

(19)



(12)



(10)

(43)

(21) 202511095219.9

(22) 2025.08.06

(71) 西北农林科技大学
712100 陕西省咸阳市杨凌示范区邠
城路3号

(72) 王勇胜 宋雪潇 余庆鹏 魏耀昶
李赫强 王峥 张小雨 黄聪

(74) 陕西禾硕知识产权代理事务
所(普通合伙) 61339
田亚红

(51) Int.Cl.

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/075 (2010.01)

A01K 67/02 (2006.01)

A01K 67/027 (2024.01)

1

13

2

(54)

一种提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并
降低流产率的方法

(57)

本发明公开了提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法,包括以下步骤:将X性控精子和经成熟的卵母细胞培养后作为供体的卵母细胞采用显微注射方式制成ICSI卵,将ICSI卵在卵母细胞成熟培养液(OM)中孵育3-5h后转移至ETH激活4-6min以促进ICSI卵正常受精,然后进行胚胎培养,从而获得性控胚胎;所述ETH是指含有6-8%乙醇的卵母细胞成熟培养液。本发明的方法产生的ICSI胚胎正常受精率显著提高,并且在移植后的检查中,早期流产率显著降低。

1. 提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法,包括以下步骤:

将X性控精子和经成熟的卵母细胞培养后作为供体的卵母细胞采用显微注射方式制成胞质内单精子注射卵,将ICSI卵在卵母细胞成熟培养液(OM)中孵育3-5h后转移至ETH激活4-6min以促进ICSI卵正常受精,然后进行胚胎培养,从而获得性控胚胎;所述ETH是指含有6-8v/v%乙醇的卵母细胞成熟培养液。

2. 根据权利要求1所述的方法,所述激活具体包括以下步骤:其中各激活处理及培养均在38.4~38.6℃、饱和湿度及4.85%~5.15%CO₂条件下进行。

3. 根据权利要求1所述的方法,卵母细胞成熟培养液以无Hepes的M199为基础培养液,并另外添加8-12%(v/v)胎牛血清、0.08-0.12%(v/v) ITS-G、0.07-0.08IU/mL HMG、0.8-1.2μg/mL 17β-雌二醇、8-12ng/mL EGF及8-12ng/mLbFGF。

4. 根据权利要求1所述的方法,所述ICSI卵母细胞的孵育具体包括以下步骤:将通过ICSI注入有性控精子的供体卵母细胞转移至卵母细胞成熟培养液(OM)中孵育3.5~4.5h;其中孵育在38.4~38.6℃、饱和湿度及4.85%~5.15%CO₂条件下进行。

5. 根据权利要求1所述的方法,所述激活处理时间5min。

6. 根据权利要求1-5任意一项所述的方法,所述激活处理不包括其它激活处理。

7. 根据权利要求1所述的方法,所述胚胎培养的条件包括:用胚胎培养液并在38.4~38.6℃、4.85%~5.15%CO₂及6.9%~7.0%O₂条件下培养6~7d。

8. 一种家畜繁殖方法,包括以下步骤:

利用上述权利要求1-7所述的方法得到性控胚胎,将所述性控胚胎移植入受体家畜中,之后检查并判断受体家畜受孕及早期流产情况。

一种提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法

技术领域

[0001] 本发明属于家畜繁育技术领域,具体涉及一种提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法。

背景技术

[0002] 奶牛ICSI技术在激活环节面临严峻挑战。研究证实,单一激活剂难以充分激活ICSI卵母细胞,而多种激活剂的联合使用虽能提升活化效率,却会引发原核形成异常,进而影响正常受精效率及胚胎发育质量,导致囊胚率、移植后妊娠率降低。如何突破这些技术瓶颈,成为提升奶牛ICSI技术应用效果的关键。

[0003] 文献Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection:Efficiency and in vitro developmental competence中利用分选后的x性控精液进行ICSI(无Piezo),ICSI后的激活方式为2mM ION激活5min和5mM 6D孵育4h,激活后得到的性控胚胎原核形成率为54%,卵裂率为79.1%,囊胚率24.7%,证明了性别分类的牛精子可以通过ICSI技术成功地产生预定性别的牛胚胎。此外,精子性别分类的ICSI预选雌性胚胎的发育能力远高于精子性别分类的IVF胚胎。但未将产生的胚胎进行移植。本专利旨在探索不依赖Piezo、高正常受精率、高移植效率的最优ICSI激活方案。

[0004] 中国专利申请CN118995579A中利用Brackett and Oliphant(BO)上浮法进行冻存性控精子的处理,并将上浮精子经离心后用体外受精液(IVF)稀释;将处理好的性控精子注射到活体采卵(OPU)供体卵母细胞中,先用5nM离子霉素激活处理2次,再用2nM6-DMAP激活处理1次,然后进行胚胎培养。发明使ICSI卵经激活后所产生胚胎的囊胚率明显提高,可以用于稳定生产高质量奶牛OPU性控胚胎。

[0005] 胞浆内单精子注射作为显微操作仪的精准受精技术,通过机械注射方式将单个精子直接注入卵母细胞胞质。在奶牛育种领域,该技术成为不依赖配子质量从而改良品种、培育优质奶牛的关键手段,当前在Piezo-ICSI操作下奶牛胚胎发育至囊胚阶段的成功率可达30%左右,有效提升了优质种源的生产效率。但当减少Piezo设备依赖以控制成本时,卵母细胞显微注射损伤率从8%上升至12%,囊胚率也会相应降低,进一步加剧了激活后胚胎发育的复杂性。如何在维持低成本操作优势的同时,构建高效稳定的激活体系,成为突破ICSI技术应用的核心挑战。因此,开发提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法具有重要意义。

发明内容

[0006] 基于上述原因,本发明提出提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法。具体而言,为了实现本发明的目的,本发明拟采用如下的技术方案:

[0007] 本发明一方面涉及提升奶牛体外ICSI胚胎正常受精率并降低流产率的方法,包括以下步骤:

[0008] 将X性控精子和经成熟的卵母细胞培养后作为供体的卵母细胞采用显微注射方式制成胞质内单精子注射(ICSI)卵,将ICSI卵在卵母细胞成熟培养液(OM)中孵育3-5h后转移至ETH激活4-6min以促进ICSI卵正常受精,然后进行胚胎培养,从而获得性控胚胎;所述ETH是指含有6-8v/v%乙醇的卵母细胞成熟培养液。

