

分类号 _____

UDC _____

单位代码 10733

甘肃农业大学

博士学位论文

牛卵母细胞及体外胚培养技术研究

Bovine Oocyte and Embryo in Vitro Culture

桑国俊

指导教师姓名 余四九 教授 (甘肃农业大学动物医学院 兰州 730070)

学科专业名称 临床兽医学 研究方向 动物胚胎工程

论文答辩日期 2008年6月19日 学位授予日期 2008年6月

答辩委员会主席 杨志强 研究员

评 阅 人 靳亚平 教授

王洪斌 教授

芮 荣 教授

2008年6月

Bovine Oocyte and Embryo *in Vitro* Culture

By

Sang Guojun

Supervisor: Prof. Yu Sijiu

A Dissertation

Submitted to Gansu Agricultural University

in Partial Fulfilment of the Requirements

for

The Degree of PhD

of Clinical Veterinary Medicine

Completed in May 2008

Commencement in June 2008

牛卵母细胞及体外胚培养技术研究

摘 要

牛胚胎体外生产技术包括卵母细胞体外成熟、体外受精、体外培养及冷冻保存等环节。本试验对牛卵母细胞及体外胚培养技术进行了研究,比较系统地掌握了牛卵母细胞的操作技术,为该技术的深入研究和应用铺垫了良好基础。

1、卵母细胞体外成熟技术

(1) COCs 级别对卵母细胞成熟的影响。选择 A、B、C 和 D 级 COCs 进行成熟培养。A 级成熟率为 63.81%, B 级为 47.81%, C 级为 2.01%, D 级为 0.00%, 各级成熟率之间差异显著 ($p < 0.01$), A、B 级远高于 C、D 级。C 级仅有个别发育成熟, D 级未见成熟。因此, A、B 级 COCs 是卵母细胞体外培养的主要资源,宜选择 A、B 级 COCs 进行成熟培养。

(2) 卵泡直径对卵母细胞成熟的影响。将卵泡分为 3 级:大卵泡($\varphi > 8\text{mm}$)、中卵泡($2\text{mm} \leq \varphi \leq 8\text{mm}$)和小卵泡($\varphi < 2\text{mm}$)。COCs 成熟率分别为大卵泡组 17.07%、中卵泡组 61.82%、小卵泡组 19.06%,中卵泡组显著高于大卵泡组和小卵泡组 ($p < 0.01$),大卵泡组和小卵泡组差异不显著 ($p > 0.05$)。卵母细胞的成熟率与采集 COCs 时的卵泡直径关系密切,在卵母细胞体外培养过程中,宜选择卵巢发育正常的卵泡采集,不宜选择发育过大或过小的边际卵泡。

2、牛卵母细胞体外受精技术

(1) 直接离心法对获能效果和卵母细胞受精率的影响。①二次离心沉淀液:对第一次离心的沉淀定容后继续离心后获得的沉淀进行活力、获能效果和受精率测定。洗涤精子最终活力为 0.44;获能效果以 10min 时最高,为 0.41,15min 时为 0.32,超活化以 15min 时最好;受精率为 40.19%。②二次离心上清液:对第一次离心的上清液定容后继续离心后获得的沉淀进行测定。洗涤精子最终活力为 0.56;获能效果以 10min 时最高,为 0.59,15min 时较低,为 0.585,超活化也以 15min 时最好;受精率为 43.21%。二次离心上清液的各项指标显著高于沉淀液 ($p < 0.01$)。从试验结果看,宜选用上清液 15min 组的获能精子进行体外受精。本试验突破了精子离心法的传统方法,避开了单纯利用沉淀液进行精子获能的思路,而直接对上清液进行离心处理,获得了理想的精子洗涤和获能效果。

(2) 不同温度对精子获能和卵母细胞受精的影响。将精子分别在 20~24℃ 室温和 38.5℃ 恒温 (CO₂ 培养箱) 上浮 60min、获能 10~20min。①室温上浮法: 超净工作台上上浮 60min, 精子活力以 45min 时最高, 达到 0.68; 对上浮 45min 的精子获能 15min 后进行体外受精, 平均受精率 41.40%。②恒温上浮法: CO₂ 培养箱上浮 60min, 精子活力 30min 时最高, 达到 0.697; 对上浮 30min 的精子获能 15min 后进行体外受精, 平均受精率 41.51%。精子获能后的超活化现象与室温法一致。二种不同上浮方法的精子活力和受精率之间差异不显著 ($p>0.05$), 恒温上浮法的效果略高于室温组。从可控角度考虑, 还以恒温上浮法为宜。

(3) 精子浓度与受精的关系。使用不同浓度 (低 1.0×10^6 、中 1.5×10^6 和高 3.0×10^6 个/ml) 精子与卵子共同孵育。中浓度组平均受精率为 47.34%, 显著高于低浓度组的 42.38% ($p<0.05$) 和高浓度组的 33.96% ($p<0.01$); 低浓度组的平均受精率显著高于高浓度组平均受精率 ($p<0.01$)。本试验表明精子适宜浓度宜控制在 $(1.0\sim 1.5)\times 10^6$ 个/ml。

3、牛体外受精胚胎培养技术

(1) 卵丘细胞、卵丘细胞+bFF 共培养系统对胚胎发育的影响。卵丘细胞组、卵丘细胞+bFF 组和对照组的桑椹胚率分别为 29.07%、34.99%和 26.67%; 囊胚率分别为 8.51%、10.63%和 7.24%。卵丘细胞+bFF 组的桑囊率显著高于卵丘细胞组和对照组 ($p<0.01$)。本试验通过添加卵丘细胞、卵丘细胞+bFF 共培养物质, 较好地克服了 2C 发育阻滞。

(2) 培养液体积对胚胎发育的影响。分别用 50 μ l 和 500 μ l 培养液培养胚胎。50 μ l 液滴的桑椹胚率为 33.14%, 囊胚率为 9.07%, 500 μ l 液滴依次为 36.23%和 10.23%。大体积培养比微滴培养有优势, 桑椹胚和囊胚率均较高 ($p<0.01$)。本项试验中 500 μ l 的效果好于 50 μ l。

4、卵母细胞冷冻保存技术及解冻培养

(1) 程序化一步法冷冻时 10%GL 和 10%EG 对 COCs 冷冻效果的影响。COCs 在液氮保存 1 周后解冻成熟培养。EG 组成熟率为 34.46%, 桑椹胚率为 11.18%, 囊胚率为 4.18%; GL 依次为 33.44%、10.56%和 3.86%。EG 组的成熟率比 GL 组高 3.05% ($p>0.05$), 桑椹胚率高 5.87% ($p>0.05$), 囊胚率高 8.29% ($p>0.05$)。冷冻保护剂 GL 和 EG 均可用于 COCs 的冷冻保存, 但 EG 的效果比较好。

(2) 玻璃化冷冻时麦管和 OPS 管对 COCs 冷冻效果的影响。以麦管和 OPS 管作为冷冻载体, 二步法玻璃化冷冻 COCs。对冷冻 1 周后的 COCs 解冻培养, 麦管法成熟率为 29.84%, 桑椹胚率为 9.34%, 囊胚率为 3.47%; OPS 法依次为 31.89%、9.66%和 3.80%。OPS 法的成熟率比麦管法高 6.87% ($p>0.05$), 桑椹胚率高 3.43% ($p>0.05$), 囊胚率高 9.51% ($p>0.05$)。OPS 管玻璃化冷冻的效果优于麦管法, 但无统计差异, 而麦管法宜于操作和储存, 宜在实际操作中选用麦管法。

(3) COCs 冷冻方法的比较。COCs 的 4 种处理方法在成熟培养、桑椹胚发育和囊胚发育方面的趋势基本一致, 整体效果的优势序列为 EG 法>GL 法>OPS 管法>麦管法。玻璃化冷冻效果低于程序化一步法冷冻法。由于玻璃化冷冻的解冻处理程序复杂, 建议实际应用时选用麦管程序化一步法冷冻法。

5、小结

通过牛卵母细胞体外培养技术试验的实施, 比较系统地掌握了牛卵母细胞成熟培养、精子获能、体外受精和体外培养的技术环节和操作流程, 利用共培养系统突破了 2C 发育阻滞, 在精子获能方面建立了新的洗涤和获能方法。本研究的技术指标在同类研究中属于较高水平, 在将后研究将进一步探索和提高。

关键词: COCs; 体外成熟; 精子获能; 体外受精; 体外培养; 程序化一步法冷冻; 玻璃化冷冻

Bovine Oocyte and Embryo *in Vitro* Culture

Summary

It is the development that the bovine oocyte can be researched to produce embryos *in vitro* for studying and demonstration. Bovine embryo production includes oocyte *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture etc. The article had reported how to carry out the process of oocyte *in vitro* and had got more dates and materials for the future studies.

1 Bovine Oocyte *in Vitro* Maturation

The Effect of *in Vitro* Maturation with Oocyte Grade

There were four COCs grade in the study. The matured oocyte rate were 63.81% for grade A, 47.81% for grade B, 2.01% for grade C and 0.00% for grade D. The difference among four grades were very significantly ($p < 0.01$) each other. Grade A and B of COCs were significantly higher than grade C and D. The grade A and B of COCs would be chose to mature in following system.

The Effect of *in Vitro* Maturation with Different Diameter Follicles

There were three kind of follicles: big follicles ($\varphi > 8\text{mm}$), middle follicles ($2\text{mm} \leq \varphi \leq 8\text{mm}$) and small follicles ($\varphi < 2\text{mm}$). The matured oocyte rate for different diameter follicles were 17.07% for big's, 61.82% for middle's and 19.06% for small's. The middle's was significantly higher than big's and small's ($p < 0.01$). There were not significant difference between big's and small's ($p > 0.05$). It had showed that the follicular diameter was very important for *in vitro* maturation of COCs. The best choice was to collect middle diameter follicles to do.

2 Bovine Oocyte *in Vitro* Fertilization

The Effect of Sperm Capacitation and Oocyte Fertilization Rate by Direct Centrifuge to Select Sperm.

Result for second centrifugal sperm for the deposit-liquid which was first centrifuged.

After the second sperm centrifuged and capacitated, the sperm washed activation

was 0.44, the high sperm capacitation was 0.41 at 10min and 0.32 at 15min, the super activation showed at 15min, and the fertilization rate of oocyte was 40.19%.

Result for second centrifugal sperm for the up-liquid which was first centrifuged.

After the second sperm centrifuged and capacitated, the sperm washed activation was 0.56, the high sperm capacitation was 0.59 at 10min and 0.585 at 15min, the super activation showed at 15min, and the fertilization rate of oocyte was 43.21%.

It were made know that the sperm activation, super activation and oocyte fertilization rate of up-liquid of second centrifuged were significantly higher than the deposit-liquid of second centrifuge's ($p < 0.01$). The up-liquid's were also observed that had clear field of microscope, had good diaphaneity, had not eyeable cryoprotectant and diluent, had few died and abnormal sperms. The deposit-liquid's were observed that had not clear field of microscope, had not clear diaphaneity, had much eyeable cryoprotectant and diluent, had many died and abnormal sperms. It is a new method to wash and capacitate sperm with two step by centrifugating for the first up-liquid.

The Effect of Sperm Capacitation and Oocyte Fertilization Rate under the Different Temperature by Swimming-up

Swimming-up in room temperature ($20 \sim 24^{\circ}\text{C}$). The thawing frozen sperm had been swum up 60min on the super clear desk in room temperature. It was indicated that the best sperm activation was 0.68 at 45min, the best sperm super capacitation was at 15min after treatment, and the fertilization rate was 41.40%.

Swimming-up in constant temperature (38.5°C). The thawing frozen sperm had been swum up 60min in CO_2 incubator in constant temperature at 38.5°C . It was indicated that the best sperm activation was 0.697 at 30 min, the best sperm super capacitation was at 15min after treatment, and the fertilization rate was 41.51%.

The sperm activation and fertilization rate were not significantly difference between the two treatment. But the constant temperature group was better than the room temperature group. It was knew that the room temperature was not very stability and always changing along with the environment temperature. And the sperm

activation and capacitation was also instability. Swimming-up in constant temperature would be the best way to select sperm because it was easy to control and stability for the sperm activation and capacitation.

The Sperm Concentration for Oocyte Fertilization Rate

The study was conducted to optimize the fertilization condition. Sperm concentration had great effect on the oocyte fertilization rate. It were showed that the oocyte fertilization rate of middle sperm concentration group ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$, 47.34%) was significantly higher than the high sperm concentration group ($3.0 \times 10^6/\text{ml}$, 33.96%) and low sperm concentration group ($1.0 \times 10^6/\text{ml}$, 42.38%) ($p < 0.01$). And the low group's was significantly higher than the high group's ($p < 0.01$). The sperm concentration would be applied at $(1.0 \sim 1.5) \times 10^6/\text{ml}$ and had less abnormal sperm and increased the fertilization rate.

3 Bovine Oocyte *in Vitro* Culture

***In Vitro* Culture with Co-culture System**

There were 3 co-culture system groups in the experiment. All of them were cumulus, cumulus+bFF and control group. The morula rate of its were 29.07%、34.99% and 26.67% and the blastocyst rate of its were 8.51%、10.63% and 7.24%. The morula and blastocyst rate of cumulus+bFF group were significantly higher than the cumulus and control group ($p < 0.01$). There was 2-cell block in the field for oocyte embryo development. Co-culture with cumulus+bFF played a important role for embryo development to blastocyst and had overcome the 2-cell block.

Oocyte Embryos Development with Medium Volume

It were treated that matured oocyte were cultured with $50\mu\text{l}$ and/or $500\mu\text{l}$ medium volume in 4-hole culture plate. The morula and blastocyst rate of $50\mu\text{l}$ medium were 33.14% and 9.07%. The morula and blastocyst rate of $500\mu\text{l}$ medium volume were 36.23% and 10.23%. The two rates of $500\mu\text{l}$ medium volume were significantly higher than the $50\mu\text{l}$ medium's ($p < 0.01$). It was reported that the small medium volume would not maintain the minienvironment verywell because it was easy to change, but the large medium volume as $500\mu\text{l}$ would maintain the

minienvironment well and had had embryo development.

4 Freezing of COCs

Oocyte been Frozen with 10%GL and 10%EG of Cryoprotectant by One-way Process

High grade COCs was frozen and stored following the designed process and thawed one week late. The maturation and morula and blastocyst rate of 10%EG group were 34.46%, 11.18% and 4.18%, and 10%GL group's were 33.44%、10.56% and 3.86%.The difference of all between the two groups was not significantly ($p > 0.05$).The trial had evidenced 10%GL and 10%EG of cryoprotectant adapted to freeze and store COCs and had the same function.

Oocyte been Frozen for Carrier by Vitrification

High grade COCs was also frozen and stored following the designed process and thawed one week late. The maturation and morula and blastocyst rate of wheat straw group were 29.84%, 9.34% and 3.47%, and OPS group's were 31.89%, 9.66% and 3.80%. The difference of all between the two groups was not significantly ($p > 0.05$). The results had showed that wheat straw and OPS of carrier adapted to freeze and store COCs, and had the same function.

Comparing with the Frozen Ways

According to above experiments of COCs frozen, the effect of one-way process was better than the vitrification process. The predominance sequence of frozen effect could express as follow as 10%EG group > 10% GL group > OPS group > wheat straw group.

5 Brief Summary.

It was carried out that the bovine oocyte *in vitro* production and freezing were studied. Through this series experiments it had been learned and applied how to mature oocyte in vitro, to capacitate sperm, to fertilize oocyte in vitro, to freeze oocyte by one-way or vitrification process, and to culture thawing oocyte been frozen. The 2-cell block had been overcome by co-culture system with cumulus or cumulus+bFF. One new centrifugal method for sperm capacitation had been tested

and applied in this research and got better than before.

Key Words: Bovine COCs, IVM, IVF, IVC, Blastocyst, One-way Frozen Process, Vitrification Frozen Process

缩略词表

List of Abbreviations

AFP	Antifreezing Protein	抗冻蛋白
AR	Acrosome Reaction	顶体反应
bFF	Bovine Follicular Fluid	牛卵泡液
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
COCs	Cumulus-Oocyte Complexes	卵丘卵母细胞复合体
CSF	Cytostatic Factor	细胞静止因子
DMSO	Dimethylsulphoxide	二甲基亚砷
Dextran		葡聚糖
EG	Ethylene Glycol	乙二醇
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
Ficoll PM400		聚蔗糖
17 β -E ₂	17 β -Estradiol	17 β -雌二醇
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FSH	Follicle-Stimulating Hormone	促卵泡素
GAG	Glycosaminoglycans	氨基多糖
GH	Growth Hormone	生长激素
GL	Glycerol	甘油
GV	Germinal Vesicle	生发泡
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown	生发泡破裂
HIS	High Tonic Strength	高离子强度液
IA	Ionophore A	Ca ²⁺ 载体
IVC	<i>In Vitro</i> Culture	体外培养
IVF	<i>In Vitro</i> Fertilization	体外受精
IVM	<i>In Vitro</i> Maturation	体外成熟
IVP	<i>In Vitro</i> Production	体外生产
LH	Luteinizing Hormone	促黄体素
MPF	Maturation Promoting Factor	成熟促进因子
OMI	Oocyte Meiosis Inhibitor	卵母细胞减数分裂抑制因子
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor	卵母细胞成熟抑制因子
OP	Osmotic Pressure	渗透压
OPS	Open Pulled Straw	开放式细管
PAF	Platelet Activating Factor	血小板激活因子
PB ₁	Polar Body	第一极体
PROH	1, 2-Propanediol	丙二醇
SC	Sperm Capacitation	精子获能
TCM199	Medium 199	199 培养基

目 录

中文摘要	I
英文摘要	V
缩略词表	IX
第一章 卵母细胞体外胚生产的原理与研究进展	1
1 卵母细胞体外成熟的原理和研究进展	1
2 卵母细胞体外受精与精子体外获能	16
3 早期胚胎体外培养的生物学原理与研究进展	33
4 小结与展望	50
第二章 卵母细胞低温保存研究进展	52
1 卵母细胞冷冻保存意义及其发展状况	53
2 卵母细胞低温冷冻保存的基本原理	54
3 卵母细胞在低温冷冻保存过程中的受损机制	57
4 冷冻方法	59
5 冷冻保护剂	62
6 解冻及脱除冷冻保护剂的方法	66
7 冷冻对卵母细胞造成的影响	68
8 影响卵母细胞冷冻效果的因素	70
9 展望	72
第三章 牛卵母细胞体外成熟技术研究	73
1 试验材料与方法	73
2 试验结果	77
3 分析讨论	79
4 小结	81
第四章 牛卵母细胞体外受精技术研究	82
1 试验材料与方法	82
2 试验结果	87
3 分析讨论	93
4 小结	95

第五章 牛体外受精胚胎培养技术研究-----	96
1 试验材料与方法-----	96
2 试验结果-----	100
3 分析讨论-----	104
4 小结-----	106
第六章 牛卵母细胞冷冻试验研究-----	107
1 试验材料与方法-----	107
2 试验结果-----	114
3 分析讨论-----	118
4 小结-----	122
参考文献-----	123
致谢-----	150
作者简介-----	151
在读期间发表的主要论文-----	151
导师简介-----	152
独创性声明-----	153

第一章 卵母细胞体外胚生产的原理与研究进展

随着哺乳动物胚胎工程技术的深入研究和商业性胚胎移植技术的迅猛发展，胚胎的需求量日益增加，单纯依靠超数排卵获得体内胚胎的方法成本高、采胚数量有限，不能满足科学研究和生产的需要。胚胎体外生产体系的建立将成为胚胎生产的主要突破点。因此，深入研究卵母细胞体外生产胚胎及其冷冻保存的技术机理，建立一整套完全在体外培养条件下快速生产和保存胚胎的技术体系，挖掘优良母畜的繁殖潜力，为胚胎工程前沿研究和加速家畜繁育进程提供优质胚胎，并为拯救濒危动物和开发利用珍稀动物提供技术保障，具有巨大的科研价值与现实意义。

牛胚胎体外生产(IVP)技术是指采用活体采卵 (OPU)、卵母细胞的体外成熟(IVM)、精子的体外获能、卵母细胞的体外受精(IVF)、受精卵的体外培养(IVC)、体外受精胚胎的冷冻保存(ECC)、体细胞核移植 (NT) 和转基因动物生产等完成胚胎生产的一系列重要技术。

胚胎体外生产(In Vitro Production, IVP)的三大技术环节是卵母细胞体外成熟(In Vitro Maturation, IVM)、体外受精(In Vitro Fertilization, IVF)和胚胎培养(In Vitro Culture, IVC)。它不仅为家畜胚胎生物工程进行细胞核移植、胚胎早期性别鉴定、转基因等前沿技术研究提供丰富而廉价的胚胎实验材料，同时也是研究配子细胞发生、受精机制、胚胎发育规律的有效手段，随着研究手段和研究技术不断提高，胚胎在体外全程工厂化生产将成为可能。

1 卵母细胞体外成熟的原理和研究进展

1.1 卵母细胞的形成及其生长发育

胚胎发育时期，原始生殖细胞 (PGCs) 从内胚层迁移至生殖嵴，多次减数分裂后，形成大量的原始卵泡。在发育到成熟排卵的过程中，大多数卵泡闭锁或退化。哺乳动物出生前在卵巢白膜之下就形成大量原始卵母细胞，小鼠约 1 万个，人约 30~40 万个，家畜约为几百万个，构成原始卵泡库。

动物出生前后，卵原细胞停止增殖，进入第一次减数分裂前期，发育成初级卵母细胞，然后经细线期、偶线期、粗线期发育到双线期。在双线期的后期染色质疏松，外被核膜，称为核网期，此时的细胞核又称生发泡(GV)，大部分动物性成熟前初级卵母细胞一直维持在GV期^[1]。

性成熟后，卵巢中卵母细胞的数量大大减少，小鼠约0.5万个，人约4万个，牛羊为10~20万个，猪为40多万个^[2-3]；每次发情周期，卵巢中约有500~1000个初级卵母细胞在促性腺激素或其他因子的作用下恢复减数分裂，发生生发泡破裂(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)，排出第一极体，并发育到第二次减数分裂中期(MII)，成为成熟卵母细胞，成熟卵母细胞由极少数优势卵泡发育而成，在卵泡发育过程中绝大部分卵泡闭锁退化^[4]，到排卵时只有一个、几个或十几个(猪和犬等)。牛经过自然发情排卵仅有数十枚成熟卵母细胞排卵、受精，一生只能获取10个左右的后代。可见哺乳动物卵巢卵母细胞蕴藏着很大的开发潜力。

采用卵母细胞体外成熟技术，开发利用未成熟卵泡，成倍增加母畜遗传资源的利用效率，也为其它胚胎工程技术研究和体外生产胚胎提供充足的卵母细胞。卵母细胞来源主要有两种途径：活体采卵和屠宰场卵巢采卵。

1.2 卵母细胞体外成熟的特征

卵母细胞的体外成熟(IVM)是涉及细胞核、细胞质、透明带和卵丘细胞成熟的一个复杂的生理过程，卵母细胞体外成熟就是未成熟卵子，经过体外培养，使卵母细胞获得能够正常受精的过程和进一步发育的能力。卵母细胞成熟主要包括卵母细胞胞质成熟和核成熟，也包括卵丘细胞的扩展和透明带成熟等。在形态学方面表现为纺锤体形成，核仁致密化，染色质高度浓缩成染色体，第一极体释放，细胞器重组，卵丘细胞扩展、膨胀和透明带软化等一系列生理变化。卵母细胞成熟包括生化、形态、功能等一系列变化：①核膜溶解，生发泡破裂(GVBD)；②染色质致密化及明显的染色体形成；③第一次减数分裂纺锤体形成；④纺锤体迁移到细胞膜；⑤第一极体的形成和排放；⑥第二次减数分裂出现；⑦停留在第二次分裂中期。

卵母细胞的核成熟一般早于胞质成熟。一些研究结果表明，核成熟和胞质成熟存在着明显的时间差，细胞核成熟所需时间短于细胞质成熟时间。细胞质成熟

与细胞核成熟的关系十分密切，细胞核的成熟进程影响细胞质的成熟，同时，细胞质的成熟又对细胞核成熟产生促进作用，二者通过信号传导相互作用，协调一致，共同完成受精前的准备过程，直接影响受精率及早期胚胎发育率。

1.2.1 卵母细胞核成熟

未成熟的卵母细胞核在细胞中央，在成熟过程中，逐渐迁移至一侧胞膜下，核膨大形成生发泡。生发泡破裂后，排放第一极体，此时细胞处于第二次减数分裂中期（MII），标志着卵母细胞核已经成熟。卵母细胞的核成熟以第一极体排出为标志，具体表现为卵母细胞的细胞核经过第一次减数分裂的浓缩期、中期、后期、末期和第二次减数分裂的间期而达到中期(MII)，在光镜下可以明显看到生发泡破裂和第一极体排出。MII 期卵母细胞可用来体外受精或孤雌激活。第一极体排出能力与卵母细胞直径大小有关，小于 110 μm 的牛卵母细胞，细胞胞质内 mRNA 转录活跃，减数分裂能力降低^[4]。

1.2.2 卵母细胞胞质成熟

卵母细胞胞质成熟是胚胎发育潜力的标志。卵母细胞的胞质成熟不仅有细胞器超微结构的改变，而且伴随着细胞质内部的生理生化变化。在电镜下观察，线粒体由近核区移向质膜下区，在一端出现大空泡，即帽状线粒体，这是卵母细胞胞质成熟的一个重要标志。卵母细胞在成熟过程中，RNAs 合成旺盛，蛋白质等聚集，为早期胚胎发育提供足够的物质。在生发泡破裂前后蛋白质的合成尤其明显。在卵母细胞成熟后期，高尔基体分泌大量皮质颗粒，并且逐步迁移至质膜下，线粒体数量增加，也不断地向卵母细胞皮质部迁移，且成群集状分布。核糖体、内质网、营养性包涵物的数量都在增加；裂隙连接也增加，通过微绒毛连接与外周卵丘细胞的联系，分泌卵丘扩张因子；卵丘细胞促进卵母细胞的进一步成熟。在卵母细胞成熟培养中，要选取外周至少 3 层卵丘细胞紧密包裹，胞质无斑块者的卵母细胞培养。此时处于生发泡阶段的卵母细胞内的皮质颗粒在胞质成团分布，尚未形成单层排列于质膜下。如果卵丘细胞少，胞质有斑块，或者无卵丘细胞形成裸卵（Nude Egg），都不利于其成熟和受精。即使核成熟（排放第一极体），

其发育潜力也有限。胞质的成熟可以用皮质颗粒(CG)细胞内的谷胱甘肽(GSH)的浓度来判断。CG位于卵母细胞皮质下则为胞质成熟,位于中部或正由中部向边缘迁移则为胞质未成熟。GSH是胞质成熟的标志之一,其在核和线粒体周围有较高浓度,可保护DNA免受氧自由基的损害。

在胞质成熟过程中,卵丘细胞对卵母细胞起着重要作用,卵丘细胞群完整度、紧密度直接影响卵母细胞体外成熟的效果,卵丘细胞扩展也是卵母细胞成熟的标志之一。相关研究表明,卵丘细胞可以启动卵母细胞内蛋白质的合成,而大量的蛋白质合成可以激活成熟促进因子(MPF),从而促进卵母细胞自身的成熟,因此,选用卵丘细胞较多的卵母细胞进行培养,可明显提高成熟率和后期发育能力。有许多学者认为,卵母细胞在体外成熟培养过程中细胞质的不完全成熟是造成卵母细胞退化和成体外受精胚胎生产效率低的主要原因。

透明带软化也是卵母细胞成熟的标志。透明带是一层糖蛋白膜,受精时可以结合并诱导精子发生顶体反应,并阻止多精受精。在卵母细胞成熟时,透明带上的精子受体(ZP₁, ZP₂, ZP₃)发生重排,同时透明带结构变软。

1.3 卵母细胞的成熟机理

卵母细胞成熟过程中,形态上表现为GVBD,第一极体排放。目前对参与GVBD的机制和应答排卵前促性腺激素峰而启动卵母细胞进入MII期的信号途径尚不完全清楚。在培养液中添加高浓度的cAMP和次黄嘌呤会抑制卵母细胞GVBD,而添加适当浓度的促性腺激素可诱导GVBD。由于卵母细胞和卵丘细胞通过裂隙连接,诸多蛋白因子通过调节卵丘细胞控制GVBD。调节因子类固醇, Ca²⁺、肌醇、cAMP和嘌呤等通过裂隙连接可以自由的在卵母细胞和卵丘细胞间流动,该信号交流受到促性腺激素的调节。同样促性腺激素对GVBD的诱导也受IP₃/Ca²⁺通路影响,研究表明Ca²⁺瞬间波动对GVBD尤为重要^[5]。卵母细胞GVBD需要蛋白质的合成,抑制卵母细胞中蛋白质合成将不能激活成熟促进因子(Maturation Promoting Factor, MPF)^[6]。目前认为MPF是最重要的调节减数分裂细胞周期进程的因子,它由催化亚基p34cdc2和调节亚基cyclinB组成^[7]。在细胞周期中,p34cdc2通过磷酸化和去磷酸化作用或与cyclinB结合调节MPF活性。在GV期MPF活性相对较低,随后逐渐升高,第一次减数分裂中期(MI)

时到达第一次顶峰，活性维持一段时间后，下降并在 MII 时再次达到顶峰，最后随着 MII 静止过程结束后 MPF 活性下降^[8]。另外 MPF 还参与了卵母细胞减数分裂过程中核膜的破裂^[9]。CSF 的一个主要功能成分是由 C-mos 原癌基因编码的 mos 蛋白，它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，主要在卵母细胞中表达。在减数分裂中期 mos 能与微管蛋白形成复合体以调节纺锤体和染色体的形态、排列和功能^[10]。MAPK 又名细胞外调节激酶，调节卵母细胞减数静止中枢。在卵母细胞进入第一次减数分裂时 MAPK 活性升高，并在整个成熟期和 MII 期静止过程中保持高水平，MAPK 活性下降同步于受精原核的形成。MAPK 对纺锤体的形成也非常重要。而丝氨酸-苏氨酸蛋白酶抑制因子-6 双甲基氨基嘌呤（DMAP）通过阻断 P34cdc2 的去磷酸化干扰 GVBD 和细胞周期，但却不影响蛋白合成。研究发现，培养液中 DMAP 能够可逆性地阻断 GVBD^[11]。因此，DMAP 可能与卵母细胞成熟的同步和一致性有关。

卵母细胞胞质成熟是受精和早期胚胎发育所需，卵母细胞生长发育过程的代谢特征是大量基因持续表达直到胚胎基因组具有转录活性开始调节胚胎发育^[12]。促性腺激素刺激卵丘细胞分泌各种物质。这些物质不仅控制核成熟而且在细胞质的成熟过程中起重要作用。排卵前卵泡中存在大量的甾体激素，而且卵母细胞内也有 E₂（雌激素）受体存在^[13]。E₂ 特异性的与 E₂ 受体（ER）结合发挥作用。E₂ 可能参与了卵母细胞胞质成熟。研究表明，细胞质成熟过程中 E₂ 可能通过改变 Ca²⁺释放系统作用于卵母细胞的表面，促进卵母细胞膜的成熟。卵母细胞应答 E₂ 并且释放 Ca²⁺的能力是成熟过程中必须的一步。因为排卵前卵泡液中含有一定浓度的孕酮（P₄），所以细胞质成熟的信号转导可能需要特殊的卵泡内孕酮环境。孕酮可能也间接或直接地参与卵母细胞 Ca²⁺释放系统的生成。在卵巢中，FSH 和卵丘细胞上的 G 蛋白家族受体结合，通过 cAMP 依赖蛋白激酶途径诱导芳香化酶系统催化雄激素向 E₂ 的转变，使得卵丘细胞产生 E₂，随后 E₂ 和 FSH 协同作用进一步增强芳香化酶的活性。FSH 与 E₂ 协同效应要强于 FSH 单个效应的 5~10 倍，而 E₂ 单独作用是无效的。卵母细胞的成熟依赖于一个特定时段的特殊基因表达，具有阶段性特异合成蛋白质的特征。卵母细胞的成熟过程受到卵母细胞蛋白质合成/降解、磷酸化和去磷酸化作用的调节，从而达到核质同步成熟^[14]。

卵母细胞从第一次减数分裂的前期开始，一直持续到第二次减数分裂的中

期,有三个最为显著的活性因子和第二信使 cAMP 贯穿了整个成熟过程,这三个活性因子是:卵母细胞成熟促进因子(Maturation Promoting Factor, MPF)、细胞静止因子(Cytostatic Factor, CSF)和卵母细胞成熟抑制因子(Oocyte Maturation Inhibitor, OMI),第二信使 cAMP 是 3, 5-环磷酸腺苷,也称环腺苷酸。

MPF 直接催化一些与细胞分裂有关的蛋白质磷酸化,促使细胞由间期向 M 期转化;CSF 促进和维持 MPF 活性,使细胞维系在 M 期;OMI 抑制卵母细胞成熟分裂。由此可见,MPF 是卵母细胞减数分裂的主要调控因子,CSF 是 MPF 活性上游正调控因子,OMI 是负调控因子。MPF, CSF 与 OMI 对卵母细胞成熟的正负调节作用共同调控着卵母细胞减数分裂的正常进行。

1.3.1 MPF 的作用

MPF 是一种蛋白激酶,由一个催化亚基 P34cdc2(Cyclin-dependent kinase I, Cdk 1)和一个调节亚基 cyclin B 组成,P34cdc2 是周期蛋白依赖激酶(Cdks)家族中的一种磷酸激酶,cyclin B 是一种细胞周期蛋白;MPF 是所有真核生物通用的一个 M 期调节因子,MPF 在 M 期可以磷酸化一系列底物,引起生发泡破裂,染色体凝聚,细胞骨架崩解等^[75]。

自卵巢表面卵泡中抽取的卵母细胞,大部分处于生发泡期(GV 期),即处于细胞周期的 G2/M 转变的边缘,此时卵母细胞内的 MPF 水平很低;在 MI 期之前的一段时间内 MPF 的活性出现,随后 MPF 水平迅速上升,在 MI 期达到高峰,激活蛋白质合成,产生更多的 MPF,引起中期染色体随纺锤体的牵引排列在赤道板上。此后,MI 期向后期 I 转变,MPF 活性降低,但并没有降到前期(GV 期)时的最低水平,而是保持在至少最高水平的 25%左右;MPF 的下降导致染色体分向两极,卵母细胞排出第一极体,此时染色体仍处于凝集状态,核膜亦未出现。第一极体排出后,MPF 的水平逐渐升高,进入 MII 期时 MPF 达到第二次高峰^[75]。

1.3.2 CSF 的作用

动物出生前后,卵原细胞进入第一次减数分裂前期,发育成初级卵母细胞,大部分动物性成熟前初级卵母细胞一直维持在 GV 期;性成熟后初级卵母细胞恢

复减数分裂，生发泡破裂(GVBD)，排出第一极体，并发育到第二次减数分裂中期(MII)，成为一个成熟卵母细胞，并且停止在这一时期，直到遇到精子或其它刺激因素作用后，才能完成第二次减数分裂，并开始卵裂。如果没有这些因素的刺激，卵母细胞将维持在 MII 期，并最终退化。

成熟卵母细胞之所以能维持在 MII 期，是因为卵母细胞胞质中存在一种细胞静止因子(CSF)，CSF 能够通过维持 cyclin B2 合成与降解的动态平衡使 MPF 保持最高水平，从而使卵母细胞保持在第二次分裂中期。有关实验表明 CSF 对 Ca^{2+} 敏感，在精子和其它刺激下， Ca^{2+} 浓度发生变化，CSF 活性降低或消失，cyclin 蛋白合成被抑制，MPF 和 P34cdc2 激酶活性降低或消失，卵母细胞被活化，开始第二次减数分裂，排出第二极体。可见 CSF 对 MPF 活性有稳定作用^[1, 75]。

1.3.3 OMI 的作用

OMI(卵母细胞成熟抑制因子)是由卵丘细胞合成后分泌到卵泡液的一段多肽，分子量约为 1~2kDa，许多哺乳动物卵巢的卵泡液中都有 OMI 存在，因而没有种属特异性。Tsafiriri 等(1982)认为 OMI 能够维持卵母细胞停止在第一次减数分裂前期的双线期，并且在卵母细胞体外培养中可以阻止自发的减数分裂^[76]。

OMI 对卵母细胞减数分裂的抑制作用可能是通过卵丘细胞完成的，Geshi 等(1999)研究资料表明 OMI 分子在卵丘细胞协同下可以自由通过卵丘细胞和卵母细胞之间的缝隙连接，抑制 COCs 的成熟，但对于完全裸卵不能产生抑制作用^[77]。

1.3.4 cAMP 的作用

细胞外信号与相应受体结合，通过调节细胞内第二信使 cAMP 的水平而引起细胞反应，激素对细胞内 cAMP 水平的调节是真核细胞中激素作用的主要机制之一，多种细胞表面的激素通过 cAMP 行使其调控功能。

cAMP 的主要作用之一是维持卵母细胞成熟分裂的静止状态，Aberdam 和 Schuliz 研究指出无论在体内还是体外卵母细胞内 cAMP 的浓度显著下降恰好发生在卵母细胞生发泡破裂之前，在培养液中添加 cAMP 刺激剂或 cAMP 类似物能抑制卵母细胞的体外自发成熟^[78]，但也有学者认为卵泡细胞中 cAMP 浓度的

暂时性升高与促性腺激素诱发的卵母细胞成熟分裂的恢复有关。

很多研究表明，在培养液中添加 cAMP 类似物，无论 cAMP 作用时间长短，卵母细胞的卵裂率和囊胚形成率均随着培养时间的延长而降低，究其原因可能是这些物质仅能部分或暂时地抑制卵母细胞的核成熟，而不能完全将卵母细胞的核维持在生发泡阶段。

1.4 影响卵母细胞体外成熟的因素

1.4.1 动物品种和年龄

不同品种的卵母细胞体外成熟所需时间、温度、培养液不同，卵母细胞成熟率也存在明显差异。同一品种在不同年龄阶段卵母细胞体外成熟的能力也有差异。相关研究表明，体外成熟的小牛卵母细胞体外受精后发育潜力低于成年牛的卵母细胞^[15]。

1.4.2 卵巢采集、运输时间与保存温度

卵母细胞成熟潜力与卵巢运输条件和季节有很大关系。一般观点为繁殖季节要优于非繁殖季节。报道非繁殖季节的山羊卵巢可获得更多的可用卵母细胞^[16]。卵巢黄体会影响到卵母细胞的数量成熟，但对成熟后受精和卵裂率没有影响^[17]。卵巢运输时温度、时间和保存方法对卵母细胞的利用率也有很大的影响。运输时间越短越好，适宜的温度范围是 25~37℃^[18-20]，牛卵巢在 25℃左右为宜。低于 20℃时，卵母细胞发生冷休克，卵母细胞成熟率显著降低。卵巢运输时间越短越好，一般为 4h 之内必须运回实验室进行处理，最晚不超过 6h；离体卵巢运输时间过长，卵母细胞因代谢障碍降低活力^[21]。

1.4.3 卵泡的大小与形态

卵泡直径也与卵母细胞的成熟相关。直径为 2~6mm 的卵泡为体外培养最佳卵泡，小于 2mm 卵泡发育能力很低，卵泡卵母细胞的减数分裂能力和胞质成熟能力差^[22]；直径大于 6mm 的卵母细胞其卵裂率及囊胚发育率显著高于直径 2~

6mm 小卵泡卵^[23]。Pavlok 实验证实, 2~8mm 之间卵泡卵母细胞有相似的卵裂率及囊胚发育率, 而小于 2mm 卵泡卵几乎完全缺乏发育至囊胚的能力, 所以选择牛卵巢 2~8mm 卵泡采卵为宜。但是如果选择大卵泡, 由于卵泡液中含有大量浑浊物, 不利于检卵, 而且采出的卵泡液浓度过大有凝固趋向。在卵泡形态上, 要注意选择淡黄色的透亮卵泡, 发红发紫有充血的症状, 一般不予选用。在实验室采卵过程中, 要无菌操作, 操作台要恒温, 保持 37℃, 1h 内完成采集为好。

1.4.4 卵母细胞的级别

根据卵丘细胞形态及其与卵母细胞结合的紧密程度可分为以下几个级别。

A 级: 由 5 层以上致密卵丘细胞包被的卵母细胞;

B 级: 由 2~4 层卵丘细胞基本包被的卵母细胞;

C 级: 卵丘细胞松散或不完全包被的卵母细胞;

D 级: 仅有少量卵丘细胞存在或裸露的卵母细胞;

E 级: 卵丘细胞已经完全扩展呈蜘蛛网状, 卵母细胞胞质不均一, 处于退化状态的卵母细胞。

不同级别的卵母细胞体外成熟率、受精率差异很大, 现在一般选用 A, B 类卵母细胞做体外培养。

1.4.5 卵母细胞体外培养条件

(1) 培养温度

不同品种卵母细胞体外培养的适宜温度因动物体温不同而存在差异, 过高或过低的培养温度均不利于卵母细胞体外成熟。在体外成熟研究中 35~39℃ 之间的温度对牛卵母细胞体外成熟无显著影响, 但体外受精以 39℃ 为宜^[24]。Wang 经过交叉组合实验, 提出牛卵母细胞的体外成熟最适温度是 38~39℃^[25]。

(2) 培养湿度

培养箱中的湿度要维持在 95%~100%, 以防止培养液中的水分蒸发, 此外, 水的纯度和高度无菌条件都是培养成功的必要条件。

(3) 气体环境

现在最常用的气体环境是含 5%CO₂ 的空气^[26]，另外还有一种是 CO₂、O₂ 和 N₂ 的混合气体(5%CO₂+5%O₂+90%N₂)，这两种气体环境中 CO₂ 非常重要，它是缓冲体系中维持培养液正常酸碱度所必需。注入 CO₂ 培养箱的 CO₂ 气体要求很高的纯度，如果混有 CO 等有害气体直接对卵母细胞和早期胚胎有毒害作用。此外，5%~10%的低氧浓度也对卵母细胞的体外成熟和体外受精均有害^[27]。

(4)培养时间

合理掌握培养时间对于卵母细胞核质成熟相当重要，卵母细胞的细胞核与细胞质成熟不同步，存在一定的时间差，培养时间过短卵母细胞没有完全成熟，不能正常受精，培养时间过长会导致细胞老化。牛卵泡卵母细胞体外成熟培养 18~24h 对受精后卵裂率和囊胚发育率无明显影响^[28]；但钱菊汾等通过电镜对牛卵泡卵母体外成熟过程中超微结构观察，提出牛卵泡卵母细胞体外成熟培养的最佳时间是 24h^[29]。杨庆章等认为，不同直径的卵泡中的卵母细胞发育的起始阶段不同，体外培养应该针对不同发育阶段的卵母细胞制定不同的培养时间，这样才能有效地利用卵母细胞，提高其体外培养成熟率。

(5)培养方式

目前最常用的培养方式是微滴培养法，上面覆盖矿质油层，这样既可以防止了水分蒸发和微生物污染，又可以缓和温度或气相波动，而且减小培养液滴的容积有利于保持卵母细胞自身分泌的信号物质。但 Braun 报道，牛、羊卵母细胞体外成熟培养应用流动系统更好，这样可防止卵丘细胞贴壁，使其扩展充分，有利于卵母细胞的体外成熟^[30]。

比较理想的牛卵母细胞培养条件应为：5%CO₂、饱和湿度、38.5~39℃培养 24h 左右。

1.4.6 卵母细胞体外培养基

牛卵泡卵母细胞常用的成熟液(OM)以 HEPES 或 NaHCO₃ 缓冲的 TCM199 为基础液，单纯用基础液培养卵母细胞时成熟率很低，如果模拟卵母细胞体内成熟环境及各种成分间的相互作用，向成熟培养液中添加一种或几种适当的成分，如卵泡液、血清、激素、生长因子和卵丘细胞等，改善体外培养条件，可以显著提高卵母细胞成熟率，获得较高的受精率和囊胚率。TCM199 是卵母细胞成熟的首

选基础培养液。Bavister 等通过比较不同培养液发现, TCM199 或 MEM 优于其它培养液。在成熟过程中, TCM199 的基础培养液中, 添加一定浓度的血清, 能显著提高成熟率。因为血清包含各种生长因子、微量元素、激素、维生素等。张涌等(1996)认为发情山羊血清有利于山羊卵母细胞的成熟率。成熟液中添加牛血清白蛋白(BSA), 可以防止透明带硬化和利于精子入卵, 但是成熟率要低于血清组。

(1) 卵泡液

卵泡液(bFF)是卵母细胞成熟的介质, 成分复杂, 含有多种生长因子、微量元素、蛋白质等来自血清的生化因子和来自卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子, 这些因子在决定卵母细胞未来命运中起主要调节作用^[31]。卵泡液对卵母细胞成熟的影响主要与卵泡液中的生化组分有关, 直径大小明显不同的卵泡中卵泡液的成分也有所不同; 卵泡液中含有硫氧还原蛋白过氧化酶、甲状腺运载蛋白和视黄醇结合蛋白, 这些蛋白质在卵泡发生时开始产生, 对卵泡发育和卵母细胞成熟有明显促进作用^[32]。但另有报道表明, 卵泡液对卵母细胞减数分裂、核成熟具有抑制作用, 并先后在猪、牛和鼠卵泡液中分离获得了卵母细胞减数分裂抑制因子(Oocyte Meiosis Inhibitor, OMI)^[33-34]。在成熟培养液中添加卵泡液, 对卵母细胞的发育有显著作用。猪卵泡液中有改善卵丘细胞扩展的物质, 经分离鉴定是一种 6.5kDa 的耐高温蛋白质, 它能促进卵母细胞核成熟和雄原核的形成。W.T.Huang 等(2001)发现 20%、40%、100%的猪卵泡液对猪卵母细胞成熟率和卵裂率差异不显著^[31]。马卵母细胞在 100%的卵泡液中成熟后, 受精率显著高于无卵泡液和 20%卵泡液成熟组^[32]。水牛卵泡越大, 卵母细胞发育率和受精率就越高, 胚胎发育潜力也越大^[33]。各个时期的卵泡液的作用是不同的。LH 峰后 20h 的牛卵泡液对牛卵母细胞的成熟率和发育率, 显著比 0h 和 8h 高^[34]。石德顺等(1994)报道在卵母细胞成熟培养液中添加适量(10%~20%)的卵泡液可以提高卵母细胞的受精率和囊胚发育率, 但当添加的卵泡液浓度过高时则抑制了卵母细胞的核质成熟^[35], 这说明卵泡液的浓度与卵母细胞核质成熟密切相关。此外, 卵母细胞在添加小卵泡卵泡液的成熟液内培养, 体外受精后其桑椹胚和囊胚的发育率明显低于添加大卵泡液成熟的卵母细胞^[36], 说明来自小卵泡的卵泡液对牛卵母细胞体外发育有抑制作用。但是, 卵泡液中含有抑制成熟因子, 1955 年张明觉等发现兔子的

