

保存温度对卵母细胞体外成熟率的影响 及牦牛卵母细胞体外成熟培养方式初探

庞 礴^{1 2 3}, 赵新全^{1 3}, 郭志林^{1 3 4}, 屈 雷⁵, 于鸿浩⁵, 郭松长^{1 3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海西宁 810001; 4. 青海民族大学化学与
生命科学学院, 青海西宁 810007; 5. 榆林学院生命科学研究中心, 陕西榆林 719000)

摘 要 【目的】探索不同卵巢保存温度对卵母细胞体外成熟的影响以及两种培养方式对牦牛卵母细胞体外成熟的影响。【方法】通过对绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞进行体外成熟培养, 比较两种保存温度对 5 种卵母细胞成熟率的影响, 并以牦牛卵母细胞为研究对象比较两种培养方式对牦牛卵母细胞成熟率的影响。【结果】卵巢保存温度为 20 ~ 25℃ 时, 山羊卵母细胞体外成熟率显著高于卵巢保存温度 26 ~ 30℃ ($P = 0.021$)。蒙古牛卵巢保存于 20 ~ 25℃ 时, 其卵母细胞成熟率极显著高于卵巢保存在 26 ~ 30℃ ($P = 0.001$)。保存温度为 20 ~ 25℃ 时, 绵羊、牦牛和奶牛的卵母细胞体外成熟率都高于卵巢保存温度为 26 ~ 30℃ 时的成熟率。另外, 牦牛卵母细胞在四孔板中成熟培养的成熟率与在 35 mm 培养皿中成熟率并没有显著差异 ($P = 0.65$)。【结论】绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛的卵巢保存于 20 ~ 25℃ 为宜, 该卵巢保存温度可提高卵母细胞体外成熟率。牦牛卵母细胞在四孔板中培养的成熟率高于在 35 mm 培养皿中成熟率。

关键词: 牦牛; 保存温度; 培养方式; 卵母细胞体外成熟; 成熟率

中图分类号: S857.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-4330(2012)06-1158-07

Influence of Different Ovary Storage Temperature on Oocyte in Vitro Maturation and Discovery of Yak Oocyte Maturation Cultivation Methods

PANG Bo^{1 2 3}, ZHAO Xin-quan^{1 3}, GUO Zhi-lin^{1 3 4}, QU Lei⁵, YU Hong-hao⁵, GUO Song-chang^{1 3}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota (AEPB), Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810001, China; 4. College of Chemistry and Life Science, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; 5. Life Science Research Center, Yulin University, Yulin Qinghai 719000, China)

Abstract 【Objective】To explore the influence of different ovary storage temperature on oocyte in vitro maturation and the influence of two cultivation methods on yak oocyte maturation. 【Method】The influence of two different ovary storage temperatures on the maturation rate of five kinds of oocytes was compared by means of in vitro maturation of sheep, goat, yak, Mongolia beef and dairy cow oocytes. Besides, two cultivation methods of yak oocyte were carried out to compare the influence on their maturation rate. 【Result】As ovary storage temperature was at 20 - 25℃, in vitro maturation rate of goat oocyte was significantly higher than that

收稿日期: 2012-01-14

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-Z-0951)

作者简介: 庞礴(1984-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学 (E-mail) pangbo926@sina.com

通讯作者: 郭松长(1976-), 男, 湖南冷水江人, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为动物遗传育种 (E-mail) guo@nwipb.cas.cn

at 26 – 30°C ($P = 0.021$). When ovary was kept at 20°C to 25°C, the Mongolia beef oocyte maturation rate was significantly higher than that at 26 – 30°C ($P = 0.001$). When ovary storage temperature was at 20°C to 25°C, the oocyte in vitro maturation rate of sheep, yak and dairy cow were higher than those at 26°C to 30°C. In addition, the maturation rate of yak oocyte cultivated in four – well plate and 35 mm culture dish showed no significant difference ($P = 0.65$). **【Conclusion】** Sheep, goat, yak, Mongolia beef and dairy cow ovary are advisable to be stored at 20°C to 25°C, which can improve the oocyte in vitro maturation rate. The maturation rate of yak oocyte cultivated in four – well plate is higher than those cultivated in 35 mm culture dish.