[0009] 优选的,所述激活具体包括以下步骤:其中各激活处理及培养均在38.4~38.6℃、饱和湿度及4.85%~5.15%CO₂条件下进行。

[0010] 优选的,卵母细胞成熟培养液以无Hepes的M199为基础培养液,并另外添加8-12%(v/v)胎牛血清、0.08-0.12%(v/v)胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂(ITS-G)、0.07-0.08IU/mL人促性腺激素(HMG)、0.8-1.2μg/mL 17β-雌二醇、8-12ng/mL表皮生长因子(EGF)及8-12ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。

[0011] 优选的,所述激活具体包括以下步骤:所述ICSI卵母细胞转移至成熟培养液(OM)中孵育3.5~4.5h,再转移至含用7%乙醇的OM中激活处理4~6min,然后用SOF清洗干净;其中各激活处理及培养均在38.4~38.6℃、饱和湿度及4.85%~5.15%CO₂条件下进行。

[0012] 优选的,所述ICSI卵母细胞的孵育具体包括以下步骤:将通过ICSI注入有性控精子的供体卵母细胞转移至卵母细胞成熟培养液(OM)中孵育3.5~4.5h;其中孵育在38.4~38.6℃、饱和湿度及4.85%~5.15%CO₂条件下进行。

[0013] 优选的,所述激活处理时间5min。

[0014] 优选的,所述激活处理不包括其它激活处理。

[0015] 优选的,所述胚胎培养的条件包括:用胚胎培养液(例如IVC)并在38.4~38.6℃、4.85%~5.15%CO₂及6.9%~7.0%O₂条件下培养6~7d。

[0016] 本发明另一方面还涉及一种家畜繁殖方法,包括以下步骤:

[0017] 利用上述用于生产性控胚胎的方法获得供体家畜(例如奶牛)的性控胚胎,将所述性控胚胎移植入受体家畜(例如奶牛)中,之后检查并判断受体家畜受孕(例如妊娠)及早期流产情况。

[0018] 本发明的有益效果是:本发明优化了一种激活方案,将处理好的性控精子注射到卵母细胞中后,在OM中孵育,ETH激活一次,激活时间为5min,此激活方案产生的ICSI胚胎正常受精率显著提高,并且在移植后的检查中,早期流产率显著降低。。

附图说明

[0019] 图1为构建ICSI卵的操作过程示意图;其中:A为注射针将精子机械断尾后,单个精子从尾端被吸入注射针内,并保持注射针前端;B为注射前固定针固定供体卵母细胞,并使第一极体位于“6点钟”位置;C为注射针回吸胞质;D为单个精子和被吸出胞质被注入供体卵母细胞中后注射针抽出;1-第一极体,2-精子。

[0020] 图2为ICSI卵用方案OM+ETH(5min)激活后48h的卵裂图。

[0021] 图3为ICSI卵用方案OM+ETH(5min)激活后168h的囊胚图。

[0022] 图4为用方案OM+ETH(5min)激活,自精子注射入供体卵母细胞中后18h的原核形成情况(为正常受精,1FPN+1MPN;图中虚线为大致的卵母细胞边界)。

具体实施方式

[0023] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0024] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0025] 实施例1:

[0026] (一)材料、试剂的来源与准备

[0027] 1.1材料

[0028] (1) 卵母细胞于2024年9月至2025年5月采集自宁夏回族自治区吴忠市屠宰场卵巢。

[0029] (2) X性控冻精于2022年11月购自美国。

[0030] (3) 上述卵母细胞和X性控冻精均来自于荷斯坦奶牛。

[0031] 1.2试剂

[0032] (1) BJ-40细玻管购自北京正天易科贸有限责任公司,硼硅酸盐玻璃购自Sutter Instrument公司(货号:B100-75-15);

[0033] (2) 受精培养液IVF、胚胎培养液IVC、胚胎移植液TRANSFER购自“IVF BIOSCIENCE”,配子缓冲液购自COOK MEDICAL(货号:K-SIGB-20),精子制动剂PVP购自Vitrolife;

[0034] (3) 6-DMAP(6-二甲基氨基嘌呤)购自SIGMA(货号:D2629-250MG),离子霉素(Ionomycin)购自SIGMA(货号:10634-1MG),无水乙醇(ETH)购自Sangon Biotech(货号:A500737-0500);

[0035] (4) 胎牛血清(FBS)为Gibco公司产品,必需氨基酸为Thermo Fisher公司产品(货号:1831512),非必需氨基酸为Thermo Fisher公司产品(货号:1958909),胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂ITS-G为Thermo Fisher公司产品(货号:1865342);

[0036] (5) 固定液购自Beyotime(货号:P0098-500mL);

[0037] (6) 其他未标明的均为SIGMA公司产品;

[0038] (7) 卵母细胞成熟培养液OM(自配):以无Hepes的M199为基础培养液,并另外添加10% (v/v) 胎牛血清、1% (v/v) ITS-G、0.075IU/mL HMG、1 μ g/mL 17 β -雌二醇、10ng/mL EGF及10ng/mLbFGF;

[0039] (8) HEPEs洗液(自配):133.38mg NaCl、4.78mg KCl、3.36mg NaH₂PO₄·H₂O、283.2 μ L乳酸钠(液体试剂)、2.3426mL 25.1mg/mL CaCl₂·2H₂O、2.04mL 10mg/mL MgCl₂·6H₂O、47.68mg Hepes、60.00mg BSA、2mL Na-py储存液(丙酮酸钠储存液,2.2mg/mL)及150 μ L庆大霉素储存液(10mg/mL),去离子水定容到200mL;

[0040] (9) 上浮液B0(自配):以SOF溶液作为基础培养液,并另外添加48mg/mL无脂肪酸牛血清白蛋白、0.1942mg/mL咖啡因及0.05mg/mL肝素钠;

[0041] (10) SOF(即上述SOF溶液,自配):26.168mg CaCl₂·2H₂O、9.999mg C₆H₅Na₃O₇·2H₂O、2.923mg谷氨酰胺、37.218mg MgSO₄·7H₂O、49.904mg肌醇、53.378mg KCl、16.195mg

KH_2PO_4 、4.402mg 丙酮酸钠、200.025mg NaHCO_3 、629.399mg NaCl 及0.0757mg 乳酸钠(固体试剂),去离子水定容到100mL;

[0042] (11)ETH(自配):7%无水乙醇+卵母细胞成熟培养液0M;

[0043] (12)PBS-PVA(自配):1.6012g NaCl 、0.0402g KCl 、0.284g Na_2HPO_4 、0.0544g KH_2PO_4 及5.00mg PVA,去离子水定容到200mL。

