

③  
153-155

## 受精滴中精子不同平衡时间 对牛卵母细胞体外受精的影响

### Effect of Sperm Equilibrated with Different Time in Fertilization Drop on Cleavage Rate of Bovine Oocytes and Their Subsequent Development

S823.34

文国艺  
Wen Guoyi

阳年生  
Yang Niansheng

Chris. Polge  
Polge, C

(广西大学动物繁殖研究所 南宁 530005)  
(Institute of Animal Reproduction,  
Guangxi Univ., Nanning, 530005)

(英国剑桥大学生物技术中心 英国)  
(Animal Biotechnology Center,  
307 Huntington Road, Cambridge, UK)

**摘要** 为寻找精子在受精滴中的最佳平衡时间,以加入精子时间为 0 h (对照组),分别在 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h 随机加入等数卵母细胞到各受精滴,结果显示:0 h, 0.5 h 组卵裂率较高,分别为 87.7%、84.7%,与其他组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 0.5 h 组的囊胚率最高,为 67.5%,与对照组的 57.7% 比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。结果表明,受精滴中精子经过 0.5 h 平衡后,弱精及死精粘聚沉淀,余下活力强的健壮精子,此时加入牛卵母细胞受精,可获得较高卵裂率及囊胚率。

**关键词** 牛卵母细胞 体外受精 受精滴 平衡时间 卵裂率 囊胚率  
中图分类号 S 823.35

精子

**Abstract** For investigating the best equilibrated time of sperm in fertilization drop (FD), 0 h is the time for control group when semen was put into FD. At time 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, the same number oocytes were randomly joined in each FD. The results showed: 0 h, 0.5 h groups took the highest cleavage rate (CR) which were 87.7%、84.7% respectively, comparing with the other groups, the difference is significant ( $P < 0.01$ ); 0.5 h group had the highest blastocyst rate (BR) (67.5%), the difference is significant ( $P < 0.01$ ) comparing with control group (57.7%). After sperm equilibrated half an hour in FD, dead sperm and weak ones got together and went down later, the remained strong sperm had more chance to penetrated oocytes. The high CR and BR could be achived in this way, and more and high quality embryos could be produced.

**Key words** bovine oocytes, in vitro fertilization, fertilization drop, equilibrated time, cleavage rate, blastocyst rate

90年代以来,完全体外化试管牛犊技术发展很快,已逐步由研究阶段转向生产应用,因此,如何进一步提高胚胎的产量和质量是当前体外受精技术的主要研究方向。卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养是影响牛体外受精胚胎质量的三个主要因素,而体外受精的关键技术是通过一定方法例如悬浮等途径获得健壮精子并使精子获能,达到超活状态。精子的获能与多种理化因子密切相关如离子强度、钙离子浓度、渗透压、肝素浓度、咖啡因浓度等<sup>[1]</sup>。在体外受精过程中,人们通常将卵子先放入或将精液与卵子同时放到受精液中,一定时间后,越来越多的精子聚集成团并下沉(一般认为死精、体弱精子因为膜电位发生改变等原因最早发生粘聚下沉);如果在加入卵子前,让精液在培养箱中受精滴里进行预平衡一定时间,部分精子粘聚下沉到受精滴底部,悬浮于受精液中的为较健壮的精子,此时加入卵子受精可获得质量较好的胚胎。本试验旨在寻找受精液中精子的最佳平衡时间。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 卵母细胞的收集和体外培养

试验所用卵巢均来自屠宰场当日所杀母牛,卵巢置于温度为38℃的磷酸盐缓冲液中,不迟于2h送达实验室;使用20mL注射器和18G针头抽取卵母细胞,选取细胞质均匀、卵丘细胞包被紧密的卵母细胞,置于含5%阉公牛血清(SS)的TCM-199液中洗涤2次后,移入装有2mL含10%SS的TCM-199培养液的培养皿中。每一平皿中放入200~300个卵母细胞,另加少量卵泡颗粒细胞进行协同培养。将平皿放入气相为5%CO<sub>2</sub>的空气、温度为39℃、相对饱和湿度的培养箱摇床上,进行体外成熟培养<sup>[2,3]</sup>。

### 1.2 颗粒细胞单层的准备

将挑选卵母细胞后剩下的卵泡液倒入离心管,以1500r/min的速度离心2次,每次5min。将第2次离心后所得的颗粒细胞用培养液稀释成 $8 \times 10^6$ 个/mL浓度,在培养皿中做45μL大小的培养滴,覆盖石蜡油后放入培养箱,培养48h后颗粒细胞即可长成细胞单层用于培养受精卵<sup>[4,5]</sup>。

### 1.3 卵母细胞的准备

将经20h~28h体外成熟培养后的卵母细胞用吸管反复抽打,去掉卵母细胞周围的部分卵丘细胞,使卵丘细胞层保留3~5层,经卵洗液(Tyrode's修正液)洗涤2次后备用。