Key words: yak; storage temperature; cultivation method; in vitro maturation; oocyte

0 引言

【研究意义】哺乳动物卵巢内含有大量的原始卵泡,其数量因发育阶段不同而异。但是,在一个生殖周期中发生排卵的卵泡只有一个或几个,大部分中途闭锁退化。随着胚胎工程技术的发展和胚胎移植商业化的发展以及哺乳动物体外受精、细胞核移植和外源基因导入等高新技术的研究不断深入,人们对成熟卵母细胞以及动物胚胎的需求量不断增加,体内成熟的卵母细胞数量以及靠超数排卵技术获得卵母细胞的办法已不能满足这类科研和实际生产的需要,因此,建立和完善卵母细胞的体外成熟体系越来越具有十分重要的意义。**【前人研究进展】**通过卵巢卵母细胞体外成熟获取大量的成熟卵母细胞,以及而后利用体外受精技术获得胚胎等已经越来越引起人们的重视并成为一研究热点。目前,通过体外成熟培养获得小鼠^[1]、绵羊^[2]、猴^[3]、人^[4]、猪^[5]、犬^[6]、牛^[7]、马^[8]、大熊猫^[9]及雪貂^[10]等哺乳动物的成熟卵母细胞。牛卵巢卵母细胞体外成熟已有许多研究报道^[11],并通过体外受精提供商业性的胚胎。与牛相比,山羊的体外胚胎相关技术发展较慢。郝志明等^[12]体外培养奶山羊卵巢卵母细胞,获得56.7%的成熟率。刘灵等^[13]选用组织培养液199(Tissue culture medium 199, TCM199)和Ham's F12培养山羊卵巢卵母细胞,体外成熟率为79.4%和76.3%。张勇等^[14]采用TCM199培养基探索了不同浓度的胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)、促卵泡素(Follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体素(Luteinizing hormone, LH)、17 β 雌二醇(Oestradiol_17 β , 17 β _E2)的组合,获得了92.5%的体外成熟率。到目前为止,各实验室所得到的体外培养成熟率差异较大,尚无一致的、保证高成熟率、高受精率的成熟培养体系。**【本研究切入点】**体细胞核移植的发展至今已有10余年研究历程。在此期间,利用体细胞核移植技术克隆了多种动物,但是克隆效率低仍是体细胞核移植研究中无法解决的难题。核移植过程中多种因素影响克隆效率,主要包括供体细胞选择、卵母细胞质量、重构胚的体外培养等,其中卵母细胞成熟质量是影响克隆成功的重要因素之一。因此欲提高核移植效率,提高卵母细胞体外成熟质量是重点考虑的问题。卵母细胞成熟是非常复杂的过程,主要受卵巢周期、激素、生长因子、细胞因子、温度、pH值、季节等因素共同影响。所以,欲获得高质量的体外成熟卵母细胞并非易事。**【拟解决的关键问题】**将绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞进行体外成熟培养,比较两种保存温度范围对5种卵母细胞成熟率的影响。在此基础上,由于目前对牦牛卵母细胞的研究工作尚较少,又根据实验设计重点探索两种不同培养方式对牦牛卵母细胞体外成熟的影响。旨在探索理想的体外成熟培养体系,为获得更多成熟卵母细胞作为细胞核移植的受体或进行体外受精获得原核胚为转基因动物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为自西宁市乐家湾屠宰场采集的绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵巢。采集的卵巢置于含有微量青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中,用保温瓶在3 h内带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 卵巢的采集、运输及卵母细胞的捡取