[0044] (二)建立一套稳定生产高质量奶牛性控胚胎的技术

[0045] 2.1卵母细胞的收集

[0046] 将屠宰场收集的卵巢恒温运输至实验室,剪去卵巢周围多余的结缔组织,使用75%酒精清洗卵巢,再用生理盐水反复冲洗,使用注射器将卵泡液抽出,将卵丘卵母细胞复合体(COCs)在体式显微镜下从卵泡液中用手持捡卵针检出。

[0047] 2.2卵母细胞成熟培养

[0048] 将检出的COCs用HEPEs洗液反复清洗至COCs周围无杂质和颗粒细胞,清洗干净后转移至0M中润洗1次,将卵母细胞已死亡(胞质松散、过成熟)的COCs去除后全部移入0M中,在38.5℃、饱和湿度的5% CO_2 培养箱中进行成熟培养。

[0049] 2.3用于生产奶牛性控胚胎的ICSI激活方法

[0050] S1奶牛卵母细胞及精子的处理

[0051] 供体卵母细胞的准备:成熟培养22h后,将培养的COCs用0.5%的透明质酸酶反复吹打,使卵丘细胞脱落,得到裸露的卵母细胞(经透明质酸酶处理后未去掉透明带),转移至0M中,并置于38.5℃、饱和湿度的5% CO_2 培养箱中恢复30min,随后准备进行单精子注射。

[0052] 通过B0上浮法处理X性控精子:准备4mL B0和2mL HEPEs洗液并在培养箱中平衡1h以上;将X性控冻精于38℃水浴锅复苏解冻后,将适量所得X性控精液转移至含有4mL B0的离心管底部,将离心管斜放45°,并置于38.5℃、饱和湿度的5% CO_2 培养箱中进行精子上浮,待精子上浮30min后,吸取上清离心10min(室温、离心转速为500×g);离心后去上清,将精子沉淀转移至1mLHEPEs洗液中吹打混匀并离心清洗2次,每次离心时间为5min(室温、离心转速为300×g)。

[0053] S2精子的稀释

[0054] 经在HEPEs洗液中离心后去上清,留少量液体将沉淀混悬,得精子混悬液;用微量移液枪吸取10μL精子混悬液到60μL IVF中进行稀释,随后可用于单精子注射。

[0055] S3胞浆内单精子注射

[0056] 进行奶牛性控精子注射前,首先在35mm塑料平皿上制备操作滴(采用配子缓冲液)、精子滴(采用PVP)等微滴并盖油;将固定针装配在左侧的显微操作臂上,注射针装配在右侧的显微操作臂上,其中固定针内径在20μm之内、外径在150~200μm之间,注射针直径在7~9μm之间,固定针由BJ-40细玻管制备,注射针由硼硅酸盐玻璃制备,装配完成后调整角度和距离至显微镜视野中心可见固定针与注射针;

[0057] 将准备的供体卵母细胞由0M转移至操作滴中,同时添加少量稀释后的精子至精子滴中,将注射针转移至精子滴中润洗1min,润洗完成后选择一个头尾完整无畸形且无杂质黏附的精子,使用注射针对精子尾部进行机械断尾,确保断尾完成后,从尾部末端将断尾后的精子2吸入注射针中,并将断尾后的精子2保持在注射针的前端;将断尾后的精子2随注射针转移至操作滴中,调整固定针,将一枚供体卵母细胞吸附固定住,通过注射针上下前后转

动该卵母细胞,使第一极体1处于“6点钟”方向(如图1A所示);随后将注射针调整至该卵母细胞同一水平面上,在该卵母细胞的“3点钟”方向进针,将注射针刺进该卵母细胞内2/3处,使注射针缓慢匀速回吸胞质(如图1B所示);待观察到注射针中的胞质回吸速度突然加快,立即停止回吸胞质的操作,并将注射针中的胞质和断尾后的精子2匀速注入该卵母细胞内,经观察确认完成注入后,将注射针从该卵母细胞中抽出(如图1C所示);按以上操作完成其他供体卵母细胞的奶牛性控精子单精子注射(通常50个卵母细胞控制在1h内)。

[0058] S4激活

[0059] 将完成奶牛性控精子注射后所得ICSI卵转移至OM中,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中孵育4h;7%ETH中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0060] S5胚胎培养

[0061] 激活完成后用SOF润洗干净并去除未存活的ICSI卵,之后转移至IVC中,并置于38.5℃、5%CO₂、7%O₂的三气培养箱中进行培养,培养1~2d后发生卵裂(如图2所示),6~7d形成囊胚(如图3所示)。

[0062] 2.4奶牛性控胚胎的检测(卵裂率、囊胚率)及胚胎移植后奶牛繁殖性能的检测(妊娠率、早期流产率)

[0063] 受精率(二极体率) = 在激活后产生二极体的卵数/存活卵数 × 100%

[0064] 卵裂率 = 卵裂数/存活卵数 × 100%

[0065] 囊胚率 = 囊胚数/存活卵数 × 100%

[0066] 胚胎移植及妊娠检查:挑选培养至7d所形成的囊胚放入TRANSFER中,装入细管,放入无菌离心管中,最后放入38.5℃恒温运输箱带到牛场;受体母牛施行1至2尾椎间隙硬膜外麻醉,清洗消毒外阴部;将含有囊胚的细管装入移植枪,再套上移植硬外套,最后套上无菌隔离外套,保持移植枪的前端无菌;将囊胚移植到受体母牛有黄体侧子宫角内,做好受体母牛移植记录;在胚胎移植后的14d内,对受体母牛的受孕是以返情作为初步判断依据,14d后返情并观察有明显阴道出血现象的认为已经流产,最终妊娠、流产的确定是以35d、70d、150d时的B超检查作为判断依据,做好怀孕母牛记录;根据记录即可计算妊娠率和早期流产率。