卵泡液抑制成熟分裂，随后发现地鼠、大鼠、小鼠和猪等动物上也有此现象。目前从猪和大鼠分离出这种成熟抑制物质（OMI），它来自卵丘细胞。

(2)血清

血清是卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养常用的添加物，牛血清的种类有多种：如胎牛血清(FBS)、新生牛血清(NCS/NBS)、犊牛血清(BCS)、胎犊血清(FCS)、发情牛血清(OCS/ECS)、发情前期母牛血清(POS)、超排母牛血清(SCS)、阉牛血清(SS)等。

目前研究者对培养体系中添加血清的有利作用已基本形成共识，血清不仅为卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus Oocyte Complexes, COCs)提供所需蛋白质，而且血清中的胎球蛋白(Fetuin)能与卵母细胞周围的卵丘细胞协同作用一起防止透明带变硬，提高卵母细胞受精能力^[37-39]。培养液中缺乏血清，精子透明带受体的完整性可能受到影响^[40]。

关于各种血清的添加效果报道很多，大都认为血清对于卵母细胞的体外成熟和体外受精有促进作用。Lu(1987)发现同 FCS 相比 OCS 可使次级卵母细胞受精率提高^[41]；Gordon(1990)在研究中把 OCS 作为体外成熟首选血清^[42]；但 Mochizuki 等(1991)报道，FCS 能有效的提高牛卵母细胞的体外成熟率与受精率，而发情牛血清(ECS)则不能^[38]。Younis 等(1989)认为 POS 在发情期前一天收集比 OCS 更有效^[43]，Lonergan(1992)报道 SS 和 OCS 对于卵母细胞的体外成熟和体外受精同样有效，而且 SS 更具有广泛性。

近年来大多数学者的研究结果表明，在所有血清中 FCS 应用效果最好，这可能是因为 FCS 含有较高浓度的促性腺激素与类固醇激素，Gordon(1990)报道在牛体外受精中单独添加 FCS 就可以达到较高的卵裂率^[43]。另据报道，FCS 与 FSH，LH，E₂ 和卵丘细胞共培养时，卵母细胞体外培养与体外受精率效果更好。

血清对于体外培养非常有用，但是血清成分十分复杂，如激素、维生素、细胞因子、生长因子，以及许多未知物质。血清的来源不同、批次不同、质量不同，血清中所含组分及组分间比例不同，血清成分的不确定性导致了卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养的不稳定。

为了减小卵母细胞与早期胚胎体外培养的不稳定性，近年来，科研人员考虑无血清培养，应用无血清培养系统可以准确调配培养基的各个组分，有利于应用

化学成分明确的培养液对单一因子进行研究，以便精确研究卵母细胞的调节机制，探明不同阶段的营养需要和信息传递。另外，无血清培养可以减少污染，降低成本。

现有一些血清替代品如 UG 可用于胚胎的培养，但在体外成熟中的应用报道很少；UG 由六类成分组成：结合蛋白、矿物质元素、维生素、生长因子、黏附因子和激素；UG 中蛋白质含量为 FBS 的 1/3，化学组成稳定，无微生物污染。

有些大分子量有机质也被用作血清替代品，如聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)，聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)等。Saeki 等(1991)报道牛卵母细胞体外成熟培养利用 0.3%的 PVP 代替 10%FCS，成熟率和受精率没有受到明显影响^[44]。牛卵母细胞在以 TCM199 为基础液，用 PVA(1mg/ml)代替血清的无血清培养体系中完成体外体外成熟、体外受精，囊胚率为 8.4%，加入 BSA(1mg/ml)后囊胚发育率为 17.2%^[45]。虽然人们在卵母细胞体外培养中尝试使用血清代用品，它对卵母细胞成熟和对早期胚胎的发育的作用机理尚不清楚。

(3)激素

激素在卵母细胞成熟起关键作用，研究卵母细胞成熟与激素变化的特征得出，FSH、LH 和 E₂ 是与卵母细胞体外成熟密切相关的几种激素。在体内，FSH 和 LH 有协同作用，因此卵母细胞体外成熟过程中，模拟体内排卵前后激素的变化，FSH 和 LH 以 1: 1 比例添加。这几种激素相互作用共同调节卵母细胞的成熟过程。

FSH。FSH 与诱导卵丘扩散、促进卵母细胞质成熟有关^[46]，能显著提高体外成熟卵母细胞的体外受精能力及早期胚胎的发育能力^[47-49]，王海滨等(1999)报道卵母细胞体外培养时添加 FSH 可以抑制卵丘细胞凋亡，维持卵丘细胞的活力，并维持卵丘细胞和卵母细胞间的联系，促进卵母细胞发育成熟^[50]。也有学者认为，FSH 暂时抑制 GVBD，改变第一次成熟分裂所需的时间，促进卵母细胞的成熟。FSH 经常与 LH 协同使用^[51]。FSH 促进卵丘细胞分泌 E₂，而 E₂ 又可直接作用于卵母细胞（有 E₂ 受体），调节卵母细胞成熟和钙离子储存。

LH。在卵母细胞体外培养中添加 LH 可有效提高卵母细胞的成熟率、受精率及早期胚胎发育率。LH 受体存在于卵泡膜细胞和卵丘细胞上，卵母细胞第一

次减数分裂的重新启动到成熟排放第一极体的排卵过程,是由 LH 峰激发的。LH 峰的出现克服了卵泡液对卵母细胞成熟的抑制作用^[52]。LH 对卵母细胞的调节作用是通过两条途径实现的,一是通过调节营养环境引起卵丘细胞代谢及结构发生一系列变化,为精子通过卵丘细胞间隙到达透明带创造条件;二是通过增强卵母细胞存活力和去除成熟分裂抑制因子(OMI)促进其成熟与受精^[53]。

E_2 。 E_2 在卵母细胞的成熟,特别是胞质成熟中作用突出。 E_2 对不同动物卵泡卵母细胞的影响有所不同。 17β - E_2 是促进胞质成熟的重要成分,它能促进卵母细胞成熟分裂的复始,显著提高卵母细胞的受精能力及早期胚胎的发育能力; 17β - E_2 能够诱导兔子精子进入卵母细胞后形成正常的原核;但也有相反的报道认为, E_2 会降低卵母细胞成熟后的受精能力和发育能力^[54-56]。人卵母细胞成熟率和受精能力就通过测定卵泡液中的 E_2 含量来鉴定,因为 E_2 促进人卵母细胞成熟。成熟培养液中添加 E_2 与否,不同物种应不同对待。如 Margot Alves、Nues Dode 等(2002)报道猪 COCs 自身能分泌类固醇,成熟液中没必要添加 E_2 。有报道称 E_2 对小鼠、大鼠、猪卵母细胞成熟有抑制作用;在牛卵母细胞成熟过程中,能促进牛卵母细胞胞质成熟。刘灵等认为 E_2 能显著提高山羊卵母细胞成熟率。在卵泡内,孕酮和 E_2 浓度随着卵泡发育而调整,可能间接或直接的对卵母细胞发生作用^[57]。G.Z.Mingoti 等报道,牛 COCs 能分泌 E_2 和孕酮^[58]。此外兔、大鼠、和人 COCs 也分泌 P 和 E_2 。FSH 和 EGF 激发卵母细胞减数分裂,通过第二信使 cAMP 促使 Ca^{2+} 内流进入卵母细胞,EGF 比 FSH 更能显著促进小鼠卵丘细胞的扩展。

(4)细胞生长因子

作用于卵母细胞的细胞生长因子(Growth Factor, GFs)是在生长分化因子(Growth Differentiation Ffactor, GDF)及其 mRNA 诱导卵丘细胞增殖与分化过程中由卵丘细胞分泌产生的。细胞生长因子是一类小分子物质,它们可以在细胞之间传递信息,对细胞的增殖、生长、分化和代谢等生命活动起着重要的调节作用。

与卵母细胞体外成熟有关的细胞因子主要有:表皮生长因子(EGF),胰岛素样生长因子(IGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和转化生长因子(TGFa, TGFp),这些因子对卵母细胞的成熟、受精与卵裂起着重要作用^[59-61]。

细胞生长因子虽然可以促进卵母细胞体外成熟、体外受精和早期胚胎的体外

发育,但是,在没有其它激素存在下,它不能独立启动减数分裂和恢复并完成减数分裂,细胞生长因子对卵母细胞的促进作用必须通过卵丘细胞介导而完成^[62]。

在各种生长因子中 EGF 在卵母细胞成熟培养中应用最多。EGF 在卵巢上由黄体 and 内膜细胞产生,存在于机体多种组织中。EGF 是卵丘细胞强有力的分裂素,也可能是卵母细胞成熟分裂复始的一种信号因子^[63-64]。Dekel 等(1985)认为 EGF 是一种卵泡卵母细胞成熟的诱导剂,EGF 对卵母细胞的作用依赖于它的使用剂量和作用时间^[65]。Coskun 等(1991)研究结果表明,EGF 能显著提高牛成熟卵母细胞原核的形成率,卵裂率及发育到 4~8 细胞的比率^[66],Arellano 等(1993)研究结果表明 EGF 能显著提高猪卵母细胞的体外成熟率^[67]。

(5)卵丘细胞

大多数哺乳动物的卵母细胞被卵丘细胞包裹,形成 COCs。排卵之前,卵丘细胞扩展,合成大量胞外基质,富含透明质酸(HA),有利于排卵后进入输卵管,也保证了卵母细胞正常的受精和胚胎发育潜力,所以卵丘细胞扩张对卵母细胞成熟,特别是卵母细胞胞质成熟起着重要作用。卵丘细胞的多少也是影响牛卵体外受精的重要因素。卵丘细胞和卵母细胞通过裂隙密切联接,卵丘细胞能够吸收卵泡液中的低分子物质,经代谢转化,通过细胞连接为卵母细胞的生长提供物质和能量^[68];而卵母细胞在生长过程中释放卵丘细胞生长的促进因子^[69],或者刺激卵丘透明质酸酶的合成,调节卵丘扩散,从而解除卵丘、卵母细胞的异源连接,促使减数分裂恢复,使卵母细胞生发泡破裂并逐渐进入 MI 期;卵丘细胞和卵母细胞相互促进,共同完成卵母细胞成熟过程。选取卵母细胞条件之一就是卵丘细胞的层数、完整性和成熟后卵丘细胞的扩展程度。一定数量卵丘细胞的存在,是卵母细胞完成体外成熟及受精的必要条件。

卵丘细胞可以启动卵母细胞内的蛋白质合成,大量蛋白质合成可以激活成熟促进因子(MPF),促进卵母细胞成熟。卵母细胞与卵丘细胞结合的紧密程度、卵丘细胞群的完整度直接影响体外成熟的效果^[70]。

卵丘细胞对卵母细胞体外成熟的影响与其浓度有关,在促性腺激素或发情牛血清存在的情况下,低浓度的卵丘细胞($0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/ml)能够刺激卵母细胞成熟分裂的启始;高浓度($50 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ 个/ml)的卵丘细胞抑制卵母细胞成熟分裂的复始^[71-72]。

卵丘细胞不仅对卵母细胞的成熟率有影响，而且卵丘细胞对精子有筛选作用，卵丘-卵母细胞成熟受精后的桑椹胚、囊胚发育率显著高于裸卵^[73]。Park 和 Fukui 认为，卵丘细胞能诱发精子发生顶体反应，并增加其穿透能力，但卵丘细胞必须保持与卵母细胞的紧密结合。Buccione R 发现，只剩卵丘细胞和透明带时，FSH 并不能使卵丘细胞扩张和透明质酸增加，说明卵母细胞可能分泌促卵丘扩展因子^[74]。因此，当 COCs 成熟扩张不充分时，可能与卵母细胞自身的活性有关。卵母细胞存在时，FSH 才促进卵丘细胞扩展，说明卵丘细胞和卵母细胞是相互作用的。卵成熟过程中，卵母细胞液分泌一种旁分泌因子(如 EGF)，促使卵母细胞分泌透明质酸，从而促进卵丘扩展，利于精子入卵。J.Y.Xoon 等（2002）得出裸卵成熟率和 CyclinB₁ 显著低于对照组。

因此，在卵母细胞成熟培养液中添加卵丘细胞，模拟卵泡卵母细胞最终成熟时细胞内的相互作用，可促进卵母细胞体外成熟、体外受精和早期胚胎发育。

(6)水

水是培养液的主要成分，无菌、超纯的水质是卵母细胞体外培养的重要保障。第一步先制作双蒸水，第二步用双蒸水制作去离子水，第三步用去离子水继续制作双蒸水，只有第三步制作的双蒸水才可用于卵母细胞培养试验。

2 卵母细胞体外受精与精子体外获能

2.1 卵母细胞体外受精的研究

2.1.1 卵母细胞体外受精的早期探索

体外受精(IVF)是指成熟卵母细胞在体外与精子结合的过程。1878 年 Schenk 尝试用家兔和豚鼠排卵前的卵母细胞与附睾内精子在子宫液内进行共孵育，结果观察到卵母细胞第二极体释放和卵裂现象，但完全体外受精直到 75 年后才有成功的报道^[79]。

Chang 和 Austin 分别同时发现了精子获能是受精现象的前提条件。Chang 利用获能精子进行哺乳动物卵母细胞体外受精实验，1954 年兔卵母细胞体外受精获得成功，为哺乳动物体外受精开创了成功的先例，但是，该项成果当时并没有得到世界的公认，直到 Thibault 研究小组提供了兔卵子体外受精形态学证据，哺

乳动物体外受精技术才真正得到承认。

尽管 20 世纪中后期体外受精技术得到了迅猛的发展,但直到 1971 年有关哺乳动物受精和胚胎发育的生理学、生物化学和形态学知识还很贫乏,哺乳动物受精机理不明确,哺乳动物卵子受精过程及早期胚胎发育在自然环境中无法调查。因此,动物排卵和受精的准确时间很难预测,精子穿破透明带及受精时配子的生理生化变化难以检测,受精条件难以人为控制。

后来人们总结体外受精过程中的经验,认为卵子在受精前需要成熟,成熟后排出第一极体,精卵结合后排出第二极体,于是认定排出第二极体为受精成功的标志,但是,在随后的研究中发现判断体外受精的标准有时有误导性,比如排除第二极体和卵裂可以由孤雌激活引起,而培养过程中卵母细胞可能被各种刺激物(如低温)激活,实现卵裂。

由于一些哺乳动物品种的卵母细胞在培养过程中可以发生孤雌发育,导致明显体外正常激活和卵裂的卵子缺乏体外受精的证据。

此外,在 1951 年以前,尽管有时精子和卵子在雌性生殖道收集液中共培养时成功受精,但当时并没有认识到精子在受精前必须获能,精子往往是从雄性生殖道中采集后直接用于体外受精,因此,精子的处理上也带有偶然性。而且,在早期胚胎发育过程中与母体环境的信息传递也无法知晓,因而当时体外受精胚胎的妊娠同样带有偶然性。

通过体外受精技术已经获得了多种动物后代。1959 年 Chang 获得体外受精仔兔。Yanggimachi 与 Chang (1964) 获体外受精卵裂胚胎。1970 年,Hamnerd 等使猫体外受精并发育到卵裂。1982 年 Brackett 等获得试管牛。1986 年 Chang 报道获得试管猪。1985 年花田章成功获得体外受精绵羊。1978 年 Steptoe 和 Edwards 报道了世界上首例试管婴儿,至今已有数十万例试管婴儿在世界上诞生。但是,在试管动物方面,获得高质量的体外受精胚胎,仍然比较困难,因为受精不稳定。牛体外受精胚胎的质量与体内受精胚胎相比仍有较大差距,主要表现在细胞数较少、内细胞团与滋养层细胞比例改变、卵裂球形状的不规则、细胞质碎片多、对冷冻保存,人为操作的敏感性增加以及移植后受胎率较低等方面。由于这些原因,很大程度上影响了牛 IVF 胚胎的生产应用效果以及相关基础研究的进展。因此为了生产提供优质胚胎,体外受精发育技术还需要进一步研究。

2.1.2 精子获能

动物交配后，精子在通过雌性生殖道时经历了一系列生理、生化变化，获得受精能力的过程即精子获能（Sperm Capacitation）。

在哺乳动物体外受精的整个研究历程中，1951年 Austin 和 Chang 发现了哺乳动物精子的获能现象成为推动卵母细胞体外受精(IVF)技术划时代意义的重大突破，它使人们了解了卵母细胞体外受精的机理，从此以后，哺乳动物卵母细胞的体外受精研究得到了蓬勃发展。

1951年 Chang 在兔子卵母细胞体外受精的研究中发现，尽管卵子在排卵后8h内仍有受精能力，但是，如果在排卵前很短的时间把精子输入输卵管，排卵后只有极少的卵子受精；如果在排卵前几小时事先把精子输入输卵管，则卵子的受精比例很高。Austin 对小鼠的实验观察表明，在排卵后当精子直接注入卵巢周隙时，4h之内没有发现有精子穿过透明带，4h以后受精卵数量迅速增加。在受精之前精子必须经历的这个重要的时间间隔不是人为的实验干涉，因为在发情小鼠排卵之后允许精卵自然结合，尽管精子在排卵后注入输卵管，精卵结合仍在2h之后。

通过一系列实验分析，Austin 和 Chang 推测一些哺乳动物的精子在获得穿透卵子的能力之前需要在雌性生殖道中停留一段时间，1951年 Austin 提出了获能的概念，并指出它是精子在受精前必须经历的一种生理变化。

在发现精子获能之后短短的几年内，哺乳动物卵母细胞体外受精技术得到了空前的发展。

1954年，Dauzier 等应用子宫液获能的精子获得兔子卵母细胞第一次体外受精成功。1959年，Chang 在体外受精研究中又一次重大突破，通过形态学观察受精卵卵裂过程，提出卵母细胞体外受精后能够正常发育，后来很多研究以不同方法验证 Chang 的结论，并不断提出新的证据。1975年，Bracken 等在研究兔子精子在体外受精的能力时，对精卵结合以及胚胎早期发育从形态学方面进一步提供了体外受精胚胎能够正常发育的证据。

随着形态学观察手段的不断提高，哺乳动物卵母细胞体外受精的研究进入黄金时代，许多不同种类的哺乳动物体外受精过程都得到了详细的观察与记录。

1961年 Thibault 和 Dauzier 首次报道了绵羊和猪体外受精成功，获得几个绵

羊体外受精胚和 1 个猪的体外受精胚。1980 年 Bondioli 和 Wright 报道了绵羊输卵管卵母细胞体外受精胚体外培养体系对胚胎发育的影响。

1963 年, Yanagimachi 和 Chang 首次报道了大颊金鼠精子体外获能获得成功。1964 年, 又详细阐述了大颊金鼠体外受精过程中精子穿过卵母细胞透明带、第二极体的释放、生殖核的形成等研究结果, 该项研究成果进一步提高了人们对受精机理的认识, 并且以此为依据, 大大简化了哺乳动物卵母细胞体外受精的操作步骤, 明显提高了体外受精的成功率, 为以后其它哺乳动物卵母细胞体外受精的技术研究奠定了宝贵的基础。1967 年, Barros 和 Austin 报道了大颊金鼠卵母细胞体外受精时精子发生的顶体反应, 描述了精子受精前顶体的形态学变化, 为精子穿过卵母细胞透明带的作用机理研究提供了形态学依据。

1975 年, Rogers 用附睾内的精子给几内亚猪卵母细胞体外受精, 发现精子在穿破卵母细胞透明带前需要 18h, 后来研究发现, 精清中所含的葡萄糖和 Mg^{2+} 导致精子获能时间延长, 如果降低葡萄糖和 Mg^{2+} 的浓度, 精子获能的时间缩短到 2~3h。另外, 研究人员发现精子获能与 Ca^{2+} 有关, Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 有竞争作用。

1984 年 Boatman 和 Bavister 研究发现咖啡因和血清是提高精子受精能力的必需物质, 但当时并不明确这两种物质的促进精子获能和受精的作用机理。

精子在体内获能, 主要发生在子宫中, 在输卵管中获能更为充分, 而且精子获能没有种属特异性, 即牛精子可以在兔生殖道内获能。获能的过程中, 不同物种间有共同特点, 如精子代谢要发生很大的变化, 精子活力增强, 呼吸率升高, 耗氧量增加, 使精子产生超激活运动(鞭打运动)等; 但是获能条件又有差异, 如小鼠附睾液中精子稀释在合适溶液中 30min 即可获能, 猪精子同样方法 2~3h 才可获能。此外去除精浆也很有利于精子的获能。其它灵长类精子获能需要除精浆和添加咖啡因或 cAMP 处理。葡萄糖有利于仓鼠、白鼠、狗和人精子获能, 但其抑制或延长牛和猪精子获能的时间。在牛精子获能过程中, 糖酵解作用使获能后胞浆内 pH 增加^[80]。小鼠精子顶体反应(AR)也伴随着出现胞浆内 pH 升高。顶体反应是精子质膜与顶体外膜融合和小泡化, 从而使顶体基质中的各种酶释放出来, 如透明质酸酶分解卵丘细胞间质、顶体素(胰样蛋白酶)、还含有磷酸酯酶、放射冠酶等酶类, 降解卵母细胞外卵丘细胞基质, 水解透明带, 并且精子质膜与卵质膜融合, 使卵母细胞顺利受精。精子获能和 AR 密切相关, 精子获能是 AR

的前提，AR 标志着精子获能结束，发生 AR 又是受精的开始。精子发生剧烈的鞭打运动，可作为获能的依据。在精子获能方面较为一致的观点是在精子获能的过程中发生 Ca^{2+} 内流，离子变化起主导作用。获能前，膜内 K^+ 高， Na^+ 低；而顶体反应后，这种离子平衡打破，产生了 Ca^{2+} 的短暂内流。因此，只要有利于膜电位变化，引起精子 Ca^{2+} 浓度变化的物质，都可以引发顶体反应。

2.1.3 顶体反应

获能精子在穿过卵母细胞透明带前顶体要发生一种变化，称顶体反应。精子受精前顶体发生的这种变化最早是由 Austin 和 Bishop 发现的，他们应用相差显微技术揭示了猪和鼠的精子穿过卵母细胞透明带时失去顶体的过程。后来，人们用电子显微镜观察鼠类精子受精过程时发现，顶体反应包括顶体膜的融解和顶体内容物的释放，获能精子的这种变化是获得受精能力的先决条件^[81]。

顶体反应相继在兔子^[82]、鼠类^[83]、猪^[84]、牛^[85]等动物体外受精过程中发现，基于这么多有力的证据，充分说明顶体反应是哺乳动物精子在获得受精能力后的一种正常反应。

在研究初期，有关精子穿过卵母细胞透明带时发生变化的名词术语相当混乱。Austin 和 Bishop(1958)认为精子顶体反应是精子获能过程的一部分，而 Yanagimachi (1969) 认为精子顶体反应是精子获能的最后阶段。

Bedford (1968) 认为获能是哺乳动物受精的特有现象，获能是一种不连续的生理变化，这种变化能够使成熟的精子对一定的刺激迅速作出生理调整，从而精子在穿入透明带时完成顶体反应，当时研究人员普遍认为 Bedford 的学说是在观察雌性生殖道内精子完成获能过程中经历自身变化的最符合逻辑的一种解释。

Bedford 认为精子获能很可能是精子自身受精条件的准备过程，这种生理上的变化使得精子一旦在输卵管中遇到成熟的卵母细胞可以迅速地发生顶体反应，完成受精。如果没有卵母细胞透明带、卵丘细胞等刺激物出现，获能的精子不会在体外自动发生顶体反应。获能精子在到达受精部位之前，其特定的生理构型可以保持数小时，甚至数天，以等待排出的卵子受精。因此，获能可以看作一种调整精子在未受精卵母细胞到来时保持顶体反应有效性的生理机制。

2.1.4 胚胎体外培养

卵母细胞体外受精后的体外培养中, Yanagimachi 和 Chang 发现大鼠金鼠的卵母细胞体外受精后仅有 45%的卵裂率, 而且不管怎么努力, 这些受精卵在体外培养的条件下突不破 2C, 这就是后来常说的“2C 阻滞”。

Schini 和 Bavister 在大鼠金鼠体外胚胎培养的“2C 阻滞”研究中阐明“2C 阻滞”与磷酸盐和葡萄糖有关^[79]。后来, Crozet(1987)报道了绵羊卵母细胞体外受精胚发育的相关条件^[86]; 1992 年 Barnett 和 Bavister 在大鼠金鼠的卵母细胞体外受精胚体外培养中突破“2C 阻滞”的研究中, 确定并公布了氨乙基亚磺酸是大鼠金鼠体外受精胚突破“2C 阻滞”的必需添加物。

20 世纪 60 年代到 90 年代是哺乳动物卵母细胞体外受精技术研究的火热时代, 在掌握精子获能技术之后, 精子和卵母细胞在获得受精能力前必须经历的生理、生化变化成为研究的焦点, 经过长达 20 多年艰苦卓越的研究, 在不断深入研究受精机理与体外胚胎发育条件的基础上, 逐步突破细胞发育阻滞, 兔子、鼠、猫、狗、猪、羊、牛和人的卵母细胞体外受精陆续获得成功, 部分动物获得了试管后代。

1969 年, Edward 等首次报道了人卵母细胞体外成熟和体外受精的研究^[87], 并描述了精子穿透卵母细胞透明带、极体释放与生殖核形成的整个过程, 1978 年首例试管婴儿在英国诞生^[88], 这一巨大的成功标志着哺乳动物体外受精技术逐渐走向成熟, 同时, 也预示了体外受精技术将为治疗人类不育成为可能。由于此项研究所用卵母细胞及胚胎培养液是建立在 1963~1964 年 Yanagimachi 和 Chang 研制的培养液基础之上, 因而可以说大鼠金鼠卵母细胞体外受精的成功为人卵母细胞体外受精的成功铺平了道路。

与人类相比, 其它灵长类动物卵母细胞体外受精的研究明显滞后, 1973 年 Gould 首次报道了猴子卵母细胞体外受精成功^[89], 然而, 由于这些研究中没有观察到受精卵中有精子尾巴, 而且受精卵发育特别慢, 因而存在很多争议, 真正受到承认的是 1983 年 Baviste 进行的恒河猴卵母细胞体外受精的研究, 在此项研究中不仅观察到受精卵中存在精子尾巴, 而且受精卵发育良好^[90]。1991 年人以外的其它灵长类卵母细胞体外受精胚终于在猕猴方面获得妊娠成功。

1982 年 Brackett 首次报道了奶牛卵母细胞体外受精胚胎成功妊娠产犊。

1985年 Hanada 首次报道了通过体外受精技术获得试管绵羊后代，同年试管山羊在日本诞生。

1986年 Cheng 等报道通过体外受精技术获得试管猪。

我国哺乳动物体外受精研究起步较晚，但近年来得到了空前的发展，1986年中国科学院遗传所陈秀兰等通过卵巢卵母细胞体外受精首次获得试管鼠，1988年北京医科大学张丽珠等通过卵巢卵母细胞体外受精首次获得试管婴儿，1989年西北农林科技大学徐君等通过输卵管卵母细胞体外受精首次获得试管兔，同年内蒙古大学旭日干等通过卵巢卵母细胞体外受精首次获得试管牛与试管绵羊，1990年西北农林科技大学钱菊汾等通过输卵管卵母细胞体外受精首次获得试管山羊，同年，江苏省农业科学院通过卵巢卵母细胞体外受精首次获得试管猪。

2.2 精子体外获能的机理

2.2.1 精子体外获能机制

哺乳动物附睾内储存的精子 and 射出的精子在体外均不具备使成熟卵母细胞受精的能力，精子只有在雌性生殖道特殊的液体环境中经过一段时间、发生一定的生理变化及形态变化才能获得受精能力，这种变化称为精子的获能。

精子获能过程中伴随着一系列生理、生化变化。首先，获能过程中精子活力增强，呼吸率升高，耗氧量增多，尾部线粒体内氧化磷酸化过程功能旺盛，这些变化可以提高精子的呼吸活动和能量产生，最终激活精子。其次，精子获能过程中细胞内部由于膜通透性的改变，原有的 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的离子平衡被打破，发生膜内外的离子流动，精子细胞内 Ca^{2+} 浓度升高到一定的阈值时，便可诱发顶体反应。第三，精子获能过程中，精子细胞膜成分的变化主要表现为膜脂和膜蛋白的变化，膜脂中胆固醇类物质的丢失，提高了膜的流动性；膜蛋白在子宫液和输卵管液中参与了糖蛋白交换，进而促进获能。第四，精子在发生顶体反应以前， Ca^{2+} 又激活 cAMP 系统和 Mg^{2+} -ATP 酶，加强了尾部外周致密纤维的运动和微管的滑动，而使精子尾部运动能力增强，表现出一种强有力的鞭打运动，称之为超激活运动。

2.2.2 影响精子体外获能的因素

诱导精子获能物质很多，在排卵时，有少部分卵泡液进入输卵管峡部，有利于精子激活、趋化、顶体反应和阻止多精入卵的作用^[91]。在研究早期应用一些生物活性物质如卵泡或卵丘细胞液诱导精子获能^[92]。后来研究发现，一些物质诱导精子获能更为有效。如碳酸氢钠对小鼠精子获能有促进作用。高离子强度和高渗利于获能，如 Oliphant (1973) 使用高离子强度液获得试管兔，随后以 380 Osm / kg 的高渗透压液也获得试管兔。钱菊芬等 (1990) 用高离子强度液处理山羊精子，与输卵管卵母细胞体外受精获得我国首例试管山羊。对于牛、猪、绵羊和山羊精子，Ca²⁺载体 A23187 (IA) 诱导顶体反应较为有效，它与 Ca²⁺形成复合物，携其进入精子，从而诱发顶体反应并激活顶体酶系。Roldan 等(1989)使用 Ca²⁺载体 A23187 处理羊精子引发顶体反应，可能是产生 DAG (二酰基甘油) 第二信使引起顶体反应^[93]。孕酮引发豚鼠精子顶体反应，可能有 PKC 参与。输卵管中的氨基多糖 (GAG) 也可促进精子对 Ca²⁺的吸收，诱发顶体反应。肝素就是高度硫酸化的 GAG，对牛精子获能很有效，适剂量 10~100μg / mL。血清白蛋白也有利于精子获能，但是白蛋白是如何支持精子获能和顶体反应还不很清楚。其一是白蛋白除去精子表面的脂质和锌离子，导致精子膜不稳定，从而发生顶体反应。Davis et al(1980)认为白蛋白通过转移磷脂酰胆碱而降低鼠精子胆固醇。此外，获能液中也添加咖啡因、肾上腺素、亚牛磺酸等，它们有利于提高精子活力，或抑制过氧化物对精子的损害。咖啡因是磷酸二酯酶的抑制剂，使精子 cAMP 含量增加，从而促进精子获能。如牛精子用含有 10 mmol 咖啡因和 20μg/mL 肝素的 BO 液洗涤，培养，可使其获能。

(1) 精子本身

不同物种的精子体外获能所需时间有所不同，如兔子精子的获能时间为数小时，而人和小鼠精子体外获能在 1h 以内；同种动物不同个体的精子体外获能的时间也有差异；此外采精部位不同，所获精子其获能情况也不相同。因此精子来源是影响体外获能的一个重要因素。

(2) 温度

精子体外获能与温度有关，大多数哺乳动物获能温度为 37℃~38℃，如猪、羊，精子获能温度在 38.7℃~39.7℃比在正常体温更有效^[92]。牛羊精子体外获能

的适宜温度为 38.5℃~39℃，有关研究表明，细微的温差会影响精子膜脂的物理状态，从而影响到精子获能效果。Holt 等（1986）指出，轻微的温度变化，可以使质膜脂类的物理学状态产生大的变化。物种不同精子获能时间和获能条件也有差异，小鼠和猫精子获能只需 2h，兔和人需要 8h。对于体外获能，还没找到特效物质，只要保证精子体外存活，它就能获能，只是效率低而已。

(3)pH

获能的最适 pH 为 7.4~8.0，低于 6.7 获能时间延长；高于 8.2，获能时间缩短，但不利于精子存活。

(4)渗透压

渗透压(Osmotic Pressure)对精子获能也会产生重要影响，低于 270 Osm/kg H₂O 或高于 343 Osm/kg H₂O 都会影响精子正常获能，哺乳动物精子获能的适宜渗透压范围是为 295~310 Osm/kg H₂O^[1]。

(5)获能液组分

① 高离子强度液(High Tonic Strength, HIS)

Brackett 等(1972)首先报道了应用 179~199mmol 的高离子强度液 NaCl 使兔精子体外获能^[94]，范必勤等应用 Brackett(1975)的方法进行兔精子体外获能试验，获得少数原核期受精卵^[95]。徐君等(1990)对 Brackett 的方法加以改良，即将原 BO 液中 NaHCO₃ 浓度由 37mmol 提高到 47mmol，称之为 XQ 液，相应的高离子强度液称为 mHIS，用 mHIS 处理兔精子 15min，对超排兔卵母细胞的受精率为 63.4%^[96]。

相关研究结果表明，高离子强度液可置换精子表面抗原物质或去能因子，从而诱发顶体反应。

② Ca²⁺载体(Ionophore A, IA)

精子的顶体反应是一个 Ca²⁺依赖过程，Ca²⁺可以刺激糖酵解过程为精子活动提供所需能量，从而加强精子运动，另外 Ca²⁺载体(IA)可与 Ca²⁺形成复合物，携带 Ca²⁺进入精子内，从而诱发精子的顶体反应并激活顶体酶。

Ca²⁺载体对精子的作用很强烈，它能有效的诱导各种哺乳动物精子的顶体反应，但是，Ca²⁺载体处理时间过长或浓度过高，会导致精子的急剧死亡。

③ 氨基多糖(Glycosaminoglycans, GAG)

母畜发情期输卵管液中的氨基多糖(GAG)可促进精子对 Ca^{2+} 吸收, 从而诱发顶体反应, 肝素是高度硫酸化的氨基多糖, 现在精子获能液常添加肝素促进精子获能。

1986 年 Parrish 等首次报道了应用肝素诱导牛精子体外获能取得成功^[97], 以后相继在牛羊上取得成功。1987 年 Lu 等以 5ug/ml 的肝素处理牛精子进行体外受精, 胚胎移植后获得牛犊^[98]。

④ 血清白蛋白(Serum Albumin, SA)

血清白蛋白是血清中的主要大分子物质, 对于锌和胆固醇具有很强的结合力, 因而它可以改变精子膜的胆固醇含量, 调整精子膜的脂肪水平, 从而改变了精子膜的稳定性, 精子一旦获能, 血清白蛋白可促进其迅速穿透卵子, 因此血清白蛋白作为精子获能的辅助成分。据报道, 在丙酮酸钠和乳酸钠存在的情况下, 应用 BSA 可使鼠卵受精率高达 83%~95%^[99]。现在在精子获能实验中最常用的是牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)。

⑤ 精浆

如果精子同精浆接触, 获能时间就会延长。因为精浆内含有去获能因子、纤粘连蛋白等, 与精子结合后起稳定作用。在精浆中, 有来自前列腺来的 Zn^{2+} 与射出的精子核蛋白 SH 基结合, 因而可使核蛋白短时间稳定。如猫附睾尾部收获的鲜精获能和入卵要比射出的精子快得多。此外精子获能也是一个可逆过程。获能精子与精浆和附睾液接触, 又可去获能 (Decapacitation)。在雌性生殖道中又可获能。这种去获能因子是一种糖蛋白 (40~200kDa)。它们都能稳定精子膜, 阻断 Ca^{2+} 内流, 并防止精子过早获能。 Zn^{2+} 和精胺就有此作用。因此精子洗涤对于精子的获能很重要。既可除去精浆中的不利物质和冷冻保护剂, 也可获得数量多, 活力旺盛的精子。

(6) 卵丘细胞

在体外受精中, 卵母细胞外围包裹的卵丘细胞有重要作用。成熟的卵母细胞卵丘扩展很明显, 其主要是由卵丘细胞和细胞外基质组成, 它分泌精子趋化因子, 吸引大量精子。获能精子的剧烈运动加上酶的作用, 使得卵丘细胞逐渐脱落, 直到精子与卵母细胞透明带融合和穿卵。在此过程中, 卵子在精子的推动下, 不停的旋转 (顺时针)。研究通过牛体外受精对比发现, 卵丘细胞的存在可延长精子

寿命，即说明卵丘细胞延缓精子的死亡。此外卵丘细胞能分泌诱导发生顶体反应的物质并且能阻止多精入卵，所以在体外受精时，卵丘细胞要有适当的保留。据报道，卵丘细胞也是活化诱导物。如果用细胞松弛素 B(Cytochalasin B)或乙酰甲基秋水仙碱(Colcemid)处理卵丘细胞，也可以阻止精子在与卵丘细胞接触时获能。

(7) 透明带

透明带(成分 ZP₁、ZP₂、ZP₃糖蛋白)是阻止多精入卵的重要屏障。种间精卵不能受精就是精卵间受体不能识别。一般认为，哺乳动物卵母细胞的透明带由三种糖蛋白组成，分别称为 ZP₁、ZP₂和 ZP₃。其中 ZP₃是精子的特异受体，并且能触发顶体反应。在受精时，精子首先与 ZP₃结合，ZP₃粘在精子头部，并刺激精子顶体小泡胞吐。然后，一种顶体内层蛋白暴露于精子顶部，这种新暴露的蛋白质是精子细胞与精子受体偶联的配基，它使精卵识别并且融合而发生受精。当去掉透明带时，种间受精就变得容易很多。如人精子不能与仓鼠卵子结合，除去透明带后，则可穿入仓鼠卵。如小鼠精子和透明带结合，首先发生初级识别及 ZP₃和精子质膜上受体结合，起识别精子和诱发顶体反应；然后是次级识别及精子发生顶体反应后，精子质膜脱落，与 ZP₂结合，ZP₁主要起结构支撑作用。

(8) 卵母细胞的质量

卵母细胞的质量对于成熟、受精和胚胎期发育有着非常重要的作用。在实验中，培养条件一致，但结果差异很大。此外，成熟液、培养条件、操作速度等都会影响到正常受精。

(9) 精液质量和获能效果

不同物种的精液的耐受力不同。同一种畜不同批次也有很大的差异，而且，精液很易被污染，从而导致整个试验的失败。当然，获能过程也是非常重要的。

(10) 精卵共孵体系和比例

现在普遍使用 50~100 μ l 微滴培养，时间不同物种不同，而且卵母细胞外围的卵丘细胞要保留。精卵比例要合适，如牛为 $1\times 10^6\sim 1.5\times 10^6$ 为宜。大多数动物在受精时卵母细胞上都还存在一定比例的卵丘细胞。

2.2.3 获能精子的变化

精子获能后,在接触透明带的过程中,头部(顶体)发生了明显形态学变化,最终将顶体帽外的质膜和顶体外膜融合,穿孔,释放出水解酶类。这一变化过程称为顶体反应。不同物种只是囊泡化方式不同而已。如牛精子是质膜与顶体外膜融合囊泡化。而猪,绵羊等动物则是质膜膨胀破裂和顶体外膜内陷囊泡化。人的卵泡液、COCs、透明带均可刺激精子发生顶体反应,这是由于卵泡液中含有孕酮与大分子物质,如白蛋白、氨基葡萄糖等。用完整溶解的透明带包括糖蛋白ZP₃处理精子,也可触发顶体反应。在进行顶体反应之前,有些动物的精子开始猛烈移动,称为超激活运动,尾部呈有力的鞭打状,为“8”字形,而且精子激活部位是在输卵管,特别是在壶腹部。在超激活运动中,Ca²⁺、腺苷酸环化酶、cAMP、蛋白激酶和蛋白质磷酸化是精子超激活必需的。精子获能和获能后,尾部表面失掉覆盖物,露出受体,被配体活化,激活G蛋白,使Ca²⁺通道活化,进而激活腺苷酸环化酶,启动cAMP蛋白激酶的系列反应。同时也激活了Na⁺/H⁺通道,使细胞内pH上升。细胞内Ca²⁺、H⁺与cAMP的浓度,可调节精子的尾部运动,细胞内Mg²⁺的浓度则影响轴丝的硬度,使轴丝动力蛋白相互作用,在线粒体的参与下,导致精子发生超激活运动。

2.2.4 精子体外获能方法

(1)精子洗涤

哺乳动物的精液中含有处于不同成熟阶段的精子,这是自然交配过程中克服不同时间排卵对受精造成影响的一种适应;精液中除高活力的健康精子外,还有成熟过度的“衰老”精子和弱死精子,这样不经筛选的精子会对体外受精造成不良影响。

另外鲜精稀释液中含有卵黄液、EDTA、柠檬酸钠、葡萄糖等,冷冻精液中除此之外还有冷冻保护剂等物质,精子在体外获能和体外受精时稀释液和冷冻液中的一些非必需物质和有害物质都要去除,精子洗涤就是精子筛选与有害物质去除过程,即将洗涤液加入鲜精或冻精中,经过离心、精子上浮等方法除去精清、死精、弱精,以及鲜精稀释液卵黄液等物质和冻精的冷冻保护剂,以获得高密度、

高质量和高活力的精子。

精子洗涤是精子体外获能的关键步骤，但是，精子洗涤离心中也容易对精子造成一定的损伤，因此，在精子洗涤离心中，尽可能是在最小离心力作用下，最短离心时间内筛选出高活力的精子，目前最常用的牛精子洗涤液为 BO 液和台氏液 TALP，常用的洗涤处理方法为直接洗涤法、Percoll 密度梯度分离法和精子上浮法。

直接洗涤法常用于鲜精处理，但也有人将冻精解冻后直接经 BO 液或 TALP 液离心洗涤后进行受精；该方法的优点是精子处理时间较短，损伤较小；但缺点是不能完全除去冷冻保护剂，对精液洗涤不彻底，影响体外受精效果。

Percoll 密度梯度分离法的理论依据是高活力的精子比活力差的精子密度大，离心后精子按密度大小分布于不同密度的梯度中，高活力精子可以在 Percoll 梯度的高密度区获得，但是，在实际操作中该法的精子分离效果并不理想。

精子上浮法（人医临床称上游法，swimming-up）是体外受精技术中用于精子筛选的最佳方法，受到了学术领域的普遍承认。具体步骤如下：

A：洗涤液预先装入无菌离心管，每管 5~7ml，在 CO₂ 培养箱预平衡 2h。

B：冻精细管 37℃解冻，剪去一头，把精液注入一小无菌离心管，管中遗留精液用于观察活力。

C：用吸管从盛放精液的小离心管中吸出精液，轻轻注入盛有洗涤液的离心管底部，离心管置于无菌烧杯中 45°倾斜，在 CO₂ 培养箱静置上浮 30~60min，此时死弱精子停留在下部卵黄液中，活力强的精子游上来进入上清液。

D：轻轻取出上浮精液管，吸取上清液，注入离心管中，2000rpm 离心 5min，弃掉上清液，只留离心管尖部少许液体，此时离心管底部的液滴中富含密集精子，精子密度可达 0.5×10^6 个/ml~ 5×10^6 个/ml。

精子洗涤中洗涤时间不能太长，离心次数不能太多，离心中容易对精子造成损伤，洗涤时间太长精子活力显著下降；但是如果不能完全除去稀释液和冷冻保护剂，精液处理不干净，也会影响受精效果。

(2)精子体外获能

牛体外获能液现在一般以 BO 液作为基础液，然后在其中添加肝素钠 20~30μg/mL，BSA 6mg/ml，配成 pH 为 7.8 的平衡盐溶液。

2.3 卵母细胞体外受精

2.3.1 卵母细胞预处理

从卵巢表面采集的卵母细胞置于小平皿中进行镜检，挑选 A、B 级卵母细胞移入清洗液，然后转入 CO₂ 培养箱平衡过的成熟液成熟 24h。成熟的卵母细胞在体视显微镜下可以看到第一极体，由于受卵丘细胞遮挡，有时看不太清楚，但调整卵母细胞的角度后可以看到，如果没有第一极体，则卵母细胞成熟不好，不能用于体外受精。

有些研究报道认为体外受精前应该用细嘴吸管反复吹打卵母细胞，或者用 1%透明质酸酶处理，以除去成熟卵母细胞周围的卵丘细胞，提高精子穿透卵母细胞的速度^[100]；但有些报道认为不应该在卵母细胞受精前除去卵丘细胞，即便要除去卵丘细胞也要等到受精后 48h 左右，因为卵丘细胞与卵母细胞的成熟关系密切，可能也与受精卵的早期发育有关^[101]。

成熟的卵母细胞无论是否除去卵丘细胞，一般在体外受精以前都要用平衡过的 BO 液洗涤 3~5 次，但也有报道认为卵母细胞体外成熟后可以不经洗涤直接移入受精滴进行体外受精。

2.3.2 卵母细胞体外受精

洗涤好的成熟卵母细胞连同 BO 液用吸管转移到一次性塑料平皿中，滴成 50μl 的小滴，每滴含 10 个左右卵母细胞，做好微滴后上盖石蜡油。

吸取获能处理的精液，注入卵母细胞微滴中进行体外受精。

牛羊等哺乳动物自然交配体内受精时受精部位的精卵比例一般为 1~15:1^[102]，体外受精时精卵比例为 10000~20000:1，如果精子活力很好，最低的精卵比例可以降到 500~1000:1。精子密度过低卵母细胞受精率下降，精子密度过高多精受精现象增加，同时囊胚的发育率下降。

2.3.3 精卵结合的不同步性

在精卵相遇前各自生理准备的同步性对于受精效果产生重大影响，精子过早

到达受精部位，或者精子在体外获能后放置时间过长，有可能在遇到卵母细胞之前已经发生了顶体反应，顶体酶过早释放，从而被抑制因子或自身水解酶灭活，这样精子便失去了受精能力。此外，准备受精的卵母细胞不成熟或老化，也不能完成正常的受精过程，只有精子获能准备与卵母细胞成熟准备同步进行，才能保证较高的受精效率。

2.3.4 卵母细胞受精时间

1996年孙青原、秦鹏春等通过对牛体外受精的程序及超微结构研究指出，体外成熟卵母细胞体外受精后精子入卵时间为3h，8h后原核形成；但也有报道认为精卵共同孵育不足16h会降低受精率^[103]；目前一般体外受精时间为18~24h。