获取卵母细胞的主要方法有超数排卵和体外卵泡液收集。由于仅靠超数排卵已经不能满足科研和生产对卵母细胞急剧增加的需求,因此,收集哺乳动物卵泡液内卵母细胞进行体外成熟是获得大量廉价卵母细胞的主要途径。实验中所用卵母细胞均通过此方法获取。

绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛、奶牛卵巢采集于青海省西宁市乐家湾屠宰场。采集时,只选择刚刚被屠宰动物的卵巢,将卵巢用灭菌剪刀剪取,放入装有生理盐水的保温瓶中,3 h 内运回实验室。剪除卵巢表面的结缔组织、脂肪和附着的输卵管,用生理盐水清洗 3 次。牦牛、蒙古牛和奶牛的卵巢用 20 mL 的一次性塑料注射器抽取卵巢表面上直径 2~8 mm 的卵泡,抽取的卵泡液用 D-PBS+3% NBS 稀释后,在体式镜下捡取卵泡液中卵丘-卵母细胞复合体。绵羊和山羊的卵巢放在盛有捡卵液的培养皿中,以手术刀将其表面卵泡割破,并轻轻挤压使卵泡液尽可能的全部流在捡卵液中,然后在体式镜下捡取卵泡液中卵丘-卵母细胞复合体。牦牛、蒙古牛和奶牛的捡卵方法称为抽吸法,绵羊和山羊的捡卵方法称为切割法。

1.2.2 卵母细胞的体外成熟培养

选择具有卵丘细胞层的卵母细胞,用预先培养箱内平衡的成熟液洗 2 次,以便去除杂质。然后在 38.5℃ 含 5% CO₂ 的空气,饱和湿度培养箱中成熟培养 24 h。根据第一极体的有无判断卵母细胞是否成熟。

1.2.3 保存温度对 5 种卵母细胞体外成熟率的影响

卵巢自屠宰场采集后用装有生理盐水的保温瓶于 3 h 内带回实验室。运输过程中卵巢的保存温度对卵母细胞体外成熟具有重要的影响。根据已有的研究报道综合分析,实验比较了两种保存温度范围 20~25、26~30℃ 对 5 种卵母细胞体外成熟率的影响。采用独立样本 *t* 检验分析两种保存温度之间是否存在显著性差异。

1.2.4 两种培养方式对牦牛卵母细胞体外成熟率的影响

将 20~25℃ 保存的卵巢运至实验室按照 1.2.1 所述方法进行捡卵,然后用两种不同培养方式进行培养,探讨其对牦牛卵母细胞体外成熟是否具有影响。

培养方式 1: 将 120 个牦牛卵母细胞与卵丘颗粒细胞复合体平均分配于 4 孔板的 4 个孔中,然后每个孔加入 0.5 mL 的牛卵母细胞成熟培养液成熟培养;

培养方式 2: 将 120 个牦牛卵母细胞与卵丘颗粒细胞复合体置于盛有 2 mL 牛卵母细胞成熟液的 35 mm 培养皿内成熟培养。根据体外成熟卵母细胞第一极体的有无判断卵母细胞是否成熟。采用独立样本 *t* 检验分析两种培养方式是否对牦牛卵母细胞体外成熟造成显著性差异。