[0067] 妊娠率 = 怀孕数/移植数 × 100%

[0068] 早期流产率 = 早期流产数/怀孕数 × 100%

[0069] 另外,通过原核检测以及计算正常受精率、精子解聚率等指标,考察了激活等操作对ICSI卵的影响。

[0070] “1MPN+1FPN”率 = 卵中仅有“1MPN+1FPN”的卵数/存活卵数 × 100%

[0071] “1PN+PDSH”率 = 卵中仅有“1PN+PDSH”的卵数/存活卵数 × 100%

[0072] “1PN+CSH”率 = 卵中仅有“1PN+CSH”的卵数/存活卵数 × 100%

[0073] “1PN”率 = 卵中仅有“1PN”的卵数/存活卵数 × 100%

[0074] “3PN”率 = 卵中仅有“3PN”的卵数/存活卵数 × 100%

[0075] “2PN+CSH”率 = 卵中仅有“2PN+CSH”的卵数/存活卵数 × 100%

[0076] 凝缩核率 = 具有卵母细胞凝素核的卵数/存活卵数 × 100%

[0077] 正常受精率(原核率) = “1MPN+1FPN”/总卵数 × 100%

[0078] 精子解聚率 = (“1MPN+1FPN”+“1PN+PDSH”+“3PN”)/总卵数 $\times$ 100%

[0079] 未激活率 = 凝缩核/总卵数 $\times$ 100%

[0080] 孤雌激活率 = “2PN+CSH”/总卵数 $\times$ 100%

[0081] 原核检测:单精子注射后16h用0.2%链蛋白酶(购自SIGMA)消化透明带,用固定液固定4h后再用PBS-PVA将固定液清洗干净,用10 μ g/mL的Hochest33342进行荧光避光染色,10min后用PBS-PVA将染料清洗干净,在荧光显微镜下观察原核形成情况。以1雄原核和1雌原核(1MPN+1FPN)并且无凝集的精子头为正常受精标准(如图4所示)。

[0082] 通过2024年间对共计727个奶牛卵母细胞进行单精子注射、激活、胚胎培养及胚胎移植,得到以下结果:激活后原核率为60.71%,卵裂率为55.65%囊胚率为11.14%;共移植了8枚使用该激活方法产生的囊胚,怀孕4头牛,流产0头牛,妊娠率为50.00%,流产率为0.00%。这些结果证明,以上用于生产奶牛性控胚胎的ICSI操作方法是可行的,并且可以实现高妊娠率、低流产率。

[0083] (三)不同激活方案对ICSI胚胎发育的影响

[0084] 3.1不同激活方案对比试验(对比例1)

[0085] 卵母细胞的收集:将屠宰场收集的卵巢恒温运输至实验室,剪去卵巢周围多余的结缔组织,使用75%酒精清洗卵巢,再用生理盐水反复冲洗,使用注射器将卵泡液抽出,用捡卵针将卵丘卵母细胞复合体(COCs)在体式显微镜下从卵泡液中检出。

[0086] 卵母细胞成熟培养:将检出的COCs用HEPEs洗液反复清洗至COCs周围无杂质和颗粒细胞,清洗干净后转移至OM中润洗1次,将卵母细胞已死亡(胞质松散、过成熟)的COCs去除后全部移入OM中,在38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行成熟培养。

[0087] 供体卵母细胞的准备:成熟培养22h后,将培养的COCs用0.5%的透明质酸酶反复吹打,使卵丘细胞脱落,得到裸露的卵母细胞,转移至OM中,并置于38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中恢复30min,随后准备进行单精子注射。

[0088] 性控精子的处理:通过BO上浮法处理X性控精子,准备4mL B0和2mL HEPEs洗液并在培养箱中平衡1h以上;将X性控冻精于38 $^{\circ}$ C水浴锅复苏解冻后,将适量所得X性控精液转移至含有4mL B0的离心管底部,将离心管斜放45 $^{\circ}$,并置于38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行精子上浮,待精子上浮30min后,吸取上清离心10min(室温、离心转速为500 $\times$ g);离心后去上清,将精子沉淀转移至1mLHEPEs洗液中吹打混匀并离心清洗2次,每次离心时间为5min(室温、离心转速为300 $\times$ g)。

[0089] 精子的稀释:经在HEPEs洗液中离心后去上清,留少量液体将沉淀混悬,得精子混悬液;用微量移液枪吸取10 μ L精子混悬液到60 μ L IVF中进行稀释,随后可用于单精子注射。

[0090] 胞浆内单精子注射:在开展奶牛性控精子注射前,先在35mm塑料平皿中制备操作滴(配子缓冲液)与含PVP的精子滴,覆盖矿物油;将BJ-40细玻管制备的内径20 μ m内、外径150~200 μ m的固定针装于左侧显微操作臂,硼硅酸盐玻璃制备的直径7~9 μ m的注射针装于右侧,调整角度和距离使两者在显微镜视野中心可见。接着把供体卵母细胞从OM转移至操作滴,将经BO上浮法处理后的X性控精子稀释后加入精子滴,用注射针在精子滴中润洗1分钟,挑选头尾完整无畸形且无杂质黏附的精子,对其尾部进行机械断尾,从尾端将断尾精子吸入注射针并保持在前端。随后将断尾精子随注射针转移至操作滴,用固定针吸附固定一枚卵母细胞,通过注射针转动卵母细胞使第一极体处于“6点钟”方向,将注射针调至同一水

平面,在“3点钟”方向进针刺入卵母细胞内2/3处,缓慢匀速回吸胞质,观察到回吸速度突然加快时停止,将胞质和精子匀速注入卵母细胞,确认注入完成后抽出注射针。

[0091] 激活:将完成奶牛性控精子注射后所得ICSI卵转移至OM中,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行恢复,之后开始激活。采用的不同激活方案的具体操作步骤如下:

[0092] (1)ETH方案

[0093] 将完成奶牛性控精子注射后所得ICSI卵转移至OM中,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中孵育4h;含7%ETH的OM中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0094] (2)ION+ETH方案

[0095] 将ICSI卵经恢复30min后转移至含5μM离子霉素SOF中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理),用SOF清洗干净后在OM中孵育4h(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行培养),再转移至7%ETH的OM中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0096] (3)ION*2+ETH

[0097] 将ICSI卵经恢复后转移至含5μM离子霉素的SOF中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理),用SOF清洗干净后在OM中培养30min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行培养),再转移至含5μM离子霉素的SOF中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理),用SOF清洗干净后转移至OM中培养4h(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行培养),再转移至含7%ETH的OM中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0098] (4)ION*2+6D方案

[0099] 将ICSI卵经恢复后转移至含5μM离子霉素的SOF中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理),用SOF清洗干净后在IVF中培养30min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行培养),再转移至含5μM离子霉素的SOF中激活处理5min(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理),用SOF清洗干净后转移至IVF中培养2h(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行培养),再转移至含2μM 6-DAMP的SOF中激活处理3h(具体是在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0100] 胚胎培养:激活完成后用SOF润洗并去除未存活ICSI卵,之后转移至IVC中,并置于38.5℃、5%CO₂、7%O₂的三气培养箱中进行培养,统计二极体率为受精率,培养2d后观察记录卵裂情况,6~7d观察记录囊胚形成情况。