2.3.5 提高精子活力的措施

精子活力的高低对于卵母细胞体外受精效果至关重要，高活力精子可以通过精子的预处理筛选而得到，也可以通过添加一些能够激发其活力的化学组分来实现。

(1) 血小板激活因子(PAF)

许多研究表明，血小板激活因子(Platelet Activating Factor, PAF)存在于牛、马、猪、兔和小鼠等动物的精子中^[104]，对提高精子的活力，促进顶体反应和体外受精均有一作用；对于雌性动物PAF具有促进血管扩张的功能，与排卵时的卵泡破裂有关，在生殖中发挥重要作用。

(2) 咖啡因

咖啡因是细胞内环核苷酸磷酸二酯酶的抑制剂，咖啡因及其盐类通过抑制磷酸二酯酶的活性而使精子细胞内第二信使cAMP浓度的升高，从而激发精子活力^[105]，促进精子顶体反应，提高精子与透明带的亲和力，以及与卵膜的融合能力，增强获能效果^[106]。在处理牛冷冻精液的过程中咖啡因得到了广泛应用，与肝素、BSA协同作用有效增强了冷冻精液精子获能的效果^[107]。

(3) PHE

PHE 是青霉胺 (Penicillamine)、亚牛磺酸 (Hypotaurine) 和肾上腺素 (Epinephrine)的混合物,许多研究表明在 BO 液中添加 PHE 可以降低过氧化作用导致的对精子的损伤^[108],明显延长精子的存活时间,极大地提高精子获能过程中对 Ca^{2+} 载体(IA)的耐受能力,从而显著提高精子活力和受精率^[109]。

这三种物质中,亚牛磺酸比较稳定,肾上腺素在光照、氧化剂和碱性环境下可氧化为细胞毒性物质,而青霉胺可以抑制肾上腺素的氧化。

(4)谷胱甘肽(GSH)

相关研究表明,谷胱甘肽(GSH)能够拮抗 BO 液中过氧化作用,改善精子生存环境,从而提高精子的生存能力与活力^[110]。

(5)其他

除了以上几种物质能提高精子活力外,有些报道认为在适当浓度范围内添加透明质酸酶、己酮可可碱(Pentoxifylline)和茶碱(Theophylline)均可不同程度地提高精子活力^[111-112]

2.3.6 异常受精

(1) 多精受精

体外受精中多精受精的机率较高,究其原因普遍认为有以下几个方面:

一是体外受精时卵母细胞周围的精子密度高。体内自然交配时,精子在生殖道运行过程中经过了筛选与淘汰,只有极少数的精子可以到达受精部位,精卵比为 1~15:1;而体外受精时,人为地把获能精子注入卵母细胞周围,密度高达 500~20000:1,高密度的精子为多精受精提供了条件。

二是体外受精所用的部分卵母细胞可能不完全成熟。卵母细胞经过成熟培养排出第一极体,说明卵母细胞的细胞核已经成熟,但是相关研究表明,细胞质的成熟滞后于细胞核的成熟,而且胞质成熟没有明显的生理标志,这样可能造成胞质不成熟的卵母细胞用于体外受精:不完全成熟的卵母细胞卵丘细胞、透明带和卵黄膜对精子的筛选与阻滞机制不完善,有可能导致多精入卵^[113]。

三是体外受精的受精卵原核形成时间较长,可能也是一个多精子受精的一个重要条件。

此外,受精液的 pH 值、组分及渗透压等均能影响受精效果,并造成多精受

精的可能。

(2)卵母细胞孤雌发育

在自然条件下，成熟卵母细胞只有在受精时才被精子激活排出第二极体，并开始卵裂；但在体外受精研究中在电镜下并没有发现精子进入卵母细胞的迹象，可卵母细胞如受精卵一样开始卵裂，后来的深入研究表明，成熟卵母细胞的卵裂不一定非由精子激活，而是很多刺激(如 6%的乙醇、离子霉素和低温等)都可以激活成熟卵母细胞，导致成熟卵母细胞的孤雌发育。

(3)核型异常

体外受精胚胎的染色体经常会出现一些单倍体和多倍体，这种核型异常可能是受精过程中对卵母细胞的异常激活或多精入卵引起的，核型异常的胚胎一般会早期死亡^[114]。

2.4 精卵识别的分子基础

成熟的卵母细胞停滞在第二次减数分裂的中期(MII)，在 MII 期卵母细胞细胞内代谢减弱，蛋白质和核酸的合成大幅度降低，DNA 合成停止。在遇到精子时，经受精刺激，成熟的卵母细胞从休眠状态中被激活。

精子与成熟卵母细胞相遇时，精子与成熟卵母细胞的表面有特异性受体(G蛋白偶联的受体或酪氨酸酶偶联的受体)结合，经信号转导诱导相应的生物学反应，精子与卵母细胞相互作用活化磷酸二酯酶(PDE)，PDE 作用于细胞膜上的 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)使其水解为 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP₃)和 1, 2-二酰基甘油(DAG)；其中 IP₃ 与 Ca²⁺贮存位点结合，促使 Ca²⁺从内质网释放；DAG 则激活蛋白激酶 C(PKC)，加速 Na⁺的流入和 H⁺的流出，使 pH 上升，从而导致精卵识别和受精。

2.5 卵母细胞受精后原核形成与融合

卵母细胞受精后，精子细胞核膨大，核膜呈泡状，进而核膜破裂染色质分散到卵子细胞质中，而且精子的染色质也从致密状态开始松散成为颗粒状或细丝状，随后泡状的核膜在分散的染色质周围集中形成许多小囊，这些小囊相互合并组成一双层结构的核膜，形成雄原核。

与此同时，卵母细胞完成第二次减数分裂，染色质首先分散，沿着分散的染色质边缘汇集了一些小囊，它们也逐渐融合形成一双层包膜，从而形成了一些内含染色质的小囊，称为染色质泡。随后这些小泡互相接近，包膜彼此合并形成一个形状不规则的雌原核。

雌雄原核逐渐移向卵子的中央，实现融合，染色体彼此聚拢在一起，使配子的单倍体恢复成为合子的双倍体，完成遗传物质的重组。

3 早期胚胎体外培养的生物学原理与研究进展

胚胎培养（IVC）是胚胎工程的重要环节。获得发育良好的体外受精胚胎、克隆胚胎或转基因胚胎，必须有一个良好的胚胎发育环境^[30]。一个好的培养体系就是要尽可能使胚胎发育到囊胚。

Bongso 总结囊胚培养的优点：

(1)克服体外培养第 2d 至第 3d(4~8 细胞期)的发育阻滞，提供生存性能极佳的胚胎。

(2)经较长时间的体外培养，有遗传缺陷的胚胎受到发育阻滞，而质量良好的胚胎得到继续存活发育，使移植胚胎具有选择性。

(3)以囊胚替代早期卵裂及未卵裂胚胎进行移植，为移植胚胎提供了更为生理性的生存环境。

(4)ICSI 后应用囊胚移植，可去除带有异常基因的胚胎。

(5)选出具有高细胞总数的胚胎，从而选择最具生存能力的胚胎移植。

(6)用酶除去囊胚的透明带后，以无透明带的囊胚进行移植，滋养叶表层直接附于子宫内膜，使植入更有保证。

(7)为解冻后的原核或卵裂期的胚胎提供一段时间进行评价及胚胎复原，再进行随后的移植。

(8)促进经 ICSI、胚胎活检和辅助孵化等显微操作后的胚胎恢复。

(9)囊胚移植入子宫后，缩短了胚胎继续发育与种植之间的时间，从而降低不良因素对胚胎—母体联系的影响。

(10)胚胎干细胞的发育，成为内细胞团(ICM)细胞的来源^[115]。

现有的培养体系还远远不能满足需要，如胚胎囊胚发育率低、胚胎耐冻力差、

流产率高和大胎综合症等^[116]，严重制约着胚胎工程发展。早期胚胎的体外培养系统比较复杂，包括培养液、温度、气相、湿度、pH 值、渗透压、离子浓度、能量来源、血清成分、光、水质和培养皿等等。不同物种的早期胚胎代谢具有差异性，而培养液的组成又极为复杂，这可能是造成各种胚胎培养基差异的根本原因。因为简单培养液不能较大限度地满足胚胎发育的需求成分，所以现在一般培养胚胎都用复合培养液。复合培养液中除含有简单培养液的成分外，还含有各种氨基酸、维生素和微量元素等其它成分。培养系统中的培养基成分和环境条件对胚胎的发育都有影响。

3.1 早期胚胎代谢特点

不同动物的早期胚胎代谢有一定的差异，同种动物胚胎发育不同阶段的代谢也存在差异，因而在体外培养胚胎时，各种动物或同种动物胚胎不同发育阶段所用胚胎培养基不尽相同。许多研究认为，早期胚胎发育不需要葡萄糖，而是以丙酮酸提供能量，如果早期胚胎培养液中含有葡萄糖反而对早期胚胎有毒害与阻滞作用^[117]。葡萄糖对早期胚胎发育的负面影响可能是因为早期胚胎缺乏糖代谢酶(如磷酸果糖激酶)，以致无法利用葡萄糖作为能量底物，糖原的异常积累而无法即时分解，就会导致卵裂球膨胀裂解，发育阻滞；同时高浓度的葡萄糖在代谢过程中容易产生氧自由基，破坏核酸和蛋白质等，使细胞丧失功能^[118]。也有学者认为，高浓度的葡萄糖抑制早期胚胎的三羧酸循环，从而抑制其发育。

但是，葡萄糖对于稍后的胚胎发育是非常重要的。在小鼠卵裂球致密期时向丙酮酸/乳酸培养基中加入葡萄糖有利于小鼠胚胎从桑椹胚向囊胚转变，如果没有葡萄糖，小鼠胚胎将停滞于桑椹胚期。

3.2 早期胚胎基因组的激活与启动

哺乳动物的早期胚胎发育由卵母细胞成熟过程中所积累的蛋白质和 mRNA 驱动，早期卵裂时期的转录导致蛋白质合成在质和量上的变化，从而产生控制转录的母本/胚胎转换(Maternal-embryonic Transition, MET)。由母型调控转入胚胎型主动调控需要胚胎基因组的启动，使遗传信息翻译成蛋白质，参与胚胎的各项功能活动。

早期胚胎的胚胎型基因组启动时间因动物不同而异,在牛早期胚胎的胚胎基因组的转录活性发生在 8C 期以后;小鼠始于 2C 期^[119-120]。对于牛的早期胚胎来说,胚胎型基因组启动之前,添加抑制剂抑制基因转录活动,不影响合子的卵裂,但却能阻滞 8C 期卵裂;这充分说明,牛早期胚胎在 8C 之前的蛋白质合成,是依赖于母型转录活动完成,而 8C 以后则需要胚胎型的调控转录。此外,在研究胚胎早期卵裂阶段 RNA 变化时人们发现,在胚胎发育过程中胚胎的 RNA 总量不但没有减少,而且还不断增加,到囊胚期 RNA 增加更加明显,这主要是胚胎基因组激活和转录的结果^[121]。

3.3 早期胚胎发育阻滞

早在 1970 年, Bowman 等就发现体外培养的哺乳动物早期胚胎存在着发育阻滞现象(Development Block),这种体外发育障碍的存在,使得体外受精技术的利用和体外胚胎的生产受到严重制约。

哺乳动物早期胚胎发育阻滞既具有普遍性,又具有种质特异性,它与胚胎基因组的激活与启动有密切关系。小鼠早期胚胎发育阻滞发生在 2C 期;仓鼠在 2、4、8C,大鼠在 4~8C,猪在 4C,猕猴、牛、绵羊均发生在 8~16C 期,山羊在 1C 期;兔发生在 16C 期,猪在 4C 期,人 4~8C 期^[122]。因此,如何克服胚胎体外发育阻滞现象,将体外受精卵培养成能够具有活力的可操作的桑椹胚或囊胚一直是胚胎体外培养的研究热点。

胚胎发育阻断与胚胎由母源性基因控制向胚胎自身基因组控制转变(母体合子基因转移, Maternal-zygote Transition, MZT)有关。在阻断培养条件下, CyclinB₁ 仍然能够正常合成且存在于细胞胞质中,用 cdc2 激酶诱导,在 2C 胚胎(无阻断) CyclinB₁ 核内增加,这一结果说明 CyclinB₁ 在 G1/M 过渡时期的运转是主要的,而且 cdc2 激酶能调控 Cyclin B₁ 的位置^[123]。培养液成分如葡萄糖,磷酸根及对外围环境不适应都可引起胚胎发育阻断。小鼠胚胎的 2C 发育阻断,可以通过优化培养条件,使其基因表达更接近体内生长的胚胎,从而发育到囊胚阶段。培养液也影响胚胎的遗传信息的表达,如小鼠 H19 基因表达就依赖于所用的培养液^[124]。在研究胚胎体内发育特性的基础上,完善胚胎培养体系,是必不可少的步骤,这样才能使体外胚胎发育质量等同于体内胚胎,从而提高体外胚胎生产效率。

相关研究表明,哺乳动物早期胚胎体外发育阻滞与胚胎基因组激活有关,通过对小鼠、牛、山羊和猪的胚源基因激活期的研究,有些研究人员认为发育阻滞多发生在胚胎母型基因调控向胚型基因调控转化的过程中,即胚型基因激活时期,发育阻滞可能与胚型基因激活不完全或激活失败有关;而 Qiu(2003)等的研究结果表明,早期胚胎发育阻滞不是胚型基因激活不完全或激活失败,而是胚型基因激活延迟^[125]。

3.4 早期胚胎发育阻滞的突破

哺乳动物早期胚胎在体外培养过程中,胚胎的物质代谢、培养液 pH 值、离子浓度和营养组分等多种因素均可影响其正常发育,导致发育阻滞。因此,通过调整培养基组分或者添加某些特殊物质可以帮助早期胚胎突破发育阻滞期。

Chatot 等(1990)在小鼠早期胚胎发育阻滞的研究中发现,在小鼠早期胚胎培养液中加入葡萄糖会抑制其发育,而培养液中以谷氨酰胺取代葡萄糖可以使小鼠胚胎突破 2C 阻滞^[126]。Larson 等(1992)在牛早期胚胎培养研究中发现,添加纤维连接蛋白和 TGF- β 等生长因子能够促进牛早期胚胎突破 8C 阻滞;牛早期胚胎与输卵管上皮细胞共培养,可克服 8~16C 阻滞^[127]。王海滨等(2000)在早期胚胎培养液中除去葡萄糖和磷酸盐,添加果糖、牛磺酸、EDTA、谷氨酰胺和氨基酸,结果改善后的培养液可以使小鼠早期胚胎突破 2C 阻滞发育到囊胚,囊胚发育率高达 85%。

3.5 胚胎体外培养条件及其影响因素

体外受精、体外培养的早期胚胎只有发育到桑椹胚或囊胚后才有希望移植后获得较高的妊娠率,多年来科技人员对体外生产胚胎进行了艰苦卓越的研究,许多哺乳动物卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养都获得了成功,而且很多试管动物诞生,但是直至今日,利用卵母细胞体外生产胚胎的培养条件仍旧缺乏系统而一致的理论依据,也几乎不存在系统而程序化的培养方案,因此,体外生产胚胎仍然处于探索阶段,只有在试验研究中不断改善培养条件才能在提高胚胎发育率的经验积累中建立和完善胚胎体外培养体系。目前体外早期胚胎体外培养体系基本上可分为两类,一类是合成培养液胚胎体外培养体系,一类是体细胞及体

内大分子物质与胚胎共培养体系。

合成培养液胚胎体外培养体系，是模拟胚胎发育的体内环境，通过人工合成成分确定的早期胚胎培养液，如 TCM199, CRLaa 或 SOF 液等，后两者以 TCM199 为基础添加 BSA，维生素、氨基酸和抗氧化剂等物质形成新的胚胎培养体系。合成培养液胚胎体外培养体系成分明确，有助于了解早期胚胎发育过程中每一种物质对胚胎的作用效果，因而主要应用于早期胚胎发育机制研究。

体细胞及体内大分子物质与胚胎共培养体系，主要利用生殖道上皮脱落物、卵丘细胞和血清等与早期胚胎共同培养，以最接近体内环境的培养体系促进胚胎发育，提高胚胎发育率，Benjamin 等(1993)利用血清添加的培养液(TCM199+血清)与早期胚胎共培养，囊胚发育率达 40%^[128]，Eyestone 等(1989)用输卵管单层上皮与牛早期胚胎共培养，桑囊胚发育率达到 43%^[129]。大量的研究报道证明上述体细胞和血清与胚胎共培养可以有效促进早期胚胎体外发育，但 Van Inzen(1995)认为，除了上述体细胞与胚胎共培养效果良好外，其他体细胞类型(皮肤、睾丸、肝)的条件液也能维持牛胚胎体外发育^[130]。

早期胚胎培养体系虽然尽可能地模拟体内环境，但远远达不到体内发育的条件。胚胎在雌性动物输卵管发育时，处于微量的液体环境中，胚胎自身分泌的活性因子能够参与胚胎发育的基因组激活和后期发育中，但是，在体外培养时，胚胎处于相对过多的胚胎培养液中，自身分泌的活性物质和信号物质被稀释，失去其生物功能，因而在体外培养中研究人员应用不超过 50 μ l 的微滴进行早期胚胎培养，以减轻液体环境对胚胎活性物质的稀释，Lane 等(1992)研究结果表明，降低培养液体积可以提高小鼠受精卵卵裂率和囊胚率，并可以显著提高胚胎成活率^[131]。

此外，胚胎从雌性动物输卵管运行到子宫的整个发育过程中，随着胚胎发育阶段不同及所处生殖道部位不同，胚胎对营养组分和液体环境的要求也在不断变化，母体为胚胎提供的液体环境也不尽相同，母体为胚胎提供的发育环境处于一种动态变化之中，而且，在胚胎在生殖道运行过程中，生殖道相关腺体分泌的因子也在对胚胎的发育进行调控，Mermillod 等(1993)指出，来自牛输卵管液中的 2 个因子支持了牛胚胎发育，小于 10KDa 的低分子量物质使胚胎达 5~8C，另外一种高分子量的物质则允许胚胎由 8C 发育到囊胚^[132]。与体内环境相比，在体外

培养时，培养体系是静止的、孤立的，因而具有相当的难度与不稳定性。胚胎体外培养体系受培养液组分、pH 值、培养温度和气相条件等多种因素影响，要做好早期胚胎的体外培养需要以下几个方面：

3.5.1 离子因素

无机盐离子是胚胎培养液的重要组成成分，直接或间接参与胚胎的代谢过程，可以维持培养体系的渗透压、缓冲酸碱度，对于胚胎的正常发育发挥着至关重要的作用。如适宜的渗透压、钠钾比例、钙镁比例和磷酸盐缓冲系统等都与胚胎发育有直接的关系。

早期胚胎培养液离子组分的确定是以哺乳动物妊娠早期雌性生殖道液体离子组成为依据。哺乳动物输卵管液以高浓度的 K^+ 和 Cl^- 为特征，培养液中高浓度 K^+ 对精子获能和胚胎发育有益，但也有相反的结论。在不同动物的生殖道中离子浓度和物理环境有差异。如猪输卵管液中， K^+ 浓度 12.4mmol/l，比绵羊(8.12 mmol/l)和牛(4.53 mmol/l)高。据检测，妊娠早期哺乳动物输卵管中含有高浓度的 K^+ 和 Cl^- ，Roblero 等(1990)研究表明，早期胚胎培养液中高浓度的 K^+ 代替部分 Na^+ 有利于胚胎发育，早期胚胎培养液中的 Na^+/K^+ 比值显著影响牛胚胎的体外发育，最适宜的 Na^+/K^+ 比值为 114: 3.2^[133]。

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 也是胚胎体外培养所必须的有效成分， Ca^{2+} 对于维持细胞膜的稳定性、通透性及细胞之间的联接发挥重要作用，这对于桑椹胚细胞间紧密联结和囊胚的形成与扩展至关重要， Mg^{2+} 是构成酶活性中心的重要组分，特别是糖酵解和三羧酸循环中许多酶的辅酶，这些酶与辅酶直接关系到能量代谢能否正常进行，研究表明，缺乏 Ca^{2+} 会显著降低牛胚胎发育的囊胚率，缺乏 Mg^{2+} 会制约牛早期胚胎正常发育。

Zn^{2+} 对早期牛胚胎在体外发育有显著的促进作用， Cu^{2+} 对早期牛胚胎在体外育有强烈的抑制作用。

在早期胚胎体外培养中，很多离子都很关键，但是对于一个培养体系来说，离子之间存在非常微妙的相互协同和相互拮抗作用，所有离子之间必须充分协调才能达到良好的培养效果。

由离子浓度决定的渗透压对胚胎发育也有影响，普通情况下，250~

300mOsm 较为理想。V.T.Nguyen(2003)认为渗透压比 Na^+ / K^+ 比对猪胚胎发育到囊胚影响更大。而且得出优化渗透压为 4C 前为 290 (280~320) mOsm, 之后为 256 (220~270) mOsm[134]。目前, 大多数胚胎培养液用 $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ 缓冲系统以维持生理性的 pH (7.2~7.4)。培养液含 NaHCO_3 是与气相培养箱中 5% CO_2 维持平衡, 也是体液生理缓冲系统。在体外, 空气易使 pH 升高, 损伤胚胎。体外用磷酸盐缓冲液替代。目前, 培养液研究应用在离子浓度和渗透压方面已经成熟。

3.5.2 营养因素

哺乳动物卵母细胞体外受精后, 从受精卵发育到桑椹胚、囊胚, 在整个发育过程中胚胎对营养的需求会随发育阶段的不同出现差异, 而且在营养消耗的同时胚胎自身代谢产物增加, 有害物质积累, 因而深入研究体外培养的营养因素十分重要。

(1) 能量物质

用于早期胚胎体外培养的能量物质主要有葡萄糖、丙酮酸, 葡萄糖和丙酮酸分别通过糖酵解途径和氧化磷酸化途径提供能量, 这两种物质在胚胎发育的不同阶段发挥的作用不同。

在不同物种的生殖道内, 能量物质的浓度也有差异。如猪输卵管液中能量物质的浓度如丙酮酸 0.21 mmol/l; 乳酸 5.17 mmol/l; 葡萄糖 0.59 mmol/l。比小鼠 (分别是 0.14; 4.26; 5.19); 兔子 (0.30; 3.67; 1.46) 和人 (0.32; 10.50; 0.50) 都低^[135]。所以在配制培养液时, 应该针对不同动物胚胎提供不同的能量组合。

早期胚胎发育能量来源可能有两种机制: 通过利用葡萄糖 (G) 的糖酵解途径和以丙酮酸或草酰乙酸为底物的氧化磷酸化途径。研究发现, 在胚胎致密期前后, 使用氧化磷酸化抑制剂的效果明显的不同。鼠, 牛和猪胚胎使用这种抑制剂胚胎在致密期后能继续发育, 在致密期前则发育严重抑制^[136]。因此胚胎发育时期不同, 能量代谢途径也不同。J.E.Swain 等报道, 不论是体内猪胚胎还是 IVF 胚胎, 都是通过糖酵解利用大部分葡萄糖。体内检测发现几种动物输卵管液中都含有不同量的葡萄糖(牛为 5~10 mmol/l、兔和绵羊为 1.5 mmol/l、小鼠为 5.2 mmol/l)。体外研究也发现, 小鼠在 8C 后才代谢葡萄糖, 而牛胚胎早在 2C 期即

产生葡萄糖代谢，且在 8~16C 期和扩张囊胚期葡萄糖代谢呈大幅度增加。Wang 在 2~4C 牛胚胎与输卵管细胞单层共同培养时，在培养液中分别添加了浓度为 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 的葡萄糖，观察其对体外发育的影响，培养 7 d 后发现桑椹胚和囊胚百分率分别为 37.1%、4.5%、1.4%和 0。这表明，高浓度的葡萄糖阻滞了牛体外胚胎的发育。有报道培养液中的葡萄糖和 Pi 对早期胚胎发育有抑制作用，还能降低呼吸和破坏线粒体结构^[137]。也有实验表明，当培养液中无 Pi 时，葡萄糖并不能阻断胚胎的发育^[138]。当葡萄糖加入 SOF 时随着浓度增加，囊胚率下降，在无 Pi 存在时也是如此^[139]。但有些学者认为牛胚胎和仓鼠胚胎只有培养液中有 Pi 存在时，葡萄糖才有抑制作用^[140]。以上结果表明，葡萄糖对牛胚胎发育的影响取决于发育时期和培养液中是否有磷酸根。

乳酸和丙酮酸也是胚胎能量代谢所需的重要物质。Narinder.K 等（2000）实验得出，牛体内胚胎和 IVF 胚胎的代谢过程基本相同，但也有各有特点，如 IVF 牛胚胎囊胚产生的乳酸是同期体内胚胎的 2 倍。乳酸的产生也许是为了维持细胞内氧化还原态的平衡。在牛输卵管液中葡萄糖的浓度约为 0.28mmol/l、乳酸 2.5mmol/l、丙酮酸 0.5mmol/l^[141]。人、绵羊、猪、牛等胚胎葡萄糖代谢方式相同。牛胚胎在 8~16C 阶段葡萄糖代谢明显增加，这个时期也是胚胎基因组激活时期，然而超排牛胚胎在 16C 后和桑椹胚期葡萄糖的代谢才增加。Narinder K 等（2000）还发现丙酮酸与乳酸的代谢相互影响，当培养液中加入 25 mmol/l 乳酸时，丙酮酸的利用率就下降。丙酮酸与乳酸的比例减小时，有利于牛胚胎的发育，而抑制仓鼠胚胎的发育，也对牛和马胚胎初期发育有抑制作用，马胚胎发育到囊胚以前主要以丙酮酸为能量来源。但是乳酸对仓鼠胚胎发育是必要的。乳酸则抑制猪胚胎的发育，且丙酮酸对猪胚胎发育也是必要的^[142]。但是 Kazuhiro 等通过猪胚胎试验需求能量的对比分析得出一个较好的能量供给方案，0~2d 用丙酮酸和乳酸，2~6d 使用葡萄糖，有较高的囊胚发育率和内细胞团细胞数^[143]。丙酮酸可转化为丙氨酸，从而起到清除人胚胎代谢氨的作用^[144]。丙酮酸也是抗氧化剂，能减少胚胎对氧化应激的敏感程度^[145]。

Thompson 和 Harvey 等研究表明，通过磷酸化抑制剂抑制丙酮酸的氧化磷酸化可以严重抑制胚胎致密期之前的发育，而不能抑制胚胎致密期之后的发育，说明胚胎在胎致密期之前的发育主要通过丙酮酸的氧化磷酸化途径提供能量。同

样，通过乙烯二胺四乙酸抑制剂抑制糖酵解可以严重抑制胚胎致密期之后的发育，而不能抑制胚胎致密期之前的发育，说明胚胎在胎致密期之后的发育主要通过葡萄糖的糖酵解途径提供能量^[146-147]。此外，有关资料认为，在致密期之前的早期胚胎不但不能利用葡萄糖，而且在葡萄糖存在的情况下会对胚胎早期发育产生明显的抑制作用，但是，葡萄糖对于胚胎发育后期(桑椹胚或囊胚)十分重要。

体外研究发现小鼠胚胎在 8C 期开始代谢葡萄糖，牛胚胎在 2C 期开始，在 8~16C 期葡萄糖代谢大幅度增加，在缺乏葡萄糖时，丙酮酸作为能量物质可以支持胚胎发育；但在乳酸存在的条件下，丙酮酸作用受到限制，另外乳酸盐和丙酮酸的比例也是影响胚胎的发育的一个重要原因^[148]。

总之，在胚胎发育的全过程中，各种能量物质存在密切的协同与拮抗作用，三者的相互协调才能保证早期胚胎的正常发育。

(2)氨基酸

氨基酸是早期胚胎培养的一种重要物质，在正常生理情况下，哺乳动物输卵管和子宫中含有 20~25 种哺乳动物所需要的必需和非必需氨基酸，这些氨基酸在胚胎生长发育过程中发挥着不可替代的重要作用。

氨基酸除作为蛋白质合成的必备物质外，还用作能量物质。有许多研究证明，谷氨酰胺是胚胎代谢的主要氮源，可以促进胚胎细胞的早期分裂，增强胚胎体外发育能力^[149]，在乳酸钠存在的情况下，谷氨酰胺对于卵母细胞体外成熟和胚胎体外发育有明显的促进作用；牛磺酸除了能够促进胚胎发育外，还具有抗氧化作用和解毒作用，甘氨酸可以维持细胞内渗透压，增强胚胎对高离子浓度环境的抗逆能力^[150]。此外，许多研究表明，在早期胚胎培养液提高氨基酸的含量可以显著提高卵裂率和囊胚率。谷氨酰胺对小鼠、仓鼠和猪等起到了胚胎能量基质的作用。加入谷氨酰胺可使仓鼠、猪胚发育通过阻滞期，牛胚胎早期阶段与桑椹胚、囊胚期相比，谷氨酰胺代谢水平较高，由此可见，谷氨酰胺对于早期胚胎发育是一项重要的能量来源。在输卵管和子宫液中发现了 20~25 种哺乳动物所需要的必需和非必需氨基酸，可见氨基酸对胚胎发育的重要性。目前，在牛早期胚胎培养基 mSOF 和 CR1aa 中，谷氨酰胺的添加量一般为 1 mmol/l^[151]。其它氨基酸则分为必需氨基酸(EAA)和非必需氨基酸(NEAA)2 种，添加量分别为 2%(V/V)和 1%(V/V)。在小鼠胚胎培养液中添加氨基酸后显著的提高了囊胚发育率。牛胚胎

在发育过程中，对氨基酸的需求也有变化，在发育早期，需添加 NEAA 和谷氨酰胺，4d 后，才需要 EAA，增加囊胚的形成和细胞数^[152]。氨基酸还可作为能量底物和 pH 值稳定因素。氨基酸能促进胚胎的发育，但不能抑制囊胚细胞的凋亡。氨基酸也有利于内细胞团细胞数的增加^[153]。兔输卵管液中含有较高水平的甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸和丝氨酸。人和小鼠输卵管液中也含有高水平的谷氨酰胺。Gardnerh 和 Lane (1993) 通过氨基酸对小鼠合子发育的影响，发现卵裂率、囊胚率和孵化率可因加入高水平的氨基酸而得到显著的提高；相反，低水平的氨基酸加入后导致卵裂率和孵化率的显著降低。氨基酸类型不同，对胚胎发育的影响也有差异。Bavister 和 Arlotto (1990) 发现天门冬氨酸、甘氨酸、组氨酸或丝氨酸对仓鼠胚胎有激活作用，而半胱氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和缬氨酸则有抑制作用。另外氨基酸在常温下要降解释放氨，对胚胎有伤害作用，培养液中添加有氨基酸时，要低温保存，而且在培养过程中，培养液要每隔 48 h 换液一次^[154]。

牛羊早期胚胎培养液(牛 CRlaa, 羊 SOF)中谷氨酰胺的含量为 1mmol, EAA 和 NEAA 添加量分别为 2%(V/V)和 1%(V/V)。

(3)蛋白质

胚胎发育阻滞和胚胎基因组转录都与胚胎内蛋白质合成有关，胚胎培养液中蛋白质含量不足与过剩都会对早期胚胎发育有一定的影响，因此，蛋白质也是早期胚胎培养的一种重要物质。用于早期胚胎培养的蛋白质来源主要有血清和牛清白蛋白(BSA)。

血清中含有许多物质，如蛋白质、氨基酸、碳水化合物、微量元素、激素、螯合金属离子及各种多肽类生长因子(生长因子、细胞粘着和扩展因子及不确定因子等)^[155]，这些物质成分复杂，协同紧密，很难确定每种成分的具体作用方式。血清的生物活性差异很大，所以使用血清很难建立一个稳定的培养体系，而且血清成分复杂，虽然能给胚胎提供生长因子，但可能引起代谢产物氨浓度的升高，并且可能是导致大胎综合征的原因之一^[154]。在胚胎培养过程中，血清也能影响基因表达，如用 M16+FCS 培养小鼠胚胎，出生胎儿重量高于无血清培养基的，而且 H19 和 IGF2 基因表达下降，Grb10 基因表达增加。生长因子受体及 Grb7 在 M16+FCS 中表达明显下降^[155]。当培养液中有血清时，胚胎颜色变暗，有颗

粒，而且增加了糖酵解率^[156]。1C 小鼠胚胎在 M16 培养液中，培养 4d 后 92% 胚胎发育到囊胚及孵化胚，当有 5% 的 FCS 时，只有 50% 发育到囊胚，10% 血清时，只有 35% 发育到囊胚，因此血清抑制 1C 小鼠胚胎的发育。但当 2C 使用 M16 培养时，99% 的发育到囊胚，M16+5% 或 10% 时，85% 的胚胎发育到囊胚阶段^[157]。在无血清条件培养胚胎，第一次卵裂和第四次卵裂时间延长，而有血清培养时，仅第四次卵裂延长，而且易出现早熟囊腔，但出现的正常囊胚也比无血清培养基早 16~18h^[158]。培养液中添加血清增加了胚胎脂滴，且能改变了线粒体的结构，所以有学者受精后 3d 内不加血清，能生产高质量的胚胎。J.G.Thompson 等(1998) 用 SOF 分别添加 BSA、FCS 和活性炭处理过的 FCS 培养牛胚胎，发现在致密桑椹胚前后差异不明显，但含 BSA 中囊胚率最低，而炭吸附血清组重复性高，且生产比在 BSA 中更多的可用胚。胚胎移植后，在 FCS 组中妊娠率最低^[159]。现阶段，尽管血清成分复杂，胚胎培养中还是普遍应用血清，特别是 FCS。FCS 有双重作用，卵裂早期抑制胚胎发育，致密期有促进作用^[160]。培养过程中，在后期才添加血清。在胚胎发育后期，血清的作用非常显著。所以，血清对早期胚胎发育具有双重作用，血清对于受精卵(牛受精卵 1-C 期)的卵裂有制约作用，但对桑椹胚的发育和囊胚的形成有促进作用，因此有人认为在卵裂前期的培养液中不加血清，而在胚胎发育后期加入血清以提高胚胎质量，至于血清对于胚胎发育前期与后期的作用机制目前尚未研究清楚。

BSA 对胚胎发育的作用还没完全清楚，部分原因是其中有许多非限定因子，如柠檬酸和脂质转运蛋白等，它们也许能被胚胎吸收，或被分解为氨基酸提供代谢底物，螯合金属离子可以消除毒性物质^[161]。M.Kuran 等用 SO (Fsynthetic Oviducta Fluid)^[162]作为基础培养液，分别添加 10%FCS、4mg / mLBSA 和 3mg/ml PVA 培养牛胚胎，卵裂率在含血清中最低 (61±3%)，由 BSA 为 76±3%，含 PVA 的为 72%，但含 PVA 在 7d 囊胚率仅为 12±2%，8d 为 21±4%，比添加血清的培养液 (分别是 33±3%；40±3%) 和含 BSA 培养液 (分别是 30±3%，37±4%) 的囊胚率都低。在 BSA 培养液中囊胚直径和内细胞团细胞数比其它两种培养液都高^[163]。

(4) 维生素

胚胎培养液中有时会添加维生素，但维生素对胚胎发育的作用机理尚未了

解。根据各种维生素的生理功能, 研究人员推测 VE, Vc 和 VB 对有胚胎体外培养具有促进作用。VE 具有抗氧化功能, 可以保护细胞免受氧化损伤, 在抗氧化方面 Vc 有协同作用, VB 族是碳水化合物和氨基酸代谢的不可分割的部分, 可能在培养发育中起重要作用, 但是目前对其作用机制尚不清楚。

3.5.3 调控因素

(1) 生长因子

生长因子作为细胞功能调节的信号传导物质对于胚胎早期发育的调控作用相当重要, 生长因子虽然微量, 但是活性很强, 它的表达可以促进或抑制胚胎的生长和发育。参与胚胎发育调控的、输卵管或其它体细胞所分泌的生长因子主要有胰岛素生长因子(IGF1 和 IGF2)、表皮生长因子(EGF)、转移生长因子(TGF- β)、血小板生长因子(PDGF)、白血病抑制因子(LiF)和活性素 A(Activin A)等均能刺激胚胎的发育。这些生长因子来自母体生殖道的旁分泌或者胚胎本身的自分泌, 均对胚胎的发育产生重大影响, 同时在胚胎细胞信号传导的研究中, 研究人员在胚胎发育的不同阶段发现了多种生长因子受体^[168-170], 这说明不同发育时期的胚胎对不同生长因子的需求量不同, 如小鼠胚胎从 2C 开始表达转化生长因子 β 1(TGF- β 1), 8C 开始表达表皮生长因子(EGF), 桑椹胚和囊胚期表达需要血小板生长因子 A 链(PDGF-A Chain)以及转化生长因子 α (TGF- α), 对此, 在早期胚胎培养液中添加这些生长因子时, 要注意胚胎不同发育阶段选择不同的生长因子, 这样才能促进胚胎的正常发育。生长因子作为细胞功能调节的信号因子, 作用相当广泛, 由于其在微量下就可以表现高活性, 促进或抑制细胞的生长和发育, 因而对哺乳动物早期胚胎发育具有正、负调节作用。但是, 关于调节的机制以及哪些生长因子对胚胎发育的哪一个阶段起作用, 还有待于进行更为深入的研究。

K.Yoshioka (2000) 在培养液中加 10 ng/mL 重组人活化素能显著缩短牛胚胎第 3 次卵裂的时间, 而且细胞数比对照数有明显增加^[164], 并且牛胚胎在 1C 到囊胚都表达编码活化素受体 mRNA^[165]。N.R.Mtogo(2003)报道生长因子和 GH 益于牛卵母细胞成熟和发育、而且增加了胚胎解冻后的存活率^[166]。Sabine Kolle 发现 GHR (生长激素受体) 基因在 2d 牛胚胎中转录, 6d 时为 2d 时的 5.9 倍。通过电镜观察, GH 使 6~8d 胚胎糖原储存减少, 增加脂质胞吐现象, 说明 GHR 能调节碳

水化合物和脂质代谢^[167]。卵丘细胞共培养液中分离出胚胎生长因子，纯化确认是 TIMP-1(金属蛋白酶组织抑制因子)，它能促进胚胎从桑椹胚到囊胚的转变和胚胎细胞数的增加。其通过抑制金属蛋白酶的活性起稳定胞外基质的作用，此外也有生长因子的功能^[168]。在牛胚胎发育到桑椹胚到囊胚时期，也有 TIMP-1mRNA 转录，这说明在胚胎发育后期，自身也能分泌 TIMP-1^[169,170]。IGF-1 对不同哺乳动物卵母细胞和胚胎发育有明显的影响。培养液中添加 IGF-1 主要是降低细胞凋亡和促进细胞分裂^[171]。在无血清培养基中，IGF-1 作用显著。低浓度 IGF-1 也被证实能改善鼠、人和兔胚胎的囊胚发育率。高浓度(100 ng/ml)时，并有共培养细胞时，才对牛胚胎生长有作用^[172]。而 H.J.Herndez 等(2002)得出 50 ng/ml 的 IGF-1 足够使 4C 牛胚胎发育到囊胚阶段^[173]。通过 RT-PCR 法，牛和其它一些哺乳动物胚胎中表达 IGF-1 受体蛋白。在 1C 牛胚胎中，就有 GH 或 IGF-1mRNA 存在，而且 IGF-1 在输卵管的浓度在胚卵期就增加^[174]。添加 GH 或 IGF-1 能提高囊胚率。GH 能增加鼠胚胎的发育，但作用能被 GH 受体抗体抑制。卵母细胞成熟后，在牛胚胎 8~16C 前，IGF 浓度逐渐下降。8~16C 后，IGF-2 和其受体 IGF-1 受体 mRNA 又逐渐增高。人 IGFs 及其受体 mRNA 在 2~4C 开始增加，在孵化后 IGFsmRNA 才大量增加。牛早期胚胎不能合成 IGF-1 蛋白，说明旁分泌产生 IGF-1^[175]。胰岛素对小鼠、猪的胚胎发育均有促进作用。经间接免疫荧光分析，小鼠胚胎细胞膜上的胰岛素受体是在发育至桑椹胚和囊胚阶段才出现的，未受精卵、2C、4C 和 8C 上均无荧光标记。通过 RT-PCR 检测发现牛胚胎和绵羊胚胎在早期发育的所有阶段均有胰岛素的受体基因表达，而在绵羊早期胚胎发育过程中没有检测到胰岛素基因的转录。这表明，小鼠仅发育至 8-C 后才受胰岛素的调节作用，而牛和羊胚胎在发育的整个阶段都受到胰岛素的调节。胰岛素能通过促进桑椹胚和囊胚期 RNA 和 DNA 的合成、氨基酸的转运和葡萄糖的代谢来促进胚胎发育。

生长因子的信号传导机理、作用途径和作用方式，以及生长因子之间的协同作用还有待于更为深入的研究。

(2)激素

在早期胚胎体外培养中应用激素的研究较少，Iwata(2003)为了改善早期胚胎体外培养条件，研究了生长激素(GH)在胎牛血清(FBS)和牛血清白蛋白(BSA)协

同下对牛早期胚胎不同发育阶段的作用效果。研究表明,在牛卵母细胞体外受精后 18~48h(1~8C 期胚胎)的胚胎培养液中,不管是否有 FCS 或 BSA 存在,添加生长激素(GH)对于胚胎发育没有任何影响,体外受精后 48~120h(5C-桑椹胚胚胎),在 BSA 存在的情况下,添加生长激素(GH)能增加囊胚中细胞数量,而 FCS 单独存在时添加 GH 没有此协同效果:体外受精后 120~192h(桑椹胚-囊胚),在 FCS 存在的情况下,添加生长激素(GH)能提高囊胚率,增加囊胚内细胞的数量^[176]。

3.5.4 环境因素

(1) 培养液对胚胎发育有重要的影响

不同物种胚胎培养液不同。小鼠胚胎使用 CZB 培养液较为理想,能有效的克服胚胎发育阻断。CZB 发现后,就采取 1.0 mmol 的谷氨酰胺取代葡萄糖,克服葡萄糖对胚胎发育抑制作用,并加入 0.1 mmol EDTA 配制而成。猪胚胎培养使用 NCSU23 比较好,能支持胚胎发育到囊胚。J.E.Swain 等使用 NCSU23 和 G1.2/2.2 培养猪胚胎,发现在卵裂率和囊胚发育率方面,NCSU23 要优于 G1.2/2.2^[177]。但是,在牛胚胎培养中,SOF 常用作基础培养液。Gutierrez 得出含有 10%的 FCS(胎牛血清)的 SOF 比无血清培养液培养的胚胎发育快且囊胚率高(47.5%vs34.4%),但是也增加了雄性胚胎的比例。共培养囊胚发育率低(27.6%~28.3%)。在培养初期,血清会明显的降低卵裂率^[178]。因此,在培养初期培养液中不添加血清较好。Rebecal (1999)^[179]通过对比不同培养液对牛胚胎发育的影响发现,SOF、G1/G2 和 HECM-6 对胚胎囊胚发育率无明显差异(41%、36%和 46%)。但 HECM-6 优于 G1/G2 培养液。培养前 3d,培养液中除去 BSA 对胚胎发育无明显影响,但后 3d 无 BSA 则囊胚发育率明显的降低(19%)。Young Gie Chung 等发现克隆胚胎和正常胚胎所需的培养液有些不同^[180]。Y.H.Choi (2002)发现 mSOF 比 mCR2aa 更有利于克隆牛胚的发育,而且培养液中高分子物质 72 h 前添加 BSA,之后用 FBS 替代,能显著提高囊胚发育率^[181]。培养条件也能影响胚胎代谢,在限定性培养液中胚胎糖酵解率低于有血清培养液^[182]。

(2) 共培养体系对胚胎发育的影响

共同培养(Co-culture)是应用辅助细胞或饲养细胞与胚胎在体外一起培养,促

进胚胎的发育，提高囊胚率的。共培养细胞能分泌胚胎营养因子和清除培养液中的毒性代谢产物^[183, 184]，改善胚胎的发育，顺利通过阻滞。D.Rizos 用卵丘细胞作共培养获得囊胚数比对照组高，且冷冻后存活率好，说明共培养体系能增加囊胚耐冷冻能力^[185]。用于共培养的体细胞类型很多，如 BOEC(牛输卵管上皮细胞)，CC(卵丘细胞)等，建系的细胞如 BRL(BuffaloRat Liver Cells)和 Vero cells(绿猴肾细胞)等单一无病原的共培养细胞^[186]。共培养细胞类型不同，对胚胎发育也有差异。L.M.C.Pegoraro 等(1998)分别用 BOEC 和 Vero 共培养体系培养牛胚胎，发现 Vero 优于 BOEC 体系^[106]。D.Izquierdo 分别用输卵管上皮细胞和卵丘细胞作单层培养 IFV 胚胎后发现效果是前者优于后者^[183]。也有报道，共培养得到的囊胚包含较多的脂质，造成胚胎对温度更为敏感^[107]。但是，在体外生产胚胎时，共培养在提高胚胎囊胚率上的作用是毋庸置疑的。

(3)缓冲体系

稳定的缓冲体系对于胚胎早期培养至关重要，pH 值不稳定会直接影响胚胎细胞质中活性物质的活性，阻止基因转录和翻译的正常进行，导致细胞膜上的离子通道失调、膜电压紊乱，从而也影响到 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等离子泵的正常生理功能^[187]。

大多数胚胎培养液所用的缓冲体系是 $NaHCO_3/CO_2$ 体系，缓冲 pH 值为 7.2~7.4。应用 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系时，培养箱内 CO_2 必须维持 5%的气相浓度，以维持培养液中 $NaHCO_3/CO_2$ 稳定比例。

$NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系是哺乳动物细胞周围体液的生理缓冲体系，也是胚胎体外培养最常用的一种缓冲体系，但在体外培养时，如果培养液在空气中放置太久，由于 CO_2 的挥发引起培养液 pH 值升高，这样会导致胚胎损伤甚至死亡。

针对 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系在空气中易于挥发的特性，可以考虑体外操作时应用稳定的磷酸盐缓冲体系或 HEPES 缓冲体系，胚胎培养时在 CO_2 培养箱应用 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系，这样既避免了体外操作中由于 pH 值变化引起胚胎的损伤，也为胚胎体外培养提供了最接近体内的环境条件。

(4)气相体系

在胚胎的早期培养中， CO_2 、 N_2 和 O_2 是与胚胎密切相关的三种气体，目前常用的胚胎体外培养气相体系主要有两种：一种是 5% CO_2 、95%空气、饱和湿