2 结果与分析

2.1 保存温度对卵母细胞成熟的影响

由于屠宰场屠宰动物的季节性变化,因此采集动物的卵巢数有所不同。列出实验中所采集绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵巢数、卵子数、平均得卵数。保存温度为 20~25、26~30℃ 时,绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞成熟率分别为 55.71% ± 2.5% VS 43.27% ± 6%, 66.61% ± 1.2% VS 62.35% ± 0.7%, 67.94% ± 4.1% VS 60.51% ± 11.8%, 85.07% ± 2.2% VS 68.04% ± 2.3%, 69.43% ± 1.8% VS 63.8% ± 3.4%。统计分析表明卵巢保存温度为 20~25℃ 时,山羊卵母细胞体外成熟率显著高于卵巢保存温度 26~30℃ ($P=0.021$)。此外,当蒙古牛卵巢保存于 20~25℃ 温度时,其卵母细胞成熟率极显著高于卵巢保存在 26~30℃ ($P=0.001$)。虽然绵羊、牦牛和奶牛卵母细胞体外成熟率在两种卵巢保存温度下没有统计学差异,但是保存温度为 20~25℃ 时,这三种动物的卵母细胞体外成熟率都较高于卵巢保存温度为 26~30℃ 时的成熟率。实验结果表明,绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛的卵巢保存于 20~25℃ 时为宜,该卵巢保存温度可提高卵母细胞体外成熟率。表 1 2,图 1 2

表 1 绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞得卵数

Table 1 Oocyte number per ovary of sheep , goat , yak , Mongolia beef and dairy cow

	卵巢数量 Ovary number	卵子数 Oocyte number	得卵数 Oocyte number per ovary
绵羊 Sheep	1 127	3 443	3.05
山羊 Goat	536	1 646	3.07
牦牛 Yak	257	1 177	4.58
蒙古牛 Mongolia beef	808	3 066	3.79
奶牛 Dairy cow	722	3 694	5.11

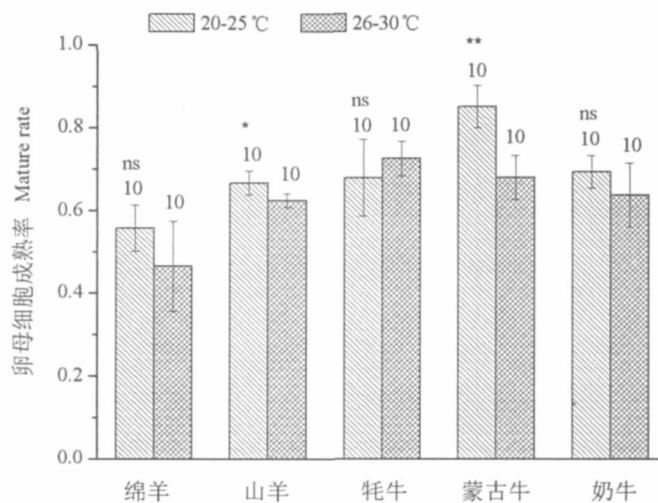
表 2 卵巢保存温度对卵母细胞体外成熟率的影响

Table 2 Influence of ovary preserved temperature to in vitro mature rate of oocytes

	绵羊 Sheep	山羊 Goat	牦牛 Yak	蒙古牛 Mongolia beef	奶牛 Dairy cow
20~25℃	0.557 ± 0.055 8 ^{ns}	0.666 ± 0.028 8 [*]	0.679 ± 0.092 5 ^{ns}	0.851 ± 0.051 2 ^{**}	0.694 ± 0.039 4 ^{ns}
26~30℃	0.465 ± 0.109	0.624 ± 0.016 6	0.725 ± 0.041 2	0.680 ± 0.053 5	0.638 ± 0.077 3

注: ^{ns}表示无显著差异; ^{*}表示 $P < 0.05$; ^{**}表示 $P < 0.01$

Note: ^{ns} indicates no significance; ^{*} indicates $P < 0.05$; ^{**} indicates $P < 0.01$



注: ^{ns}表示无显著差异, ^{*}表示 $P < 0.05$, ^{**}表示 $P < 0.01$ 图中标注数字表示样本数

Note: ^{ns} indicates no significance, ^{*} indicates $P < 0.05$, ^{**} indicates $P < 0.01$ numbers above the bars show the number of samples.