### 1.4 卵母细胞的体外受精

用受精液做成45μL的受精滴,上覆盖石蜡油后置于培养箱中预热;细管精液解冻后用获能液(Tyrode's修正液)离心洗涤2次,每次10min,离心速度1500r/min,然后加入各个受精滴中,最终精子浓度约为 $2 \times 10^6$ 个/mL,以加入精子时为0h,分别在0h,0.5h,1h,2h,4h组随机加入等数卵母细胞到各受精滴,各批15个/滴~20个/滴。

### 1.5 受精卵的体外培养

受精后24h,分别将各组受精卵移入颗粒细胞单层中;受精后48h检查卵裂率并继续培养5d~7d,每隔48h用新鲜培养液更换1次并观察早期胚胎发育情况。记录受精后第7天、第8天、第9天囊胚发育数及第12天的囊胚孵化数。

### 1.6 统计分析

所得数据均用卡方分析确定差异的显著性。

## 2 结果

受精后各组卵裂率见表1, 各组囊胚率及囊胚孵化率见表2。结果显示, 受精液中加入精子后同时及0.5 h时放入卵母细胞进行体外受精, 可获得较高卵裂率, 分别为87.7%、84.7%, 与在1 h、2 h、4 h放入卵母细胞的卵裂率比较差异显著; 0.5 h组可获得较高囊胚率、67.5%, 与0 h组即对照组的57.7%比较差异显著, 与其他组无显著差异。各组间囊胚孵化率无显著差异。

表1 受精液中精子不同平衡时间后受精卵裂率

组别	卵裂率±SD(%)
0 h	87.7±5.5 (293/334) <sup>a</sup>
0.5 h	84.7±6.9 (283/334) <sup>a</sup>
1 h	75.7±13.4 (112/148) <sup>b</sup>
2 h	66.2±15.0 (98/148) <sup>b</sup>
4 h	73.0±13.7 (108/148) <sup>b</sup>

a, b均 $P < 0.01$ ; 括号内为数值比。

表2 各平衡时间组的囊胚率及囊胚孵化率

组别	第7天	第8天	第9天	囊胚率±SD(%)	囊胚孵化率±SD(%)
0 h	139	23	7	57.7±4.6 (169/293) <sup>c</sup>	79.9±9.4 (135/169)
0.5 h	143	42	6	67.5±10.1 (191/283) <sup>d</sup>	80.6±12.1 (154/191)
1 h	52	13	3	60.7±4.3 (68/112) <sup>cd</sup>	86.8±10.9 (59/68)
2 h	48	11	3	63.3±14.2 (62/98) <sup>cd</sup>	87.1±7.0 (54/62)
4 h	47	15	8	64.8±16.7 (70/108) <sup>cd</sup>	80.0±6.0 (57/70)

c, d均 $P < 0.01$ ; 括号内为数值比。

## 3 讨论

若卵母细胞数固定, 当单位体积内精子浓度较高即精卵比数大时, 则每个卵母细胞受精机会较高, 但同时多精受精的机率也增高, 多精受精的胚胎一般不能发育到囊胚, 所以在体外受精实际操作过程中应选用适宜的精子浓度, 并不是越高越好; 而强壮的精子受精后胚胎的质量较好, 胚胎质量的优劣可通过囊胚率及囊胚孵化率衡量; 本研究的实际结果与试验设计预想基本吻合, 由表1的结果可清楚看到, 平衡0 h组(对照组)或0.5 h组的卵裂率显著高于平衡1 h、2 h、4 h组的卵裂率, 这是因为随着平衡时间的推移, 受精液中越来越多弱质精子或死精粘聚成团下沉, 单位体积有效精子浓度降低即精卵比数变小从而导致受精卵裂率降低, 但同时平衡后的精子较为健壮, 受精后的卵裂球能较好地发育, 可顺利通过8~16细胞“阻断”并最终获得较好的囊胚率及囊胚孵化率, 其中对照组与平衡0.5 h组囊胚率差异显著; 由此可以得出结论, 在现行的完全体外化受精过程中, 卵母细胞可在精液加入受精液滴0.5 h后加入, 可获得较高的卵裂率及较多的高质量胚胎。

### 参考文献

- 1 文国艺, 卢克焕. 受精液中肝素和咖啡因的组合对牛卵母细胞体外受精的影响. 广西农业大学学报, 1994, 13 (1): 27~31.
- 2 Lu k h. Studies related to the in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes in cattle [Ph D Thesis]. National University of Ireland, 1990. 247.
- 3 文国艺, 卢克焕. 两种方法对牛体外受精及体外发育的影响. 中国兽医学报, 1996, 16 (5): 510~513.
- 4 文国艺, 卢克焕. 颗粒细胞制备单层细胞时其浓度对牛早期胚胎体外发育的影响. 中国兽医学报, 1994, 14 (2): 185~187.
- 5 O'Doherty E M, Wade M G, Hill J L et al. . Effects of culturing bovine oocytes either singly or groups on development to blastocysts. Therio, 1997, 48: 161~169.

(责任编辑: 蒋汉明)