度、38.5℃~39℃微滴法培养，一种是5%CO₂、5%O₂、90%N₂、饱和湿度、38.5℃~39℃微滴法培养。比较两种气相体系，许多研究人员认为第二种5%O₂浓度与哺乳动物雌性生殖道中氧气浓度相一致，远比空气中的20%O₂浓度更利于胚胎发育^[188]，降低氧气浓度有益于减少过氧自由基的形成，从而减轻了高氧对胚胎的毒害作用。但也有相反的报道，Fukui(1991)在5%和20% O₂浓度环境中培养牛早期胚胎，结果无显著差异^[189]。尽管高浓度氧对胚胎发育有一定的影响，但目前许多实验室认为CO₂培养箱简单便捷，一直应用“空气+5%CO₂”气相体系。

(5)温度体系

在胚胎的体外培养过程中，温度对胚胎也有很大的影响，牛羊等动物胚胎培养以38.5℃为宜。温度过高，胚胎发育会受到热应激影响，发育能力下降，温度过低会发生冷休克。Azambnja (1998)将卵母细胞置于不同温度培养，发现温度偏高或偏低都不利于胚胎的发育。在体外操作过程中，时间越短越好。室温不能过低，培养箱中的温度应与动物体温一致。不同动物的正常体温如下：猫38.6℃，牛38.5℃，仓鼠38℃，马37℃，小鼠37.8℃，兔39.4~39.6℃，羊39℃，猪39℃，人37℃^[190]。因此牛羊等动物胚胎培养以38.5℃为宜。在炎热的夏季，由于气温普遍高，动物热应激而使生殖机能下降，胚胎发育也就会受到热应激影响，发育能力下降。但胚胎也有一定的抗热应激能力。F.F.Pawla-lopes等(2000)用TUNEL反应证实，41℃或42℃不能诱导2~4C牛胚胎凋亡。如发育3d的8~16C胚胎在41℃下诱导9h不凋亡，而发育4d的8~16C胚胎有凋亡的趋势。而当4d的8~16C的胚胎预先在40℃下放置80min后，能够阻止在41℃、9h的凋亡现象。说明温度能诱导胚胎细胞凋亡，但胚胎也有一定的抗热应激能力^[191]。R.M.Azambnja (1998)将卵母细胞置于不同温度5~20min，发现随着温度的下降，其卵裂率也就随着下降，胚胎的发育能力也下降^[192]。温度影响胚胎质量与品种也有关，高温和湿度对荷斯坦牛的卵母细胞和胚胎质量有不利影响，但对于Brahaem牛影响较小^[193]。

(6)抗氧化体系

在胚胎体外培养体系中容易产生一些氧的毒性代谢物，如超氧阴离子(O²⁻)、羟基自由基(HO[·])、过氧化氢(H₂O₂)等，这些氧代谢物能引起膜脂的组成改变，诱导膜的不稳定性，导致异常卵裂。许多研究表明低氧环境更有利于牛胚胎的发

育, 但自由基清除剂存在时, 高氧环境同样支持胚胎的正常发育^[194]。β-ME (β-巯基乙醇) 与胞内 GSH (谷胱甘肽) 合成有关, GSH 则是胞内重要的氧化还原平衡剂, 清除氧自由基。在母畜生殖道中也有 GSH 存在^[195]。在植入前胚胎 GSH 浓度逐渐降低, 胚胎合成它的量也甚微。增加胞内 GSH (特别卵母细胞成熟时期) 能改善受精率和发育率。GSH 的合成取决于培养基中半胱氨酸, 但是半胱氨酸很易被氧化为胱氨酸, 细胞就不易吸收, 导致细胞分裂能力下降和胞内 GSH 浓度下降。培养基中添加 β-ME 能促进细胞对胱氨酸吸收, GSH 浓度升高, 细胞增殖加快。在 5%O₂ 下, 半胱氨酸利于内细胞团细胞数的增加^[196]。卵母细胞成熟液中加 5μmolβ-Me 和亚牛磺酸也能提高卵母细胞中 GSH 的平均浓度, 且成熟率高。β-ME 能提高正常受精率, 但是不能显著提高囊胚的发育率^[197]。子宫角和输卵管是低氧环境, 子宫比输卵管氧浓度更低^[198], 所以将高氧 (空气) 作为氧源, 在培养中易产生 ROS (活性氧), 其易对细胞和胚胎造成毒害作用, 如 DNA 裂解、脂质过氧化、蛋白质氧化^[199, 200]。为了降低培养液中 ROS 浓度, 常给培养中加一些低分子量的巯基化合物, 有利于 GSH 前体的合成^[201]。在体内, 有稳定的氧化还原平衡系统, 能抑制 ROS 的积累^[202]。其包括酶催化、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶。有些哺乳动物的早期胚胎也表达此类酶^[203]。降低氧浓度比使用还原酶更有利于胚胎的发育^[204]。Dalvit GC 等 (2006) 研究体外生产牛胚胎中活性氧的变化得出, 在成熟过程中, 活性氧保持不变, 到桑椹胚胎时期最高, 囊胚期又回到成熟时期水平, 表明胚胎可自我调节活性氧的变化^[95]。总之, 降低氧气浓度更有利于胚胎的发育, 而且胚胎细胞数和囊胚率增加。这也主要得益于降低了 ROS^[202]。

葡萄糖、次黄嘌呤和氧均能增加细胞中氧基的含量, 从而抑制胚胎的发育, 而谷氨酰胺(Glutamine, Gln)、还原型谷胱甘肽(Glutathion, GSH), 17β-二巯基乙醇(β-ME)和其它抗氧化剂则通过抗氧化作用保护脂质膜免遭氧化^[205]。

此外, 半胱氨酸、VC, VE 和次牛磺酸都有直接或间接清除氧自由基的功能, Dematos 报道添加半胱氨酸能够促进卵母细胞胞质内谷胱甘肽的合成, 从而有利于胚胎的发育^[206]。

4 小结与展望

哺乳动物卵母细胞体外成熟、体外受精及早期胚胎体外培养经过近百年研究,取得了可喜进展,很多哺乳动物已经成功地获得了相应的“试管婴儿”,甚至健康生长,这是全世界科研人员共同奋斗的丰硕成果。

但是,必须清楚地看到,胚胎工程技术研究任重而道远。直到今日,利用卵母细胞体外生产胚胎的培养条件仍旧缺乏系统而统一的理论依据,也几乎不存在标准而程序化的培养方案,因此,体外生产胚胎仍然处于探索阶段,只有在试验研究中不断改善培养条件,才能在不断经验积累中建立和完善胚胎体外培养体系。

无论是进行体外受精研究还是孤雌激活研究,都以充足的成熟卵母细胞来源为前提条件,卵母细胞的质量与其成熟度直接决定了其后期发育能力,因此,卵母细胞的成熟培养是体外生产胚胎的前提与基础。

成熟的卵母细胞要恢复减数分裂,实现卵裂,必须由外来刺激激活,否则会一直停滞在 MII 期,直至退化。在自然情况下,卵母细胞的激活由精子来完成,但在体外培养中可以人工控制实现卵母细胞孤雌激活。无论是精子还是其它刺激激活卵母细胞,都会引起卵母细胞胞质内 Ca^{2+} 浓度的升高和波动,从而降低 CSF 与 MPF 的活性,使卵母细胞离开 MII 期,恢复减数分裂,向后期过渡。

通过对体外受精产生胚胎的途径进行研究,可以深入了解卵母细胞的活化机制,认识受精卵与孤雌卵母型基因与胚型基因在决定胚胎细胞分化方面的差异,阐明有性生殖生产胚胎的发育潜力,以及更加深入地了解父源基因与母源基因的相互修饰作用。

体外受精胚在体外培养时存在胚胎发育阻滞,大量研究证明,体外培养的早期胚胎囊胚率和胚胎质量远远不及母体体内孵育的胚胎,这一点充分说明了人们对于早期胚胎发育的体内环境还了解不够,就目前的技术水平还无法动态调节胚胎发育过程中的一些必要的活性成分与未知因子。

对此,今后研究的重点仍然是进一步改进卵母细胞及早期胚胎的体外培养体系,提高卵母细胞体外成熟的质量、受精率及早期体外受精胚的“桑-囊胚”发育率,为体外受精技术的商业化应用奠定坚实的基础。随着哺乳动物体外受精技术的不断完善,该技术将会更加充分地挖掘和利用优良母畜的繁殖潜力,为胚胎工

程技术的其它研究领域(如胚胎细胞核移植、性别鉴定、干细胞系建立、基因导入等)提供优质、丰富、精准的研究材料,为畜牧业“高产、优质、高效”的生产体系提供良种保障,有力地推动哺乳动物胚胎工程技术在畜牧业生产领域的开发和应用进程。

第二章 卵母细胞低温保存研究进展

1949年 Polge 等发现低温保存精子时加入甘油(GL),可以增加精子的活力,成为低温生物学发展的里程碑^[207]。1972年,Whittingham 等首次用慢速冷冻法成功保存小鼠胚胎,胚胎冷冻技术得到迅速的发展^[208]。1977年,Whittingham 再次报道了来自冷冻、解冻小鼠卵母细胞得到活仔,推动了对人类、家畜、实验动物卵母细胞的大量研究^[209-219]。Whittingham 等(1972)首次报道的慢速冷冻法操作过程复杂,1977年 Willadsen 进行了改良,建立了快速冷冻法,但此法仍需 2h 左右的时间才能完成^[220]。为此,1985年 Rail 和 Fahy 建立了玻璃化冷冻法,不但将操作时间缩短到了 30min 之内,而且方法简易,设备简单,容易在生产中推广使用,为卵母细胞及胚胎的冷冻保存提供了有效手段,因而日益受到人们的重视,并已取得很大进展^[221]。1986年 Scephfen 等利用丙三醇及丙二醇为冷冻保护液,冷冻保存后的胚胎生存率仍不高^[222]。1989年 Nakagata 采用二甲基亚砜、乙酰胺为主要冻保护剂制成玻璃化液冷冻小鼠成熟卵母细胞,解冻后形态正常率达 87%,将形态正常的卵母细胞进行体外受精,卵裂率达 78%,此后未能继续发育^[223]。针对这个问题,1990年 Kasai 等利用化学毒性较低的 EG 为主体冷冻保护剂,主要对小鼠桑椹胚进行玻璃化冷冻保存^[224]。在室温下仅需 0.5~5min 平衡后直接投入液氮中,其生存率达 98%,但此方法对囊胚期以后阶段的胚胎保存效果不佳。1992年 Fuku 等以丙二醇为主要冷冻剂,用慢速冷冻法对牛成熟卵母细胞冷冻保存,解冻后经体外受精其卵裂率达 16%,囊胚发育率达到 11%^[225]。1993年 Otoil 等利用 1.6mol/l 的丙二醇、丙三醇和二甲基亚砜冷冻牛卵母细胞,受精后的卵裂率为 18%~22%,但囊胚发育率仅为 0.9%~4.8%^[226]。上述方法皆采用 0.25ml 细管法冷冻保存。为探索更好的冷冻方法,1998年 Vajta 等首次采用 OPS(open pulled straw)法冷冻牛卵母细胞取得了一定进展,体外受精后囊胚发育率达 11%~25%^[227]。此后,P.V.Pereira 等用程序化冷冻法对体外胚胎进行了处理,结果移植后有 43.14%获得了妊娠^[228]。J.R.Dobrinsky 等的研究中,经过玻璃化冷冻解冻后 86%的牛受精卵在体外可继续发育^[229]。经过移植后,玻璃化法冷冻、解冻妊娠率为 24%,常规冷冻、解冻妊娠率为 28%。IVP 胚胎直接培养并用于移植后作为对照,有 26%的建立了妊娠。虽然对照的妊娠率比期望值要低,但是这

些数据说明低温保存胚胎可能不会影响 IVP 胚胎在体内的发育。最近, 很多研究致力于家畜卵母细胞和胚胎的玻璃化冷冻保存。

1 卵母细胞冷冻保存意义及其发展状况

1.1 卵母细胞冷冻保存的意义

哺乳动物卵母细胞的冷冻保存, 可充分利用各种卵母细胞资源, 为体外受精、核移植等胚胎工程技术提供丰富而方便的材料来源, 为科研和生产服务。

卵母细胞的冷冻保存技术的意义:

- (1) 保护品种资源和拯救濒危动物不可缺少的技术保障之一。
- (2) 加快家畜品种改良和胚胎移植技术产业化的重要组成部分, 代替活畜进口, 不受时间和空间的限制。
- (3) 用于卵母细胞的低温生物学特性和体外受精机理研究。
- (4) 建立雌性动物的基因库, 还可以充分利用丰富廉价的卵母细胞资源, 使体外受精、转基因及克隆等技术的研究应用不受时间和地域的约束。
- (5) 在医学方面, 人卵母细胞的冷冻保存可克服胚胎冷冻保存所引起的伦理道德以及法律上的问题, 为过早摘除卵巢或输卵管堵塞病人提供怀孕的机会^[230]。

1.2 卵母细胞冷冻保存

卵母细胞冷冻成功于 1977 年, Whittingham 等用慢速冷冻法对小鼠卵母细胞冷冻保存后受精, 移植后得到了后代^[231]。随后, Al-Hasan 等对兔卵母细胞冷冻保存后受精, 移植后也得到了后代^[232]。家畜的卵母细胞冷冻保存主要集中在牛上, Lim 等首次成功冷冻保存了牛的卵母细胞, 且第一头超低温冷冻保存的卵母细胞产生的牛犊出生于 1992 年^[233]。虽然牛卵母细胞冷冻方法借鉴了胚胎的冷冻方法, 但是其效果远不及牛胚胎的冷冻。1998 年 Vajita 等首次采用 OPS 法冷冻牛卵母细胞取得成功, 体外受精后囊胚发育率达 11%~25%。2002 年 Amir 等结合微滴法和超低温液氮的方法, 取得了 20%的囊胚率并获得一头健康小牛^[234]。与成熟卵母细胞相比, 未成熟卵母细胞的冷冻更为困难。Suzuki 等用慢速冷冻法冷冻牛 GV 期卵母细胞, 体外受精后有 35.3%~42.2%卵裂率, 1.3%~3.1%的卵

母细胞发育到囊胚^[235]。此后，GV 期卵母细胞冷冻的进展缓慢。最近国内也有一些关于 GV 期卵母细胞冷冻的进展，2004 年包华琼等冷冻牛 GV 期卵母细胞，冷冻解冻后体外受精卵裂率为 36.67%~52.3%^[236]。2005 年禹学礼等^[237]用 OPS 法和细管法冷冻牛 GV 期卵母细胞，成熟率分别为 66.0%和 48.2%，只有 OPS 法得到了 4%的囊胚率。牛卵母细胞冷冻的研究主要集中在玻璃化方法的应用和寻求减少冷冻液体积和加快降温速率的方法上，在低温生物学机理和探讨冷冻损伤的机理方面做的还不够，因此，卵母细胞的冷冻保存条件及低温生物学特性等方面还有待进一步研究^[238]。

在人卵母细胞冷冻方面：1986 年 Chen 成功冷冻人卵母细胞并获得后代^[239]。2000 年，Yong 等首次用玻璃化冷冻方法冷冻人成熟卵母细胞，获得了第一例来自玻璃化冷冻方法的后代^[240]。最近研究人员通过理论和试验分析比较了人卵母细胞冷冻和胚胎冷冻的优缺点。2004 年 Andrea 等通过优化卵母细胞的冷冻技术获得了高达 12.5%出生率，Andrea 认为随着卵母细胞冷冻技术的发展，人卵母细胞的冷冻可以作为胚胎冷冻的一种选择^[241]。Tucker 等从社会、伦理和建立“卵子库”的意义等方面分析也认为人卵母细胞的冷冻将是未来人工辅助生殖技术发展的方向^[242]。

2 卵母细胞低温冷冻保存的基本原理

哺乳动物卵母细胞的超低温保存，是指在超低温（-196℃）条件下抑制细胞内一切新陈代谢活动，并使细胞被长期保存，按一定方式解冻后，又能恢复其受精、卵裂等发育潜能的一种保存技术。

一般情况下，哺乳动物的细胞冷冻到-20℃以下时极难存活。大多数细胞存在一种最适宜的冷冻速度，如果超出这一速度，细胞内结冰和解冻时容易再次形成冰晶，引起细胞死亡。若低于这一速度，因冰晶形成产生的溶液变化较大，同样也会引起细胞死亡。低温冷冻保存的最大优点是细胞能长期保存而不丧失活性，其原因是因为细胞内一切新陈代谢过程中的化学反应被低温所抑制，当温度降到一定程度时，细胞内所有化学变化也就处于一种“暂停”状态而使细胞得以长期保存，低温保存的细胞以一定方式复苏后，又具有存活能力^[255]。卵母细胞和胚胎的水分占胞质 80%以上，在一般情况下，低温冷冻时有 90%的水分形成游

离水而冻结成冰晶,可破坏蛋白质结构并发生不可逆的变化,从而导致细胞死亡。通常,在冷冻过程中,冰晶首先在细胞外液中形成,此时冰晶与溶质分离,细胞外液未冻结部分的溶液浓度升高,细胞外液的渗透压增加,细胞内水分渗出。随着温度继续下降,细胞外冰晶不断形成,未冻结部分的溶液浓度增加,细胞内外的渗透压差增大。这时可能发生两种情况:(1)当降温速度很慢时,胞质内更多的水分有足够的时间渗出,水分在细胞外冻结,随着细胞外冰晶的形成,细胞内外形成了较高的渗透压,使细胞内水分逐渐减少,细胞内电解质浓度增高,导致细胞膜蛋白复合体的破坏和膜的分解。(2)当降温速度很快时,胞质内水分形成的冰晶使细胞受到物理性的损伤。温度过低会引起膜脂肪相的变化,从而影响细胞的新陈代谢。采用合理的冷冻方法,添加适当的冷冻保护剂,就能减少细胞在冷冻过程中的损害^[256]。

2.1 诱发结晶

溶液在温度达到冰点时不结冰,待降到冰点以下一定温度时才结晶,这种现象叫过冷现象。过冷现象的产生,使得溶液在冰点以下任何温度都可结冰,这样易对卵母细胞造成两种损伤:一是溶液在结冰时放出的潜热使温度回升而后再下降,如果溶液结冰时的温度距冰点较远(-15℃下),则这种温度的急剧变化往往会造成卵母细胞死亡;二是分子运动和温度有关,当溶液在冰点附近结冰时,水分子运动相对活跃,来不及排列成整齐的冰晶,生成的冰晶较小,对细胞的影响相对较小;出现过冷现象时,结冰的温度相对较低,则相应形成的冰晶就大,对细胞造成的损伤也严重。为了防止过冷现象的发生,通常在-7℃左右时通过人工强制诱发结晶,以避免较大冰晶的形成^[257]。诱发结晶主要在冷冻降温速率较慢的程序化冷冻中使用。诱发方法有两种:①用液氮预冷过的镊子夹麦管中部含卵母细胞的冷冻液上部;②在冷冻液中加入制冷剂晶母等。

2.2 冷冻保护剂对卵母细胞的保护作用

(1) 渗透性保护剂

渗透性保护剂是一类小分子化合物,因其在冷冻过程中能够渗透进入胞质内而得名,常用的有GL(Glycerol, GL)、二甲基亚砷(Dimethylsulphoxide, DMSO)、

丙二醇(1, 2-Propanediol, PROH)、EG (Ethylene Glycol, EG)等。该类物质在冷冻过程中进入细胞内部, 可以起到以下作用: ①防止卵母细胞因脱水过度收缩; ②与水分子发生水合作用, 减慢溶液结晶速度; ③稀释胞质中因脱水而产生的高盐, 减少盐害作用的产生^[258]。

(2) 非渗透性保护剂

相对于渗透性保护剂, 这是一类大分子化合物, 能溶于水, 但不能渗入细胞, 较为常用的有蔗糖、聚蔗糖、血清等。冷冻降温过程中, 卵母细胞外液首先结晶, 随着结晶程度的加深, 胞外溶质浓度逐渐增加, 并顺着胞内外化学势能差进入胞质内, 对卵母细胞产生盐害作用。冷冻保护剂中含有这类大分子物质, 就能有效降低胞质外溶质的浓度, 减少盐害作用的产生; 在快速冷冻时, 可协助渗透性保护剂促使细胞脱水, 减少细胞内冰晶形成; 组成玻璃化液时, 可有效降低渗透性保护剂的摩尔浓度、可使发生玻璃化的相变温度升高、可促进胞质及保护液玻璃化; 解冻时, 为卵母细胞提供一个高渗环境, 避免水分进入胞内过快而产生的渗透性破裂。

(3) 其他保护剂

主要是指最近所发现的一些新型冷冻保护剂, 如抗冻蛋白。抗冻蛋白 (Antifreezing Protein, AFP) 最早是在极地耐寒动物身上发现的一种具有特殊性质的蛋白质。在低温 (4℃) 和超低温 (-30℃~-196℃) 下, 与细胞膜相互作用, 封闭离子通道, 阻止渗透而使细胞膜受到保护^[259]。也有研究表明, AFP 的作用机理是能够与冰晶相互作用, 防止降温过程中冰晶生成和升温过程中重结晶的发生^[260]。

2.3 玻璃化保护作用

玻璃化是高浓度的冷冻保护液在低温或超低温下溶液由液相变为固相时, 其内部的分子、离子分布不改变其原有的分布, 不形成有规则外表的物质形态, 可有效避免冰晶形成时对卵母细胞内部骨架结构和亚细胞器膜的牵拉断裂和尖锐刺伤。

3 卵母细胞在低温冷冻保存过程中的受损机制

卵母细胞的冷冻保存技术来源于胚胎冷冻保存，由于细胞自身所具有的一系列特殊性质，因而冷冻保存的难度较大。与精子、胚胎冷冻保存相似，卵母细胞在冷冻保存及复温过程中易受到一系列的损伤。

3.1 细胞内冰晶损伤

在胚胎及卵母细胞冷冻过程中，当温度降低到冰点以下，在细胞外液内液都有冰晶产生，使细胞受到致命性的损伤（物理损伤）^[261]，这个因素也是胚胎及卵母细胞冷冻保存的关键。Mazur 等（1992）对仓鼠组织培养细胞的低温保存试验数据进行分析认为，冷冻速度过快形成的细胞内冰晶，对细胞产生致命性损伤。并且冷冻速度越快，损伤越大^[262]。Miyake 和 Bank 认为，在快速冷冻中形成的细胞内冰晶本身对细胞并非是致命的，致命性损伤是由于细胞内产生重结晶^[263]。快速冷冻时，由于降温速率快，结晶时的冰晶核较多，从而形成数目多且体积小的冰晶，对细胞造成的损害较小。如果解冻时采取快速复温，则细胞仍能存活，但若在解冻过程中，在温度较高的区域（如-40℃或更高）经历较长时间或进行慢速复温，则会产生重结晶现象，即细胞内小冰晶重结晶成大冰晶，从而机械性的破坏细胞的超微结构而造成细胞的致命损伤。

3.2 细胞外冰晶损伤

慢速冷冻时，冰晶首先在细胞外形成。细胞外液冰晶形成后，使得溶液中离子浓度升高，对细胞产生了离子影响，此损伤又称盐损伤^[264]。随着更多冰晶的产生，使溶液逐渐浓缩，溶液的浓缩对细胞的影响越来越大，此现象被称为溶液效应又称为化学损伤。冷却的速度越慢，则浓度越高，对卵母细胞的作用时间也越长，对卵母细胞膜蛋白复合体造成的伤害也越大。这主要是由于细胞内外的电解质浓度增高，导致细胞膜蛋白复合体的破坏和核膜的降解^[265]。

3.3 破裂损伤

采用常规法冷冻的卵母细胞或胚胎解冻后可见到透明带破裂,这主要是由于物质的膨胀率和收缩率不同,这种现象被称作破裂损伤。DePaz 等^[266]、Titterington 等^[267]发现,即使在没有冰晶形成的玻璃化冷冻中,这中损伤也达到了 20%左右。葛西等小鼠的胚胎反复冻融,结果快速反复冻融 10 次样本中有 75%发生了破裂,但缓慢通过-110℃~-130℃的冷冻液变相温度区域的反复冻融 10 次后,样本没有发现破裂损伤^[268]。由此可见,破裂损伤往往发生在液相和固相急速转化的过程中。因此,慢速冷冻时缓慢通过冷冻液变相温度区域非常重要。

3.4 渗透压损伤

损伤主要来自解冻过程,卵母细胞或胚胎在冷冻液中平衡或脱出冷冻保护剂时,由于渗透压的急剧变化而引起细胞过度膨胀或收缩使细胞受到损伤;同时渗透压的急剧变化使大量水或冷冻保护剂快速通过细胞膜,而引起细胞膜机械性损伤^[269]。解冻时若将胚胎直接移入等渗溶液中,由于内部的渗透压较高,水分很容易渗入细胞内,冷冻保护剂未来得及脱出,造成细胞膨胀而受到损伤。所以,在脱出细胞内部冷冻保护剂的同时使细胞膨胀控制在最小程度。Pedro 等指出,冷冻解冻后的胚胎比鲜胚更容易受到膨胀和收缩的损伤,可能与冷冻使胚胎细胞膜机能不全而导致膜易破损有关^[270]。

3.5 冷冻保护剂化学毒性损伤

当卵母细胞或胚胎移入冷冻保护剂液平衡时,随着时间的延长和浓度的升高,生存率下降。造成这个结果的原因是冷冻保护剂中渗透性冷冻保护剂的化学毒性作用^[271]。冷冻过程中渗透性冷冻保护剂渗入细胞,影响和改变细胞内超微结构和大分子物质的结构和功能,间接引起高级结构的破坏。毒性表现在引起细胞膜变脆或破裂^[272-274]、透明带硬化^[275]、微管及微丝聚合或解聚^[275-278]、染色体和 DNA^[279-280]损伤等。冷冻保护剂中主要是渗透性保护剂对卵母细胞产生化学毒害作用,其毒性大小随作用温度、作用时间和作用浓度的增大而增大^[281-282]。具体表现为细胞变脆崩裂^[283-286]、透明带硬化^[287]、微管微丝的聚合和解聚^[288-290]、

染色体和 DNA 损伤^[291-292]等。

3.6 低温损伤

卵母细胞和胚胎对温度的降低极为敏感，在温度高于冰点，细胞内外均无冰晶形成的情况下，仍会造成细胞的损伤。不同哺乳动物的细胞在低温保存过程中都会受到一定的低温影响，特别是脂质含量较多的猪卵母细胞和牛卵母细胞。这种由于温度低于正常温度所造成的细胞损伤被称为低温损伤。这种损伤很大程度上取决于温度的变化。造成这种损伤的机理可能是的低温引起膜脂肪相的变化，从而影响细胞的新陈代谢^[293]。低温损伤与细胞质内脂肪颗粒的含量有关，如猪和牛卵母细胞及早期胚胎由为突出，其他哺乳动物脂肪含量较少，受低温损伤影响不大。

3.7 过冷损伤

冰晶的成核过程主要由热力学条件决定。溶液在被冷却到低于冰点的某一温度时才开始结冰，在冷冻过程中溶液温度降低到冰点以下有可能回升到冰点，对细胞产生损伤。如果溶液结冰的温度离冰点有一定距离，如-15℃以下，由于潜热的释放使溶液温度迅速上升，潜热释放完后又急剧下降，细胞往往在温度的这种剧烈变化中死亡，所以在常规冷冻中，在稍低于溶液冰点，在-5℃时采取人工植冰，使溶液瞬间度过冰点温度，防止过冷损伤的发生。

4 冷冻方法

4.1 慢速冷冻法

此法由 Whittingham (1971) 建立，是早期胚胎冷冻研究中常用的方法。该法将胚胎置于冷冻保护液中以 0.2~0.8℃/min 的速率缓慢降温至-80℃，然后投入液氮保存。利用这一方法先后对多种家畜和实验动物的胚胎进行冷冻试验并取得成功，但由于其冷冻过程花费的时间比较长（6h 以上），而且需要特殊的冷冻降温设备，因此目前已经很少采用。

4.2 快速冷冻法

又称常规冷冻法。该法一般使用混合保护液，保护液由浓度为 0.2~3.5 mol/l 渗透性的保护剂如 GL 和丙二醇与浓度为 0.25~0.5 mol/l 的非渗透性的保护剂如蔗糖混合而成。胚胎冻前脱水，使细胞内水分减少，冰晶量及大块冰晶形成减少，可以获得较高存活率。1978 年，Wiladsen 等在牛的胚胎冷冻中首次建立并使用了这种方法，此法使冷冻时间缩短到 2h。具体操作为在-4.6~-7℃开始，将装有胚胎的细管置于冷冻仪中，并保持 10~15min（放入胚胎后开始植冰）；从植冰温度开始以 0.3~0.5℃/min 的降温速度降温至-30℃；在-30℃时将胚胎快速投入到液氮中保存。该法最大的优点在于将水从细胞中脱出的速度和水结成冰的速度达成了平衡状态，但需要价格昂贵的程序化冷冻仪。

慢（快）速冷冻法是通过冷冻程序仪来控制其降温速率，一般以 1℃/min 左右的速率降至-7℃左右时，进行人工诱导结晶，再以 0.1~1.0℃/min 的速率降至-30~-40℃（快速冷冻）或者-80℃（慢速冷冻）时，投入液氮中保存。

4.3 玻璃化法

玻璃化冷冻法是 1985 年发展起来的一种快速冷冻胚胎的方法。“玻璃化”是一个物理学上的概念，是指当水或溶液快速降温达到或低于-100~-110℃的温度范围时，形成一种具有高粘度的介于液态和固态之间、非晶体态、杂乱无章、透明的玻璃状态。它虽然不能像液态那样流动，却可向晶体一样保持自己的形状。配制的高浓度冷冻保护液在液氮中能形成类似玻璃状稳定而透明的非晶体化固体物质状态。其特点为：①分子不按晶格结构排列，为无定型结构。②在玻璃化过程中，分子不重新排列，发生剧烈运动，没有准确固定的转变固化点，其形态的转变是在一定的温度区内完成的，即玻璃化变相温度是代表一个区域的温度。③当水溶液有电解质或其他可溶性成分转变成玻璃态时，由于其均一的分散系统未遭到破坏，所以溶液的浓度不发生改变或改变很小^[294]。玻璃态的物理性能与晶体不同，是一种即可以避免或减轻冷冻细胞、组织损伤，又可长期保存细胞、组织的良好方法。

玻璃化冷冻法是超快速降低细胞温度的一种冷冻模式，因为冷冻液在液氮中

形成的是一种非晶体物质状态，因而避免了慢速冷冻过程中细胞所遭受的机械损伤，同时缩短了冷冻处理所需的时间，简化了步骤，也不需要昂贵的程序降温仪，逐渐成为胚胎和卵母细胞冷冻的趋势。但是，高浓度的冷冻保护剂对细胞有较大的化学毒性，在操作时间上不易掌握。因此，在具体实施玻璃化冷冻时，要注意保护剂浓度和作用时间的平衡，既要使细胞质充分脱水，又不能作用时间过长，或者进一步寻找开发容易实现玻璃化且对细胞损伤较小的防冻剂。

根据采用不同的材料和处理方法分为：OPS 法（Open Pulled Straw）；冷冻环（Cryo-loop）法；玻璃微细管法；封闭式细管法，此方法和 OPS 法很相似，不同的是需要封住细管的两端，使用 0.25ml 细管，不需要自己拉制细管；电镜铜网法，利用电镜的铜网作为胚胎的载体，将电镜铜网连同胚胎一起放入液氮中。

（1）OPS 法。利用 0.25ml 细管，在 107℃ 左右对细管的中间 7~8cm 处加热，两手轻拉细管至 24cm 以上长度，截去两头粗的一端，用刀片在中间切断，即可得到两段细管。利用细管的虹吸作用将含有胚胎或卵母细胞的微量玻璃化液吸入细管内，然后直接投入液氮中冷冻保存。OPS 法降低了细管壁厚度，加快了温度的传导，提高了表面积/体积比值，提高了致冷率，加快了降温速度，降温速度可达到 2000℃/min 以上，从而降低了冷冻时的损伤。谭世俭等用 OPS 法冷冻了牛的卵母细胞和囊胚，冻后卵母细胞的卵裂率可达到 80.9%，囊胚率达到 46.3%；冻后囊胚存活率可达到 92.7%，孵化率 83.6%^[295]。A.VonBaer 等用该法对绵羊的囊胚进行了玻璃化冷冻，发育率达到 40%^[296]。E.S.C.Siqueira 等用此法冷冻了 MII 期卵母细胞，冻后存活率达到 66%^[297]。目前，已经利用这种方法成功的对小鼠、兔子、牛、绵羊、山羊、等家畜胚胎和卵母细胞进行了冷冻。

（2）冷环法（Cryo-loop）。以尼龙膜环作为胚胎或卵母细胞的承载工具。具体操作为：先将胚胎在冷冻保护剂中处理，然后将胚胎移到附有玻璃化液的尼龙膜环（Φ0.5-0.7mm）上，将环投入液氮中。胚胎接触玻璃化液到投入液氮的时间约为 20~30s。此法具有与 OPS 法相似的降温速度，最先在小鼠和人囊胚上应用^[298]采用此法冷冻的人囊胚移植后已经成功产出婴儿^[299]。目前，以用此法成功地冷冻保存了马^[230]、猕猴^[231]的胚胎。

（3）电镜铜网法。以电子显微镜铜网作为胚胎或卵母细胞的承载工具，采用小体积冷冻液（<1μl）和液氮直接接触，冷冻速率达到 3000℃/min。具体操作

为：胚胎或卵母细胞在冷冻液中处理一定时间后，将它们和冷冻液移到电子显微镜铜网上，然后用镊子夹住铜网，直接浸入液氮。1990年 Steponkus 等^[232]和 1992年 Mazur^[233]用电镜铜网法成功地冷冻保存了对低温非常敏感的果蝇胚胎。1996年 Martino 等采用该法冷冻保存牛卵母细胞，解冻后形态正常率近 60%，体外受精后卵裂率和囊胚率分别为 29%~32%和 10%~15%^[234]。

(4) 玻璃微细管法。以毛细玻璃管拉制成直径为 0.3mm 玻璃微细管作为卵母细胞或胚胎的承载工具，具体操作类似于 OPS 法。玻璃的导热性能比塑料好，而且直径小重量较大，能够克服 OPS 法在冷冻时漂浮在液氮面上的缺陷，冷冻速度要高于 OPS 法。2000年 Kong 等^[235]用玻璃微细管法冷冻保存小鼠囊胚，与 OPS 法比较，结果两者间没有显著差异。

(5) 细管法。以 0.25ml 细管作为胚胎或卵母细胞的承载工具。1991年 Kono 等用含有二甲基亚砷、乙酰胺、丙二醇和聚乙稀乙二醇的冷冻保护剂对小鼠卵母细胞进行冷冻保存，使用 0.25ml 塑料细管作为载体，投入液氮冷冻保存。解冻后正常受精率达 80%~87%，有 69%~78%发育至囊胚。1993年 Wood 等也是用 0.25ml 塑料细管作为载体冷冻小鼠卵母细胞^[236]。与 Kono 等不同的是细管在液氮蒸汽熏蒸 3min 后投入液氮冷冻保存，解冻时先进行 10s 空气浴(20℃)，然后 20℃水浴 10s。体外受精后培养，分裂率为 91%，移植妊娠率为 79%。

4.4 微滴法

如果将含有胚胎的冷冻液直接滴入液氮，冷冻速率将会得到极大提高，这便产生了微滴法。具体操作为：在冷冻过程中，将含有胚胎的体积约为 6 μ l 的冷冻液小滴直接滴入液氮中，然后用镊子将冷冻液形成的颗粒集中到小管中保存。解冻时将冷冻颗粒直接投入解冻液中，颗粒融化后收集胚胎并按程序脱出冷冻保护剂。朱士恩等用微滴法冷冻保存小鼠扩张囊胚，解冻后的存活率达 100%，移植后产仔率达到 71%^[237]。

5 冷冻保护剂

1949年 Polge 冷冻哺乳动物精子获得成功，发现了 GL 在精子冷冻过程中能起到保护作用。保护剂的研究也从此开始。冷冻保护剂的作用在于与水结合后，

可避免或减少冰晶形成的程度与速度，或只结成较小冰晶。其最主要的作用是降低冷冻过程中由于溶质浓度升高造成的溶质损伤，从而使细胞的环境温度安全降至-196℃。其主要为一些易溶于水的低分子有机物以及个别高分子有机物，主要为 GL、EG、DMSO、蔗糖(S)等。目前已确认有防冻效果的约有 40 余种。冷冻保护剂按渗透性可分为两类：渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂。

5.1 冷冻保护剂作用原理

当冷冻保护剂渗入到细胞内后，能增加整个细胞的粘度和细胞内的溶质浓度，干扰水分子的空间排列方向，使冰晶生长的驱动力减弱，晶体生长速率降低，从而降低细胞外液和细胞内容物的冰点，推迟冰晶的形成速度。在浓度增加到一定程度后，整个保存系统可以在相对较慢的冷却速率下形成玻璃化，从而避免“胞内冰晶损伤”和“溶质性损伤”。

5.2 渗透性冷冻保护剂

渗透性冷冻保护剂与水结合后，使水的冰点下降，使之不易形成冰晶，从而起到冷冻保护的作用。这种保护剂通过提高保存液和细胞的渗透压，以防止或缓解冰晶的形成；同时，具有防止溶质浓度的升高和冰晶形成所带来的损害。此类保护剂又称细胞内液保护剂。常用的渗透性冷冻保护剂有 GL、DMSO、EG、PROH、乙酰胺等。这种冷冻保护剂的特点是，分子量为 100 以下，能够透过细胞膜。早期的研究通常以 GL 和 DMSO 为冷冻保护剂，后来逐渐转向使用 EG 和 PROH。EG 和 PROH 在低温条件下能以非常稳定的非结晶状态存在，且二者对细胞的毒性也明显小于 DMSO。AndrasSzell 曾报道，超排处理后第 6d 回收的绵羊胚胎和第 7d 回收的牛胚胎对 EG 的渗透性强于 GL^[238]。Nsongsasen 报道以下四种防冻剂对胚胎的渗透性由强至弱依次为 EG、PROH、DMSO、GL，使用前三种防冻剂的胚胎，解冻后的存活率分别为 76.9%、62.5%、55.6%^[239]，可见，防冻剂的渗透性与胚胎解冻后的存活率成正比关系。总之，防冻剂的选择应根据胚胎种类及发育状态而定，目前牛胚胎的冷冻通常使用 EG、GL 和 PROH。

GL。GL 与水结合使水的冰点显著下降，同时由于 GL 粘性大，温度下降时，可使溶液内冰的结晶中心增长速度减慢，从而减弱了水的固化。

DMSO。跟 GL 相同，也是低分子量的非电解质，发现它具有冷冻作用已有 30 多年。自从 Whittingham 报道 DMSO 具有冷冻作用以来一直被广泛应用^[240]。DMSO 的毒性比 GL、PROH、EG 的毒性大，温度低时毒性较小。

PROH。1949 年，Polge 报道了 PROH 的冷冻保护作用。PROH 的无定型水溶液在零度以下具有很高的稳定性，从而在复温中能限制冰晶的再生长^[241]。PROH 比 GL 和 DMSO 具有更强的玻璃化能力。Renard 等利用 PROH 作为冷冻保护剂来冷冻保存小鼠 8C 胚^[242]。将 2C 期的大鼠胚再室温下分别暴露于 PROH、GL、DMSO 中，结果表明 PROH 毒性最小。PROH 和其它冷冻保护剂联合使用，可以减少对胚的毒性。

EG。EG 在运用于慢速冷冻小鼠 8C 胚和桑椹胚中获得了成功^[243]。由于 EG 具有分子量小、渗透性强、毒性小、玻璃化能力强，近年来越来越受到重视，并广泛运用于慢速冷冻法和玻璃化冷冻法中^[244]。

5.3 非渗透性冷冻保护剂

常用的非渗透性保护剂主要包括聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、聚乙二醇（PEG）、聚乙烯醇、聚蔗糖（Ficoll）、白蛋白及羟乙基淀粉等。非渗透性冷冻保护剂一般为大分子物质和小分子糖类。这类物质由于分子量较大，很难渗透过细胞膜。对于大分子物质冷冻保护剂的研究显示，大分子保护剂可以加速膜的再封闭，防止冰晶的细胞内播种以及复温时使细胞外液渗透压变化较为稳定。此类保护剂又称细胞外液保护剂。常用于哺乳动物胚胎玻璃化冷冻液中的大分子物质有：PEG^[245]、Ficoll^[246]、PVP、葡聚糖（Dextran）及血清等。小分子物质多为单糖或二糖，常见的有半乳糖、葡萄糖、海藻糖、蔗糖等。它们必须与渗透性冷冻保护剂同时使用才能有效地保护细胞。在胚胎冷冻前的预处理中，小分子糖类有助于细胞内部玻璃化状态的形成，减少冷冻保护剂对胚胎的毒性作用，也防止解冻时胚胎细胞的过度膨胀。

早期研究中通常单独使用非渗透性冷冻保护剂，后来逐渐发现，在添加渗透性防冻剂的同时，结合使用非渗透性的多元醇，能有效地提高胚胎冷冻存活率和移植受胎率。非渗透性冷冻保护剂的作用是通过提高细胞外液的渗透压，使细胞内的水分外流，使得胚胎在冷冻过程中减少冰晶的形成，从而达到冷冻保护目的。

Shaw 等^[247]在小鼠胚胎冷冻中，以 1.5mol/l GL 添加 0.1mol/l 海藻糖为冷冻剂，其效果(冷冻存活率 70%)明显优于单独使用 1.5mol/l GL 的效果(31.0%)。Richards 等在 1.4mol/l 的 GL 内再添加 20%棉籽糖进行牛胚胎冷冻，解冻后的移植受胎率明显高于不添加棉籽糖的处理组。黄凤玲发现不同 GL 浓度对牛体外受精有明显的影响，并且细管内的组合以含 1.0 mol/l GL 为冷冻液，两端装 0.5 mol/l 蔗糖为最佳^[248]。2001 年李培昌实验表明：用含有 0.2 mol/l 的蔗糖和 25%的 EG 混合的玻璃化溶液保存的早期囊胚的生存力明显高于不含蔗糖的玻璃化溶液(P<0.01)。

5.4 冷冻蛋白

有冷冻特性的植物和动物原生蛋白的分离及使用是冷冻保护剂应用上的最大进展。冷冻蛋白(Antifreeze Proteins, AFPS)最初是从极地海鱼中发现的一类抑制冰晶生长的蛋白质，它能够通过阻止体液内冰核的形成与生长，维持体液的非冰冻状态，使无体温调节能力的生物在低温的环境里得以生存^[249]。Scholand 等 1957 年研究报道北极鱼可以在-18℃的水中生存，而它的血清的凝固点大约比这一温度高 1℃，从这种动物体内分离一种抗冷冻蛋白 (AFPS)，并对这一物质开展了广泛的应用研究，AFPS 在冷冻过程中可以抑制冰核的形成，从而保护了细胞免受损害。在 2, 3-丙二醇(30%)组成的玻璃化溶液中加入 1%人工合成的冷冻蛋白可以抑制解冻时去玻璃化的发生。目前，在植物、昆虫、细菌和真菌都发现并分离出冷冻蛋白，但它们的冷冻活性也有差异^[250]。应用鱼的冷冻蛋白已成功的玻璃化冷冻了牛和羊的胚胎及猪的卵细胞^[251]。其他一些学者报道，在常规冷冻方法中使用鱼的冷冻蛋白对小鼠囊胚没有影响^[252]，而在牛囊胚的玻璃化中使用植物的抗冷冻蛋白并没有使解冻后的胚胎成活率提高，但是，移植后的妊娠率比添加 BSA 的高。

5.5 冷冻保护剂的筛选及处理方式

冷冻保护剂的玻璃化能力与其组成和浓度有很大关系。研究表明，当玻璃化溶液中含有 1, 2, 3-丁二醇、PROH、DMSO、EG、GL 等冷冻保护剂及适量 PVP、聚乙烯醇、PEG 等高聚合物时，其玻璃化形成能力较强^[253-254]。对某个特定的冷冻保护剂，其玻璃化能力随浓度升高而增大。

对大多数生物学系统,要求冷冻保护剂的浓度高达 6.0~9.0mol/l 才能实现玻璃化冷冻保存^[255]。高浓度的冷冻保护剂会产生严重的生物化学毒性,减少冷冻保护剂毒性是确保其玻璃化冷冻保存细胞、组织的关键因素之一。减少冷冻保护剂毒性的常用方法包括:①使生物标本在高浓度的冷冻保护剂中暴露的时间尽可能短、温度尽可能低。②选择合适的冷冻保护剂。③对某些冷冻保护剂选用特定的毒性中和剂,如在 DMSO 中加入适量的甲酰胺、乙酰胺可大大降低其生物化学毒性。高浓度的冷冻保护剂也会导致细胞内外的渗透压差过大。由于冷冻保护剂穿透细胞膜的速率比水要小,因此加载冷冻保护剂的最初反应是细胞内水分的渗出,同样,在生物标本中移出冷冻保护剂时,细胞外的水分要渗入。尽管细胞内外的水分、冷冻保护剂相互渗透并最终达到平衡,细胞体积的过度变化将导致细胞失活。因此在玻璃化冷冻保存细胞、组织的过程中应逐步加载、移出冷冻保护剂,以减少细胞内外的渗透压差^[256]。要实现玻璃化冷冻保存,需要针对不同的生物标本对冷冻保护剂的种类、浓度进行筛选并确定相应的加入、移出方式。

6 解冻及脱除冷冻保护剂的方法

6.1 解冻

当胚胎或卵母细胞被冷冻时,将遭受低温应激和冰晶形成的应激。冰晶产生可导致高渗液的形成,从而使细胞内水份失去,细胞萎缩,还可能导致离子的内流。而解冻正好是一个相反的过程,可导致水的内流对细胞造成破裂损伤^[257]。慢速解冻法通常是以 4~25°C/min 的速率使胚胎由冷冻保存温度逐渐升至室温,一般适用于慢速冷冻的胚胎。当温度由-196°C升到-50~-15°C时,细胞内仍可能形成大冰晶而致死胚胎。快速解冻法通常采用温水浴法,以 3000~3600°C/min 的速率使胚胎在 30~40s 内从-196°C迅速升至室温。即将装有胚胎的细管由液氮中取出,直接(或在空气中停留 5~10s)投入 20~35°C的温水中,10~20s 即可完成解冻过程。这样,可避免了细胞内大冰晶形成,从而有效地保护了胚胎。