[0101] 3.2试验结果分析

[0102] 所有试验数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。参见表1,相比于“ETH”、“ION+ETH”、“ION*2+ETH”方案,使用方案“ION*2+6D”进行ICSI操作中激活后的受精率、卵裂率及囊胚率均显著提高;在乙醇激活的方案中,使用方案“ION+ETH”激活较方案“ETH”、“ION*2+ETH”囊胚率显著提高;而使用方案“ETH”激活较方案“ION+ETH”、“ION*2+ETH”受精率显著提高。

[0103] 表1.不同激活方案对ICSI胚胎发育的影响

[0104]	激活方案	注射总数	存活卵数	受精率 (%)	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)
	ETH	727	535	75.27±1.85 ^a	51.75±1.86 ^b	7.35±0.79 ^c
	ION+ETH	541	403	67.54±2.05 ^b	52.93±2.06 ^b	10.08±0.88 ^b
	ION*2+ETH	151	115	68.22±3.44 ^b	39.43±3.46 ^c	5.13±1.47 ^c
	ION*2+6D	91	79	75.28±5.94 ^a	73.84±4.42 ^a	31.33±7.92 ^a

[0105] 注:本试验重复次数 $n>4$,同一列中相同字母上标为差异不显著($P>0.05$),不同小写字母上标为差异显著($P<0.05$),不同大写字母上标为差异极显著($P<0.01$)。

[0106] (四) 不同激活方案对胚胎移植效率的影响

[0107] 在以上不同激活方案对比试验中,对于激活后产生囊胚效率较高的方案“ETH”、“ION+ETH”和“ION*2+6D”进行胚胎移植及妊娠检查:挑选培养至7d所形成的囊胚放入TRANSFER中,装入细管,放入无菌离心管中,最后放入38.5℃恒温运输箱带到牛场;受体母牛施行1至2尾椎间隙硬膜外麻醉,清洗消毒外阴部;将含有囊胚的细管装入移植枪,再套上移植硬外套,最后套上无菌隔离外套,保持移植枪的前端无菌;将囊胚移植到受体母牛有黄体侧子宫角内,做好受体牛移植记录;在胚胎移植后的14d内,对受体母牛的受孕是以返情作为初步判断依据,14d后返情并观察有明显阴道出血现象的认为已经流产,最终妊娠、流产的确定是以35d、70d、150d时的B超检查作为判断依据统计妊娠情况和早期流产情况。

[0108] 参见表2,相比于方案“ION+ETH”、“ION*2+6D”,移植激活方案“ETH”产生的囊胚后的早期流产率显著降低,方案“ETH”移植后的妊娠率相较方案“ION+ETH”、“ION*2+6D”有一定提高,但无显著性差异。

[0109] 表2. ICSI后不同激活方案对胚胎移植效率的影响

[0110]		移植	怀孕	早期流产	妊娠率 (%)	早期流产率 (%)
	ETH	8	4	0	50.00 ^a	0.00 ^b
	ION+ETH	12	3	1	25.00 ^a	33.33 ^{ab}
	ION*2+6D	14	5	4	35.71 ^a	80.00 ^a

[0111] 注:妊娠率=怀孕数/移植数 $\times 100\%$,早期流产率=早期流产数/怀孕数 $\times 100\%$;

[0112] 同一列中不同小写字母上标为差异显著($P<0.05$),不同大写字母上标为差异极显著($P<0.01$)。

[0113] (五) 不同激活方案对ICSI原核形成的影响

[0114] 在以上不同激活方案对比试验中,对于激活后产生囊胚效率较高的方案“ETH”、“ION+ETH”和“ION*2+6D”,于单精子注射后16h后取样进行原核染色:用0.2%链蛋白酶消化透明带,用固定液固定4h后再用PBS-PVA将固定液清洗干净,用10 $\mu\text{g/mL}$ 的H33342进行荧光避光染色,10min后用PBS-PVA将染料清洗干净,在荧光显微镜下观察原核形成情况,并按原核形成类型分组记录。所有数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。

[0115] 参见表3,使用方案“ETH”进行激活后,相比于方案“ION*2+6D”可形成更多的雌雄

原核(指“1MPN+1FPN”),有利于在胚胎移植后获得较高的妊娠率。

[0116] 表3. ICSI后16h不同激活方案的原核形成情况(不同原核类型分布情况)

	染色 总数	1MPN+1FPN (%)	1FPN+PDSH (%)	1FPN+CSH (%)	1PN (%)	3PN (%)	凝缩核 (%)
[0117] ETH	33	60.71±12.88 ^a	12.70±4.96 ^b	12.30±3.44 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	14.29±14.29 ^a
ION+ETH	33	54.44±5.09 ^{ab}	29.44±4.19 ^a	7.50±6.61 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	8.61±7.47 ^a
ION*2+6D	41	38.61±10.20 ^b	17.22±5.33 ^b	19.45±7.93 ^a	19.72±8.48 ^a	5.00±10.00 ^a	0.00±0.00 ^a

[0118] 注:MPN代表雄原核,FPN代表雌原核,PDSH代表解聚精子头(表明精子解聚但尚未发育成雄原核),CSH代表未解聚精子头,1PN代表一原核(例如雌原核),3PN代表三原核(例如孤雌激活+雄原核);本试验重复次数n=3,同一列中相同字母上标为差异不显著(P>0.05),不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0119] 表4. ICSI后16h不同激活方案的原核形成情况(精子解聚情况)

	染色总数	正常受精 (%)	精子解聚 (%)	未激活 (%)
ETH	33	60.71±12.88 ^a	73.41±17.35 ^{ab}	14.29±14.29 ^a
ION+ETH	33	54.44±5.09 ^{a^b}	83.89±7.88 ^a	8.61±7.47 ^a
ION*2+6D	41	38.61±10.20 ^b	60.84±13.98 ^b	0.00±0.00 ^a

[0121] 注:正常受精为1MPN+1FPN,精子解聚为1MPN+1FPN、1FPN+PDSH及3PN,未激活为凝缩核;

[0122] 同一列中不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0123] 进一步分析表明,使用方案“ETH”进行激活后,可以通过促进形成雌雄原核、提高ICSI卵的活化效率(如表3、表4所示),从而形成更多正常受精的ICSI卵母细胞,并促进胚胎发育和提高发育质量。

[0124] (六)不同ICSI卵激活时孵育液对胚胎发育的影响

[0125] 4.1不同孵育液体对比试验(对比例2)