图 1 卵巢保存温度对卵母细胞成熟率的影响

Fig. 1 Influence of ovary preserved temperature to in vitro mature rate of oocytes

2.2 两种培养方式对牦牛卵母细胞体外成熟的影响

牦牛卵母细胞在四孔板中成熟培养的成熟率为 $64.01\% \pm 10.18\%$, 在 35 mm 培养皿中成熟率为 $58.04\% \pm 7.68\%$ 。虽然统计学分析表明两者并没有显著差异 ($P = 0.65$), 但是牦牛卵母细胞在四孔板中成熟率高于在 35 mm 培养皿中成熟率。因此为得到较多可用于核移植实验的牦牛体外成熟卵母细胞 将卵母细胞散开培养是可取途径之一。表 3

3 讨论

供体细胞核具有全能性是核移植的前提, 但是已经高度分化的供体细胞核只有在重编程因子的作用下才能去程序化, 被重编程为与受精卵相似的发育状态。研究表明卵母细胞质是供体细胞核重编程

的最好微环境。这些重编程因子是母型信息物质,随着卵母细胞的成熟而在胞质中不断积累。如果卵母细胞成熟不好,母型信息不完善则导致供体细胞核去程序化不完全,无法启动克隆胚的发育。因此,受体卵母细胞体外成熟是核移植实验的关键程序。

表 3 两种培养方式对牦牛卵母细胞体外成熟率的影响

Table 3 Maturation rate of yak oocyte with two cultivation methods

	牦牛 Yak
四孔板 4-well plate	0.640 ± 0.249 ^{ns}
35mm 培养皿 35mm culture dish	0.580 ± 0.188

注: ns 表示无显著差异

Note: ns indicates no significance

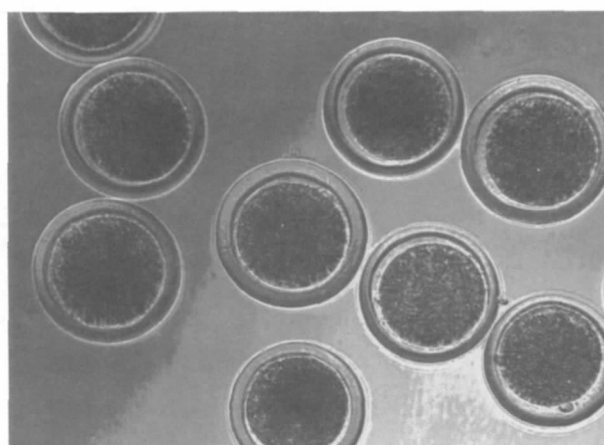


图 2 成熟培养后牦牛卵母细胞

Fig. 2 Oocytes of yak after in vitro mature culture

卵母细胞的成熟包括核成熟以及胞质成熟两个方面。核成熟表现在生发泡的破裂及第一极体排除等方面。胞质成熟包括一些调节早期胚胎发育的 mRNA、蛋白质合成、细胞器、细胞骨架、质膜及透明带的变化。不同学者在核移植研究中所采用的判断卵母细胞成熟的方法不同,可分为两种方法,包括孤雌激活卵裂法^[15]和第一极体判断法^[16]。由于第一极体判断法较孤雌激活卵裂法操作简单快捷,因此实验根据第一极体有无判断卵母细胞是否成熟。