6.2 降温与升温速率

当水或溶液以极快的速度冷却,超过冷冻保护剂冰点和成核温度,使过冷的

液体没有足够的时间来形成冰晶的晶核，并限制已形成的晶核向外扩大生长，亦即降温的速率大于冰晶成核及晶核生长的速率，则液体就会固化形成玻璃态，所以要实现玻璃化冷冻保存就必须加快降温速率^[258]。

储存于液氮内的细胞，需要解冻到常温后才能应用。若升温的速度不够快，储存的细胞从液氮温度回升到成核温度时，细胞会从周围吸热，热力学发生变化后出现再结晶现象，即发生所谓的“去玻璃化”现象^[259]。去玻璃化过程有两种类型，一种是原来降温过程中形成的微小冰核在升温的过程中形成冰晶；另一种是没有微小冰核的标本中在复苏的过程中形成冰核并结晶生长。一般去玻璃化过程中形成的冰晶对细胞和组织的损伤大于降温时形成的冰晶对细胞的损伤，因此必须以一定的速率升温以避免加热复苏过程中的去玻璃化现象发生。玻璃化冷冻保存细胞一般需要强化传热以加快降温和升温速率。

6.3 除去冷冻保护剂的方法

冷冻保护剂对胚胎或卵母细胞都有一定的毒性。当含有较高浓度冷冻保护剂的胚胎或卵母细胞移入等渗培养液中，由于细胞内外存在较高的渗透压差，大量水分子进入细胞而使其膨胀，导致细胞死亡。只有当保护剂被脱除后，胚胎或卵母细胞复水，才能继续发育。目前，脱除冷冻保护剂的方法主要有三种。

6.3.1 逐步稀释法

用浓度递减的保护液逐步稀释，使冷冻保护剂脱除。此方法比较繁琐，但效果好，目前普遍采用此方法。

6.3.2 非渗透性溶液脱除法

应用较高浓度的非渗透性保护液经一步或两步脱除保护剂。将解冻后的胚胎移入含有高浓度的非渗透性保护液中，有助于脱除冷冻保护剂而不产生新的渗透性损伤。此法常以蔗糖作溶质，蔗糖是非渗透性双糖，在稀释细胞内保护剂时起缓冲渗透压的作用，防止水分大量渗入细胞而引起过度膨胀。此法已广泛用于冷冻保护剂的脱除，但蔗糖所用浓度范围很大，从 0.05 mol/l 至 2.0 mol/l。这种方

法包括 Niemaun 等的二步法及法国 Renard(1982)、日本铃木达行等 (1983)、美国 Leibo 等 (1983) 改进后的一步法及一步细管法。Delcampo 等 (1990) 和 Palaz 等 (1990) 研究发现, 用 1.0 mol/l 或 0.5 mol/l 蔗糖液去除 1.5 mol/l GL, 结果无明显差异, 但明显优于 0.3 mol/l 蔗糖稀释液。Xu 等(1988)却发现 0.5 mol/l 的效果优于 0.75 mol/l。但也有研究指出, 较低浓度的蔗糖液对一步法去除保护剂更为有效。

6.3.3 细管内脱出冷冻保护剂

1983 年 Leibo 等提出一步细管法, 冷冻时将冷冻保护剂及解冻液定量分装在细管内的不同部位, 解冻时使胚胎解冻和脱除冷冻保护剂一步完成, 解冻后可直接进行移植^[260]。目前人们对这一方法继续进行研究, 试图找出无需脱除即可直接移植的冷冻保护剂。对于玻璃化冷冻的胚胎, 在细管中间装入三段玻璃化液, 中间段含胚胎, 其余部分为稀释液。解冻后手握封口端摇晃均匀, 然后直接移植, 细管内的保护液可起到双重作用: 稀释胚胎内的保护剂有利于胚胎复水; 降低输入子宫内的保护剂浓度, 从而减少对子宫内膜的刺激作用。玻璃化冷冻牛胚胎, 细管内脱出冷冻保护剂后直接移植, 获得成功^[261-262]。

7 冷冻对卵母细胞造成的影响

卵母细胞体积大, 内部水分含量高, 内容物丰富, 使得卵母细胞的冷冻保存受到了很大的限制, 如猪卵母细胞中含有的大量脂肪粒, 牛卵母细胞中含有的大量囊泡等对低温十分敏感。

7.1 对微管的影响

卵母细胞中的微管主要是参与纺锤体形成。正常情况下, 胞质中的微管由 α 管蛋白和 β 管蛋白结合组成。微管对温度敏感, 0~4℃可引起微管的解降, 25℃以上时则有利于聚合^[263-264]。据此, 有人认为冷冻 GV 期卵母细胞比冷冻成熟卵母细胞的效果要更好, 但迄今为止有相同结论的研究报道不多^[265]。

7.2 对微丝的影响

微丝是由聚合肌动蛋白和自由肌动蛋白组成，它对纺锤体旋转、极体排出、原核迁移和胞质分裂是必需的。正常情况下，两种肌动蛋白保持平衡，但冷冻保存可能破坏这种平衡^[266]。Saunders (1999) 报道牛体外成熟卵母细胞解冻后微丝正常分布率显著低于未冷冻组^[267]。Nagashima 显微观察猪胚胎，发现冷冻时使微丝系统产生重构，但解冻复温后又恢复常态^[268]。

7.3 对染色体的影响

处于 MII 期的成熟卵母细胞其染色体松散地附着在纺锤体上，缺少包被的核膜对低温相当敏感。许多研究表明，不论是慢速冷冻还是玻璃化冷冻卵母细胞，解冻受精后，都可观察到畸形的染色体组型^[269-270]。

7.4 对透明带和细胞器的影响

除上述因素外，低温冷冻对透明带和细胞器也产生一定的影响。冷冻除了造成透明带本身的破损、断裂和脱落外，还可对其内在性质产生影响。冯怀亮(1996) 等报道，用玻璃化冷冻卵母细胞解冻后，透明带对蛋白酶的抵抗力显著增强。对超微结构的影响，主要表现在质膜和一些细胞器上。孙青原等 (1994) 报道，对牛 GV 期卵母细胞及体外成熟卵母细胞进行冷冻保存，经台盼蓝染色判定为存活的卵母细胞均存在不同程度的亚细胞结构损伤：质膜内陷、破裂，胞质与透明带相连，微绒毛数量减少或消失，线粒体分散、膨大，内质网囊池扩张，高尔基复合体消失，细胞基质出现空白区等现象。

8 影响卵母细胞冷冻效果的因素

8.1 卵母细胞的不同发育时期对冷冻效果的影响

从各种动物及人卵母细胞的冷冻试验发现，成熟卵母细胞的冷冻效果最好，且从 GV 期到成熟期，随着卵母细胞成熟时间的增加其冷冻效果也呈上升趋势

[271]。刘海军对山羊卵母细胞冷冻的研究，从 GV 期、体外成熟 9h、24h，冷冻解冻后卵母细胞形态正常率、卵裂率都逐渐增加^[272]。孙青原等用平衡冷冻法和玻璃化法冷冻牛未成熟卵母细胞，研究卵母细胞解冻后细微结构的损伤，主要表现为细胞膜的破坏和微绒毛的减少或消失，各种细胞器和内含物的损伤^[273]。这些结构的损伤是未成熟卵母细胞不能继续成熟、受精和发育的原因。

8.2 卵母细胞脂肪含量对冷冻效果的影响

细胞内脂质是造成细胞冷冻敏感性的重要原因^[274]。猪的卵母细胞因其含脂肪相对较高而对低温耐受性低。Nagashima 等采用去除胞质中的脂滴的方法对猪卵母细胞进行了玻璃化冷冻的尝试^[275]。实验分为三组，第一组卵母细胞用 7.5 μ l/ml 细胞松弛素 B 预处理 10min 后再以 12500Xg 离心 10min；第二组用显微操作法去除脂滴；第三组为对照组未经任何处理。将三组玻璃化冷冻后形态正常率分别为 46%、58%、60%，三组之间无差别；带下精子注射受精率分别为 40%、44%、0%；受精卵发育至 8 细胞的比率分别为 0%、100%、0%。结果表明去除脂滴可明显提高猪卵母细胞冷冻效果。

8.3 卵母细胞外围结构对冷冻效果的影响

卵母细胞的外围结构特别是透明带，对卵母细胞起着极为重要的保护作用，1982 年 Quinn 等证明透明带完整的卵母细胞冷冻后存活率和受精率分别为 71.0% 和 17.5%；而透明带不完整的卵母细胞分别为 31.0% 和 14.5%。关于卵丘细胞对卵母细胞的冷冻效果，结果不一。Whittingham、Michaelis 认为有无卵丘细胞对冷冻效果没有明显影响；而 Lim 等在冷冻 GV 期卵母细胞时，保留和去除卵丘细胞的卵母细胞冷冻解冻后成熟率分别为 44% 和 30%，表明卵丘细胞的存在对卵母细胞的冷冻效果有益^[276]。Trounson、Imoedemhe 和 Sique 的研究效果也证明卵丘细胞的存在对人卵母细胞冷冻解冻后的发育有良好作用^[277]。

8.4 冷冻方法的影响

目前卵母细胞超低温冷冻方法是借鉴于胚胎冷冻方法而建立的，常用的有慢

速、快速冷冻法和玻璃化冷冻法。慢速冷冻中过慢的冷冻速度使溶液的电解质逐渐升高，导致卵母细胞膜脂质蛋白复合体被破坏和膜被分解^[278]。当细胞膜脱水收缩达到临界最小体积时，又会使细胞膜的渗透性产生不可逆的损伤，原来不能透过膜的溶质变成可渗透的，进而造成细胞损伤或死亡^[279]。快速冷冻法中卵母细胞必须经历低于 10℃ 的一段时间，低温对卵母细胞发育力很有影响^[280]。玻璃化法使通过使用高浓度冷冻保护剂而使液体在快速降温过程中形成非晶体的玻璃态，从而避免了细胞内冰晶的形成。

玻璃化法因其快速的冷却速率可有效地克服慢速、快速冷冻法中对卵母细胞造成的负面影响，但玻璃化法的高浓度冷冻保护剂会造成对卵母细胞的细胞毒性和渗透损伤。

8.5 冷冻保护剂的影响

冷冻保护剂的作用主要是促使细胞脱水，稀释溶液中溶质浓度，减少冷冻和解冻过程中细胞渗透性损伤和阻止冰晶的形成。根据其对细胞膜的渗透能力可将其分为渗透性保护剂（如：GL、DMSO、EG、PROH 等）和非渗透性保护剂（常用的有：蔗糖、Ficoll、BSA、FBS 等）。渗透性保护剂的主要作用机制是与水结合后，可使溶液的冰点下降，使之不易形成冰晶；除此外，在脱水和复水过程中，它可以起到稀释溶液中溶质浓度，减轻盐害作用；进入细胞后，可降低细胞脱水引起的皱缩程度和速度，缓解复温时渗透性膨胀所引起的损伤，从而起到冷冻保护作用。非渗透性保护剂的作用则是通过提高细胞外液渗透压，使细胞在冷冻降温前充分脱水，减少冰晶形成；同时，解冻复温复水过程中，在细胞外液产生足够的渗透压，以防止水分过快地进入细胞而千万细胞过度膨胀死亡，从而达到冷冻保护的目。

在早期卵母细胞冷冻实验中，人们往往只使用单一冷冻保护剂（渗透性保护剂）^[281]。后来，研究人员通过多方研究发现，在单一渗透性冷冻保护剂中添加一定浓度的非渗透性保护剂，能显著提高卵母细胞冻后培养成熟率及胚胎后期发育潜力。这方面研究最早是由 Scheffen 发现，现在在哺乳动物卵母细胞冷冻保存中广为应用，只是不同的学者在具体操作有所不同，包括混合冷冻保护剂的组成、浓度以及处理时间等^[282-285]。在混合冷冻保护剂的使用中，最为典型的莫过于玻

璃化冷冻液的配制。国外以 Kasai、Vajta 等人的报道较多，而国内则多采用朱士恩冷冻保护配方，其基本组成都是以高浓度渗透性保护剂+高浓度非渗透性保护剂（如 40%EG+18%Ficoll）。

以上冷冻剂是人工有机化学物质，它们的使用对卵母细胞都不可避免地造成损害。近些年来对抗冻动物保护机制的研究发现，大多数的抗冻动物可以合成一些特殊的低温保护物质。提取这些物质用于卵母细胞冷冻保存，即使浓度很低也能有效抑制冰晶的形成，且对卵母细胞无毒害作用。对这些天然低温保护物质的使用，也有相反的声音，认为它们的添加对卵母细胞的冷冻效果没有什么促进作用^[286-287]，甚至会产生不利的影响^[288]。对这些新型无毒抗冻剂的进一步研究使用，可望能将胚胎和卵母细胞冷冻保存带入一个新的发展阶段。

9 展望

利用卵母细胞冷冻保存技术和胚胎冷冻技术可以建立“卵子库”和“胚子库”，不仅可以解决目前卵母细胞来源短缺的问题，还可以使其它生物技术如体外受精、克隆和转基因动物生产不受时间和空间的限制，并且代替家畜的活体保种和濒危动物遗传种质资源保存。在人类医学上，卵母细胞的冷冻保存将会为那些由于病理或其它原因造成不孕的病人提供一个挽救生育的机会。但是，卵母细胞的冷冻保存仍然存在着许多尚待解决的问题，如卵母细胞对低温的敏感性很强，冷冻保存后卵母细胞活力、受精率及其发育能力均明显降低。在不久的将来，随着卵母细胞冷冻保存技术和胚胎冷冻保存技术的进一步完善和规范，使其与其它胚胎工程技术相结合，必将在畜牧业生产、生物技术以及人类医学领域取得新的突破。

第三章 牛卵母细胞体外成熟技术研究

卵母细胞体外成熟是体外胚生产的基础,卵母细胞体外成熟不仅受到卵巢周期、动物品种、卵泡大小、激素、血清等多种因素影响,而且与卵母细胞体外成熟的程序和方法及操作熟练程度密切相关。卵母细胞成熟包括细胞胞质成熟和细胞核成熟。在体内成熟的卵母细胞,细胞质和细胞核成熟几乎同时进行,但体外成熟的卵母细胞往往是细胞核成熟早于细胞质成熟。目前,牛卵母细胞成熟效率各个实验室报道不一致,成熟率大约在30%~70%之间。在成熟培养中,常用TCM199添加血清和生殖激素作为基础培养液培养卵母细胞。本试验是以牛卵母细胞为材料,以掌握和完善牛卵母细胞体外成熟体系,为体外胚胎生产奠定基础。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂

促卵泡素(Follicle Stimulating Hormone, FSH, 加拿大 bioniche, L032-B053);
促黄体素(Luteal Hormone, LH, 宁波市激素制品有限公司, 20060516);
17 β -雌二醇(17- β -estrogen, 17 β -E₂, 上海博蕴科技有限公司, 20070406);
胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, ①北京元亨圣马生物技术研究所, 20060508; ②GIBCO, Lot No 613866, Expiration: 07/2011);
牛血清白蛋白(BSA, Albumin Bovine V, Roche 738328, Expiration: 09/2009);
TCM199 培养液(Earles salts, Sigma, M-4530);
丙酮酸钠(Sodium Pyruvate, Sigma, P-2256);
透明质酸酶(Hyaluronidase, HE, Sigma 分装, H-3506);
青霉素钠(Penicillin G Sodium Salt, C₁₆H₁₇N₂NaO₄S, 1650units/mg, Sigma, PENNA, Bbiotech BOYUN, Expiration: 09/2009);
硫酸链霉素(Streptomycin Sulfate, (C₂₁H₃₉N₇O₁₂) 3H₂SO₄, Amresco 0382,

Expiration: 08/2010);

甘油 (Glycerol, GL, 天津市元立化工有限公司, 20070105);

石蜡油 (Mineral Oil, Sigma, M-8410);

生理盐水 (陕西德福来有限责任公司, 批号 2007082218);

超纯水 (Super Pure Water, 去离子 4 蒸水, 自制);

无机盐试剂全部用实验室现有试剂。

1.1.2 仪器与设备

体视显微镜 (Olympus TRPT-4045 型);

CO₂ 培养箱 (SANYO MCO-15A, SANYO Electric Co., Ltd., Japan);

倒置显微镜 (COIC-0802);

超净工作台 (苏州无线电专用设备厂, SW-CJ-IB 型);

高压灭菌锅 (上海医疗器械二厂, YXQ G01 280 型);

超纯水机 (上海亚荣生化仪器厂, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器);

电子天平 (Sartorius, Germany, 0.0001g);

酸度计 (上海世诺物理光学仪器有限公司, PHB-1 型);

冰箱 (TCL);

35mm 培养皿 (美国);

4 孔培养板 (瑞士);

1.1.3 卵巢采集

实验用卵巢采自甘肃省平凉市崆峒区屠宰场。荷斯坦奶牛或黄牛屠宰后, 在 20~30min 内取出卵巢, 立即无菌采集卵巢, 用解剖剪切除子宫及卵巢上多余的脂肪组织后, 放入盛有 1000ml 含 100IU/ml 青霉素和链霉素的灭菌生理盐水中, 热水瓶内温度保持在 30~35℃之间 (初始控制温度 35℃)。1h 内带回实验室, 用 30~35℃无菌生理盐水冲洗三遍, 无菌操作间或超净台内进行采卵。

1.2 试验方法

1.2.1 牛卵泡卵母细胞的采集

用抽吸法采集卵母细胞。卵巢带回实验室后，除去表面的血迹，用 35℃ 灭菌生理盐水将卵巢清洗 3 次后，用灭菌滤纸或灭菌纸巾吸干卵巢表面的水珠，用带有 12 号针头的 10ml 注射器抽取卵巢表面直径为 2~8mm 卵泡中的卵母细胞。将抽取物缓慢注入 35mm 的拣卵皿中，静置沉淀 5~10min 后，于体视镜下拣取 COCs，移入另一 35mm 的拣卵皿中，加入适量拣卵液或采卵液(TCM199+10%血清)稀释。挑选卵丘细胞完整致密，胞质均一，色泽浅的卵母细胞成熟培养。

1.2.2 卵母细胞的筛选和分级

把拣取的卵母细胞用拣卵液洗涤 3 遍，体视镜检卵，根据镜下 COCs 的形态判定卵母细胞等级，然后讲行分级和计数。卵母细胞从形态学分为四级：

A 级 卵丘细胞层完整而致密，不扩散，细胞质均匀、色泽浅而一致(暗凝)，形状规则，至少有 4 层卵丘细胞完全包裹的卵母细胞(卵丘细胞包裹 4~6 层以上)；COCs 直径 $\geq 300\mu\text{m}$ 。

B 级 卵丘细胞层部分脱落，胞质均匀、色泽较浅而一致，卵丘细胞包裹 2~4 层或 3 层，基本上包裹卵母细胞；COCs 直径 $\geq 200\mu\text{m}$ 。

C 级 卵丘细胞层极少或全部脱落的裸卵或胞质不均或呈现颗粒状、颜色发黑。为半裸卵，卵母细胞外有部分卵丘细胞存在；COCs 直径 $\geq 100\mu\text{m}$ 。

D 级 级为裸卵、变形卵，包括退化的卵母细胞。COCs 直径 $< 100\mu\text{m}$ 。

A、B 两级用于体外成熟培养，一般成熟率较高，C 级也可用于体外成熟培养，D 级不培养。

选择 A、B 级卵母细胞用成熟培养液洗涤三次，然后移入已在 CO_2 培养箱平衡 2h 的 $50\mu\text{l}\backslash 500\mu\text{l}$ 的成熟培养微滴中，上盖石蜡油，每个微滴培养卵母细胞 10~40 枚。培养条件为 38.5°C ，100%饱和湿度和 5% CO_2 。

1.2.4 卵母细胞的培养

在体视镜下收集可用于体外成熟的 A、B、C 和 D 级 COCs，COCs 用洗卵液洗涤 3~5 次，然后用成熟培养液洗涤 3~5 次，卵的洗涤处理是将检出的卵移入已备好的培养皿(35×15mm)的微滴中，在平皿作 3 个微滴(50 μ l)，依次通过而完成洗涤净化。在培养皿(35×10mm)的微滴(50 μ l)或四孔培养板(500 μ l)中培养 20~26h，培养条件为 5%CO₂，38.5℃和饱和湿度。培养时用灭菌液体石蜡油覆盖，每个微滴内培养 10~40 枚 COCs。

多次洗涤可除去杂质和病原菌。

1.2.5 卵母细胞体外成熟的判断

卵母细胞成熟培养一定时间后，观察卵母细胞周围的卵丘细胞扩展情况、胞质均一性，并抽检卵母细胞 PB₁ 排出情况。若卵丘细胞充分扩展，卵周隙扩大，并有 PB₁ 排出判为成熟。以卵丘细胞扩张、PB₁ 排出作为卵母细胞体外成熟的标志。

卵母细胞成熟率测定。将卵母细胞放入含 0.1%的透明质酸酶的成熟液中 3min，用仅仅比卵母细胞大几个微米的吸管将卵母细胞反复吹入吸出，以去除卵丘细胞。每次随即抽取部分 COCs，脱去胞外卵丘细胞，查 PB₁ 释放率。

1.3 培养液配方

采卵液：TCM199 液+10%FBS。

卵母细胞成熟培养液：

基础液：TCM199 液中加入 25mmol Hepes、0.055mg/ml 丙酮酸钠、2.2mg/ml NaHCO₃ 及 100IU/ml 青、链霉素。

成熟培养液：由基础液添加以下激素构成：10% FBS+10 μ g/ml FSH+10 μ g/ml LH+1 μ g/ml E₂。

1.4 试验设计

试验 1 将 COCs 按分级标准分为 A、B、C 和 D 级 4 级，分别进行成熟培养，测定卵母细胞的成熟率。体外成熟培养时间为 24h，重复测定 30 次。

试验 2 将 COCs 按来源卵泡大小分为大($\varphi > 8 \text{ mm}$)、中($2 \text{ mm} \leq \varphi \leq 8 \text{ mm}$)、小($\varphi < 2 \text{ mm}$) 3 组进行体外成熟培养，测定卵母细胞的成熟率。体外成熟培养时间为 24h，重复测定 30 次。

1.5 数据统计

全部数据均用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 LSD 显著性检验。

2 试验结果

2.1 COCs 级别对卵母细胞成熟的影响

按照 COCs 分级标准，将 COCs 分为 4 级，分别进行成熟培养，测定卵母细胞的成熟率。测定结果统计见表 3-1。

表 3-1 不同级别 COCs 卵母细胞成熟率

Table 3-1 Effect of the Different Grade COCs on the Oocyte Maturation

COCs 级别 Grade of COCs	样本数 Samples	COCs 数 (枚) No.of COCs	成熟 COCs (枚) Mat.COCs	成熟率 (%) Rate Of Mat.	标准误 Std.Deviation
A 级 COCs First Grade	30	409	255	63.8097 a	12.5506
B 级 COCs Second Grade	30	427	197	47.8090 b	9.9379
C 级 COCs Third Grade	30	339	8	2.0123 c	3.6461
D 级 COCs Forth Grade	30	186	0	0.0000 d	0.0000

备注 (Note): ab、ac、ad、bc、bd、cd ($p < 0.01$)。

表 3-1 资料表明，COCs 选择级别不同，其培养成熟率之间存在很大差异，成熟率由高到低的顺序为 A 级、B 级、C 级和 D 级，各组之间的差异均达到极显著水平 ($p < 0.01$)，其中 A 级 COCs 成熟率达到 63.81%，B 级 COCs 成熟率达到 47.81%，明显高于 C 级 COCs 和 D 级 COCs，C 级 COCs 仅有个别发育成熟，D 级 COCs 未见到发育成熟的卵母细胞。因此，A 级和 B 级 COCs 是卵母细

胞体外培养和胚胎体外生产的主要资源。

用表 3-1 资料绘制的不同级别 COCs 培育成熟率均数图（图 3-1）更直观地反映了 COCs 成熟率与 COCs 级别之间的密切关系。

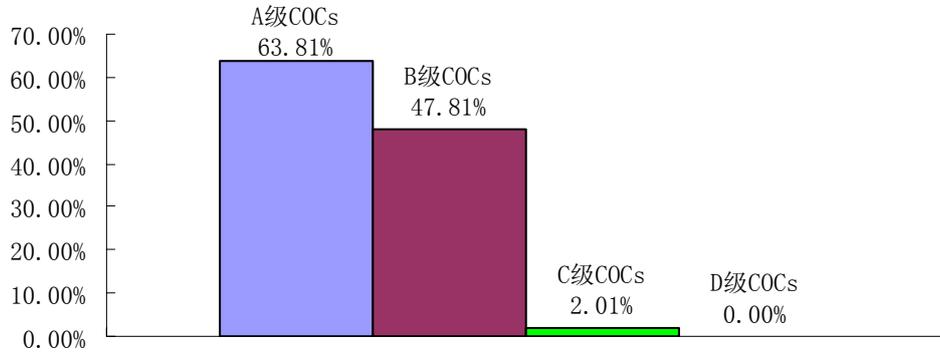


图3-1 不同级别COCs卵母细胞成熟率均数图

Fig.3-1 Means Histogram of Oocyte Maturation Rate for Different Grade of COCs

2.2 卵泡直径对卵母细胞成熟率的影响

根据卵巢表面卵泡直径，将卵泡划分为大 ($\phi > 8 \text{ mm}$)、中 ($2 \text{ mm} \leq \phi \leq 8 \text{ mm}$)、小 ($\phi < 2 \text{ mm}$) 三种类型，分别采集 COCs 和卵泡液。对采自三种不同类型卵泡的 COCs 分别进行成熟培养，测定卵母细胞的成熟率。测定结果见表 3-2。

表 3-2 COCs 不同来源对卵母细胞成熟的影响

Table 3-2 Effect of the COCs From Different Size Follicle on the Oocyte Maturation

卵泡直径 Follicular Diameter	样本数 Samples	COCs 数 No.of COCs	成熟 COCs Mat.COCs	成熟率 Rate of Mat.	标准误 Std. Deviation
卵泡直径 < 2mm	30	649	128	19.0647 b	4.4812
卵泡直径 2~8mm	30	945	578	61.8433 a	8.3118
卵泡直径 > 8mm	30	147	30	17.0723 c	12.7210

备注：ab、ac ($p < 0.01$)；bc ($p > 0.05$)。

表 3-2 资料表明，卵母细胞的成熟率与采集 COCs 时的卵泡直径关系密切。卵泡直径 2~8mm 组的卵母细胞的成熟率高达 61.82%，显著高于卵泡直径 < 2mm 组 (19.06%) 和卵泡直径 > 8mm 组 (17.07%) ($p < 0.01$)。后 2 组中卵泡直径 < 2mm 组略高于卵泡直径 > 8mm 组，但无显著差异 ($p > 0.05$)。因此，在卵母细胞体外培养过程中，宜选择卵泡发育水平基本正常的卵泡采集 COCs，而不宜选择卵泡发育过大或过小的边际卵泡。

用表 3-2 资料绘制的不同卵泡直径 COCs 卵母细胞成熟率均数图（图 3-2）同样直观反映了卵母细胞成熟率与卵泡直径之间的密切关系。

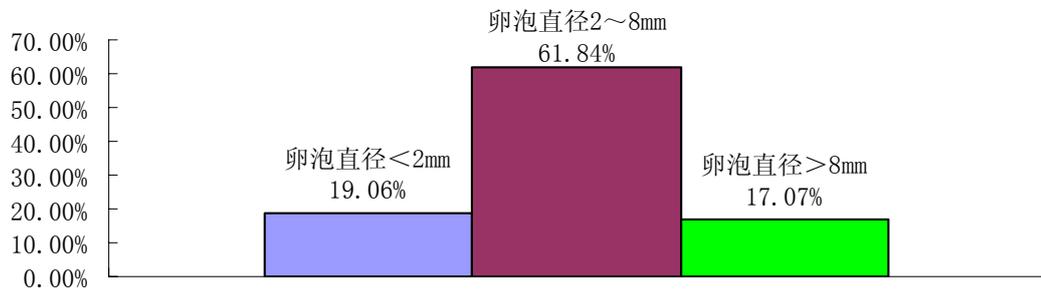


图3-2 源于不同直径卵泡COCs的卵母细胞成熟率均数图

Fig.3-2 Means Histogram of Oocyte Maturation Rate for Different size Follicle

3 分析讨论

3.1 COCs 级别对卵母细胞成熟的影响

在采集卵母细胞过程中，回收液中含有不同级别的 COCs，其大小、形态、发育潜力等方面均存在差异。COCs 依其卵丘细胞对卵母细胞的包被程度分为 4 级，其中 A 级至少有 4 层卵丘细胞完全包被卵母细胞，B 级 2~4 层卵丘细胞基本上包被卵母细胞，C 级为半裸卵，卵母细胞外有部分卵丘细胞存在，D 级为裸卵、变形卵，包括退化的卵母细胞。

卵丘细胞与卵母细胞之间存在着广泛的间隙连接，为卵母细胞提供大量的营养物质，如卵母细胞成熟所需的蛋白质的磷酸化与去磷酸化、氨基酸的摄入都受卵丘细胞的调节，cAMP、IP₃ 等第二信使也是通过缝隙连接从卵丘细胞进入卵母细胞的，对卵母细胞的成熟起着非常重要的调节作用。在卵母细胞成熟过程中，卵丘细胞层高度扩展，并且分泌多种物质，促进了卵母细胞核成熟和胞质成熟。卵母细胞的成熟也促进卵丘细胞的进一步扩展，FSH 和 EGF 刺激卵母细胞产生并分泌透明质酸。因此从卵丘细胞的扩展程度可以判定卵母细胞的成熟效果。当卵母细胞接近成熟时，卵丘细胞与卵母细胞的间隙连接也就变得松散，卵丘细胞向卵母细胞传递的卵母细胞减数分裂抑制物质减少，引起卵母细胞核成熟排出 PB₁，PB₁ 的排出是判定卵母细胞体外成熟的主要特征。成熟良好的卵母细胞，卵丘细胞层也容易吹散。李裕强（2001）研究得出在卵母细胞体外成熟阶段，包

裹在卵母细胞外周的卵丘细胞的层数和紧密程度,对卵母细胞受精和卵裂以及胚胎发育均有很大的影响,而且发育能力随卵丘细胞层数的增加呈增加的趋势。

本试验表明,COCs 等级对卵母细胞的成熟有显著的影响,A 级和 B 级 COCs 的成熟率显著高于 C 级和 D 级,A 级成熟率达到 63.81%,B 级成熟率达到 47.81%,明显高于 C 级 2.01%和 D 级 0.00%,这与 COCs 的卵丘细胞数量和培养扩展有很大关系,同样表明卵丘细胞对卵母细胞的包被程度直接影响了卵母细胞的成熟程度。因此,COCs 的形态等级直接体现为卵丘细胞的数量,包被好的 A 级和 B 级 COCs 是卵母细胞体外培养和胚胎体外生产的主要资源和选择对象。

3.2 卵泡直径对卵母细胞成熟率的影响

利用屠体离体卵巢采集 COCs 时,卵巢表面分布有不同发育时期的卵泡,具体体现为直径和体积差异很大。在采集 COCs 时选择合适的卵泡直接影响将后卵母细胞成熟率。据报道,直径为 2~6mm 的卵泡为体外培养最佳卵泡,小于 2mm 卵泡发育能力很低,卵泡卵母细胞的减数分裂能力和胞质成熟能力差^[22];直径大于 6mm 的卵母细胞其卵裂率及囊胚发育率显著高于直径 2~6mm 小卵泡卵^[23]。Pavlok 报道,2~8mm 之间卵泡卵母细胞有相似的卵裂率及囊胚发育率,而小于 2mm 卵泡卵几乎完全缺乏发育至囊胚的能力,所以选择牛卵巢 2~8mm 卵泡采卵为宜。但是如果选择大卵泡,由于卵泡液中含有大量浑浊物,不利于检卵,而且采出的卵泡液浓度过大有凝固趋向。在卵泡形态上,要注意选择淡黄色的透亮卵泡,发红发紫有充血的症状,一般不予选用。

在选择卵巢卵泡过程中,不仅要考虑卵泡直径,同样要考虑采集卵泡的数量。从报道的资料看,直径为 2~6mm 的卵泡为体外培养最佳卵泡,但明显限制了 COCs 的获得数量。本试验中选择了卵泡直径>8mm、直径 2~8mm 和直径<2mm 三种类型的卵泡采集 COCs,卵母细胞成熟培养表明,卵母细胞的成熟率与采集 COCs 时的卵泡直径关系密切,其中卵泡直径 2~8mm 组的卵母细胞的成熟率高达 61.82%,显著高于其它组,并且采集的 COCs 比较多,这与 Pavlok 的报道结论一致。

所以,在卵母细胞体外培养过程中,宜选择卵泡发育水平基本正常的卵泡采集 COCs,而不宜选择卵泡发育过大或过小的边际卵泡。

4 小结

本次试验的目的是选择卵母细胞体外成熟培养的方法。试验从 COCs 的级别选择和卵巢卵泡直径选择 2 个方面进行了研究探讨。通过对试验结果的分析 and 讨论看, 可以认为: ①在卵母细胞成熟培养过程中, 选择 A 级和 B 级 COCs 的成熟率显著高于 C 级和 D 级, 操作过程中首先应选择 A 级和 B 级 COCs。②在卵巢卵泡大小的选择方面, 卵泡直径 2~8mm 组的卵母细胞成熟率显著高于其它组, 操作过程中应选择直径 2~8mm 卵泡采集 COCs。

第四章 牛卵母细胞体外受精技术研究

哺乳动物刚射出的精子并不具备受精能力，精子受精之前，须经过获能，发生顶体反应，才能使精子与卵子透明带发生作用，其中精子活力和顶体反应是影响受精效率的关键因素。在生殖道内，精子可以自动完成获能过程，但是在体外，必须经过特定的获能处理。在输卵管内，精子的获能和精子的运动能力主要受宫颈和输卵管内的分泌物调控，如 cAMP、氨基多糖（GAG）和离子等。精子是否与透明带识别，穿过卵黄膜，受精形成受精卵是评价精子获能的主要指标。近年来，随着精子获能机制的逐步解析，生殖道液体中诱导获能和顶体反应因子得到了深入了解。在体内，诱导精子获能的活性物质主要是发情期输卵管液中的氨基多糖。肝素是高度硫酸化的氨基多糖，能提高精子运动，诱导精子获能和顶体反应，添加肝素能提高受精率、卵裂率和胚胎囊胚发育率。肝素和咖啡因联合应用，可以减少精子进入卵子的时间，增加精子受精和胚胎发育率。精子浓度对受精和胚胎发育也有影响。本试验的目的是对牛精子体外获能的方法和体外受精效果作进行研究和探讨，为成熟卵母细胞的受精和胚胎发育提供科学依据。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂

促卵泡素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH, 加拿大 bioniche, L032-B053);
促黄体素 (Luteal Hormone, LH, 宁波市激素制品有限公司, 20060516);
17 β -雌二醇 (17- β -estrogen, 17 β -E₂, 上海博蕴科技有限公司, 20070406);
胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, ①北京元亨圣马生物技术研究所, 20060508; ②GIBCO, Lot No 613866, Expiration: 07/2011);
牛血清白蛋白(BSA, Albumin Bovine V, Roche 738328, Expiration: 09/2009);
TCM199 培养液 (Earles salts, Sigma, M-4530);

咖啡因 (Caffeine, Biotech boyun, s06020);
肝素钠(Heparin Sodium Salt, Sigma, Lot46D8537);
丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate, Sigma, P-2256);
透明质酸酶 (Hyaluronidase, HE, Sigma 分装, H-3506);
青霉素钠 (Penicillin G Sodium Salt, 1650units/mg, Sigma, PENNA, Bbiotech BOYUN, Expiration: 09/2009);
硫酸链霉素 (Streptomycin Sulfate, Amresco 0382, Expiration: 08/2010);
乙二醇 (Ethylene Glycol, EG, 莱阳市双双化工有限公司, 20070310);
甘油 (Glycerol, GL, 天津市元立化工有限公司, 20070105);
石蜡油 (Mineral Oil, Sigma, M-8410);
生理盐水 (陕西德福来有限责任公司, 批号 2007082218);
超纯水 (Super Pure Water, 去离子 4 蒸水, 自制);
无机盐试剂全部用实验室现有试剂。

1.1.2 仪器与设备

体视显微镜 (OlympusTRPT-4045 型);
CO₂ 培养箱 (SANYOMCO-15A, SANYOElectricCo., Ltd., Japan);
倒置显微镜 (COIC-0802);
超净工作台 (苏州无线电专用设备厂, SW-CJ-IB 型);
高压灭菌锅 (上海医疗器械二厂, YXQ G01 280 型);
超纯水机 (上海亚荣生化仪器厂, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器);
电子天平 (Sartorius,Germany, 0.0001g);
酸度计 (上海世诺物理光学仪器有限公司, PHB-1 型);
冰箱 (TCL); 35mm 培养皿 (美国); 4 孔培养板 (瑞士);
台式离心机 (4000rpm, 上海安亭科学仪器厂)。

1.1.3 牛卵巢和精液

实验用卵巢采自甘肃省平凉市崆峒区屠宰场。荷斯坦奶牛或黄牛屠宰后, 在

20~30min 内取出卵巢，立即无菌采集卵巢，用解剖剪切除子宫及卵巢上多余的脂肪组织后，放入盛有 1000ml 含 100IU/ml 青霉素和链霉素的灭菌生理盐水中，热水瓶内温度保持在 30~35℃之间（初始控制温度 35℃）。1h 内带回实验室，用 30~35℃无菌生理盐水冲洗三遍，无菌操作间或超净台内进行采卵。

实验用精液为上海金晖公司 0.25ml 南德温牛（SD）冻精，编号以实际使用时纪录为准。

1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的的采集与培养

用抽吸法采集卵巢表面直径为 2~8mm 卵泡中的卵母细胞，在体视镜下收集可用于体外成熟的 A、B 级 COCs，COCs 用洗卵液洗涤 3~5 次，然后用成熟培养液洗涤 3~5 次，卵的洗涤处理是将检出的卵移入已备好的培养皿(35×15mm)的微滴中，在平皿作 3 个微滴(50μl)，依次通过而完成洗涤净化。在培养皿(35×10mm)的微滴(50μl)或四孔培养板(500μl)中培养 24h，培养条件为 5%CO₂、38.5℃和饱和湿度。培养时用灭菌液体石蜡油覆盖，每个微滴内培养 10~40 枚 COCs。

1.2.2 卵母细胞体外成熟的判断

卵母细胞成熟培养一定时间后，观察卵母细胞周围的卵丘细胞扩展情况、胞质均一性，并抽检卵母细胞 PB₁ 排出情况。若卵丘细胞充分扩展，卵周隙扩大，并有 PB₁ 排出判为成熟。以卵丘细胞扩张、PB₁ 排出作为卵母细胞体外成熟的标志。选择成熟度较好的卵母细胞进行体外受精。

1.2.3 精子分离及获能方法

(1) 上浮法精子分离。取 0.25ml SD 牛细管冻精一支，35℃水浴解冻 20sec，检查活力(低限为 0.3)，然后将精液沿离心管管壁轻轻推入离心管底部，将加有精液和 5ml BO 液的离心管在 CO₂ 培养箱倾斜 45°放置 10~60min，使离心

管底部有活力的精子尽可能上浮至洗精液上部，然后取出离心管，吸取上层约 4ml 含有精子的 BO 液转移至另一离心管，再加入 1ml BO 液、离心(1500rpm, 5min)，弃上清液，用 150 μ l (0.15ml) 获能液悬浮分离精子，并调整精子浓度为 1×10^6 个/ml。在 CO₂ 培养箱孵育 10~15min 获能备用。

(2) 离心法精子分离。取 0.25ml SD 牛细管冻精一支，35℃温水解冻 20sec，检查活力(低限为 0.3)，然后立即将精液沿 BO 液面轻轻推入装有 5ml BO 液的离心管中，摇匀后 1500rpm 离心 5min，第一次离心结束后，分离上清液(上部 4.5ml)和沉淀液(下部 0.5ml)，检查精子活力(低限 0.4 有超活化现象)，活力符合规定后，再在沉淀液中注入 4.5ml BO 液，在上清液中注入 0.5ml BO 液，1500rpm 离心 5min，均弃上清，用 150 μ l (0.15ml) 获能液悬浮分离精子，调节精子密度至 1×10^6 /ml (用 BO 液)，在 CO₂ 培养箱孵育 10~15min 获能备用。

1.4 卵母细胞体外受精

将成熟培养 24h、卵丘细胞充分扩展的成熟 COCs 用受精液充分洗涤 3 遍，然后按每微滴(50 μ l 或 500 μ l)10~40 枚移入已平衡 2h 以上、有石蜡油覆盖的受精液中，再加入等体积的经浓度调整的精液，置 CO₂ 培养箱中孵育 8h (BO 液洗涤和获能)。

受精结束后，震荡去除卵母细胞外围的精子 and 卵丘细胞，受精卵继续进行胚胎培养。

1.5 体外胚胎培养

使用 4 孔板进行胚胎培养，用 500 μ l IVC 培养液，每次培养受精卵 20~40 枚，培养液上面覆盖石蜡油。培养 48 h 后，观察且记录胚胎卵裂情况，去除未卵裂的卵母细胞，补加等量置换的 IVC 培养液，继续培养 120 h，记录囊胚发育情况。胚胎培养过程中使用共培养系统。

1.6 培养基的配制

采卵液：TCM199 液+10%FBS。

IVM 液: ①基础液 (TCM199 液中加入 25mmol Hepes、0.055mg/ml 丙酮酸钠、2.2mg/ml 碳酸氢钠及 100IU/ml 青、链霉素); ②IVM 液(①+10%FBS+10 μ g/ml FSH+10 μ g/ml LH+1 μ g/ml E₂)。

BO 液(清洗液): 由 A 液和 B 液两部分组成(g/1000ml): A 液: NaCl 6.5500、KCl 0.3000、NaHCO₃ 3.1040、NaH₂PO₄H₂O 0.1130、Glucose 2.5000、Na-pyruvate 0.0550、Penicillin 0.0310 和 Streptomycine 0.050; B 液: MgCl₂6H₂O 0.1060、CaCl₂2H₂O 0.3300。将 A 液、B 液混匀, 加入 0.1%Phenol red 2ml (0.4%Phenol red0.5ml), 调整 pH 值至 7.2~7.4(用 pH 计测定), 用去离子四蒸水定容到 1000ml, 调制成 BO 液, 其渗透压浓度为 300mOsm。

获能液 (受精液): BO 液+3mg/ml BSA+10 μ g/ml 肝素钠+5mmol 咖啡因。

IVC 液: TCM199+10%FBS+0.1 mg/ml 谷氨酰胺(Gln)+1 μ g/ml 表皮生长因子(EGF)+共培养系统。

1.7 试验设计

试验 1 探讨不同精子处理方法对精子获能效果和卵母细胞受精率的影响。精子处理方法有上游法、Percoll 法等, 本试验采用不同的上浮法和直接离心法处理精子。通过不同上浮或离心处理, 观察精子获能效果, 选择获能效果好的上浮法和离心法用于卵母细胞体外受精研究。

试验 2 探讨温度对精子获能和卵母细胞受精率的影响。精子分别在 20 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C 室温和 38.5 $^{\circ}$ C 恒温 (CO₂ 培养箱) 温度条件下上浮和获能 10~60min, 精卵共孵育时间 8h。观察受精卵及桑囊胚发育情况。

试验 3 探讨精子浓度与受精的关系。使用不同浓度 (1.0 \times 10⁶、1.5 \times 10⁶ 和 3.0 \times 10⁶ 个/ml) 精子与卵子共同孵育 8h 后, 观察受精卵的受精情况, 48h 后观察卵裂数。

1.8 数据统计

全部数据均用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 LSD 检验。

2 试验结果

2.1 精子离心法获能效果

依据离心法精子分离和获能程序，精子洗涤分为 2 个阶段，第一阶段为初级分离，第二阶段是在第一阶段的基础上对沉淀液和上清液分别添加 BO 液定容到 5ml 后，各自进行第二次离心。获取 2 种沉淀液（0.5ml 左右）并进行获能处理。

用 150 μ l 获能液悬浮分离精子，用 BO 液调节精子密度至 1×10^6 个/ml，在 CO₂ 培养箱孵育 10~20min 获能备用。

将获能液加入 2 种二次沉淀液前立即抹片，对离心后的活力和精子密度进行检查。试验统计结果详见表 4-1。

表 4-1 精子离心法活力比较

Table 4-1 Compare of Sperm Activation by Centrifuged

精子活力 Sperm Activation	样本 Samples	均数 Mean of S.A.	标准差 Std. Deviation
冻精活力 S.A. of Thawing Freezed Sperm	20	0.4050 c	0.0510
2次离心上清液活力 S.A. of Up-liquid Sperm by Second Centrifuged	20	0.5579 a	0.0854
2次离心沉淀液活力 S.A. of Deposit-liquid Sperm by Second Centrifuged	20	0.4381 b	0.0669

备注 (Note) : ab、ac ($p < 0.01$) , bc ($p > 0.05$) 。 S.A. Means Sperm Activation

离心法是精子分离的方法之一，现有的资料全部是直接利用沉淀液，或者继续对沉淀液进行第二次离心，用第二次离心获得的沉淀液进行获能处理。在预备试验中，发现离心上清液的离心精子和品质优于沉淀液的。在本试验中，对这一现象进行了更深入研究，发现预备试验中的现象在后期试验中的重复率很高。表 4-1 统计分析表明，2 次离心上清液活力为 0.56，显著高于 2 次离心沉淀液活力 (0.44) 和冻精解冻时活力 (0.41) ($p < 0.01$)，而后 2 者之间以沉淀液活力为好，但无统计学差异 ($p > 0.05$)。另外，2 次离心上清液的透明度非常好，其沉淀液中肉眼观察不到可见的防冻剂等，表明 2 次离心上清液及其沉淀液已更进一步对防冻剂、稀释剂进行了稀释和清洗，可能进一步降低了他们对精子的损伤程度。