[0126] 卵母细胞的收集:将屠宰场收集的卵巢恒温运输至实验室,剪去卵巢周围多余的结缔组织,使用75%酒精清洗卵巢,再用生理盐水反复冲洗,使用注射器将卵泡液抽出,用捡卵针将卵丘卵母细胞复合体(COCs)在体式显微镜下从卵泡液中检出。

[0127] 卵母细胞成熟培养:将检出的COCs用HEPEs洗液反复清洗至COCs周围无杂质和颗粒细胞,清洗干净后转移至OM中润洗1次,将卵母细胞已死亡(胞质松散、过成熟)的COCs去除后全部移入OM中,在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行成熟培养。

[0128] 供体卵母细胞的准备:成熟培养22h后,将培养的COCs用0.5%的透明质酸酶反复吹打,使卵丘细胞脱落,得到裸露的卵母细胞,转移至OM中,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中恢复30min,随后准备进行单精子注射。

[0129] 性控精子的处理:通过B0上浮法处理X性控精子,准备4mL B0和2mL HEPEs洗液并在培养箱中平衡1h以上;将X性控冻精于38℃水浴锅复苏解冻后,将适量所得X性控精液转移至含有4mL B0的离心管底部,将离心管斜放45°,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养

箱中进行精子上浮,待精子上浮30min后,吸取上清离心10min(室温、离心转速为 $500\times g$);离心后去上清,将精子沉淀转移至1mLHEPEs洗液中吹打混匀并离心清洗2次,每次离心时间为5min(室温、离心转速为 $300\times g$)。

[0130] 精子的稀释:经在HEPEs洗液中离心后去上清,留少量液体将沉淀混悬,得精子混悬液;用微量移液枪吸取10 μ L精子混悬液到60 μ L IVF中进行稀释,随后可用于单精子注射。

[0131] 胞浆内单精子注射:在开展奶牛性控精子注射前,先在35mm塑料平皿中制备操作滴(配子缓冲液)与含PVP的精子滴,覆盖矿物油;将BJ-40细玻管制备的内径20 μ m内、外径150~200 μ m的固定针装于左侧显微操作臂,硼硅酸盐玻璃制备的直径7~9 μ m的注射针装于右侧,调整角度和距离使两者在显微镜视野中心可见。接着把供体卵母细胞从OM转移至操作滴,将经B0上浮法处理后的X性控精子稀释后加入精子滴,用注射针在精子滴中润洗1分钟,挑选头尾完整无畸形且无杂质黏附的精子,对其尾部进行机械断尾,从尾端将断尾精子吸入注射针并保持在前端。随后将断尾精子随注射针转移至操作滴,用固定针吸附固定一枚卵母细胞,通过注射针转动卵母细胞使第一极体处于“6点钟”方向,将注射针调至同一水平面,在“3点钟”方向进针刺入卵母细胞内2/3处,缓慢匀速回吸胞质,观察到回吸速度突然加快时停止,将胞质和精子匀速注入卵母细胞,确认注入完成后抽出注射针。

[0132] 激活:将完成奶牛性控精子注射后所得ICSI卵转移至OM或IVF中,并置于38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中孵育4h;7%ETH中激活处理5min(具体是在38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0133] 胚胎培养:激活完成后用SOF润洗并去除未存活ICSI卵,之后转移至IVC中,并置于38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、7%O₂的三气培养箱中进行培养,统计二极体率为受精率,培养2d后观察记录卵裂情况,6~7d观察记录囊胚形成情况。

[0134] 4.2试验结果分析

[0135] 所有试验数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。参见表5,使用OM作为激活时的孵育液相较于IVF,在应用于ICSI后所产生胚胎的卵裂率、囊胚率均显著提高。

[0136] 表5.不同孵育液对奶牛性控胚胎发育的影响

[0137]

	注射总数	存活卵数	受精率(%)	卵裂率(%)	囊胚率(%)
OM	688	525	67.96 ± 1.85^b	55.65 ± 1.86^a	11.14 ± 0.79^a
IVF	731	554	73.88 ± 1.80^a	44.24 ± 1.81^b	4.90 ± 0.77^b

[0138] 注:本试验重复次数 $n>4$,同一列中相同字母上标为差异不显著($P>0.05$),不同字母上标为差异显著($P<0.05$)。

[0139] (七)不同ICSI卵激活时孵育液对ICSI原核形成的影响

[0140] 将以上对比实验中,ICSI后在不同液体中孵育后激活产生的ICSI胚胎在16h后取样进行原核染色:用0.2%链蛋白酶消化透明带,用固定液固定4h后再用PBS-PVA将固定液清洗干净,用10 μ g/mL的H33342进行荧光避光染色,10min后用PBS-PVA将染料清洗干净,在荧光显微镜下观察原核形成情况,并按原核形成类型分组记录。所有数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。

[0141] 参见表6、表7,在雌雄原核(指“1MPN+1FPN”)形成、精子未解聚(1FPN+CSH)等方面,使用OM与IVF充当孵育液差异均不显著;在解聚精子(1FPN+PDSH)方面,使用IVF充当激活时的孵育液较OM显著提高,从而显著影响了IVF的受精率,但由于“1FPN+PDSH”不属于正常受

精,导致IVF作为孵育液产生的ICSI性控胚胎卵裂率、囊胚率较孵育液OM显著降低。

[0142] 表6.不同孵育液的原核形成情况(不同原核类型分布情况)

	液体类型	染色总数	1MPN+1FPN (%)	1FPN+PDSH (%)	1FPN+CSH (%)	1PN (%)	3PN (%)	2PN+CSH (%)	凝 缩 核 (%)
[0143]	OM	33	60.71±12.88 ^a	12.70±4.96 ^b	12.30±3.44 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	14.29±14.29 ^a
	IVF	50	41.78±2.35 ^a	26.53±6.01 ^a	8.55±3.51 ^a	0.00±0.00 ^a	6.06±10.50 ^a	8.89±8.39 ^a	3.33±5.77 ^a

[0144] 注:MPN代表雄原核,FPN代表雌原核,PDSH代表解聚精子头(表明精子解聚但尚未发育成雄原核),CSH代表未解聚精子头,1PN代表一原核(例如雌原核),2PN+CSH代表二原核和未解聚精子头(例如孤雌激活+未解聚精子头),3PN代表三原核(例如孤雌激活+雄原核);本试验重复次数n=3,同一列中相同字母上标为差异不显著(P>0.05),不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0145] 表7.不同孵育液的原核形成情况(精子解聚情况)

	液体类型	染色总数	正 常 受 精 (%)	精 子 解 聚 (%)	未激活 (%)
[0146]	OM	33	60.71±12.88 ^a	73.41±17.35 ^a	14.29±14.29 ^a
	IVF	50	41.78±2.35 ^a	74.38±15.57 ^a	3.33±5.77 ^a