卵母细胞的来源虽然可以通过超数排卵、活体采卵等方式获得,但目前主要还是从屠宰场收集屠宰动物的卵巢来获得大量价廉的卵母细胞,因此其运输时间和温度都很重要。通常,从屠宰场获得废弃的卵巢,在一定温度下保存一定时间运至实验室,从中抽取卵母细胞进行体外培养,这种做法目前也已为大多数研究者所接受。为了找出经长途运输保存卵巢的适宜温度,拓展卵巢资源的利用,有些研究报道长时间运输应将卵巢置于 30℃ 下保存。另有研究结果表明,牛卵巢在 37 ~ 39℃ 保存 8 h,卵母细胞的成熟率和受精后的发育潜力均有所下降,25℃ 保存 8 h,成熟率和受精后的发育潜力没有明显变化^[17]。Moodie 等的研究结果认为,绵羊卵巢贮存在 22℃ 数小时,对其卵母细胞的体外成熟无明显影响,但若贮存在体温条件下,则会使卵母细胞的质量下降。也有研究结果表明,运输温度在 28 ~ 32℃ 的成熟率高于 22 ~ 24 和 35 ~ 37℃,且差异显著。这可能因从屠宰场收集的卵巢卵母细胞大多数未成熟,且处于 M I 阶段,从 M I 阶段到 M II 阶段的转化需蛋白合成,22 ~ 24℃ 保存 4 ~ 5 h 对蛋白合成具有阻滞作用;35 ~ 37℃ 接近绵羊体温,卵巢生理活动旺盛,卵巢在离体环境中得不到充足的营养物质,使卵母细胞中部分物质发生降解。因此,实验比较了两个保存温度范围 20 ~ 25、26 ~ 30℃ 对卵母细胞体外成熟率的影响。实验结果表明,绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛五种动物的卵巢保存于 20 ~ 25℃ 要好于 26 ~ 30℃

的卵巢保存温度。适宜的保存温度是由供体动物的生理状态、营养情况、运输时间、实验室条件等因素共同决定,因此推测同一物种的卵巢适宜保存温度可能不是定值,研究者可根据具体实际情况探寻最优的卵巢保存温度。

卵母细胞成熟是一个复杂的过程,体外成熟时主要的影响因素包括培养温度^[18]、颗粒细胞^[19,20]、卵泡大小^[21,22]、生长因子^[23]等。卵母细胞体外成熟培养方式主要包括培养皿培养法、微滴培养法、4孔板培养法。由于目前对牦牛卵母细胞的研究工作尚且较少,所以在验证了不同卵巢保存温度范围对卵母细胞体外成熟的影响之后,研究又根据实验设计重点探索了两种培养方式—培养皿培养法和4孔板培养法对牦牛卵母细胞体外成熟的影响,结果表明4孔板培养法培养的牦牛卵母细胞成熟率与培养皿培养法的牦牛卵母细胞成熟率没有统计学差异。欲获得更高的牦牛卵母细胞体外成熟率可着重考虑生长因子、激素水平、血清浓度等因素。

牛在畜牧业中占有重要的地位,因此关于牛卵母细胞体外成熟的相关研究较多。目前牛卵母细胞体外成熟率可达90%以上,最高可达95%。但是研究中发现牛卵母细胞体外成熟受外界因素影响较大,因此成熟还不稳定,最低只有30%,可见波动很大。实验中牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞的体外成熟率分别为67.94%、85.07%和69.43%,虽然牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞体外成熟率没有达到90%以上,但是均超过60%,结果较为满意。根据宋继梅^[15]对牛卵母细胞体外成熟的研究,欲提高牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞体外成熟率,可在现有成熟培养液中加入适当的生长因子和胰岛素进而改善成熟培养系统。绵羊和山羊卵母细胞的体外成熟率分别为55.71%、66.61%。山羊卵母细胞体外成熟率与施巧婷^[16]和武浩等^[24]的研究结果较为接近,结果满意。绵羊卵母细胞体外成熟率较低,但可增加绵羊卵巢采集数量解决核移植实验所需的绵羊卵母细胞的数量问题。