以上结果图示如下。图 4-1 直观反映了上述试验结果，2 次离心上清液活力均数点显著高于其它 2 组。

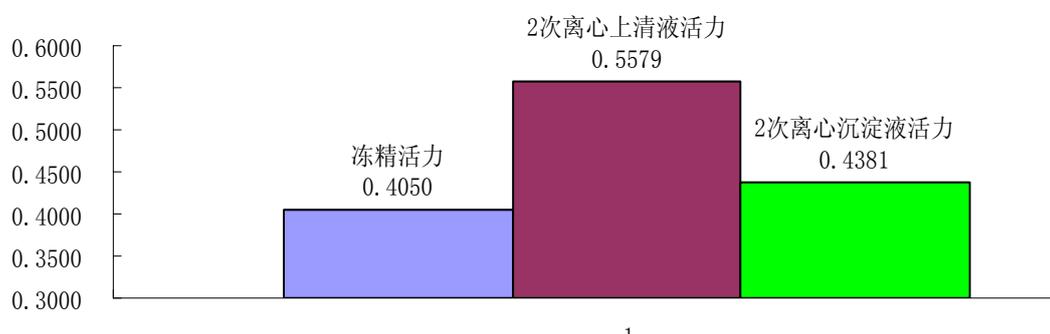


图 4-1 精子离心活力均数比较图

Fig.4-1 Means Histogram Compare of S.A.by Centrifuged

对 2 次离心上清液和 2 次离心沉淀液同时进行获能处理，并按 10min、15min 和 20min 三个时段进行精子获能活力检查，测定不同处理及其不同时段的最佳获能效果。测定结果见表 4-2。

表 4-2 统计分析资料表明，2 次离心上清液获得的精子不仅活力高，而且获能效果更好，表现为镜检活力高，视野清晰，死亡精子和畸形精子少，超活化精子比例高等；相反，2 次离心沉淀液获得的精子活力比较低，表现为镜检时视野较混浊，死亡精子和畸形精子多，虽然超活化精子较多，但总体视觉效果差，死、弱、畸精子影响了获能效果。获能效果最好的是上清液 10min，活力达到 0.59，其次为上清液 15min，活力为 0.58，二者均显著高于其他组 ($p < 0.01$)；在沉淀液组活力的升降序列也是 10min 优于 15min 和 20min。但从精子超活化和获能效果综合分析，应选用上清液 15min 组的获能精子进行体外受精。

表 4-2 精子不同离心方法获能效果

Table4-2 Effect of Sperm Capacitation for Different Management

处理 Management	样本 Samples	精子活力均数 Mean of S.A.	标准差 Std. Deviation
上清液10min Up-liquid	20	0.5900 a	0.11653
上清液 15min Up-liquid	20	0.5850 b	0.10400
上清液 20min Up-liquid	20	0.4950 c	0.06048
沉淀液 10min Deposit -liquid	20	0.4050 d	0.02236
沉淀液 15min Deposit -liquid	20	0.3150 e	0.03663
沉淀液 20min Deposit -liquid	20	0.2600 f	0.05026

备注 (Note) : ab、bc ($p < 0.05$) , ac、ad、ae、af、bc、bd、be、bf、cd、ce、cf、de、df ($p < 0.01$) , ef ($p < 0.05$) , ab ($p > 0.05$) 。

将以上统计资料转化为图形显示，2次离心上清液精子获能效果占据了高位部分，2次离心沉淀液则居于下部。说明采用不同的离心方法可产生不同的获能效果。

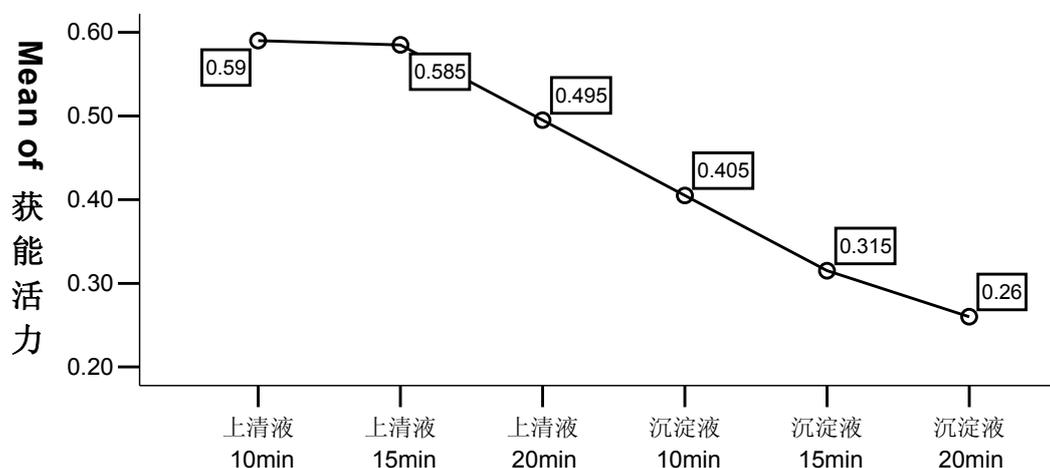


图 4-2 不同精子获能方法获能效果均数比较图

Fig.4-2 Means Plots of Sperm Capacitation for Different Management

2.2 温度对精子获能的影响

2.2.1 室温对精子获能的影响

一般情况下，精子洗涤、上浮和获能均在 CO₂ 培养箱中进行，但其过程过于复杂，反复开启 CO₂ 培养箱时对箱内其他培养物及箱内微环境有较大影响。在此基础上，提出了室温条件下在超净工作台上进行精子获能试验，探讨室温对精子获能的影响。室温控制在 20℃~24℃ 温度条件下获能 10~60min，测定精子活力的变化。实验时每 5min 镜检 1 次精子活力。室温条件下不同时间单位精子活力测定结果见表 4-3。

对照室温下不同上浮时间的精子活力均数绘制趋势图（图 4-3）和表 4-3 统计分析资料，室温上浮中以 45min 组的上浮效果最好，精子平均活力达到了 0.68 ($p < 0.01$)，其次为 50min 组，达到 0.62。在项目后期试验中，均以上述试验为基础，选择了上浮 45min 组的获能精子进行体外受精研究。

表 4-3 室温条件下上浮不同时间的精子活力

Table 4-3 Sperm Activation of Different Time of Swimming-up in Room Temperature

处理 Management	样本 Samples	精子活力均数 Mean of S.A.	标准误 Std. Deviation
冻精解冻活力 S.A. of Thawing Freezed Sperm	15	0.5000 g	0.0534
上浮15min Swimming-up 15 min	15	0.5667 c	0.0723
上浮20min Swimming-up 20 min	15	0.6200 b	0.0560
上浮25min Swimming-up 25 min	15	0.5933 bc	0.0798
上浮30min Swimming-up 30 min	15	0.6100 bc	0.0603
上浮35min Swimming-up 35 min	15	0.5467 df	0.0990
上浮40min Swimming-up 40 min	15	0.5900 bce	0.0603
上浮45min Swimming-up 45 min	15	0.6800 a	0.0455
上浮50min Swimming-up 50 min	15	0.6233 b	0.0623
上浮55min Swimming-up 55 min	15	0.6033 bc	0.0789
上浮60min Swimming-up 60 min	15	0.5267 de	0.0562

备注(Note): 以英文字母顺序排列, 相邻字母之间 $p < 0.05$, 间隔字母之间 $p < 0.01$ 。

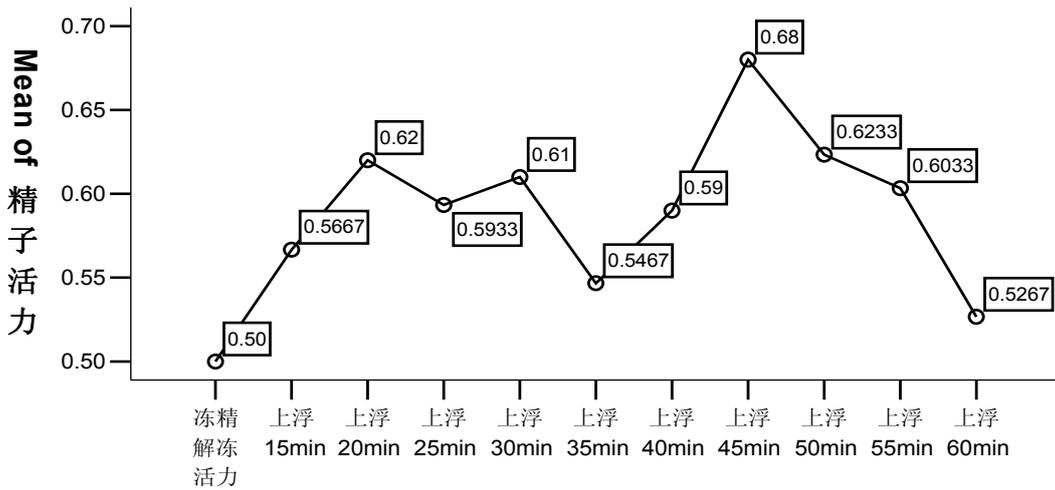


图 4-3 室温下不同上浮时间的精子活力均数比较图

Fig.4-3 Means Plots of Sperm Activation of Different Time for Swimming-up in Room Temperature

2.2.2 CO₂ 培养箱上浮对精子获能的影响

精子 CO₂ 培养箱 (38.5℃) 上浮法获能的特点是精子在高温下运动速度快, 高活力精子上浮较快。本试验结果 (表 4-4) 表明, 上浮 30min 时精子活力已经达到最大值, 比室温上浮的快 15min, 但此后的活力下降速度很快, 图 4-4 对此趋势给予了较好的描述。

表 4-4 CO₂ 培养箱 (38.5℃) 不同上浮时间的精子活力

Table 4-4 Sperm Activation of Different Time of Swimming-up in CO₂ Incubater (38.5℃)

处理 Management	样本 Samples	精子活力均数 Mean of S.A.	标准误 Std. Deviation
冻精解冻活力 S.A. of Thawing Freezed Sperm	15	0.4800 d	0.0527
上浮15min Swimming-up 15 min	15	0.5367 c	0.0667
上浮20min Swimming-up 20 min	15	0.5933 b	0.0562
上浮25min Swimming-up 25 min	15	0.6067 b	0.0798
上浮30min Swimming-up 30 min	15	0.6967 a	0.0766
上浮35min Swimming-up 35 min	15	0.5867 b	0.0743
上浮40min Swimming-up 40 min	15	0.5300 c	0.0527
上浮45min Swimming-up 45 min	15	0.4633 d	0.0441
上浮50min Swimming-up 50 min	15	0.4367 d	0.0480
上浮55min Swimming-up 55 min	15	0.4100 e	0.0338
上浮60min Swimming-up 60 min	15	0.3867 e	0.0441

备注 (Note)：以英文字母顺序排列，不同字母之间 $p < 0.01$ ，相同字母之间 $p > 0.05$ 。

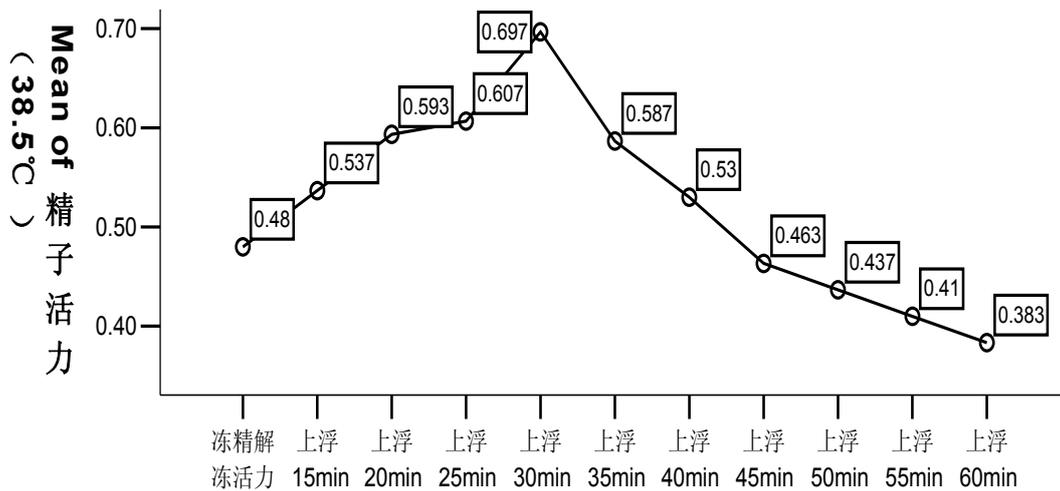


图 4-4 CO₂ 培养箱 (38.5℃) 中不同上浮时间的精子活力均数比较图

Fig.4-4 Means Plots of Sperm Activation of Different Time for Swimming-up in CO₂ Incubater

2.3 精子上浮法和离心法的受精效果

利用上清液获能精子、沉淀液获能精子、45min 室温上浮获能精子、30min CO₂ 培养箱上浮获能精子对成熟卵母细胞按照设计程序进行体外受精，培养 48h 后进行镜检，记录 2C 及其以上卵裂细胞数，对不同获能方式获能的精子进行体外受精效果评价。各项实验测定结果详见表 4-5。从表中统计分析数据看，各组数据接近，差异均不显著 ($p > 0.05$)，但总体效果以上清液获能精子的卵裂率最

高，表明其受精效果最好，其他组基本接近。

表 4-5 不同方法获能精子与卵母细胞受精率 (%)

Table 4-5 Fertilization Rate of Oocyte by Capacitated Sperm in Different Treatments

项目 Management	样本数 Samples	卵母细胞数 No. of O.M.	卵裂数 No. of 2-cell	受精率均数 Rate of Fertilization	标准误 Std. Deviation
上清液获能精子受精率 Fertilization of Up-liquid	30	478	205	43.2123	9.3765
沉淀液获能精子受精率 Fertilization of Deposit -liquid	30	471	192	40.1867	7.8066
室温上浮获能精子受精率 Fertilization of Room Temperature	30	478	199	41.4007	7.2640
CO ₂ 培养箱上浮获能精子受精率 Fertilization of CO ₂ Incubater Temperature	30	435	182	41.5057	5.7422

备注 (Note): 各组之间差异均不显著 ($p > 0.05$)。O.M. Means Oocyte Maturation。

对 4 个组的受精率均数制作如下均数图 (图 4-5)，更好地显示了各组的变化特点。

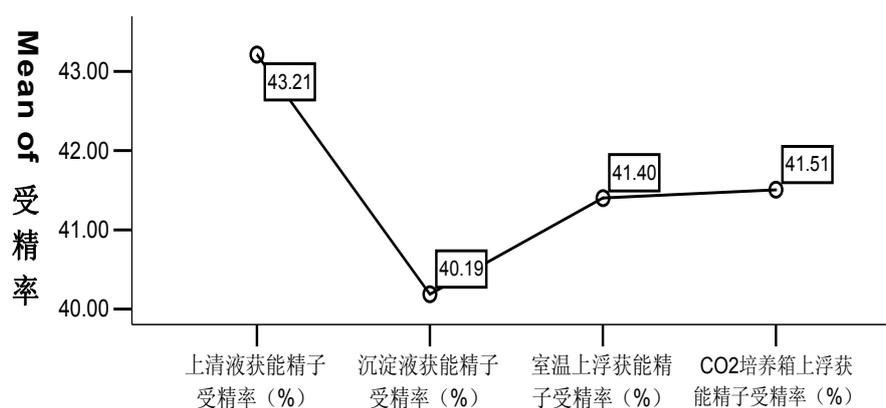


图 4-5 不同精子获能方法对卵母细胞受精率的影响 (均数图)

Fig.4-5 Means Plots of Fertilization Rate of Oocyte by Capacitated Sperm in Different Treatments

2.4 精子浓度与受精的关系

使用不同浓度的精子进行体外受精(上清液获能精子和 45min 室温上浮获能精子)，精子浓度选用高 (3.0×10^6 个/ml)、中 (1.5×10^6 个/ml)、低 (1.0×10^6 个/ml) 3 类与卵子共同孵育 6~8h，48h 后观察卵裂数。精子浓度用血球计数器测定。各项测定数据统计结果见表 4-6。结果表明，中浓度组的平均受精率为 47.34%，显著高于低浓度组的 42.38% ($p < 0.05$) 和高浓度组的 33.96% ($p < 0.01$)；低浓

度组的平均受精率显著高于高浓度组平均受精率 ($p < 0.01$)。

上述结果表明, 在本试验中, 卵母细胞体外受精所需精子的浓度应保持在适度范围内, 既不能太高, 也不宜偏低, 精子浓度以 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/ml 为宜。其变化趋势见图 6-6。

表 4-6 不同浓度的获能精子与卵母细胞的受精率

Fig.4-6 Fertilization Rate of Oocyte in Different Sperm Concentration

项目 Management	样本数 Samples	卵母细胞数 No.of O.M.	卵裂数 No.of 2-cell	受精率均数 Rate of Fertilization	标准误 Std. Deviation
精子密度高 (300万/ml) High Concentration of Sperm	30	402	137	33.9637 c	5.3815
精子密度中 (150万/ml) Middle Concentration of Sperm	30	403	190	47.3357 a	10.4297
精子密度稀低 (100万/ml) Low Concentration of Sperm	30	382	162	42.3837 b	5.7162

备注 (Note): ab ($p < 0.05$), ac、bc ($p < 0.01$)。

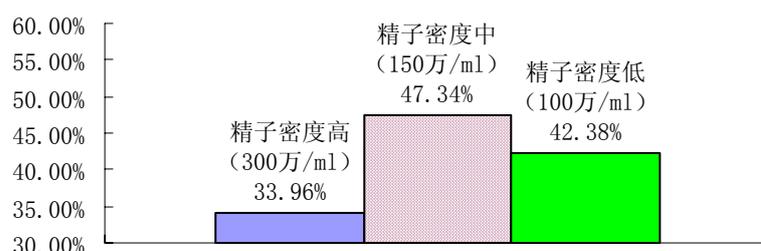


图 4-6 不同浓度精子对卵母细胞受精率的影响

Fig.4-6 Means Histogram of Fertilization Rate of Oocyte in Different Sperm Concentration

3 分析讨论

本试验从多个方面对牛卵母细胞体外受精技术涉及的关键环节进行了研究, 对比测定了精子获能的不同方法的获能效果, 并进行了受精试验和卵裂测定。

3.1 精子获能方法的研究

常用的精子获能方法主要是上浮法和 Percoll 法, 有时也用离心法。上浮法利用高活力精子运动快, 低活力精子运动慢的特点, 使高活力精子在一定条件下上浮到洗涤液的上清液中, 通过对上清液的离心获得清洗干净和活力高的精子进行获能处理, 此法的效果比较稳定。Percoll 密度梯度分离法是利用高活力精子比低活力精子密度大, 离心后精子按照密度大小分布于不同密度的梯度中, 高活力

精子可以在 Percoll 梯度的高密度区获得，此法的效果相对较差。离心法是将精液直接加入洗涤液中混匀，直接进行离心处理，将上清液弃掉，将离心管底部的沉淀进行获能处理，此法不能完全除去冷冻剂，对精液的洗涤不彻底，影响获能和体外受精的效果。本研究采用了离心法和上浮法精子洗涤和获能的方法，结合试验测定，对 2 种方法均进行了新探索和改进。

离心法的程序简单，可控性好，在试验前期试验过程中，发现第一次离心的上清液中有大量活力很好的精子存在。经过对上清液的二次离心，其沉淀物中的精子不仅活力好，而且在显微镜视野下清晰度非常好，无冷冻剂和稀释剂的颗粒等存在，死弱畸精子少，与原法第一次和第二次离心沉淀物形成了鲜明对比。其结果在精子获能和体外受精过程中得到了证明，即利用上清液 2 次离心得到的精子获能效果好，受精能力强。

上浮法的程序也较简单，与离心法相比，其特点体现在第一阶段的上浮过程中。其第二阶段与离心法异曲同工。从 2 种上浮法的结果看，室温上浮时由于室温变化较大，每次上浮效果差异也较大，均数点状图未形成稳定的抛物线。利用 CO₂ 培养箱进行精子上浮时，由于处于恒温环境，精子上浮效果比较稳定，均数图的抛物线趋势明显。从稳定性和降低精液利用率方面考虑，在精子获能和卵母细胞体外受精时，应首选 CO₂ 培养箱恒温精子上浮和获能的方法。另外，Parrish (1986) 首次报道使用上浮法处理精子时指出，上浮法处理过程耗时较长，所需冻精量要多，才能保证精子回收浓度。本研究虽然未探讨精液用量和上浮精子的关系，但试验中还是发现精液量较大时（用 2 枚冻精）上浮效果更好些。

3.2 精子上浮法和离心法的受精效果

本试验选用了 4 种精子获能方法，在卵母细胞体外受精过程中也表现出了相似的卵裂情况，受精率由高到低的序列为上清液获能 > 恒温上浮获能 > 室温上浮获能 > 沉淀液获能，其趋势与精子获能效果相一致。从实际应用方面分析，前 2 种方法的效果比较稳定，宜作为精子获能和体外受精的主要方法。

3.3 精子浓度与受精的关系

精子浓度与受精的关系方面研究较多。K.H.Lu (2004) 报道，如精子浓度过

于高，多精受精就多，浓度低则降低受精率， 1.0×10^6 个/ml 为最佳的受精浓度，当高浓度 3.0×10^6 个/ml 时，卵子的异常受精数量就增加，特别是多精受精增加，浓度为 0.5×10^6 个/ml 时，受精率显著的下降，精子浓度为 1.0×10^6 个/ml 浓度时，卵裂率和囊胚发育率比对照组高^[252]。当然，在保证精子浓度的特定条件下，其它因素也会影响精子浓度对受精的影响。Maria A.Gil (2004) 通过对猪体外受精发现，精子浓度与颗粒细胞有关，当卵子外有完整颗粒层时，精子浓度就应该提高 3~4 倍^[253]。本试验采用了 $(1.0、1.5、3.0) \times 10^6$ 个/ml 精子浓度受精研究，表明 1.5×10^6 个/ml 精子浓度的受精率最好，其次为 1.0×10^6 个/ml 精子浓度组，均显著高于 3.0×10^6 个/ml 精子浓度组的受精率，与报道资料相一致。

4 小结

精子离心法和上浮法在精子获能方面各有所长。

本试验突破了精子离心法的传统方法，避开了单纯利用沉淀液进行精子获能的思路，而直接对上清液进行离心处理，结果获得了理想的精子洗涤和获能效果，在卵母细胞体外受精率方面也得到了证明。为此，在本试验和后期培养试验中，2 次上清液离心法处理的精子得到了大量应用。

本试验中对 2 种上浮法的精子获能效果进行了对比试验，虽然室温上浮法简单易行，但效果没有 CO_2 培养箱恒温上浮法稳定，在试验中宜选用后者进行体外受精操作。

对于选择受精时获能精子的浓度，多数试验表明 1×10^6 个/ml 是比较理想的使用范围，本次研究的理想比例是 1.5×10^6 个/ml， 1.0×10^6 个/ml 的受精率也比较高。表明精子适宜浓度宜控制在 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/ml，不仅能提高受精率，还可避免或降低多精受精现象。

第五章 牛体外受精胚胎培养技术研究

早期胚胎的体外培养是体外受精、动物克隆、转基因等生物技术的一个关键环节，尽管体外培养许多物种的胚胎均可发育到囊胚阶段，但囊胚率偏低、质量较差，主要原因是胚胎体外培养体系不完善、体外胚发育能力差，移植后妊娠率降低。目前胚胎的体外培养体系不能完全模拟母畜生殖道内的环境，且不稳定。建立一个简单、稳定的胚胎发育培养体系势在必行。

本试验采用不同的培养体系对牛体外受精胚胎进行了体外培养，研究了不同培养条件下胚胎的体外发育能力，优化了牛胚胎体外培养体系。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂

促卵泡素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH, 加拿大 bioniche, L032-B053);
促黄体素 (Luteal Hormone, LH, 宁波市激素制品有限公司, 20060516);
17 β -雌二醇 (17- β -estrogen, 17 β -E₂, 上海博蕴科技有限公司, 20070406);
胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, ①北京元亨圣马生物技术研究所, 20060508; ②GIBCO, Lot No 613866, Expiration: 07/2011);
牛血清白蛋白 (BSA, Albumin Bovine V, Roche 738328, Expiration: 09/2009);
TCM199 培养液 (Earles salts, Sigma, M-4530);
咖啡因 (Caffeine, Biotech boyun, s06020);
EGF (Human EGF, Lot No 090605-2);
肝素钠 (Heparin Sodium Salt, Sigma, Lot46D8537);
丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate, Sigma, P-2256);
透明质酸酶 (Hyaluronidase, HE, Sigma 分装, H-3506);
Hepes (①N, N-羟乙基哌嗪乙烷磺酸, 毕龙-比特博分装; ②C₈H₁₈N₂O₄S,

BOYUN REAGENT, Expiration: 06/2009);

谷氨酰胺 (Glutamine, Sigma, G-3126);

青霉素钠 (Penicillin G Sodium Salt, $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$, 1650units/mg, Sigma, PENNA, Bbiotech BOYUN, Expiration: 09/2009);

硫酸链霉素 (Streptomycin Sulfate, $(C_{21}H_{39}N_7O_{12}) 3H_2SO_4$, Amresco 0382, Expiration: 08/2010);

乙二醇 (Ethylene Glycol, EG, 莱阳市双双化工有限公司, 20070310);

甘油 (Glycerol, GL, 天津市元立化工有限公司, 20070105);

石蜡油 (Mineral Oil, Sigma, M-8410);

生理盐水 (陕西德福来有限责任公司, 批号 2007082218);

超纯水 (Super Pure Water, 去离子 4 蒸水, 自制);

无机盐试剂全部用实验室现有试剂。

1.1.2 仪器与设备

体视显微镜 (OlympusTRPT-4045 型);

CO₂ 培养箱 (SANYOMCO-15A, SANYOElectricCo., Ltd., Japan);

倒置显微镜 (COIC-0802);

超净工作台 (苏州无线电专用设备厂, SW-CJ-IB 型);

高压灭菌锅 (上海医疗器械二厂, YXQ G01 280 型);

超纯水机 (上海亚荣生化仪器厂, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器);

电子天平 (Sartorius,Germany, 0.0001g);

酸度计 (上海世诺物理光学仪器有限公司, PHB-1 型);

冰箱 (TCL); 35mm 培养皿 (美国); 4 孔培养板 (瑞士);

台式离心机 (4000rpm, 上海安亭科学仪器厂)。

1.1.3 牛卵巢和精液

实验用卵巢采自甘肃省平凉市崆峒区屠宰场。荷斯坦奶牛或黄牛屠宰后, 在 20~30min 内取出卵巢, 立即无菌采集卵巢, 用解剖剪切除子宫及卵巢上多余的

脂肪组织后，放入盛有 1000ml 含 100IU/ml 青霉素和链霉素的灭菌生理盐水中，热水瓶内温度保持在 30~35℃ 之间（初始控制温度 35℃）。1h 内带回实验室，用 30~35℃ 无菌生理盐水冲洗三遍，无菌操作间或超净台内进行采卵。

实验用精液为上海金晖公司 0.25ml 南德温牛冻精，编号以实际使用时纪录为准。

1.2 试验方法

1.2.1 牛卵泡卵母细胞的采集与成熟培养

用抽吸法采集卵母细胞。抽取卵巢表面直径为 2~8mm 卵泡中的卵母细胞，于体视镜下拣取 COCs，挑选卵丘细胞完整致密，胞质均一，色泽浅的 A、B 级卵母细胞成熟培养。收集的 COCs 用洗卵液洗涤 3~5 次，然后用成熟培养液洗涤 3~5 次。在培养皿或四孔培养板(50μl 或 500μl 培养液，培养时上面用石蜡油覆盖，每个微滴内培养 10~40 个 COCs)中培养 24h，培养条件为 5%CO₂，38.5℃ 和饱和湿度。成熟培养液预先在培养箱中平衡 2h。

1.2.2 卵母细胞体外成熟的判断

卵母细胞成熟培养一定时间后，观察卵母细胞周围的卵丘细胞扩展情况、胞质均一性，并抽检卵母细胞第一极体排出情况。若卵丘细胞充分扩展，卵周隙扩大，并有第一极体排出判为成熟。以卵丘细胞扩张、第一极体排出作为卵母细胞体外成熟的标志。

1.2.3 卵母细胞体外受精

将成熟培养 24h、卵丘细胞充分扩展成熟 A、B 级 COCs 用受精液充分洗涤 3 遍，然后按每微滴(50μl 或 500μl)10~40 枚（依成熟卵母细胞数确定）移入已平衡 2h 以上、有石蜡油覆盖的受精液中，再加入等体积的经浓度调整的获能精液，置 CO₂ 培养箱中孵育 8h。

受精结束后，震荡去除卵母细胞外围的精子 and 卵丘细胞，受精卵继续进行胚

胎培养。

1.2.7 胚胎培养

受精结束后，将受精卵移出受精滴，用胚胎培养液充分洗涤 3 次，移入已平衡 2h 以上的 4 孔培养板或培养皿中胚胎培养液中。培养液覆盖石蜡油，每次培养受精卵 10~40 枚，每隔 48h 半量更换培养液，中途若出现污染，适当提前换液（提前时间不能超过 4h）。受精后 48h 统计卵裂率并吸弃未分裂的卵母细胞，继续培养 120h，定期观察早期胚胎发育情况。胚胎培养过程中使用共培养系统。

1.3 培养基配方

(1) 拣卵液：TCM199 液+10% FBS。

(2) IVM 液（卵母细胞成熟培养液）：

①基础液：TCM199+25mmol Hepes+0.055mg/ml 丙酮酸钠+2.2mg/ml 碳酸氢钠+ 100IU/ml 青、链霉素)；

②IVM 液：①+10%FBS+10 μ g/ml FSH+10 μ g/ml LH+1 μ g/ml E₂。

(3) 精液清洗液：BO 液。

(4) 精子获能液（卵母受精液）：BO 液+3mg/ml BSA+10 μ g/ml 肝素钠+5mmol 咖啡因。

(5) IVC 液：TCM199+10%FBS+0.1 mg/ml 谷氨酰胺(Gln)+1 μ g/ml 表皮生长因子(EGF)和卵丘细胞（GCM）共同培养。

1.4 共培养系统

(1) 卵丘细胞的制备

把采集卵母细胞时弃去的上清卵泡液移入另一 10ml 玻璃离心管，在培养箱静置一会儿后吸取上方约 2ml 清亮卵泡液，加入到盛有 2ml 0.2%的透明质酸酶(用 TCM199 配制而成)的离心管中，摇匀，静置 3~5min，然后用手振荡 1min，再加入约 2ml 洗卵液，立即 1500rpm 离心 5min，弃去上清液；再加入约 5ml 卵母细胞成熟培养液，1500rpm 离心 5min，弃去上清液；给沉淀物（卵丘细胞）

加入适量的 IVC 培养液，将其稀释成 1×10^6 个/ml，待卵丘细胞扩散后，吸弃大块的凝聚物。最后将卵丘细胞液滴放入 CO_2 培养箱培养 32~42h，备用。

(2) 大卵泡液的制备

用带有 12 号针头的注射器从牛卵巢表面中等大小卵泡中抽取卵泡液，然后注入于离心管，经 3500rpm 离心 15min。取上清液， $0.22\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌，分装冷冻保存备用。用前解冻并加入成熟液中。

1.5 实验设计

试验 1 共培养体系对胚胎发育的影响。用 IVC 液培养卵丘细胞 (1.0×10^6 个/ml)，24h 后用作共培养体系，每次用量为 $50\mu\text{l}$ 。bFF 按照添加量也为 $50\mu\text{l}$ 。培养滴体积为 $500\mu\text{l}$ 。用前 2h CO_2 培养箱平衡。培养方法：用共培养体系中培养受精卵，48 h 后镜检，计算卵裂率。50%换液，继续培养 120 h，计算桑囊胚率。

试验 2 培养液体积对胚胎发育的影响。分别用 $50\mu\text{l}$ 和 $500\mu\text{l}$ 培养液培养胚胎，培养 48h 后按照 50%换液，继续培养 120 h，观察并记录桑囊胚发育情况。均按照 10%添加卵丘细胞和 bFF。

1.6 数据统计

全部数据均用 SPSS 软件进行统计分析。

2 试验结果

2.1 共培养体系对胚胎发育的影响

2.1.1 共培养系统对桑椹胚发育的影响

卵母细胞体外胚的发育培养受到多种因素的影响，其中培养液的组成成分尤其重要。培养过程中应尽量模拟卵母细胞或胚胎在子宫中的条件，给细胞发育创造良好的环境。许多报道表明，卵母细胞体外受精过程中明显存在 2C 发育阻滞现象，克服 2C 发育阻滞的主要手段就是用共培养系统提高卵裂率和桑囊胚的发

育率。本试验在 IVC 基础培养液中添加了卵丘细胞 (1.0×10^6 个/ml, 10%)、卵丘细胞+bFF (各 10%)，与对照组进行了比较。各项测定结果及统计分析详见表 5-1。

表 5-1 共培养体系与桑椹胚发育

Table 5-1 Effect on Morula Rate of Maturated Oocyte with Co-culture System

处理 Management	样本 Samples	成熟卵母细胞数 No.of O.M.	桑椹胚数 No.of Morula	桑椹胚率 Rate of Morula	标准误 Std. Deviation
卵丘细胞组 Cumulus Cell for Co-culture System	30	391	113	29.0713 b	7.8136
卵丘细胞+bFF Granular Cell and bFF for Co-culture System	30	424	148	34.9890 a	7.9049
对照组 Control	30	308	78	26.6677 c	14.0434

备注 (Note): ab ($p < 0.05$), ac ($p < 0.01$), bc ($p > 0.05$)。O.M. Means Oocyte Maturation。

上述统计分析表明，共培养系统对卵母细胞体外胚的发育具有促进作用。在本试验选取的 2 种共培养系统中，卵丘细胞+bFF 组的桑椹胚率达到 34.99%，显著高于卵丘细胞组的 29.07% ($p < 0.05$) 和对照组的 26.67% ($p < 0.01$)，卵丘细胞组虽然高于对照组，但差异不显著 ($p > 0.05$)。

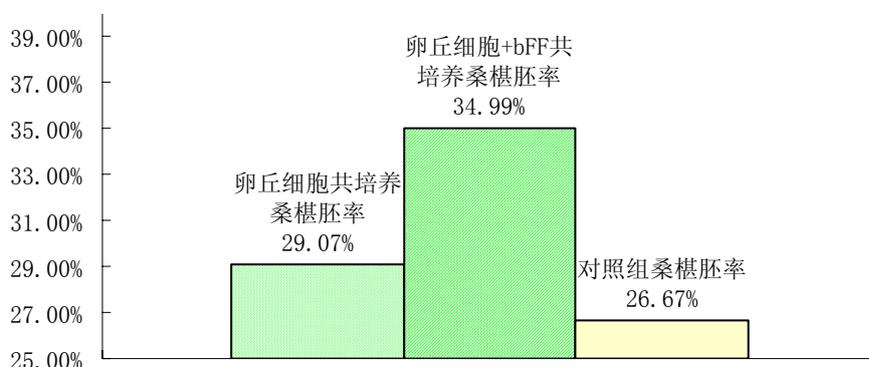


图 5-1 共培养时桑椹胚发育率均数图比较

Fig.5-1 Means Histogram Compare of Morula Rate of Maturated Oocyte with Co-culture System

2.1.2 共培养体系对囊胚发育的影响

对共培养条件下检出的桑椹胚继续培育，检测囊胚的发育情况。结果统计见表 5-2。卵丘细胞+bFF 组的囊胚率达到 10.63%，显著高于对照组的 7.24% ($p < 0.05$)，但与卵丘细胞组的 8.51% 差异不显著 ($p > 0.05$)。卵丘细胞组略高于对

对照组，差异也不显著 ($p > 0.05$)。上述统计分析表明，共培养体系对卵母细胞囊胚发育有促进作用，其中卵丘细胞+bFF 组成的共培养体系对囊胚的发育率比较好。

表 5-2 共培养体系与囊胚发育

Table 5-2 Blastocyst Rate of Maturated Oocyte with Co-culture System

处理 Management	样本 Samples	卵母细胞数 No.of O.M.	囊胚数 No.of Blastocyst	囊胚率 Rate of Blastocyst	标准误 Std. Deviation
卵丘细胞组 Cumulus Cell for Co-culture System	30	391	33	8.5063 b	6.0943
卵丘细胞+bFF 组 Granular Cell and bFF for Co-culture System	30	424	45	10.6343 a	4.6524
对照组 Control	30	308	19	7.2363 c	7.0785

备注 (Note): ac ($p < 0.05$), ab、bc ($p > 0.05$)。

3 个组合的囊胚率均数示意图如下。

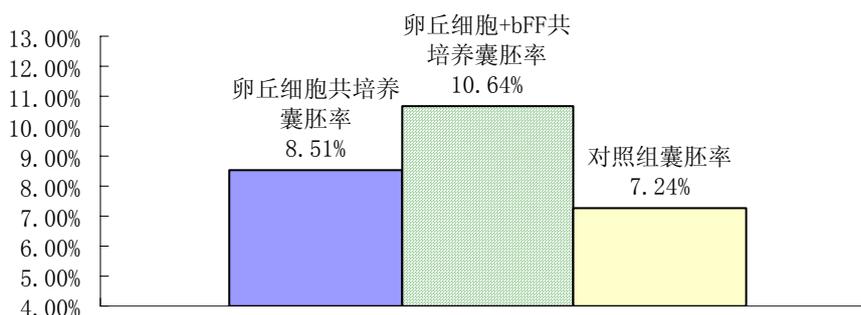


图 5-2 共培养时囊胚发育率均数图比较

Fig.5-2 Compare of Blastocyst Rate of Maturated Oocyte with Co-culture System

2.2 培养液体积对卵母细胞胚胎发育的影响

2.2.1 培养液体积对桑椹胚发育的影响

培养液的体积与卵母细胞的成熟、卵裂及进一步的发育密切相关。常用方法为微滴培育，微滴体积控制在 $50 \sim 100 \mu\text{l}$ 之间，近年又有将培养液体积扩大到 $200 \sim 500 \mu\text{l}$ 的报道，但相互之间的报道均有高有低，因此，本试验选择了 $50 \mu\text{l}$ 和 $500 \mu\text{l}$ 2 种培养液培育方式，以对不同培养液体积做出选择。不同培养液体积

对桑椹胚发育效果的测定结果见表 5-3。

表 5-3 不同体积培养液对桑椹胚率的影响

Table 5-3 Effect on Different Culture Medium Volume for Morula Rate

处理 Management	样本 Samples	卵母细胞数 No.of O.M.	桑椹胚数 No.of Morula	桑椹胚率 Rate of Morula	标准误 Std. Deviation
50 μ l 培养液 Culture Medium Volume	30	377	123	33.1433 b	6.8419
500 μ l 培养液 Culture Medium Volume	30	388	137	36.2260 a	13.1559

备注 (Note): ab ($p < 0.01$)。

表 5-3 资料表明, 培养液体积不同, 桑椹胚发育状况也不同。500 μ l 培养液的桑椹胚率为 36.23%, 显著高于 50 μ l 的 33.14% ($p < 0.01$)。其均数分布图见图 5-3。

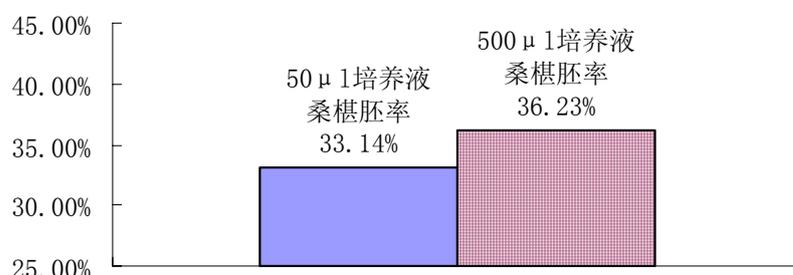


图 5-3 不同体积培养液对桑椹胚率的影响的均数图

Fig.5-3 Different Culture Medium Volume for Morula Rate

2.2.2 培养液体积对囊胚发育的影响

在桑椹胚培养的基础上, 进一步测定囊胚的发育情况。试验表明 (表 5-4), 50 μ l 和 500 μ l 2 种培育方式的囊胚发育趋势与桑椹胚发育一致, 培养液体积不同, 囊胚发育状况不同。500 μ l 培养液的囊胚率为 10.23%, 显著高于 50 μ l 的 9.07% ($p < 0.01$)。其均数比较图见图 5-4。

表 5-4 不同体积培养液对桑椹胚率的影响

Table 5-4 Effect on Different Culture Medium Volume for Blastocyst Rate

处理 Management	样本 Samples	卵母细胞数 No.of O.M.	囊胚数 No.of Blastocyst	囊胚率 Rate of Blastocyst	标准误 Std. Deviation
50 μ l 培养液 Culture Medium Volume	30	377	35	9.0680 b	4.8328
500 μ l 培养液 Culture Medium Volume	30	388	38	10.2310 a	4.5014

备注 (Note): ab ($p < 0.01$)。

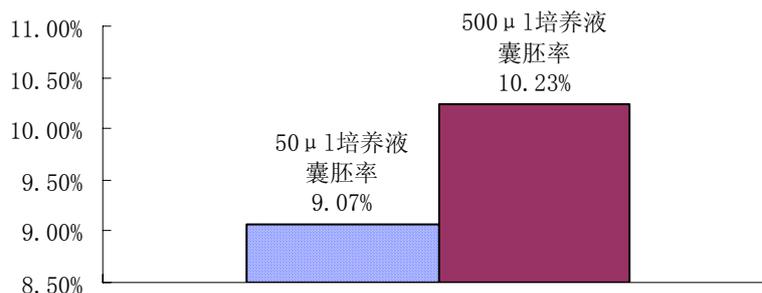


图 5-4 不同体积培养液对囊胚率影响的均数图

Fig.5-4 Different Culture Medium Volume for Blastocyst Rate

3 分析讨论

3.1 共培养体系对胚胎发育的影响

构成卵母细胞体外胚胎共培养体系的主要有卵丘细胞、卵泡液、输卵管上皮细胞、EGF 等因子等，它们在培养液中加入的比例和共培养时间均可对胚胎发育产生不同程度的影响。本试验中采用了卵丘细胞和卵泡液作为胚胎发育的共培养体系。

卵丘细胞是包被在卵母细胞周围的多层颗粒样细胞组织，它与卵丘细胞结合形成 COCs。排卵之前，卵丘细胞扩展，合成大量胞外基质，富含透明质酸(HA)，有利于排卵后进入输卵管，也保证了卵母细胞正常的受精和胚胎发育潜力。卵丘细胞和卵母细胞通过裂隙密切联接，卵丘细胞能够吸收卵泡液中的低分子物质，经代谢转化，通过细胞连接为卵母细胞的生长提供物质和能量^[68]；卵母细胞在生长过程中释放卵丘细胞生长促进因子^[69]，刺激透明质酸酶合成，调节卵丘扩散，卵母细胞生发泡破裂逐渐进入 MI 期，卵丘细胞可以启动卵母细胞内的蛋白质合成，大量蛋白质合成可激活成熟促进因子(MPF)，促进卵母细胞成熟。卵母细胞与卵丘细胞结合的紧密程度、卵丘细胞群的完整度直接影响体外成熟的效果^[70]。卵丘细胞对卵母细胞体外成熟的影响与其浓度有关，在促性腺激素或发情牛血清存在的情况下，低浓度的卵丘细胞($0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/ml)能够刺激卵母细胞成熟分裂的启始；高浓度($50 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ 个/ml)的卵丘细胞抑制卵母细胞成熟分裂的复始。卵丘细胞对精子有筛选作用，COCs 成熟受精后的桑椹胚、囊胚发育率显著高于裸卵^[73]。卵丘细胞能诱发精子发生顶体反应，并增加其穿透能力。因此，

在培养液中添加卵丘细胞，可促进卵母细胞体外成熟、体外受精和早期。

卵泡液(bFF)是卵母细胞成熟的介质，含有多种生长因子、微量元素，蛋白质等大量生化因子和来自卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子^[31]。卵泡液对卵母细胞成熟的影响主要与卵泡液中的生化组分有关，卵泡大小不同，卵泡液成分也不同。卵泡液中含有硫氧还原蛋白过氧化酶、甲状腺运载蛋白和视黄醇结合蛋白，这些蛋白质在卵泡发生时开始产生，对卵泡发育和卵母细胞成熟有明显促进作用^[32]。马卵母细胞在 100%的卵泡液中成熟后，受精率显著高于无卵泡液和 20%卵泡液成熟组。水牛卵泡越大，卵母细胞发育率和受精率就越高，胚胎发育潜力也越大。石德顺等报道在卵母细胞成熟培养液中添加适量(10%~20%)的卵泡液可以提高卵母细胞的受精率和囊胚发育率，但当添加的卵泡液浓度过高时则抑制了卵母细胞的核质成熟，说明卵泡液的浓度与卵母细胞核质成熟密切相关^[35]。卵母细胞在添加小卵泡卵泡液的成熟液内培养，体外受精后其桑椹胚和囊胚的发育率明显低于添加大卵泡液成熟的卵母细胞，说明小卵泡卵泡液对牛卵母细胞体外发育有抑制作用^[36]。卵泡液中含有抑制成熟因子，张明觉等发现兔子的卵泡液抑制成熟分裂，随后发现在地鼠、大鼠、和小鼠和猪等动物上也有此现象。

本试验从卵丘细胞、卵丘细胞+bFF 二方面探讨了共培养系统对桑椹胚和囊胚发育率的影响，结果表明，单一卵丘细胞共培养系统（ 1.0×10^6 个/ml，10%）对胚胎发育有一定的促进作用，可显著促进桑囊胚的发育，但其效果比卵丘细胞+bFF 组成的共培养系统（各 10%）差，说明 bFF 也可促进胚胎发育，并与卵丘细胞有协同作用，共同促进了胚胎发育。

3.2 培养液体积对胚胎发育的影响

常用的培养液体积为 50 μ l 的微滴，每个微滴可培养卵母细胞或胚胎 5~20 枚不等，但由于体积过小，操作难度较大。近期已有用大液滴培养卵母细胞和胚胎的报道，液滴体积在 0.1~0.5ml。

培养液体积与液体蒸发、培养体系的稳定有关。培养液量过小，胚胎培养微环境平衡性差，培养环境容易随外围环境改变；而培养液量过大，胚胎及细胞分泌的生长因子浓度降低，不能有效促进胚胎正常发育。Pereira D C 等（2005）在胚胎培养体系中，观察单个胚胎培养与群体培养，发现群体培养胚胎质量更佳，

可能与提高了胚胎分泌因子浓度有关。另外，现在多用 4 孔培养板，比以前使用的 96 孔培养皿的效率，为大体积培养创造了良好条件。

本试验采用了两种不同体积的培养液进行胚胎培养，试验结果表明，500 μ l 大体积培养液的胚胎发育效果显著优于 50 μ l。因此，在本试验条件下，500 μ l 体积的培养液有利于牛胚胎的培养。