[0147] 注:正常受精为1MPN+1FPN,精子解聚为1MPN+1FPN、1FPN+PDSH及3PN,未激活为凝缩核,孤雌激活为2PN+CSH;同一列中不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0148] (八)ETH不同激活时间对ICSI胚胎发育的影响

[0149] 8.1不同ETH激活时间对比试验(对比例3)

[0150] 卵母细胞的收集:将屠宰场收集的卵巢恒温运输至实验室,剪去卵巢周围多余的结缔组织,使用75%酒精清洗卵巢,再用生理盐水反复冲洗,使用注射器将卵泡液抽出,用捡卵针将卵丘卵母细胞复合体(COCs)在体式显微镜下从卵泡液中检出。

[0151] 卵母细胞成熟培养:将检出的COCs用HEPEs洗液反复清洗至COCs周围无杂质和颗粒细胞,清洗干净后转移至OM中润洗1次,将卵母细胞已死亡(胞质松散、过成熟)的COCs去除后全部移入OM中,在38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行成熟培养。

[0152] 供体卵母细胞的准备:成熟培养22h后,将培养的COCs用0.5%的透明质酸酶反复吹打,使卵丘细胞脱落,得到裸露的卵母细胞,转移至OM中,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中恢复30min,随后准备进行单精子注射。

[0153] 性控精子的处理:通过B0上浮法处理X性控精子,准备4mL B0和2mL HEPEs洗液并在培养箱中平衡1h以上;将X性控冻精于38℃水浴锅复苏解冻后,将适量所得X性控精液转移至含有4mL B0的离心管底部,将离心管斜放45°,并置于38.5℃、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行精子上浮,待精子上浮30min后,吸取上清离心10min(室温、离心转速为500×g);离心后去上清,将精子沉淀转移至1mLHEPEs洗液中吹打混匀并离心清洗2次,每次离心时间

为5min(室温、离心转速为 $300\times g$)。

[0154] 精子的稀释:经在HEPEs洗液中离心后去上清,留少量液体将沉淀混悬,得精子混悬液;用微量移液枪吸取10 μ L精子混悬液到60 μ L IVF中进行稀释,随后可用于单精子注射。

[0155] 胞浆内单精子注射:在开展奶牛性控精子注射前,先在35mm塑料平皿中制备操作滴(配子缓冲液)与含PVP的精子滴,覆盖矿物油;将BJ-40细玻管制备的内径20 μ m内、外径150~200 μ m的固定针装于左侧显微操作臂,硼硅酸盐玻璃制备的直径7~9 μ m的注射针装于右侧,调整角度和距离使两者在显微镜视野中心可见。接着把供体卵母细胞从OM转移至操作滴,将经B0上浮法处理后的X性控精子稀释后加入精子滴,用注射针在精子滴中润洗1分钟,挑选头尾完整无畸形且无杂质黏附的精子,对其尾部进行机械断尾,从尾端将断尾精子吸入注射针并保持在前端。随后将断尾精子随注射针转移至操作滴,用固定针吸附固定一枚卵母细胞,通过注射针转动卵母细胞使第一极体处于“6点钟”方向,将注射针调至同一水平面,在“3点钟”方向进针刺入卵母细胞内2/3处,缓慢匀速回吸胞质,观察到回吸速度突然加快时停止,将胞质和精子匀速注入卵母细胞,确认注入完成后抽出注射针。

[0156] 激活:将完成奶牛性控精子注射后所得ICSI卵转移至OM中,并置于38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中孵育4h;7%ETH中激活处理5min或10min(具体是在38.5 $^{\circ}$ C、饱和湿度的5%CO₂培养箱中进行激活处理)。

[0157] 胚胎培养:激活完成后用SOF润洗并去除未存活ICSI卵,之后转移至IVC中,并置于38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、7%O₂的三气培养箱中进行培养,统计二极体率为受精率,培养2d后观察记录卵裂情况,6~7d观察记录囊胚形成情况。

[0158] 8.2试验结果分析

[0159] 所有试验数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。参见表8,相比于用7%ETH激活10min,7%ETH激活5min后的ICSI胚胎卵裂率和囊胚率均显著提高。

[0160] 表8.ETH不同激活时间对奶牛性控胚胎发育的影响

[0161]	激活时间	注射总数	存活卵数	受精率(%)	卵裂率(%)	囊胚率(%)
	5min	808	585	72.44 $\pm$ 1.78 ^a	55.06 $\pm$ 1.79 ^a	9.89 $\pm$ 0.76 ^a
	10min	611	468	69.551 $\pm$ 1.86 ^a	45.35 $\pm$ 1.87 ^b	6.34 $\pm$ 0.79 ^b

[0162] 注:本试验重复次数 $n>4$,同一列中相同字母上标为差异不显著($P>0.05$),不同小写字母上标为差异显著($P<0.05$),不同大写字母上标为差异极显著($P<0.01$)。

[0163] (九)ETH不同激活时间对ICSI原核形成的影响

[0164] 将以上对比实验中,单精子注射后不同激活时间产生的ICSI胚胎在16h后取样进行原核染色:用0.2%链蛋白酶消化透明带,用固定液固定4h后再用PBS-PVA将固定液清洗干净,用10 μ g/mL的H33342进行荧光避光染色,10min后用PBS-PVA将染料清洗干净,在荧光显微镜下观察原核形成情况,并按原核形成类型分组记录。所有数据用SPSS进行统计分析,并确定差异的显著性。

[0165] 参见表9、表10,使用7%ETH激活5min相比于激活10min可形成更多的雌雄原核(指“1MPN+1FPN”),即正常受精率有极显著的提高,从而显著提高了7%ETH激活5min方案下所

得胚胎的卵裂率、囊胚率。

[0166] 表9.ETH不同激活时间的原核形成情况(不同原核类型分布情况)

激活时间	染色总数	1MPN+1FPN (%)	1FPN+PDSH (%)	1FPN+CSH (%)	1PN (%)	3PN (%)	2PN+CSH (%)	凝缩核 (%)
[0167] 5min	28	53.90±3.61 ^A	9.70±10.01 ^a	11.13±2.78 ^a	4.76±8.25 ^a	3.03±5.25 ^a	0.00±0.00 ^b	17.49±2.92 ^a
	10min	31	38.51±2.80 ^B	20.20±10.01 ^a	13.00±4.94 ^a	5.81±5.04 ^a	0.00±0.00 ^b	5.81±5.04 ^a

