雏鸟，记录好孵化比例和健康条件。

10

结果:

1. 将卵黄破坏的卵丢弃，剩下 131 个实验卵和 135 个阴性对照卵。
2. 5 天后检查发育情况，131 个卵中，有 7 个 (5%) 被刺穿的卵有明显胚胎发育的迹象。
- 15 3. 7 个胚胎发育的鸟卵中，有 5 个孵出了正常健康的雏鸟。
4. 阴性对照组中，没有胚胎发育的现象。

20

在整个应用中，参考了各种文献。这些文献的公开，以及本发明所引用的参考文献，都完整引入这项应用中，以便能更全面的描述有关本发明领域的现状。

25

本领域技术人员都知道，对本发明所作的任何修饰和改变都是允许的，只要不偏离本发明的范围和精神。本领域技术人员考虑在此公开的说明书和实施应明白本发明的其它具体实施方案。本发明所提供的说明和实施例仅是举例性的，本发明真正的范围和精神由权利要求指出。