4 小结

本试验采用卵丘细胞、卵丘细胞+bFF 共培养体系对胚胎进行了发育培养，测定结果表明 2 种共培养体系均对桑椹胚和囊胚的发育有促进作用，其中以卵丘细胞+bFF 共培养体系对桑椹胚和囊胚的发育最好。因此，共培养体系是促进胚胎发育到桑椹胚和囊胚阶段的有效方法。

用培养皿微滴培养（50 μ l）和用 4 孔板大体积培养（500 μ l）的试验表明，大体积培养比微滴培养有优势，桑椹胚和囊胚率均较高。

第六章 卵母细胞冷冻试验研究

卵母细胞的超低温冷冻保存是指卵母细胞在超低温（-196℃）条件下代谢活动停止，在一定条件下按一定程序解冻后又能恢复其成熟、受精、卵裂等发育潜能的一种保存技术。通过对卵母细胞的长期冷冻保存，可使胚胎生物技术的研究与开发不受时间和空间的限制，提高胚胎生物技术的实际应用价值。随着胚胎生物技术迅速发展，卵母细胞需求量日益增加，建立比较完善的卵母细胞冷冻保存方法非常必要。

卵母细胞通过体外培养和体外受精，发育为体外胚胎（桑椹胚和囊胚），具有与体内胚相同或相似的发育和遗传能力。一定规模的体外胚对科研和技术推广具有很高的利用价值，是体内胚的重要补充部分。体外胚的数量大，通过冷冻保存实现随机使用是体外胚商业化和降低移植成本的有效方法。体外胚冷冻保存方法的建立将显著推动卵母细胞体外受精技术的发展和應用，实现体外胚的产业化应用，为科研和生产服务。

本试验的目的是探索一种适合于超低温冷冻保存牛卵母细胞的冷冻方法，为体外受精、核移植、体细胞克隆等技术的研究适时提供可供操作的原材料。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂

生理盐水（陕西德福来有限责任公司，批号 2007082218）；
促卵泡素（FSH，加拿大 bioniche，L032-B053）；
促黄体素（LH，宁波市激素制品有限公司，20060516）；
胎牛血清（FBS）（北京元亨圣马生物技术研究所，20060508）；
17β-雌二醇（17β-E₂，上海博蕴科技有限公司，20070406）；
石蜡油（Mineral Oil，Sigma，M-8410）；

丙酮酸钠 (Sigma, P-2256); 谷氨酰胺 (Sigma, G-3126)
透明质酸酶 (Hyaluronidase, HE, Sigma 分装, H-3506);
Hepes (毕龙-比特博分装); TCM199 (含 Earle'S 盐) (Sigma, M-4530);
青霉素钠 (Penicillin G Sodium Salt, $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$, 1650units/mg, Sigma, PENNA, Bbiotech BOYUN, Expiration: 09/2009);
硫酸链霉素 (Streptomycin Sulfate, ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) $3H_2SO_4$, Amresco 0382, Expiration: 08/2010);
蔗糖 (Sucrose, 天津市化学试剂一厂, 990416);
聚蔗糖 400 (Ficoll PM400, 华美生物工程公司, BIO321);
乙二醇 (EthyleneGlycol, EG, 莱阳市双双化工有限公司, 20070310);
甘油 (Glycerine, GL, 天津市元立化工有限公司, 20070105)。

1.1.2 仪器与设备

程序化冷冻仪 (CryoLogicPlyLtd, A.C.N.050022832, CL-5500);
体视显微镜 (OlympusTRPT-4045 型);
CO₂ 培养箱 (SANYOMCO-15A, SANYOElectricCo., Ltd., Japan);
超净工作台 (苏州无线电专用设备厂, SW-CJ-IB 型);
超纯水机 (上海亚荣生化仪器厂, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器);
倒置显微镜 (NikonTE300);
生物液氮罐 (成都金凤液氮生物容器有限公司, YDS-30-125);
0.25ml 麦管 (France, Lot.12757); OPS 玻璃化麦管 (OPS 管, 用麦管控制)。

1.1.3 牛卵巢和精液

实验用卵巢采自甘肃省平凉市崆峒区屠宰场。荷斯坦奶牛或黄牛屠宰后, 在 20~30min 内取出卵巢, 立即无菌采集卵巢, 用解剖剪切除子宫及卵巢上多余的脂肪组织后, 放入盛有 1000ml 含 100IU/ml 青霉素和链霉素的灭菌生理盐水中, 热水瓶内温度保持在 30~35℃之间 (初始控制温度 35℃)。1h 内带回实验室, 用 30~35℃无菌生理盐水冲洗三遍, 无菌操作间或超净台内进行采卵。

实验用精液为上海金晖公司 0.25ml 南德温牛 (SD) 冻精, 编号以实际使用时纪录为准。

1.1.4 OPS 玻璃化麦管的制作

制作 OPS 玻璃化麦管 (Open Pulled Straw, OPS) 细管的材料为 0.25ml 的塑料细管。用加热装置 (酒精灯) 对细管进行均匀加热, 两手轻拉至长度为约 30cm 时, 保持拉力数秒以使细管回冷变硬, 最后从中间用锋利的刀片切断, 将细管的头部切除, 这样便得到了两根细管, 其管壁厚度约为 0.07mm、内径约 0.8mm, 长度控制在 5~6cm。制作好的细管用 75% 的酒精浸泡过夜消毒, 干烤箱自然干燥待用。

1.2 试验方法

1.2.1 牛卵母细胞的采集

用抽吸法采集卵母细胞。卵巢带回实验室后, 除去表面的血迹, 用 35℃ 灭菌生理盐水将卵巢清洗 3 次后, 用灭菌滤纸或灭菌纸巾吸干卵巢表面的水珠, 用带有 12 号针头的 10ml 注射器抽取卵巢表面直径为 2~8mm 卵泡中的卵母细胞, 于体视镜下拣取 COCs。挑选卵丘细胞完整致密, 胞质均一, 色泽浅的 A、B 级卵母细胞进行冷冻试验。

1.2.2 卵母细胞程序化一步法冷冻与解冻

(1) 冷冻

卵母细胞在预处理液中平衡 10min, 然后再移入冷冻液中平衡 10min (包括装管时间), 分三段装入麦管。先吸入一段冷冻液, 再吸入含有卵母细胞的冷冻液, 最后吸入一段冷冻液, 三段之间用空气柱隔开, 每管装 COCs 10 枚左右, 热镊封口。放入冷冻程序仪内, 启动程序进行降温。冷冻程序为: 自 20℃ 或室温起以 1℃/min 降至 -7℃, 植冰, 停留 10min, 再以 0.3℃/min 降至 -30℃, 最后以 0.1℃/min 降至 -33℃, 停留一段时间, 结束程序。程序结束后, 将麦管迅速取出,

投入液氮保存。

(2) 解冻

将卵母细胞麦管从液氮中取出，置空气中 10s，37℃水浴 15s 左右，用灭菌纸巾吸干麦管表面水份，剪去两端，吹出内容物，将卵母细胞在体视镜下检出。卵母细胞分两步（不含冷冻保护剂的 12.5%蔗糖液、IVM 液）脱去冷冻保护剂，每步 10min，IVM 液洗 3 遍，继续培养 24h 后脱卵丘观察。

1.2.3 卵母细胞玻璃化冷冻与解冻

卵母细胞先在含半浓度冷冻保护剂的预处理液（EFS20）中平衡 5min，再在 EFS40 中平衡约 30s（包括装管时间），装管，投入液氮中进行保存。

(1) 麦管法冷冻

卵母细胞经二步处理后，分 3 段式装管（0.5mol/l 蔗糖、空气、含卵冷冻液、空气、0.5mol/l 蔗糖），热镊封口，直接投入液氮进行保存。整个装管过程要求控制在 1min 内。

(2) OPS 法冷冻

卵母细胞经过二步处理后，移入 2~3 μ l EFS40 中，利用毛吸现象将含卵母细胞的 EFS40 液吸入管内，直接投入液氮保存。

(3) 麦管法和 OPS 法冷冻卵母细胞的解冻

麦管的解冻：将麦管从液氮中取出后，在空气中停留或摆动 10s，再在 37℃水浴 15s 左右，轻轻振荡，拿起麦管，吸净表面水份，剪去两端，将内容物吹入盛有 0.5mol/l 蔗糖液（37℃）的培养皿中，迅速将卵母细胞捡入另一新鲜含有 0.5mol/l 蔗糖的液滴中。10min 后，将卵母细胞移入含有 0.25mol/l 蔗糖的液滴，10min。最后，移入 IVM 液洗 2~3 遍，在 IVM 液中平衡 10min，并用 IVM 液培养 24h 后脱卵丘观察。

OPS 法解冻：将 OPS 管从液氮中取出后，将吸有卵的一端（细端）直接插入 37℃0.5mol/l 蔗糖液中，液柱上升后，立即吹出内容物，迅速将卵捡入另一新鲜 0.5mol/l 蔗糖液滴中，后续步骤同麦管法解冻。

1.2.5 解冻后卵母细胞成熟培养

冷冻保存后的卵母细胞经解冻后，用成熟培养液洗 2 遍，然后放入预先平衡 2h 的成熟培养皿中培养 24h，用 HE 脱去卵丘细胞，观察记录卵的形态及极体排出情况。培养密度为 10 COCs/50 μ l，培养条件为 5%CO₂，38.5 $^{\circ}$ C，饱和湿度。

1.2.6 解冻后卵母细胞质量评定

(1) 解冻后卵母细胞存活判断标准：体视镜或倒置显微镜下观察卵母细胞的形态变化，判断卵母细胞是否正常。正常卵母细胞形圆、对称，胞质均匀、无扩散、无渗漏，透明带完整，卵丘细胞未见脱落，无膜损伤等。异常卵母细胞一般透明带破裂，卵黄膜破损，胞质扩散或聚缩或不完全。

(2) 解冻后卵母细胞的第一极体成熟率：选择正常的卵母细胞进行 IVM 培养，卵母细胞经 24h 成熟培养后，观察记录第一极体排出情况。

1.3 冷冻液、解冻液及培养液的制备

1.3.1 卵母细胞采集液

(1) 卵巢采集液

0.9%灭菌生理盐水加 100IU/ml 青霉素和 100IU/ml 链霉素。

(2) 卵母细胞采集液

直接用 IVM 液。

(3) 卵母细胞冻后成熟培养液

直接用 IVM 液。

以上液体全部用 0.22 μ m 的过滤器过滤后置 4 $^{\circ}$ C（1 周）或 -15 $^{\circ}$ C~-20 $^{\circ}$ C（长期）冰箱保存。

1.3.2 卵母细胞程序化一步法冷冻液

(1) 预处理液

直接用 IVM 液。

(2) 冷冻液

直接用 IVM 液。

① 甘油冷冻液 (10%GL)

10ml 甘油冷冻液 (10%GL) 的配制: 9ml IVM 液+1ml GL, 用 0.22 μ m 过滤器过滤后冷藏备用。

10ml 12.5%蔗糖液的配制: 1.25g 蔗糖+9ml IVM 液+1mlFBS+双抗 0.1ml。

1000ml 双抗: 1000ml 四蒸水+10 万 IU 青霉素钠 (60mg) +10 万 IU 硫酸链霉素 (125.0mg)。

② 乙二醇冷冻液 (10%EG)

10ml 乙二醇冷冻液 (10%EG) 的配制: 9ml IVM 液+1ml EG。

10ml 12.5%蔗糖液的配制: 1.25g 蔗糖+9ml IVM 液+1mlFBS+双抗 0.1ml。

(3) 解冻液:

用 IVM 液作解冻液, 冲洗 2~3 次备用。

以上液体全部用 0.22 μ m 的过滤器过滤后置 4 $^{\circ}$ C (1 周) 或-15 $^{\circ}$ C~-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.3.3 卵母细胞玻璃化冷冻液

(1) 玻璃化冷冻基础液

基础液(EF 液):10%FBS+300g/L 聚蔗糖(Ficoll)+0.5mol/l 蔗糖, 均用 TCM199 稀释。

20ml EF 液: 18ml TCM199+2 ml FBS+6g Ficoll+3.422g Sucrose。

30ml0.5mol/l 蔗糖液: 5.1345g Sucrose+30ml TCM199。

20ml 10%EG 液: 2ml EG+18ml TCM199。

(2) 玻璃化冷冻液 (EFS20 液和 EFS40 液)

EFS20 液: 20%乙二醇 (EG) +基础液 (EF 液)。

EFS40 液: 40%乙二醇 (EG) +基础液 (EF 液)。

30 ml EFS20 液: EF 液 24 ml+6 ml EG

30 ml EFS40 液: EF 液 18 ml+12 ml EG。

(3) 玻璃化解冻液 (WM 液)

TCM199+10%FBS+蔗糖梯度浓度液 (0.25mol/l、0 mol/l)。

40ml WM 液的蔗糖梯度及配制:

0.25mol/l 蔗糖: 16ml TCM199+4ml FBS+3.423g 0.25mol/l 蔗糖。

0.00mol/l 蔗糖梯度: 16 ml TCM199+4 ml FBS。

以上液体全部用 0.22 μ m 的过滤器过滤后置 4 $^{\circ}$ C (1 周) 或 -15 $^{\circ}$ C ~ -20 $^{\circ}$ C (长期) 冰箱保存。

1.4 试验设计

1.4.1 程序化一步法冷冻时渗透性保护剂对 COCs 冷冻效果的影响

实验比较两种渗透性保护剂甘油 (Glycerine, GL) 和乙二醇 (Ethylene glycol, EG) 对牛卵母细胞的冷冻保存效果。

以基础液、10%FBS、10%蔗糖为冷冻液的共同组分, 然后分别添加 10%GL 和 10%EG, 组成 2 种冷冻保护液, 再用这 2 种冷冻保护液分别冷冻牛 COCs。将经过冷冻处理的牛卵母细胞解冻后进行培养, 比较这 2 种冷冻保护剂的冻后成熟率。

1.4.2 玻璃化冷冻时麦管和 OPS 管对 COCs 冷冻效果的影响

以麦管和 OPS 管作为冷冻载体, 采用二步处理法玻璃化冷冻牛 COCs。即先在含半浓度玻璃化冷冻保护剂的预处理液 (EFS20) 中分别平衡 5min, 再在 EFS40 中停留约 30s, 观察记录 COCs 冻后成熟培养成熟率, 比较研究他们对卵母细胞玻璃化冷冻效果的影响, 寻找既能使卵母细胞充分脱水, 又能降低对卵母细胞造成的化学毒性损伤的最佳冻前预处理方法。

1.4.3 不同冷冻剂冷冻 COCs 的发育培养

对①节以甘油 (GL) 和乙二醇 (EG) 为冷冻保护剂制作的冷冻 COCs 按照设计程序解冻后进行成熟培养, 选择成熟良好的 COCs 继续进行 IVC 培养, 测

定桑椹胚和囊胚的发育情况。

1.4.4 不同玻璃化法冷冻 COCs 的发育培养

对②节以麦管和 OPS 管为载体制作的冷冻 COCs 按照设计程序解冻后进行成熟培养，选择成熟良好的 COCs 继续进行 IVC 培养，测定桑椹胚和囊胚的发育情况。

1.5 统计分析

采用 SPSS13.0 软件对试验结果进行统计分析。

2 试验结果

2.1 程序化一步法冷冻时渗透性保护剂对 COCs 冷冻效果的影响

对以 GL 和 EG 为冷冻保护剂制作的 COCs 按照一步法冷冻后，在液氮中保存 1 周，依程序进行解冻和成熟培养。成熟培养时间为 24h，培养条件为 5%CO₂，38.5℃，饱和湿度。培养结果见表 6-1。

表 6-1 冷冻剂 GL 和 EG 对 COCs 成熟率的影响

Table 6-1 Effect on Maturation Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of Freezing COCs.	成熟卵母细胞数 No.of O.M.	成熟率均数 Rate of O.M.	标准误 Std. Deviation
甘油组 GL	30	356	118	33.4413 a	7.6569
乙二醇组 EG	30	349	119	34.4590 b	7.8415

备注 (Note): ab ($p>0.05$)。O.M. Means Oocyte Maturation。

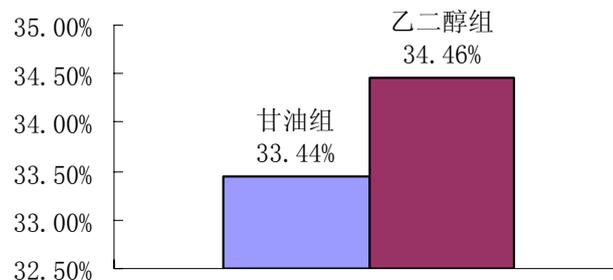


图 6-1 冷冻剂 GL 和 EG 对 COCs 成熟率的影响均数图

Fig.6-1 Means Histogram for Effect on Maturation Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

表 6-1 数据表明，以 EG 为冷冻保护剂的冷冻 COCs 解冻成熟培养的成熟率为 34.46%，GL 为 33.44%，EG 组比 GL 组高 3.05%，但二者之间无显著差异 ($p > 0.05$)。成熟率均数比较图示见图 6-1。

2.2 玻璃化冷冻时麦管和 OPS 管对 COCs 冷冻效果的影响

早期的玻璃化冷冻时采用的冷冻保护剂有 DMSO、GL 等，载体是专用设备拉制的微型玻璃管或塑料麦管。由于玻璃化操作的特殊性，对操作时间的控制比较严格，如直接使用 0.25ml 的麦管时存在时间较难控制的问题，但如果使用特制拉管，由于体积小、重量轻，在冷冻过程中始终漂浮在液氮面上，必然导致冷冻温度的变化（偏高），将会降低降温速率。本试验选用 2 种冷冻方法，在严格控制操作时间的基础上，对比测定了麦管 3 段法玻璃化冷冻和 OPS 管直接冷冻 COCs，对比了 COCs 解冻后成熟培养的效果。各项测定结果详见表 6-2。结果表明，麦管法冷冻的 COCs 解冻后成熟率为 29.84%，OPS 法冷冻的 COCs 解冻后成熟率为 31.89%，OPS 法的成熟率略高于麦管法 6.87%，二者差异不显著 ($p > 0.05$)。

表 6-2 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻对 COCs 成熟率的影响

Table 6-2 Effect on Maturation Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of Freezing COCs.	成熟卵母细胞数 No.of O.M.	成熟率均数 Rate of O.M.	标准误 Std. Deviation
麦管法 Wheat Straw	30	347	102	29.8377 a	6.7094
OPS 法 OPS	30	372	118	31.8880 b	6.1673

备注 (Note): ab ($p > 0.05$)。O.M. Means Oocyte Maturation。

麦管法和 OPS 法的结果虽然无统计学差异，但 OPS 法的成熟率好于麦管法，这在图 6-2 的均数柱状图中得到了较好反映。

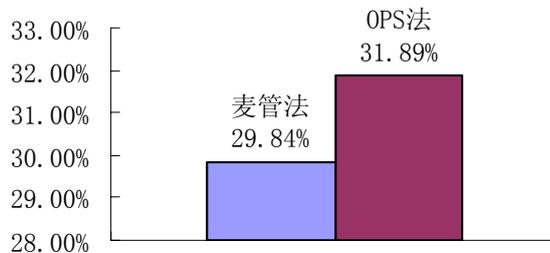


图 6-2 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻对 COCs 成熟率影响的均数图

Fig.6-2 Mean Histogram for Effect on Maturation Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

2.3 冷冻保护剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的桑椹胚发育效果

对 GL 和 EG 一步法冷冻的 COCs 进行成熟培养，选择成熟效果好的 COCs 进行卵裂培养。二组的桑椹胚发育测定结果详见表 6-3。结果表明，GL 组的桑椹胚率为 10.56%，EG 组的桑椹胚率为 11.18%，EG 组的桑椹胚率略高于 GL 组 5.87%，二者差异不显著 ($p>0.05$)。

表 6-3 冷冻剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的桑椹胚率

Table 6-3 Effect on Morula Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of Freezing COCs.	桑椹胚数 No.of .Morula	桑椹胚率均数 Rate of Morula	标准误 Std. Deviation
甘油组 GL	30	356	37	10.5623 a	4.5119
乙二醇组 EG	30	349	38	11.1810 b	5.6726

备注 (Note): ab ($p>0.05$)。

图 6-3 的均数柱状图也较好反映了上述分析结果。

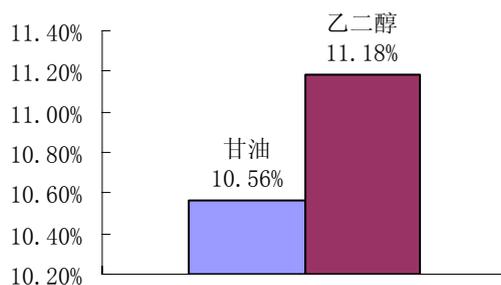


图 6-3 冷冻剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的桑椹胚率均数图

Fig.6-3 Means Histogram for Effect on Morula Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

2.4 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻 COCs 的桑椹胚发育效果

麦管法、OPS 法冷冻 COCs 卵裂培养的桑椹胚发育测定结果详见表 6-4。

表 6-4 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻对 COCs 桑椹胚发育的影响

Table 6-4 Effect on Morula Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of freezing cocs.	桑椹胚数 No.of .morula	桑椹胚率均数 Rate of morula	标准误 Std. Deviation
麦管法 wheat straw	30	347	33	9.3443 a	6.7094
Ops 法 ops	30	372	36	9.6657 b	6.1673

备注 (Note): ab ($p>0.05$)。

结果表明，麦管组的桑椹胚率为 9.34%，OPS 组的桑椹胚率为 9.66%，OPS 组的

桑椹胚率略高于麦管组 3.43%，二者差异不显著 ($p>0.05$)。

图 6-4 的均数柱状图也反映了上述分析结果。

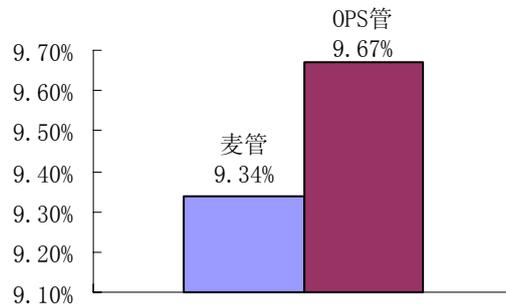


图 6-4 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻对 COCs 桑椹胚发育影响的均数图

Fig.6-4 Means Histogram for Effect on Morula Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

2.5 冷冻保护剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的囊胚发育效果

对 GL 和 EG 一步法冷冻的 COCs 在桑椹胚培养的基础上继续培养，检测囊胚的发育情况。二组囊胚发育测定结果详见表 6-5。结果表明，GL 组的囊胚率为 3.86%，EG 组为 4.18%，EG 组囊胚率略高于 GL 组 8.29%，二者差异不显著 ($p>0.05$)。

表 6-5 冷冻剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的囊胚率

Table 6-5 Effect on Blastocyst Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of Freezing COCs.	囊椹胚数 No.of . Blastocyst	囊胚率均数 Rate of Blastocyst	标准误 Std. Deviation
甘油组 GL	30	356	14	3.8610 a	4.2411
乙二醇组 EG	30	349	14	4.1817 b	4.5933

备注 (Note): ab ($p>0.05$)。

图 6-5 的均数柱状图也较好反映了上述分析结果。

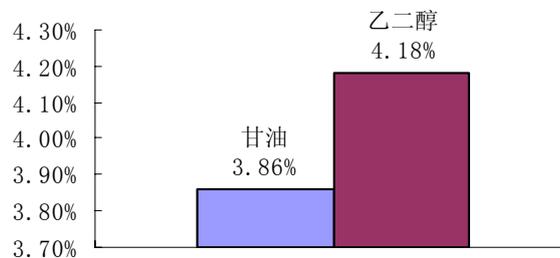


图 6-5 冷冻剂 GL 和 EG 冷冻 COCs 的囊胚率均数图

Fig.6-5 Means Histogram for Effect on Blastocyst Rate of COCs for Cryoprotectant GL or EG

2.6 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻 COCs 的囊胚发育效果

同样对麦管法、OPS 法冷冻 COCs 的桑椹胚继续培养,测定囊胚的发育情况。测定结果详见表 6-6。结果表明,麦管组的囊胚率为 3.47%,OPS 组的囊胚率为 3.80%,OPS 组的囊胚率略高于麦管组 9.51%,二者差异不显著 ($p>0.05$)。

表 6-6 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻 COCs 的囊胚率

Table 6-6 Effect on Blastocyst Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

处理 Management	样本 Samples	冷冻卵母细胞数 No.of Freezing COCs.	囊胚数 No.of . Blastocyst	囊胚率均数 Rate of Blastocyst	标准误 Std. Deviation
麦管法 Wheat Straw	30	347	12	3.4700 a	4.4348
OPS 法 OPS	30	372	14	3.8003 b	4.1826

备注 (Note): ab ($p>0.05$)。

上述数据用均数柱状图表示,更直观地反映了二者的变化情况(图 6-6)。

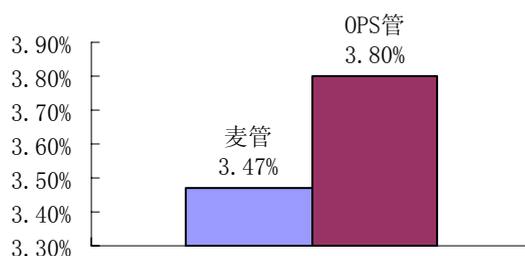


图 6-6 麦管法和 OPS 法玻璃化冷冻 COCs 的囊胚率均数图

Fig.6-6 Means Histogram for Effect on Blastocyst Rate of COCs for Vitrification of Wheat Straw or OPS

3 分析讨论

本试验采用了 4 种不同的方法对 COCs 进行了冷冻试验和发育培养。试验中紧密结合了传统胚胎冷冻的方法,借鉴其基础操作步骤,但培养液已经与传统胚胎培养条件有了质的变化。GL 和 EG 是常规冷冻剂,结合一步法进行冷冻。玻璃化法包括传统的麦管法和新的 OPS 法。

3.1 COCs 冷冻保存时冷冻方法、冷冻保护剂和载体的选择

冷冻方法。目前卵母细胞冷冻方法借鉴了胚胎冷冻方法,常用的有慢速、快速冷冻法和玻璃化冷冻法。慢速冷冻对细胞损伤大^[279]。快速冷冻法中卵母细胞

必须经历低于 10℃的一段时间，低温对卵母细胞发育力很有影响^[280]。玻璃化法通过使用高浓度冷冻保护剂而使液体在快速降温过程中形成非晶体的玻璃态，从而避免了细胞内冰晶的形成。玻璃化法因其快速的冷却速率可有效克服慢速、快速冷冻法中对卵母细胞造成的负面影响，但玻璃化法的高浓度冷冻保护剂会造成对卵母细胞的细胞毒性和渗透损伤。

冷冻保护剂。在胚胎生产过程中，选用了多种冷冻保护剂，其中以渗透性保护剂（GL、DMSO、EG、PROH 等）、非渗透性保护剂（蔗糖、聚蔗糖、血清等）以及抗冻蛋白等。渗透性保护剂是一类小分子化合物，该类物质在冷冻过程中进入细胞内部，可以①防止卵母细胞因脱水过度收缩；②与水分子发生水合作用，减慢溶液结晶速度；③稀释胞质中因脱水而产生的高盐，减少盐害作用的产生^[258]。非渗透性保护剂是一类大分子化合物，能溶于水，但不能渗入细胞，能有效降低胞质外溶质的浓度，减少盐害作用的产生；在快速冷冻时，可协助渗透性保护剂促使细胞脱水，减少细胞内冰晶形成；组成玻璃化液时，可有效降低渗透性保护剂的摩尔浓度、可使发生玻璃化的相变温度升高、可促进胞质及保护液玻璃化；解冻时，为卵母细胞提供一个高渗环境，避免水分进入胞内过快而产生的渗透性破裂。抗冻蛋白可在低温（4℃）和超低温（-30℃~-196℃）下，与细胞膜相互作用，封闭离子通道，使细胞膜受到保护^[259]。在早期卵母细胞冷冻实验中常使用单一冷冻保护剂（渗透性保护剂）^[281]，但在单一渗透性冷冻保护剂中添加一定浓度的非渗透性保护剂，能显著提高卵母细胞冻后培养成熟率及胚胎后期发育潜力，因而现在在哺乳动物卵母细胞冷冻保存中广为应用。

冷冻载体。在冷冻载体的选择上，程序化冷冻所使用的都是麦管，其选择主要是针对玻璃化冷冻。根据所使用承载工具的不同可将哺乳动物胚胎和卵母细胞冷冻保存的方法分为麦管法、毛细玻璃管法、OPS 法、电子显微镜铜网法、尼龙环法、微滴法等。本试验中选择了宜于操作和保存麦管法和 OPS 法。

3.2 冷冻 COCs 的成熟培养效果综合比较

冷冻 COCs 的成熟培养及成熟率是反映冷冻体系效能的关键步骤。成熟率越高，说明冷冻效率越高。本试验采用了程序化一步法冷冻法探讨了 GL 和 EG 对 COCs 的冷冻效果；采用玻璃化冷冻法探讨了普通麦管和 OPS 管对 COCs 的玻璃

化冷冻效果。从试验结果看，反映出如下 3 个方面。

一步法冷冻 COCs 时，选用 EG 为冷冻保护剂的效果优于 GL。

玻璃化冷冻 COCs 时，选用 OPS 管为冷冻载体的效果优于麦管法。

一步法冷冻 COCs 的效果显著好于玻璃化冷冻法 ($p < 0.01$)，如图 6-7 所示。

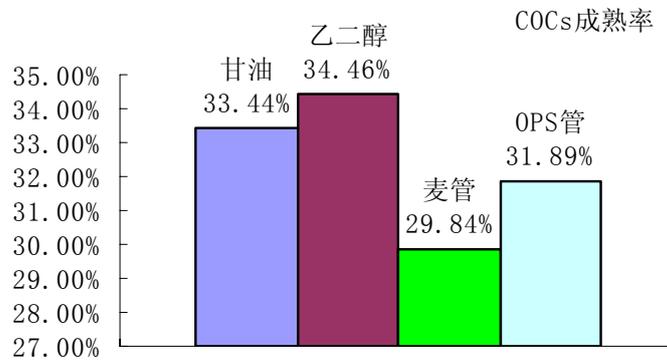


图 6-7 不同冷冻方法处理的 COCs 解冻成熟培养效果比较

Fig.6-7 Compare of Maturation Rate of Oocyte in Different Freezed Management

上述分析表明，冷冻程序、冷冻保护剂和冷冻载体均对冷冻 COCs 的解冻培养有影响，他们对 COCs 的保护效果不一致。就冷冻程序而言，一步法程序的冷冻效果明显优于玻璃化冷冻；就冷冻保护剂而言，EG 优于 GL；就玻璃化冷冻载体而言，OPS 管法优于麦管法，这在图 6-7 中得到较好反映。

程序化一步法冷冻法的程序设计更接近于细胞超低温冷冻的理化变化，相对于玻璃化冷冻程序，其降温速率严格按照细胞内冰晶形成规律控制，而玻璃化冷冻则省去了全部中间环节，装管后直接投入液氮中进行冷冻，极大地缩短了操作时间。在冷冻保护剂方面，在其它液相一致的情况下，EG 对细胞毒副作用小于 GL。在载体方面，麦管的管壁较厚，一步法冷冻时，由于降温缓慢，麦管内外温差小，而玻璃化冷冻时，麦管内外温差要大于 OPS 管，降温速率快，导致出现上述差异。如周国燕用外径 1.95mm、管壁厚 0.25mm 的细管加热后拉伸外径变为约 0.27~0.4mm，管壁约 0.05mm 的 OPS 细管进行了细管导热特性研究，结果显示普通细管的降温速率为 2500~4700 K/min，复温速率达到 4200~6700 K/min，拉伸细管的降温速率达到 11400~18400 K/min，复温速率达到 12200~32300 K/min。

减少冷冻保护剂毒性的常用方法包括：①使细胞在高浓度的冷冻保护剂中暴露的时间尽可能短、温度尽可能低。②选择合适的冷冻保护剂。③对某些冷冻保

护剂选用特定的毒性中和剂。高浓度的冷冻保护剂也会导致细胞内外的渗透压差过大。由于冷冻保护剂穿透细胞膜的速率比水要小，因此加载冷冻保护剂的最初反应是细胞内水分的渗出，同样，在移出冷冻保护剂时，细胞外的水分要渗入。尽管细胞内外的水分、冷冻保护剂相互渗透并最终达到平衡，细胞体积的过度变化将导致细胞失活。因此在玻璃化冷冻保存细胞、组织的过程中应逐步加载、移出冷冻保护剂，以减少细胞内外的渗透压差^[256]。

3.3 冷冻 COCs 的桑椹胚发育效果比较

冷冻 COCs 的桑椹胚发育培养是在 COCs 成熟培养的基础上进行的。不同处理方法的培育结果之间存在较大差异，图 6-8 显示了各种处理的综合效应。从中同样可以反映出与成熟培养相似的发育状况：一步法程序化冷冻优于玻璃化冷冻；冷冻保护剂 EG 优于 GL；OPS 管玻璃化冷冻优于麦管。

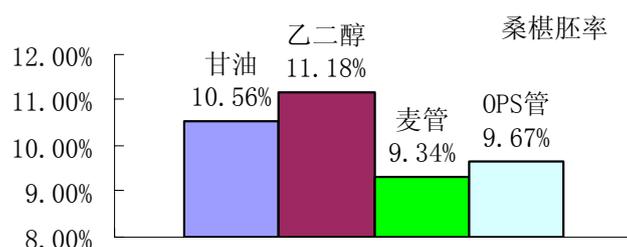


图 6-8 不同冷冻方法处理的 COCs 桑椹胚发育效果比较

Fig.6-8 Compare of Morula Rate of Oocyte in Different Freezed Management

3.4 冷冻 COCs 的囊胚发育效果比较

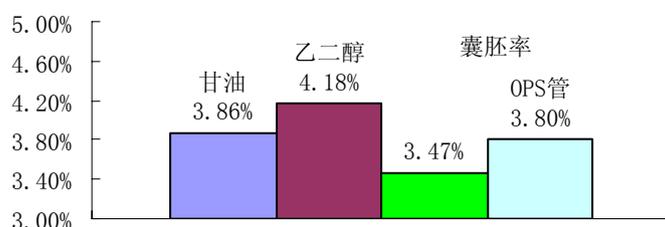


图 6-9 不同冷冻方法处理的 COCs 囊胚发育比较

Fig.6-9 Compare of Blastocyst Rate of Oocyte in Different Freezed Management

冷冻 COCs 的囊胚发育在不同处理之间也存在较大差异，图 6-9 显示了各种

处理的综合效应，其中一步法程序化冷冻优于玻璃化冷冻；冷冻保护剂 EG 优于 GL；OPS 管玻璃化冷冻优于麦管。

4 小结

① 程序化一步法冷冻法适用于 COCs 的冷冻保存。

② 冷冻保护剂 EG 适用于 COCs 的冷冻保存，效果比传统的 GL 好，适宜剂量为 10%。

③ 玻璃化冷冻 COCs 的效果低于程序化一步法冷冻法。

④ OPS 管玻璃化冷冻的效果优于麦管法，但无统计差异，而麦管法宜于操作和储存，建议在实际操作中选用麦管法。

⑤ COCs 的 4 种处理方法在 COCs 成熟、桑椹胚发育和囊胚发育方面的趋势基本一致，整体效果的优势排序为 EG 法 > GL 法 > OPS 管法 > 麦管法。由于玻璃化冷冻的解冻处理程序复杂，建议实际应用时选用麦管程序化一步法冷冻法。

参考文献

- [1]陈大元.受精生物学[M].北京: 科学出版社, 2000.
- [2]Braw T R, Yossefi S.Study in vivo and in vitro the initiation follicle growth in the bovine ovary[J].Journal of Reproduction and Fertility.1997, 109: 165-171.
- [3]Byskov A G, Anderson C Y, Hossaini A.Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH [J]. Molecular Reproduction and Development, 1997, 46: 296-305.
- [4]王建辰, 章孝荣, 等.动物生殖调控[M].合肥: 安徽科学技术出版社, 1998.
- [5]Whitaker M. Control of meiotic arrest[J].Rev Reprod, 1996, 1: 127-35.
- [6]Hashimoto N and Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation[J]. Dev. Biol, 1988, 126: 242-252.
- [7]Nurse P.Universal control mechanism regulating onset of M-phase[J].Nature, 1990, 344: 503-822.
- [8]Liu L, Ju J C, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes[J]. Biol Reprod, 1998, 59: 537-45.
- [9]Oh B, Hampl A., Eppig J J, Solter D and Knowles B B.SPIN, A substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes[J].Mol Reprod Dev, 1998, 50: 240-249.
- [10]Verlhac M H, Kubiak J Z, Weber M et al.Mosis required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse[J].Development, 1996, 122: 815-22.
- [11]Anderiesz C, Fong C Y, Bongso et al.Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-dimethylaminopurine[J].Hum Reprod, 2000, 15: 379-388.
- [12]Fair T, Hyttel P, Greve T.Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity[J].Mol Reprod Dev.1995, 42: 437-442.
- [13]Wu S.and Wolgemuth D J.The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse Cdc25 gene family suggest differential functions during gametogenesis[J]. Dev. Biol, 1995, 170: 195-206.
- [14]Nakajo N., Yoshitome S., Iwashita J et al. Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes[J]. Genes Dev, 2000. 14: 328-338.
- [15]Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P. Comparative analysis of calf and cow oocyte during in vitro maturation[J].Molecular Reproduction and Development, 1998, 49(2): 168-175.
- [16]郭继彤.成年体细胞克隆山羊研究[D].西北农林科技大学 2000 届攻读博士学位研究

生学位论文, 2000.

[17]Sajjan Singh, Dhanda O. P. The presence of corpus luteum on oocyte recovery and subsequent in vitro maturation and fertilization in buffaloes[J]. Asian-Aust. J. Anim. Sci. vol, 2001, 14(12): 165-1677.

[18]Ravindranatha B M, Nandi S, Raghu H M, Reddy S M. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes: effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media[J].Reproduction in Domestic Animals. 2003, 38(1): 21-26.

[19]Lucci C M, Kacinskis M A.Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu preantral ovarian follicles[J].Theriogenology.2004, 61(2-3): 461-472.

[20]Love L B, Choi Y H, Love C C, Varner D D, Hinrichs K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes[J]. Theriogenology. 2003, 59(3-4): 765-774.

[21]Shioya Y, Ueda S, Saitou A, Oota H, Hanada A.Effect of the time between slaughter and aspiration of follicles on the developmental capability of bovine oocytes matured and fertilized in vitro[J].Journal of Animal Reproduction, 1998, 34: 39-44.

[22]Pavlok A, Hahn A L and Niemann.Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles[J].Molecular Reproduction and Development, 1992, 31: 63-67.

[23]Lonergan P, Monaghan P, Rizes D.Effect of follicle size on bovine oocyte quality in vitro[J].Molecular Reproduction and Development, 1994, 37: 48-53.

[24]Lenz R W, Ball G D, Leibfried M L, First NL.In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes[J].Biology of Reproduction, 1983, 29: 173-179.

[25]Wang W L, Jiang H S, Shi D S, Lu K H, Gordon I, Polge C.The effect of temperature on the in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes[J].Proc seventh Congress Euro Embryo Transfer Asso(Cambridge), 1991, 216.

[26]Guler A, Poulin N et al.Effect of growth factor, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes[J].Theriogenology, 2000, 54(1): 209-218.

[27]Pinyopummolintr T, Bavister B D.Effect of gaseous atmosphere on in vitro fertilization of bovine oocytes[J].Theriogenology, 1994, 41: 276.

[28]Prokofier M I, Emst L K, Srueva N M et al.Bovine oocytes maturation, fertilization and further development in vitro and after transfer into recipients[J].Theriogenology, 1992, 38: 461-469

[29]张家弊, 段恩奎, 王建辰, 等.牛卵泡卵母细胞体外成熟的超微结构变化[M].兽医产

科学进展, 西安: 陕西出版社, 1994.89-91.

[30]Braun J.Influence of protein supplement and culture conditions on cumulus cell expansion and nuclear maturation of sheep follicular oocytes[J].Theriogenology, 1988, 29: 189-202.

[31]Yang X.IVF and embryo development are influenced by IVF technicians and bulls[J].Theriogenology, 1995, 43: 360.

[32]Romero-Arredondo A, Seidel GE JR.Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes[J]. Teriogenology, 1994, 41: 383-394.

[33]钱云, 师蔚群, 丁家桐, 等.哺乳动物体外受精的研究进展[J].动物科学与动物医学, 2000, 17(1): 26-28.

[34]钱云, 师蔚群, 丁家桐, 等.哺乳动物体外受精的研究进展[J].动物科学与动物医学, 2000, 17(2): 27-29

[35]石德顺, 卢克焕.卵泡液对牛卵母细胞体外成熟的影响[J], 广西农业大学学报, 1994, 13(1): 1-5

[36]Wang S, Liu Y, Holyoak G R et al. Effects of supplementation with fluids from bovine follicles of varied sizes in in vitro maturation medium on subsequent embryo development in vitro[J].Theriogenology, 1999, 51(1): 394.

[37]Fukui Y, Pugh P A and Teruit H R. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro[J].Journal of Reproduction and Fertility, 1991, 92: 125-131.

[38]Mochizuki H, Fukui Y and Ono H. Effect of the number of granuloa cell added to culture medium for in vitro maturation , fertilization and development of bovine oocytes[J]. Theriogenology, 1991, 36: 973-986

[39]Schroeder A., Schultz R M, Kopf G.S et al. Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum[J].Biology-Reproduction, 1990, 43: 891-897.

[40]Serta R T, Seibel M M, Kiessling A A. Maturation and fertilization of mouse oocytes in serum-free media. Serono Symposium on Preimplantation Embryo Development, 1998, (45): 321-328.

[41]Lu K H, Gordon I, Gallagher M and Mcgoven H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro [J]. Veterinary Record, 1987, 121: 259-260

[42]Gordon I and Lu K H. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production[J].Theriogenology, 1990, 33: 77-87.

[43]Gordon I and Lu K H. In vitro maturation(IVM) and Fertilization(IVF) of cattle ova[J].

Embryo transfer Newsletter,]990b, 8: 6-11

[44]Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M L, First N L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium[J]. Biology of Reproduction, 1991, 44: 256-260.

[45]Eckert J. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media[J]. Theriogenology, 1995, 43(1): 1211-1225.

[46]Leibfried-Rutledge M L, Crister E S, Eyestone W H et al. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or vivo[J]. Biology of Reproduction, 1987, 36: 376-383.

[47]Delcapo M. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture in vitro maturation of equine oocyte[J]. Theriogenology.1995, 43: 1141-I 153.

[48]Figueiredo J R. Extracellular matrix proteins and basement membrane : their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles[J]. Theriogenolog), 1995, 43: 845-858.

[49]Mattioli M. Concentration of cAMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro[J].Journal of Reproduction and Fertility, 1994, 100: 403-409.

[50]土海滨, 夏国良, 李美玲, 等.哺乳动物卵母细胞培养体系的研究进展[J].农业生物技术学报, 2000, 8(3): 297-310.

[51]Fukushima M and Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocyte cultured in vitro [J].Animal Reproduction Science, 1985, 9: 323-332.

[52] Webb R.J, Bains H. Gap-junctional communication in mousecumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation[J]. Reproduction, 2002, 123: 41-52.

[53]Iwata H, Akamastu S, Minami N et al. Allopueinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/IVF bovine embryos in vitro under certain culture conditions[J]. Thedogenology, 1999, 51: 613-622.

[54]Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y and Ono H. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocytes maturation in vitro[J].Thenogenology, 1989, 18: 161-175.

[55]Zhang Y and Armstrong D T. Effect of follicle stimulating hormone and ovarian steroids during in vitro meiotic maturation on fertilization of rat oocytes[J].Gamete Research, 1989, 23: 267-277.

[56]Jewgenow K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats[J]. Theriogenology, 1996, 45: 889-895

[57]刘灵.山羊卵泡卵母细胞体外受精试验.西北农业大学硕士毕业论文[D], 1992.

[58] Mingoti G Z , Garcia J M.Steroidogenesis in cumulus cells of bovine

cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids[J]. *Animal reproduction science* 2002, 69: 175-186.

[59]Coskun S, Lin Y C. Mechanism of action of epidermal growth factor induced porcine oocyte maturation[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, 42: 311-317.

[60]Erickson R P. Recent advances in developmental genetics: Growth factors and morphogens[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, 41: 109-125

[61]Singh B, Armstrong D. Insulinlike growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro[J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 56: 1370-1375.

[62]Brucker C, Alexander NJ. Transforming growth factor alpha arguments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1991, 28: 94-98.

[63]Schams D. Ovarian peptides in the cow and sheep[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement, 1989, 37: 225-231.

[64]Tonetta S A and Dizerega G S. Intraovarian regulation of follicular maturation[J]. *Endocrine Reviews*, 1989, 10: 205-229.

[65]Dekel N and Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes[J]. *Endocrinology*. 1985, 116: 406-409.

[66]Coskun S, Sanbuisbo A and Rikihica Y. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor(EGF)[J]. *Theriogenology*, 1991, 36: 485-494.

[67]Arellano J. Epidermal growth factor enhance porcine oocyte maturation in vitro in the absence of follicular fluid or hormones[J]. *Theriogenology*, 1993, 39(1): 180.

[68]Hanada A. In vitro fertilization in sheep[J]. *Journal of Animal Reproduction*, 1985, 32(4): 21-25.

[69]Vanderhyden B C, Teller E E, Eppig J J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro[J]. *Biology of Reproduction*, 1992, 46(6): 1196-1204.

[70]Heller D T, Cahill D M, Schultz R M. Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing bovine oocytes[J]. *Developmental Biology*, 1981, 84: 455-464.

[71]Sirard M A and Bilodeau S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 43: 777-783.

[72]Khatir H. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation[J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 917-929.

[73]Leibfried-Rutledge M L, Crister E S, Parrish JJ. In vitro maturation and fertilization of

bovine oocytes[J].Theriogenology, 1989, 31: 61-74.

[74]Buccione R. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor secreted by the oocyte[J]. Dev Bio 1990, 138: 16-25.

[75]汪玺仁, 薛绍白, 柳惠图.细胞生物学[M].北京: 北京师范大学出版社, 2001, 436-526.

[76]Tsafriri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation[J].Journal of Reproduction and Fertility, 1982, 64: 541-551

[77]Geshi M, Yonai M, Sakaguchi M et al. Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol[J].Theriogenology, 1999, 51: 551-558.