[0168] 注:MPN代表雄原核,FPN代表雌原核,PDSH代表解聚精子头(表明精子解聚但尚未发育成雄原核),CSH代表未解聚精子头,1PN代表一原核(例如雌原核),2PN+CSH代表二原核和未解聚精子头(例如孤雌激活+未解聚精子头),3PN代表三原核(例如孤雌激活+雄原核);本试验重复次数n=3,同一列中相同字母上标为差异不显著(P>0.05),不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0169] 表10.ICSI后16h不同激活方案的原核形成情况(精子解聚情况)

激活时间	染色总数	正常受精 (%)	精子解聚 (%)	未激活 (%)	孤雌激活
[0170] 5min	28	53.90±3.61 ^A	71.39±1.37 ^a	17.49±2.92 ^a	0.00±0.00 ^b
	10min	31	38.51±2.80 ^B	64.52±7.41 ^a	16.67±14.43 ^b

[0171] 注:正常受精为1MPN+1FPN,精子解聚为1MPN+1FPN、1FPN+PDSH及3PN,未激活为凝缩核,孤雌激活为2PN+CSH;同一列中不同小写字母上标为差异显著(P<0.05),不同大写字母上标为差异极显著(P<0.01)。

[0172] 以上描述了本发明优选实施方式,然其并非用以限定本发明。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

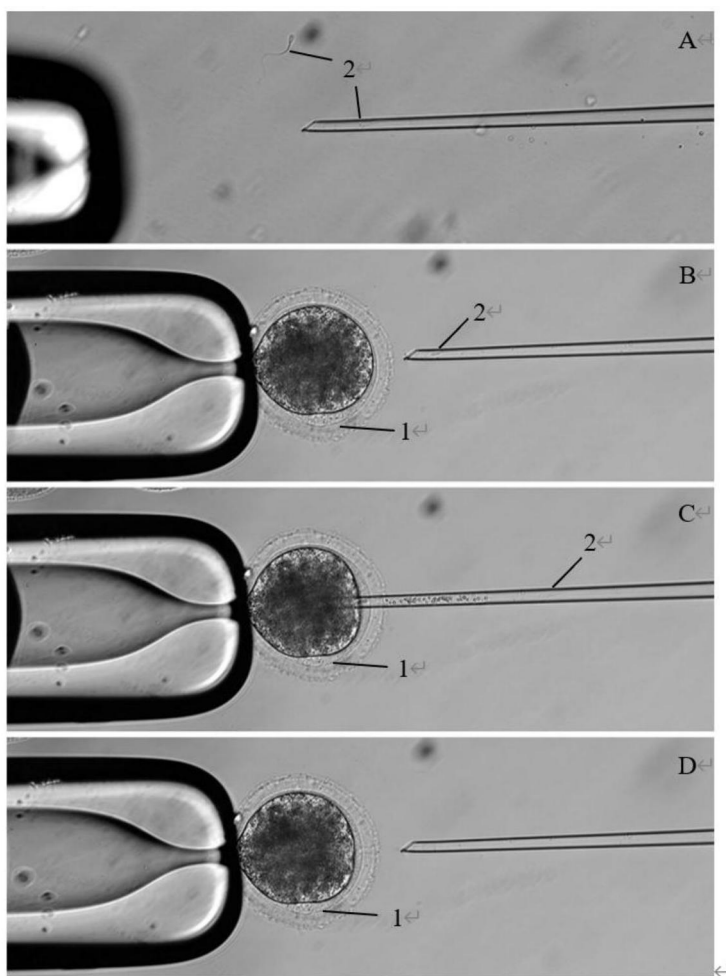


图1



图2

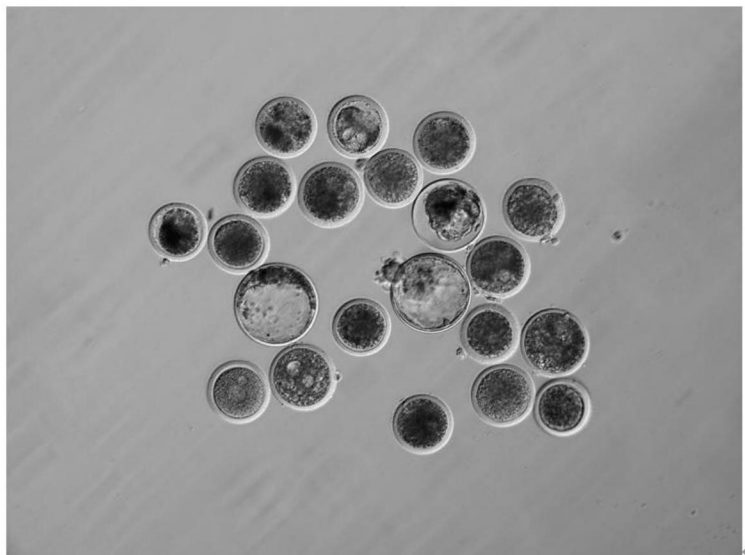


图3

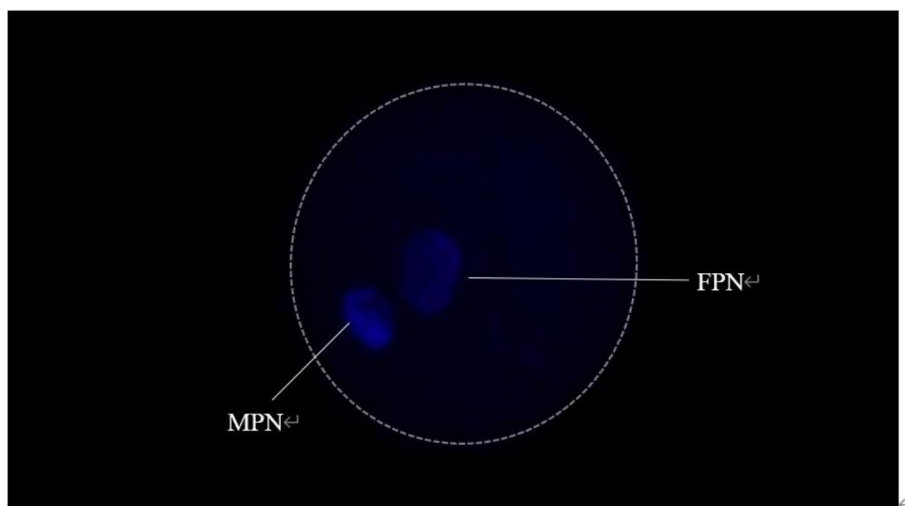


图4