4 结论

保存温度为20~25、26~30℃时,绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛卵母细胞成熟率分别为55.71% ± 2.5% VS 43.27% ± 6%,66.61% ± 1.2% VS 62.35% ± 0.7%,67.94% ± 4.1% VS 60.51% ± 11.8%,85.07% ± 2.2% VS 68.04% ± 2.3%,69.43% ± 1.8% VS 63.8% ± 3.4%。统计分析表明卵巢保存温度为20~25℃时,山羊卵母细胞体外成熟率显著高于卵巢保存温度26~30℃($P = 0.021$)。此外,当蒙古牛卵巢保存于20~25℃温度时,其卵母细胞成熟率极显著高于卵巢保存在26~30℃($P = 0.001$)。保存温度为20~25℃时,绵羊、牦牛和奶牛的卵母细胞体外成熟率都较高于卵巢保存温度为26~30℃时的成熟率。实验结果表明,绵羊、山羊、牦牛、蒙古牛和奶牛的卵巢保存于20~25℃时为宜,该卵巢保存温度可提高卵母细胞体外成熟率。另外,牦牛卵母细胞在四孔板中成熟培养的成熟率为64.01% ± 10.18%,在35 mm培养皿中成熟率为58.04% ± 7.68%。虽然统计学分析表明两者并没有显著差异($P = 0.65$),但是牦牛卵母细胞在四孔板中成熟率高于在35 mm培养皿中成熟率。

参考文献:

- [1] Cho W, Stern S, Biggers J. Inhibitory effect of dibutyryl CAMP on mouse oocyte maturation in vitro [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2005, 187: 383 - 386.
- [2] Wilmut I, Paterson L. Somatic cell nuclear transfer [J]. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2003, 136: 303 - 307.
- [3] Morgan P, Warikoo P, Bavister B. In vitro maturation of ovary oocytes from unstimulated rhesus monkeys: assessment of cytoplasmic maturity by embryonic development after in vitro fertilization [J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 45: 89 - 93.
- [4] Zhang J, Wang C, Krey L, et al. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer I [J]. *Fertility and sterility*, 1999, 71: 726 - 731.
- [5] Meinecke B, Meinecke - Tillmann S. Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured in vitro [J]. *Theriogenology*, 1979, 11: 351 - 365.
- [6] Hewitt D, England G. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro [J]. *Animal reproduction science*, 1999, 55: 63 - 75.

- [7] Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y, et al. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro [J]. *Theriogenology*, 1982, 18: 161 – 175.
- [8] Fulka Jr J, Okolski A. Culture of horse oocytes in vitro [J]. *Reproduction*, 1981, 61: 213 – 215.
- [9] Zhang M, Hou R, Zhang A, et al. In vitro maturation of follicular oocytes of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): A case report [J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 1 251 – 1 255.
- [10] Li Z, Sun X, Chen J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer [J]. *Developmental biology*, 2006, 293: 439 – 448.
- [11] 李晟阳, 罗克彬, 张晓华, 等. 促卵泡素与促黄体素对猪卵母细胞体外成熟的影响 [J]. *华北农学报*, 2006, 21(1): 63 – 67.
- [12] Hao ZM, Qian JF, Wang JC. In vitro maturation of follicular oocytes from the mouse and dairy goat [J]. *Theriogenology*, 1990, (1): 364 – 367.
- [13] 刘灵, 张涌, 钱菊汾. 山羊卵巢卵母细胞的体外成熟 [J]. *西北农业大学学报*, 1992, 20(1): 107 – 110.
- [14] 张勇, 刘泽隆, 李裕强. 山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究 [J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(1): 14 – 18.
- [15] 宋继梅. 东北虎体细胞异种核移植 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士论文, 2007.
- [16] 施巧婷. 北山羊体细胞异种克隆技术的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学博士论文, 2004.
- [17] Yang NS, Lu KH, Gordon I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries [J]. *Theriogenology*, 1990, 33: 352.
- [18] Shi D, Avery B, Greve T. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 667 – 674.
- [19] Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 1 451 – 1 463.
- [20] Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1991, 36: 973 – 986.
- [21] Ocana – Quero J, Pinedo – Merlin M, Moreno – Millan M. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro [J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 667 – 672.
- [22] Varisanga M, Sumantri C, Murakami M, et al. Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF – produced bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 1 015 – 1 023.
- [23] Park K, Iga K, Niwa K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically – defined medium [J]. *Theriogenology*, 1997, 48: 1 127 – 1 135.
- [24] 武浩. 小鼠 – 山羊交互异种核移植研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士论文, 2004.