[78]Perone N.In vitro fertilization and embryo transfer: a historical perspective[J].Journal of Reproductive Medicine, 1994, 39: 695-700.

[79]Barry D.Bavister Early history of in vitro fertilization[J]. Reproduction, 2002, 124: 181-196.

[80]Parrish J J, Susko-Parrish J L and First N L. Capacitation of bovine sperm by heparin inhibitory effect of glucose and role of intracellular PH[J]. Biology of Reproduction, 1989, (41): 683-699.

[81]Schini S A and Bavister B D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose[J].Biology of Reproduction, 1988, 39: 1183-1192.

[82]Yanagimachi R.In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions[J]. Journal of Experimental Zoology, 1969, 170: 269-280.

[83]Crozet N, Huneau D, Desmedt V et al. In vitro fertilization with normal development in the sheep[J].Gamete Research, 1987, 16: 159-170.

[84]Barnett D K and Bavister B D. Hypotaurine requirement for in vitro development of golden hamster one-cell embryos into morula and blastocysts, and production of term offspring from in vitro fertilized ova[J].Biology of Reproduction, 1992, 47: 297-304.

[85]Edwards R G, Bavister B D and Steptoe P C. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matures in vitro[J].Nature (London), 1969, 221: 632-635.

[86]Crozet N, Huneau D, Desmedt V et al. In vitro fertilization with normal development in the sheep[J].Gamete Research, 1987, 16: 159-170

[87]Edwards R G, Bavister B D and Steptoe P C.Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matures in vitro[J].Nature(London), 1969, 221: 632-635.

[88]Cheng W K, Moor R M and Polge C.In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo[J].Theriogenology, 1986, 25: 146

[89]Aberdam E, Hanski E, Dekel N. Maintenance of meiotic arrest in isolated rat oocytes by

the invasive adenylate cyclase of *Vibrio cholerae* [J]. *Biology of Reproduction*, 1987, 12: 271-276.

[90] Schuliz R M, Montgomery R R, Belanoff J R. Regulation of oocyte maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis[J]. *Developmental Biology*, 1983, 97: 264-273.

[91] unahashi F H. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes[J]. *J. Reprod. Fertil*, 1993, 99: 97-103.

[92] 石其贤, Roldan E R S. 碳酸氢盐在小鼠精子获能和顶体反应中的应用. *生殖医学杂志*[J]. 1995, 4: 25-26.

[93] Roldan E R S, Harrison R A P. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} /ionophore-induced acrossome reaction of mammalian spermatozoa[J]. *Biochem J*[J]. 1989, 259: 397-406.

[94] Brackett B G, Mills J A, Oliphant G et al. Preliminary efforts to capacitate rabbit sperm in vitro [J]. *International Journal of Fertility*, 1972, 17(2): 89-92.

[95] Brackett B G, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro[J]. *Biology of Reproduction*, 1975, 12(2): 260-74.

[96] 徐君, 钱菊汾, 张涌. 家兔精子体外获能与体外受精试验[J]. *西北农业大学学报*, 1990, 1: 19-24.

[97] Panish J J. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen[J]. *Theriogenology*. 1986, 25: 591-600.

[98] Lu K H, Macdonnell H F and Gordon I. Birth of calves after in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes[J]. *Theriogenology*, 1989, 31: 222.

[99] Hanada A. In vitro Fertilization in sheep[J]. *Journal of Animal Reproduction*, 1985, 31(5): 21-26.

[100] Parrish J J, Susko-Parrish J L, Winer M A, First N L. Capacitation of bovine sperm by heparin[J]. *Biology of Reproduction*, 1988, 38: 1171-1180

[101] Hamono S and Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between cutting and aspiration method[J]. *Theriogenology*, 1993, 39: 703-712.

[102] Hunter R H F. Sperm: egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1993, 35: 324-327.

[103] Ling Z L and Lu K H. Frequency of cleavage and development of in vitro bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentration[J]. *Theriogenology*, 1990, 33: 275-278.

[104]Hough S R, Parks J E. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster[J].Biology of Reproduction, 1994, 50(4): 912-916.

[105]Park CK, Ohgoda O, Niwa K et al. Penetration of bovine follicular by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1989, 86: 577-582.

[106]Pomeroy K O. Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes[J]. Journal of Experimental Zoology, 1988, 284: 207-212.

[107]Ohgoda O, Niwa K et al. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls[J]. Theriogenology, 1987, 29: 1375-1381.

[108]Pavlova S K. Peroxidase activities in bull spermatozoa[J].Molecular Reproduction and Development.1994, 37: 204-209.

[109]Miller G F. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine(PHE) to bovine oviductal epithelial cells alone or in combination to bovine in vitro fertilization mediumincreases the subsequent embryo cleavage rate[J]. Theriogenology, 1994, 41: 689-696.

[110]Slaweta R, Laskowska T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bulls peen[J].Animal Reproduction Science, 1987, 13: 249-253.

[111]Kay V J, Coutts J R T, Robertson L. Penloxifulline stimulates hyperactivation in human s permato-zoa[J].Human Reproduction, 1993, 8: 727-731.

[112]Yovich J L. Pentoxifylline: action and applications in assisted reproduction[J]. Human Reproduction, 1993, 8: 1786-1791.

[113]Hunter RHF. Sperm: egg rations and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammolals[J]. Molecular Reproduction and Development, 1993, 35: 324-327.

[114]Iwasaki S, Hamano S, Kuwayama M, Yamashita M, Ushijma H, Nakahara T. Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 261: 77-85.

[115]邓晓惠, 陈元本, 江森. 囊胚期胚胎培养和移植[J].现代妇产科进展, 2000, (2).

[116]M. Kuran, J. J. Robinson, M. E. Staines and T. G. Mcevoy. Development and denovo protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems[J]. Theriogenology, 2001, 55: 593-606.

[117]Ledda S, Loi P, Cappai P, Filia F, Naitana S. Effect of glucose on early ovine embryos developed in simple serum free medium[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1991, 7: 8-15.

[118]Rosenkrans C F, Zeng G Q et al. Development of bovine embryos in vitro as affected by

energy substrates[J]. *Biology of Reproduction*, 1993, 49: 459-462.

[119]Watson A J, Hogan A, Hahnel A et al. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1992a, 31: 87-95.

[120]Watson A J, Wiemer K E, Arcellana-Panlilio M et al. U2 small nuclear RNA localization and expression during bovine preimplantation development[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1992b, 31: 231-240.

[121]张琇.牛卵母细胞孤雌激活与体外受精.西北农林科技大学 2002 届硕士毕业论文.

[122]秦鹏春.哺乳动物胚胎学[M], 北京: 科学出版社, 2001.

[123]Akihrio Ohashi, Naoijrominam1, Hiroshi Lmai. Nuclear accumulation of cyclin B in mouse twp-cell embryos is controlled by the activation of cdc2[J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1195-1200.

[124]Young Gie Chung, Mellissa R W Mann, Marisas bartocomei et al. Nuclear-cytoplasmic (tug of war)during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation colned mouse embryos[J]. *Boil Reprod*. 2002, 661: 178-1189.

[125]Qiu J J, Zhang W W, Wu Z L et al. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos [J].*Cell Research*, 2003, 13(3): 179-185.

[126]Chatot C L, Lewis J L, Tomes I et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 42: 432-436.

[127]Larson R C, Ignatz G G, Currie W B. Transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early embryo development during the fourth cell cycle[J].*Molecular Reproduction and Development*, 1992b, 33: 432-435.

[128]Benjamin G, Brackett. Analysis of factors involved in the vitro production of bovine embryos[J].*Theriogenology*, 1993, 39: 43-64.

[129]Eyestone W H. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, 85: 715-720.

[130]Van Inzen W G. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using Buffalo Rat Liver (BRL) cells[J]. *Theriogenology*, 1995, 723-738.

[131]Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro[J]. *Human Reproduction*, 1992, 7: 558-562

[132]Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C et al. Characterization of the embryo trophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 1993, 49(3): 582-587.

[133]Roblero L S, Guadarrama A, Ortiz ME et al. High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa[J].

Fertility and Sterility, 1990, 54: 328-332.

[134]Nguyen V T. Stage specific Effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig[J] Theriogenology, 2003, 59: 719-734.

[135]Kojii Yoshioika, Chie Suzuki, Atsushi Tanaka et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium[J]. Biol Reprod, 2002, 66: 112-119.

[136]Thompson J G, Mcnaughton C, Gasparrini B, McGowan L. Balstulation of bovine embryos cultured in vitro[J]J. Reprod Fertl, 2000, 1184: 7-55.

[137]Tenneille E, Ludwig, Jayne M, Squirrel, Anne, Palmenberg et al. Relationship between development metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate[J]Boil Reprod, 2001, 65: 1648-1654.

[138]Ludwig T E, lane M, Bavister B D. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture[J]. Boil Reprod, 2001, 64: 1366-1374.

[139] Rosenkrans C F. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates[J]Boil Reprod, 1993, 49: 459-462.

[140]Pinyopummintr T, Bavister B D. In vivo-matured/in vitro fertilized bovine oocytes can development morulae/balstocysts in chemically defined protein free culture media[J]. Biol Reprod. 1991, 45: 736-742.

[141]Narinder K, Khurana. Energy metabolism inpreimplantation bovine embryos derived in vtiro or in vivo[J].Boil Reprod, 2000, 62: 847-856.

[142] Swain J E, Bormann C L, Clark S G et al. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro[J]. Reproduction, 2002, 123: 253-260.

[143] Gustafsson H, Larsson B, Shamsuddin M, Jaakma U and Emanuelson U. Factors affecting the survival of frozen thawed bovine in vitro produced blastocysts [J]. Asian-Aust. J. Anim, 2001, 14: 7-12.

[144]Liza Butcher et al. Metabolism of pyruvate by the early human embryo[J]. Biology of Reproduction, 1998, 58: 1054-1056.

[145]Fallon J V and Wrightrw J. Pyruvate revisited: a nonmetabolic role for pyruvate in preimplantation embryo development[J]. Theriogenology, 1995, 43: 288.

[146]Thompson J G, Mcnaughton C, Gasparrini et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 2000, 118(1): 47-55.

[147]Harvey A J, Kind K L, Thompson J G. REDOX regulation of early embryo development[J]. Reproduction, 2002, 123(4): 479-486.

[148]Butcher L, Martin K L. The effect of glucose on the early bovine embryos[J]. Biology of Reproduction, 1998, 56: 954-956.

[149]Rose-Hellekant T A, Libersky-Williamson E A, Bavister B D. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence[J]. *Zygote*, 1998, 6(4): 285-294.

[150]Van Winkle L J, Haghghat N, Campione A L. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1990, 253(2): 215-219

[151]卢晟盛. 牛磺酸和卵丘细胞对牛胚胎体外发育的影响[J]. *广西农业生物科学*, 1999, 18(2): 120-123.

[152] Steeves T E and Gardner D K. Temporal and different effects of amino acids on bovine embryo development in cattle[J]. *Biology of reproduction*, 1999, 61, 731-740.

[153]John D, Biggers, Lynda K. Amino acids and potassium simplex optimized medium[J]. *Biology of reproduction*, 2000, 63: 281-293.

[154]陈大元主编. 受精生物学[M]. 科学出版社, 2000, 352-353.

[155]Takagi Y, Mori K, Tomizawa M et al. Development of bovine oocytes matured fertilized and cultured in a serum-free chemically defined medium[J]. *Theriogenology*, 1991, 35: 1197-1207.

[154]Thompson J G. Defining the requirements for bovine embryo culture[J]. *Theriogenology*. 1996, 45: 27-40.

[155]Sanjeev Khosla, Wandy Dena, David Brown, Wofl Reik, and Robert Feil. Culture of preimplantation mouse embryo affect fetal development and the expression of imprinted genes[J]. *Boil Reprod*, 2001, 64: 918-926.

[156]Rebecca L, Krisher, Michelle Lane, and Barry D, Bavsiter. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1345-1352.

[157]Chatct C L, Zoimek C A, Bavister B D, Lewis J L, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro[J]. *J Report Fertil* 1989, 86: 679-688.

[158] Homl P, Bouth P J and Ccallesen H. Kinetic of early in vitro development of bovine in vivo and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media[J]. *Reproducticon*, 2002, 123: 553-565.

[159] Thompson J G, Allen N W, MCGowan L T et al. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer[J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 1239-1249.

[160]Pinyopumnitr T, Bavister B D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation[J]. *Theriogenology*,

1998, 41: 1241-1249.

[161]Pollard J W, Plante C, Leibo S P. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media[J]. *J Reprod Fertil*, 1995, 103: 331-337.

[162]Tervit H R, Whittington D G, Rowson L E A. Successful culture of in vitro sheep and cattle ova[J]. *J Reprod Fertil*, 1972, 30: 493-497.

[163]Kuran M, Robinson J J, Staines M E. Development and *de novo* protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 593-606.

[164]Yoshioka K, Suzuki C. Effects of activin and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos cinematographic analysis in a chemically defined medium[J]. *J Reprod Fertil*, 2000, 118: 119-125.

[165]Yoshioka K, Takata M. Differential expression of activin subunits, activin receptors and follistatin genes in bovine oocytes and preimplantation embryos[J]. *Reprod Fertility and Development*. 1998b, 10: 293-298.

[166]N R Mtsho. Growth factor and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts[J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 1393-1402.

[167]Johnson M H, Nasr Esfahani M H. Radical solution and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro[J]. *Bio Essays*, 1994, 16: 31-38.

[168]Hiroyoshi Hosshi, Shoko Yamashita. In vitro maturation, fertilization of bovine oocytes and embryo culture in serum-free medium[J]. *Asian-aust. J Anim Sci*. 2001. 114: 38-42.

[169]Sato T, Kobayashi K, Yamashta S, Kikuchi M, Sendai Y, Hochi H. Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP-1) produced by granulosa cells and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo[J]. *Biol Reprod*, 1994a, 50: 835-844.

[170]Kikuchi, M Y Sendai. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP-1) and collagenase genes in preimplantation bovine embryos[J]. *J Reprod Dev*. 1996, 42: 55-60.

[171]Makarevich A V and Markkila M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66: 386-392.

[172]Rosenkrans C F. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49: 459-462.

[173]Hernandez-Fonseca H J, Sirisathien S. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media[J]. *Animal Reproduction Science*, 2002, 69: 151-158.

[174]Moreira F, Paula-lobes F F. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I

on development of in vitro derived bovine embryos[J]. *Theriogenology*. 2002, 57: 895-907.

[175]Palma G A, Muller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor-I (IGF-1) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro[J].*J.Reprod.Feritel*, 1997, 110: 347-353.

[176]Iwata H, Ohota M, Hashimoto S et al. Stage-specific effect of growth hormone on developmental competence of bovine embryos produced in vitro[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2003, 49(6): 493-499.

[177] Swain J E, Bormann C L and Krisher R L. Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in UCSU23 and G1.2 /G2.2 sequential medium[J]. *Theriogenology*, 2001, 56: 456-469.

[178]Pinyopummintr T, Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effect of serum, timing of its inclusion and heat in activation[J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 1241-1249.

[179]Rebecca L.Krisher, Michelle Lane, Barry D.Bavister. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semidefined and defined culture media [J]. *Boil Reprod*, 1999, 60: 1345-1352.

[180]Young Gie Chung, Mellissa R.W.Mann, Marisas.bartocomei et al. Nuclear-cytoplasmic (tug of war) during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos[J]. *Boil Reprod*, 2002, 661: 178-1189.

[181] Choi Y H, Lee B C, Lim J M. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome[J]. *Theriogenology*, 2002, 58: 1187-1197.

[182]Krisher R L, Lana M, Bavister B D.Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined cultured media[J].*Biol Reprod*, 1999, 60:1345-1352.

[183] Izquierdo D, Villamediana P and Paramio M T.Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes[J].*Theriogenology*, 1999, 52:847-861.

[184]Kane M T, Carney E W, Ellington.T E.The role of nutrients peptide growth factors and coculture cells in development of preimplantation embryos in vitro[J].*Theriogenology*, 1992, 38:297-313.

[185]Rizos D, Ward F, Boland M P, and Lonergan P.Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification[J].*Theriogenology*, 2001, 56:1-16.

[186]Marquant-Leguienne B and Humblot P.Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine[J].*Theriogenology*, 1998, 49:3-11.

[187]Lane M, Baltz J M, Bavister B D. Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen antiporter[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 1483-1490.

[188]Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K et al. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1992, 31: 28-32.

[189]Fukui Y, Pugh P A and Teruit H R. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1991, 92: 125-131.

[190]秦鹏春等编著. 哺乳动物胚胎学. 科学出版社 2001, 456-520.

[191]F F Paula-Lopes and P J Hansen. Heat shock-induced apoptosis in reimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon[J]. *Biol Reprod*, 2002, 1169-1177.

[192]R M Azambuja, D C Kraemer and E Westhusin. Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes[J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 1155-1164.

[183]Rocha A, D Randel R, Broussard J R, Lim J M. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *bos indicus* cows[J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 657-665.

[194]Noda Y, Matsuimoto H, Umaoka Y et al. Improvement of superoxide radicals in mouse two cell block phenomenon[J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, 28: 256-260.

[185]Gardner C S, Salmen J J, Brabdt C J. Glutathione is present in reproductive secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 431-436.

[196]Van Soom A, Yuan Y Q, Peelman L J et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition[J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 1453-1465.

[197]Mizushima S and Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 1431-1455.

[198]Fischer B and Bavister B D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits[J]. *J Reprod Fert*, 1993, 99: 673-679.

[199]Johnson M H, Nasr Esfahani M H. Radical solution and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro[J]. *Bio Essays*, 1994, 16: 31-38.

[200]Guerin P, E I Mouatassim S and Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surrounding[J]. *Human Reproduction update*, 2001, 7: 17-189.

[201]Van Soom A., Yuan Y Q, Peelman L J, Dematos D G, Ewulf J D. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition[J]. Theriogenology, 2002, 57: 1453-1465.

[202]Alexandre J.Harvey, Karen L.Kind, Jeremy G.Thompson. Redox regulation of early embryo development[J]. Reproduction, 2002, 123: 479-486.

[203]Harvey M B, Arcellana-panlilio M Y, Zhang X et al. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture[J]. Biol Reprod, 1995, 53: 532-540.

[204]Orsi N and Leese H J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate[J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 59: 44-53.

[205]Dematos DG, Fumus CC, Moses DF et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro[J]. Molecular Reproduction and Development, 1995, 42(4): 432-436.

[206]Azambuja R M, Kraemer D C and Westhusin E.Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes[J]. Theriogenology, 1998, 49: 1155-1164.

[207]Polge C, Smith A U, Parks A S.Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.Nature, 1949, 164:666

[208]Whittingham D G, Leibo S P, Mazur P.Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C.Science(N.Y.)1972, 178:411-414

[209]Whittingham D G.Fertilization in vitro and developments to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at-196°C.J Reprod Fertil 1977, 49:89-94

[210]郝志明, 张涌, 钱菊芬.山羊卵泡卵母细胞低温冷冻保存的研究.西北农业大学学报 1992, 20(增刊):121-124

[211]刘海军.山羊卵母细胞冷冻保存研究:[博士学位论文].杨陵:西北农林科技大学 2000

[212]Chen C.Pregancy after human oocyte cryopreservation.Lancet 1986, 2:884-886

[213]Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus G L, Downey B R.In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes.Cryobiology 1992, 29:485-492

[214]Hochi S, Fujimoto, Choi Y H et al.Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing.Theriogenology 1994, 42:1085-1094

[215]Luvoni G C, Pellizzari P, Battocchio M.Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis immature cate oocytes.J Reprod Fertil 1997, 51:93-99

[216]Luvoni G C , Pellizzari P.Embryos development of in vitro-matured cat oocytes cryopreserved by low and ultrarapid freezing.Theriogenology 2000, 53:260

[217]Nagashima H, Kuwayama M, Grupen CG.Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets.Theriogenology 1996, 45:180

[218]Suzuki T, Boediono B, Takagi M, Saha S, Sumantri C.Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro.Cryobiology, 1996, 33(5):515-524

[219]Vajta G, Kuwayama M, Booth P J, Holm P, Greve T, Callesen H.Open pulled straw(OPS) vitrification of cattle oocytes.Theriogenology 1998, 49:176

[220]Willadsen S M.Factors affecting the survival sheep embryos during deep-freezing and thawing[J].In The Freezing of Mammalian Embryos 1977.175-200。

[221]Rall W F, Fahy G M.1985: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at-196oC by vitrification.Nature 1985.573-575.

[222]Scheffen B.A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification.Cryo-Letters.1986.260-269.

[223]Nakagata N.High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. 1989.479-493.

[224]Kasai M.A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability.J.Reprod.Fertil, 1990, .91-97.

[225]Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus G J, Downey B R.Invitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes.Cryobiology, 1992.485-492.

[226]Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T. Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants.1993.801-807.

[227]Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P J, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.Open pulled Straw(OPS)vitrification Molecular Reproduction and Debelopment, 1998.53-58.

[228]Pereira P V. Pregnancy rate following transfer of cryopreservation in vitro produced bovine embryos.Theriogenology 2002.475.

[229]Dobrinsky J R.Advancements in Cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology 2002.285-302.

[230]Denise M Dudzinski.Ethical Issues in Fertility Preservation for Adolescent Cancer

Survivors: Oocyte and Ovarian Tissue Cryopreservation[J].Pediatr Adoles Gynecol, 2004.97-102.

[231]Whittingham D G.Fertilization and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at-196℃。1977.89-94.

[232]AL-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K et al.Successful embryo transfer of cryopreserved and in-vitro fertilized rabbit oocytes[J].Hum.Reprod, 1989.77-79.

[233]Lim J M, Fukui Y, Ono H.Development competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization[J], Theriogenology, 1991.351-361.

[234]Amir Arav, Saar Yavin et al.New trends in gamete's cryopreservation[J].Molecular and Cellular Endocrinology, 2002.77-81.

[235]Suzuki A, Bobediono M et al.Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by one-step dilution method in vitro[J].Cryobiology, 1996.515-524.

[236]包华琼, 李跃民, 王新庄, 等. 3种因素对牛卵母细胞玻璃毛细管玻璃化冷冻效果的影响研究[J].动物医学进展, 2004年06期.

[237]禹学礼, 邓雯, 庞有志, 等.开放式拉伸细管对牛卵母细胞冷冻效果的影响研究[J].畜牧兽医学报.2005.221-224.

[238]桑润滋.动物繁殖生物技术[M].北京: 中国农业出版社, 2002.

[239]Chen C.Pregnancy after human oocyte cryobiology[J], Lancet, 1986.884-886.

[240]Yoon T K, Chung H M, Lim J M et al.Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitried oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program[J].Fertil.Steril., 2000.180-181.

[241]Andrea Borini, Maria Antonietta Bonu, Giovanni Coticchio et al.Pregnancies and births after oocyte cryopreservation[J].2004, 82(3).

[242]Tucker, Paula Morton, Juergen Liebermann.Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation?[J].European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2004, 24-27.

[243]杜立新, 张沅, 吴常信.畜禽遗传资源保存综观[J].黄牛杂志, 1993.19(2): 1-4.

[244]Wilmut I, Rowson Lea.Successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos[J], 1973, 352-353.

[245]Whittingham D G, Adams C E.Low temperature preservation of rabbit embryos[J].

Reprod Fertil, 1976, 269-274.

[246]Willadsen S M. Factors affecting the survival sheep embryos during deep-freezing and thawing[J].In The Freezing of Mammalian Embryos.1977, 175-200.

[247]Bilton R J, Moor N W.In vitro culture storage and transfer of goat embryos[J].BioSci, 1976, 125-129.

[248]White I G.The lipids of sperm in relation to cold shock.8thCongress Anim Reprod Artif Insem, 1976, 951-954.

[249]Dobrinsky J R.Advancements in Cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology.2002, 285-302.

[250]Tomita S Y.The use of in vitro produced cryopreserved for direct transfer to induce twinning in beef cattle.Theriogenology.2002, 486

[251]Mukaida T, Wada S, Takahashi K et al.Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos[J].Hum Reprod, 1998, 2874

[252]Saito H, Ishida G M, Kaneko T et al.Application of vitrication to human embryo freezing[J].Gynercol Obstet Invest.2000, 145.

[253]Imam D V, Helmy S.Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocolfor 3 human embryos[J].Fertil Steril.2001, 400.

[254]Yokota Y, Sato S, Yokoto M et al.Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts[J].Fertil Steril.2001, 1027-1029.

[255]罗晓中, 杨志明.组织工程化组织的低温冷冻保存研究[J].中国临床康复.2004.8(17), 3327-3329.

[256]周虚, 张嘉保, 田允波, 等.动物繁殖学.吉林人民出版社.2003, 268-272

[257]冯怀亮, 孙青原, 李子义, 等.牛的体外成熟卵母细胞冷冻保存的研究[J].畜牧兽医学报.1995, 26(6):481-486

[258]付永伦, 严敬明.人类卵母细胞的冷冻保存[J].生殖与避孕.1996, 16 (3): 163-166

[259]王君辉, 黄纯农.抗冻蛋白与细胞的低温和超低温保存[J].细胞生物学杂志, 1996, 8(3):107-111

[260]朱化彬摘译.热滞蛋白在低温保存卵母细胞和胚胎中的应用[J].国外畜牧科技.1995, 22(2):24-26

[261]Mazur P.Freezing of sperm living cells: mechanisms and implications[J]. Amer J

Physiol.1984, 125-144.

[262]Mazur P, Cole K W, Hall W H, Scheuders P K, Mahowald A P.Cryobiological preservation of Drosophila embryos[J].Science.1992, 258:1932-1935

[263]Miyake T.Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol based solution by a simple method[J]. Theriogenology.1993, 121-134.

[264]Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige K, Kasai M, Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages[J].Cryobiology.1977, 35: 150-158

[265]Bielanski A, Hare W D.Survival in vitro of bovine demi-embryos after freezing by slow cooling rates or vitrification[J].Theriogenology.1988, 223

[266]De P P, Sanchez, A J.Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing[J].Theriogenology.1994, 327-338.

[267]Titterington J L.Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification[J].Hum.Reprod.1995, 649-653.

[268]Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H.Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages[J].Theriogenology.1992, 839-850.

[269]Frideder S, Giudice I, Lamb E. Cryopreservation of embryos and Ova[J].Fertil. Steril.1988, 743-764.

[270]Pedro P B, Sakurai T, Edashige K.Effects of osmotic shrinkage on the survival of mouse oocytes and embryos at various developmental stages[J]. J.Mamm.Ova.Res, 1997, 66-71.

[271]Kasai M. High survival of rabbit morulae after vitrification in an Ethylene Glycol-based solution by a simple method[J].Biology of Reproduction. 1992, 1042-1046.

[272]Didion B A, Pomp D, Martin M J, Homanics G E et al.Observations on the cooling and cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification[J]. Biol.Reprod.2000, 564-570.

[273]孙青原, 秦鹏春, 刘艺国, 等.牛卵母细胞冷冻损伤的研究[J].中国兽医学报, 1994, 41-47.

[274]刘海军, 张美佳, 侯蓉, 等.OPS 玻璃化冷冻对山羊卵母细胞超微结构的影响[J].西北农林科技大学学报.2001, 29 (3): 9-12.

[275]Schiewe M C.In dilution of ovine embryos cryopreserved by conventioned freezing or vitrification [J]. Theriogenology . 1990, 321.

[276]Vicente J S.Osmotic and cryoprotective effects of mixture of DMSO and EG on rabbit morulae [J]. Theriogenology . 1994, 1205-1215.

[277]Nguyen E, Pruliere G, Doizou P. Rheological properties of cellular plasmas and cryobehavioral studies on the early embryos and by in vitro simulations[J]. Cryo-Lett . 1990, 277-286.

[278]Bouquet M, Selva J, Avreoux M.Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rate of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities.Mol.Reprod.Dev.1995.110-115.

[279]Bouquet M, Selva J, Avreoux M.Cryopreservation of mouse oocytes: Mutagenic effects in the embryo[J]. Biol.Reprod.1993, 764-769.

[280]Shaw J M.Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue [J]. Theriogenology . 2000, 59-72.

[281]Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu S E, Miyake T, Sakurai T, Machida T.High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method [J]. Biol.Reprod.1992, 46:1042-1046 .

[282]Kasai M, Yodoyama E, Edashige K, Sakurai T, Machida T.Permeability of mouse morulae to various cryoprotectants and the survival of the embryos after vitrification [J]. Cryobiology.1994, 31:570 .

[283]Frieder S, Giudice L.Lamb E.Cryopreservation of embryos and Ova.Fertil [J]. Steril.1988, 743-764 .

[284]Didion B A, Pomp D, Martin M F, Homanics G E, Markert C L.Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage [J]. J.Anim.Sci.1990, 68:2803-2810 .

[285]孙青原, 刘国艺, 徐立滨, 杨庆章, 秦鹏春, 冯怀亮, 文兴豪.牛卵泡卵母细胞冷冻保存后发育潜力的研究[J].中国兽医学报. 1994, 14(4):341-345 .

[286]刘海军, 侯蓉, 张美佳, 张志和, 王基山, 兰景超, 钱菊汾, 张安居.山羊卵母细胞冷冻保存及其对发育效果的影响[J].畜牧兽医学报. 2003, 34(1):28-32 .

[287]Schakoff M E, Oskowita P S, Powers R D.Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryoprotectives [J]. Biol.Reprod . 1989, 40:379-394.

[288]Johnson M H, Pickering S J and George M A.The influence of cooling on the properties

of the zona pellucida of the mouse oocytes[J].Hum.Reprod.1988, 3:383-387.

[289]Vincent C, Garnier J, Heyman Y, Renard J P.Solvent effects on cytoskeletal organization and in vitro survival after freezing of rabbit oocytes[J]. J.Reprod.Fertil . 1989, 87:809-820 .

[290]Bouquet M, Selva J, Aureoux M.Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rat of fertilization, development, and chromosomal abnormalities [J]. Mol.Reprod.Dev.1995, 40:110-115 .

[291]Bouquet M, Selva J, Aureoux M.Cryopreservation of mouse oocytes:Mutagenic effects in the embryo [J]. Biol.Reprod.1993, 49:764-769 .

[292]Shaw J M, Oranratnachai A, Trounson A O.Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue.Theriogenology 2000, 53:59-72 .

[293]李广武, 郑从义, 唐兵.低温生物学[J]. 1998, 湖南科学技术出版社.

[294]关静, 龚承元, 崔占峰.玻璃化冷冻保存细胞、组织研究进展[J].国外医学生物医学工程分册, 2004, 4(27): 252-255.

[295]谭世俭, Henrik Callesen.OPS 法玻璃化冷冻牛卵母细胞和囊胚[J].广西农业生物科学, 2002, 23(1): 1-7.

[296]Von Baer A.Vitrification and cold storage of Llama hatched blastocysts [J]. Theriogenology . 2002, 489.

[297]Siqueira E S C.Vitrification of bovine oocytes in presence of follicular fluid using open pulled straws [J]. Theriogenology . 2002, 482.

[298]Lane M, Schoolcraft W B, Gardner D K.Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique[J].Fertil Steril. 1999, 1073-1078.

[299]Mukaida S, Nakamura et al.Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with of a cryoloop containerless technique[J]. Fertio Steril. 2001, 618-623.

[230]N Oberstein et al.Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods[J]. Theriogenology. 2001, 607-613.

[231]Yeoman R R, Gerami-Naini B, Mitalipov S.Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts[J].Hum Reprod.2001, 1965-1969.

[232]Steponkus P L, Myers S P, Lynch D V et al.Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryo[J], Nature.1990, 170-172.

[233]Mazur P, Cole K W, Hall W H et al.Cryobiological preservation of Drosophila embryos[J].Science, 1992.1932-1935.

[234]Martino A, Songsasen N, Leibo S P.Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling[J].Biol.Reprod.1996, 1059-1069.

[235]Kong et al.Comparison of open pulled straw vs glass micropipette vitrification in mouse blastocyst[J].Theriogenology.2000, 1817-1826.

[236]Kono T, K won O Y, Nakahara T.Development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization[J].Cryobiology.1991, 4-15.

[237]朱士恩, 曾申明, 张忠诚.小鼠扩张囊胚颗粒化玻璃化冷冻保存技术的研究[J].上海实验动物科学.1999, 67-71.

[238]Arav A et al.Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes[J].J Reprod Fert.1993, 353-358.

[239]Nakagata N.Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes[J].J Reprod Fert.1993, 77-80.

[240]Whittingham D G. Fertilization and development to term of unfertilized mouse oocytes prebiously stored at-196°C[J].1977, 89-94

[241]Summers P M.The effects of cryopreservation and transfer on embryonic development in the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*[J].J Reprod Fert.1987, 241-250.

[242]Renard et al. Cryopreservation study of bovine in vitro produced embryos using different cryoprotectant solution and at different ages[J].Theriogenology.2002, 487.

[243]Halasz A N, Colins G M. Studies in cryoprotectants: Propylene glycol and glycerol[J].Cryobiologs.1984, 407.

[244]Ruffing N A et al.Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages.Cryobiology, 1993.562-580.

[245]Darin-Bennett A et al.The effect of cold-shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa[J].Aust J Biol Sci.1973, 1409-1420.

[246]Miyamoto H, Ishibashi T.Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos[J].J Reprod Fert.1986, 471-478.

[247]Shaw J M et al.Evaluation of propandiol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze

proteins on the survival of slow cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos[J].Hum Reprod.1995, 10: 396-402.

[248]黄凤玲, 石德顺, 卢克焕.几种冷冻条件对牛体外受精卵发育率的影响[J].中国兽医学报.2002, 337-338.

[249]史洪材.家畜胚胎冷冻保存的研究进展[J].草食家畜.1993, 01.

[250]王君晖, 黄纯农.冷冻蛋白与细胞的低温和超低温保存[J].细胞生物学杂志.1996, 107-111.

[251]Leboeuf B, Maxwell W M C, Ewans G.Survival of mouse morula vitrified in media containing antifreeze protein[J].Theriogenology.1997, 349.

[252]Rubinsky B, Arav A, Fletcher G L. Hypothermia protection: a fundamental property of antifreeze proteins[J].Biochem Biophys Res Comm.1991, 566-571.

[253]Brain W, Eugen L, Christopher M R et al.Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents[J].Cryobiology.2000, 228-236.

[254]Ren H S, Wei Y, Hua T G, Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions[J].Cryobiology.1994, 47-56.

[255]Von Baer A.Vitrification and cold storage of Llama hatched blastocysts[J].Theriogenology.2002, 57.

[256]Karlson J O et al.Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol[J].Hum Reprod.1996, 1296-1305.

[257]Schiewe M C, Rall W F et al.Analisis of cryoprotectant freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos[J].Theriogenology.1991, 279-291.

[258]Critser J K et al. Factors affecting the cryosurviaval of mouse two-cell embryos[J].J Reprod Fert.1998, 27-33.

[259]Hongsheng Men et al.Effect of meiotic stages and muturation protocols on bovine oocytes resistance to Cryopreservation[J].Theriogenology.2002, 1095-1103.

[260]Leibo S P et al.Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. Theriogenology 2002.303-326.

[261]Magnusson V et al.In vitro development of bovine oocytes exposed to two vitrification solution[J].Theriogenology.2002, 469.

[262]Tomita S Y et al.The use of in vitro produced cryopreserved for direct transfer to induce

twinning in beef cattle[J].Theriogenology.2002, 486.

[263]Magistrini M.Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes[J].Eur J Cell Biol.1980, 22(2):699-707.

[264]Aman R R, Parks J E.Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosome of in vitro mature bovine oocytes[J].Biol Reprod.1996, 54:1059-1069.

[265]Wininger J D, Kort H I.Cryopreservation of immature and mature human oocytes[J].Semin Reprod Med.2002, 20(1):45-49.

[266]Webb M, Howlett S K, Maro B.Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs[J].J Embryo Exp Morphol.1986, 95:131-145.

[267]Sounders K M, Park J E.Effects of cryopreservation procedure on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes[J].Biol Reprod.1999, 61:178-187

[268]Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ et al.Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling[J].Biol Reprod.1994, 51(4):618-622.

[269]Bouquet M, Selva J, Auroux M.The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after in-vitro fertilization[J].Hum Reprod.1992, 7(1):76-80.

[270]Van D F.Development capacity of mouse oocytes after ultrarapid freezing[J].Cryobiology.1991, 28:514.

[271]Stachecki J J et al.Cryopreservation of unfertilized oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium[J].Cryobiology.1998, 345-346.

[272]刘海军, 候蓉, 张美佳, 等.山羊卵母细胞冷冻保存及其对发育效果的影响[J].畜牧兽医学报.2003, 28-32.

[273]孙青原.牛卵母细胞体外成熟、冷冻及受精的研究[J].东北农业大学博士论文.1994.

[274]Leibo S P, Pollard J W, Martino A.Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro derived bovine embryos[J].Theriogenology.1995, 265.

[275]Nagashima H, Kuwayama M et al.Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets[J].Theriogenology.1996, 803.

[276]Lim J M, Ko J J, Hwang W S, Chung H M, Niwa K.Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants[J].Theriogenology.1999, 3-10.

[277]Trounson A, Kirby C.Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulfoxide[J].Fertil.Steril.1989, 778-786.

[278]kasai M.A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability[J].J Reprod Fert.1990, 91-97.

[279]Kuleshoba LL et al.Sugars exert a major influence embryos and oocytes[J].Cryobiology.1999, 119-130.

[280]Ali J, Shelton J N.Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos[J].J Reprod Fert.1993, 471-477.

[281]Suzuki T.Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1, 2-propanediol[J].Theriogenology.1990, 34:1051-1057.

[282]Leibo S P, Pollard J W, Martino A.Chilling and freezing sensitivity of “reassembled” in vitro-derived bovine embryos[J].Theriogenology.1995, 43:265.

[283]Rall W F.Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification[J].Cryobiology.1987, 24:387-402.

[284]Shaw P W, Fuller B J, Bernard A et al.Vitrification of mouse oocytes improved rates of survival, fertilization and development to blastocysts[J].Mol Reprod Dev.1991, 20:373-378.

[285]Ohlrichs C L.In vitro survival of IVF-derived embryos frozen using antifreeze proteins[J].Theriogenology.1996, 45(1):174.

[286]Leboeuf B, Maxwell W M C.Survival of mouse morulae vitrified in media containing antifreeze protein type I[J].Theriogenology.1997, 51:349.

[287]Palsaz A T.Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes:recent advances[J].Biotech Adv.1996, 14:127-149.

[288]Kasai M, Komi J H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T.A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability[J].J.Reprod.Fertil.1990, 89:91-97.

[289]Zhu S E, Sakurai T, Edashige K, Machida T, Kasai M.Optimization of the procedures for the vitrification of expanded mouse blastocysts in glycerol-based solution[J].J.Reprod. Def.1994, 40:293-300.

[290]权国波.小鼠原核胚和卵母细胞的玻璃化冷冻保存研究.中国农业大学硕士论文集.2001.

[291]吴通义.小鼠和牛卵母细胞 OPS 法冷冻保存技术的研究.中国农业大学硕士论文

集.2002.

[292]Landa V, Tepla O.Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops[J].Folia Biol.1990, 36:153-158.

[293]朱士恩, 曾申明, 张忠诚.小鼠扩张囊胚颗粒法玻璃化冷冻保存技术的研究[J].上海实验动物科学.1999, 19(2):67-71.

[294]Martino A, Pollant J W, Leibo S P.Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence[J].Mol.Reprod.Dev.1996, 45:503-512.

[295]朱士恩, 张忠诚, 葛西孙三郎.扩张囊胚玻璃化超低温冷冻保存及移植技术的研究[J].中国畜牧杂志.1996, 4.

[296]Visntin J A.Cryopreservation of Bos Taurus VS.Bos indicus embryos: are they really different[J].Theriogenology.2002, 345-360.

[297]阳年生, 卢克焕.玻璃化冷冻对保存牛体外受精胚胎[J].广西农业大学学报.1992, 11(3): 102-107.

[298]Vantini R.Cryopreservation study of bovine in vitro produced embryos using different cryoprotectant solution and at different ages[J].Theriogenology.2002, 487.

[299]Amorin C A.Viability of ovine primordial follicles after cryopreservation with different DMSO concentrations[J].Theriogenology.2002, 460.

[300]Magnusson V.In vitro development of bovine oocytes exposed to two vitrification solution[J].Theriogenology.2002, 469.

[301]Pribenszky C.In vitro survival of hatching and hatched mouse blastocysts cryopreserved by rapid freezing[J].Theriogenology.2002, 476.

[302]Boggio J C.Survival of ovine embryos vitrified in 5.5M ethyleneglycol+1.0Msucrose or 1.0M trehalose.first report in Uruguay[J]. Theriogenology.2002, 489.

[303]Castellini C.Water volume of rabbit spermatozoa measured by electron paramagnetic resonance at different temperatrrres[J].World Rabbit Congress Toulouse.1996, 55-58.

[304]Amorin C A.Viability of ovine primordial follicles after cryopreservation with different DMSO concentrations[J]. Theriogenology.2002, 460.

[305]Bruyas J F.Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells[J].J Reprod Fert.1993, 15-23.

[306]王光亚, 马保华, 赵晓娥, 等.安哥拉山羊胚胎冷冻试验[J].西北农业学报.1996, 5 (4) .36-40.

[307]徐照学, 兰亚莉, 安森亚, 等.牛体外受精胚胎冷冻保存的研究[J].中国兽医学报.1997, 17 (4): 402-405.

致谢

本研究在实施过程中,得到导师和同事们的的大力支持和帮助,在此深表谢意!

首先,本研究是在导师余四九教授的精心指导和关心下顺利完成的。余导开阔缜密的科研思路、坚韧严谨的治学态度熏陶和激励着我勤奋努力、不断创新,顺利地完成了学习和科研工作。同时,崔燕教授在本人学习和试验期间也给了许多指导,也在此深表谢意!

其次,本研究还得到甘肃省畜牧兽医研究所贺奋义所长和甘肃省农业生物技术项目《家畜胚胎移植关键技术研究与应用》课题组成员郭海龙、豆有院、邱忠玉、丁春贤及同事薛掌林、陈伯祥、党岩、孙春香、王必慧等同志的大力支持和帮助,在此一并表示衷心感谢!

最后,对于一直大力支持我科研工作家人以及给予我热心帮助的老师 and 朋友们表示诚挚的感谢!

作者简介

桑国俊，男，1963年8月生，汉族，甘肃省临洮县人。1986年毕业于甘肃农业大学畜牧系。现为甘肃省畜牧兽医研究所副研究员，甘肃省畜牧兽医研究所动物科学研究室主任。完成“甘肃省黄牛转化途径和方法的研究”、“陇东高原半湿润偏旱区（镇原）农业综合发展研究”、“牛胚胎移植试验示范”、“陇东优质高效肉牛产业开发和利用途径的研究”等科研成果10项，获甘肃省农牧渔业丰收奖、甘肃省科技进步奖等科研奖励7项。近几年在《畜牧与兽医》、《中国畜牧兽医杂志》、《甘肃农业大学学报》、《Animal Biotechnology Bulletin》等专业学术期刊上发表“牛卵母细胞体外受精和体外成熟技术”、“奶牛和肉牛冻胚移植试验”、“动物胚胎玻璃化冷冻试验”、“Study on Good Cycle of Grass-animal-manure-grain in Agroecosystem”等学术论文62篇。目前主要从事家畜胚胎工程工作，主持甘肃省农业生物技术项目“家畜胚胎移植关键技术研究与应用”和“EG和TCM199提高牛精液冷冻效果的关键技术研究”。

在读期间发表的主要论文

在读期间以甘肃农业大学为第一署名单位发表学术论文6篇：

- 1 桑国俊，贺奋义. 猪胚胎冷冻保存技术. 广西农业生物科学[J]. 2006，9：156-161.
- 2 桑国俊. 牛卵母细胞体外受精和体外成熟技术. 中国牛业科学[J]. 2007，1：30-34.
- 3 邱忠玉，桑国俊. 德本 F₁ 和蓝本 F₁ 牛繁殖性能研究. 中国牛业科学[J]. 2008，1：31-36.
- 4 桑国俊，邱忠玉，豆有院等. 初生德本 F₁ 和蓝本 F₁ 牛的生长发育性能. 甘肃畜牧兽医[J]. 2008，1：15-18.
- 5 桑国俊，余四九. 促排素和促黄体素在牛不孕症方面的应用. 畜牧兽医杂志[J]. 2008，3：25-27.

导师简介

余四九,男,汉族,1961年6月生,甘肃秦安人,中共党员。甘肃农业大学动物医学院院长、教授、博士研究生导师。甘肃省牛羊胚胎工程技术研究中心主任兼首席科学家,国务院学位委员会学科评议组成员,甘肃省学位委员会成员,中国畜牧兽医学会兽医产科学分会秘书长,国际牦牛信息研究中心科技秘书,中国牦牛品种协会常务理事,中国动物生物技术学会理事,甘肃省高级专家协会甘肃农大分会副理事长,《中国兽医杂志》和《中国兽医科学》编委等。

1984年毕业于甘肃农业大学兽医系兽医专业,获学士学位。1987年获甘肃农业大学兽医学硕士学位。1990年获甘肃农业大学兽医学博士学位。

1996年被确定为甘肃省省属高校跨世纪学科带头人,1997年入选国家“百千万人才工程”第一、二层次人选,1998年被评为甘肃省优秀中青年专家,2004年受聘为甘肃省特聘首席科技专家。曾获甘肃省青年教师成才奖、首届甘肃省十佳青年科技奖、国家教委霍英东教育基金会青年教师研究类奖、“全国优秀青年科技标兵”等奖励及荣誉称号。享受国务院政府特殊津贴。

主要研究方向为动物胚胎工程、动物生殖生理和动物临床疾病防治。先后主持完成了由国际科学基金、国际原子能机构、国家自然科学基金和国家教育部优秀青年教师基金资助的科研课题15项。获国家教学成果二等奖1项,省部级科研成果二等奖、三等各1项,国际牦牛研究贡献二等奖一项,厅局级科研成果一等奖、二等奖各1项。在《Reproduction》、《Animal Reproduction Science》、《The Veterinary Journal》、《中国科学》等国内外著名刊物上发表论文68篇,其中10篇被SCI收录。主编了《特种经济动物学》、《Yak Breeds and Production》、《世界牦牛文献题录》,参编了《兽医产科学》、《动物生殖调控学》、《家畜生殖内分泌学》等。已培养博士研究生11人,硕士研究生17人;目前正在指导在读博士研究生9人,硕士研究生11人。

