

分类号: Q813.7  
密 级: \_\_\_\_\_

单位代码: 10364  
学 号: s06090501424

# 安徽农业大学

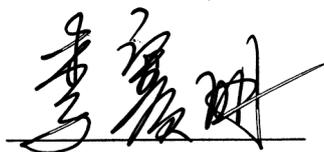
学位论文

## 小鼠胚胎体外培养体系的优化

Optimization of Protocols for *in Vitro* Culture of Mouse Embryos

研 究 生: 周 世 贤  
指 导 教 师: 陶 勇 副 教 授  
合 作 指 导 教 师: 章 孝 荣 教 授  
申 请 学 位 门 类 级 别: 农 学 硕 士  
专 业 名 称: 动 物 遗 传 育 种 与 繁 殖  
研 究 方 向: 动 物 生 殖 生 物 技 术  
所 在 学 院: 动 物 科 技 学 院

答辩委员会主席:



二零零九年 六月

# Anhui Agricultural University

Master Degree Thesis

*Optimization of Protocols for in Vitro Culture of Mouse Embryos*

Postgraduate: Zhou Shixian

Tutor: Assoc.Prof. Tao Yong

Co-tutor: Prof. Zhang Xiaorong

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural  
University,  
Hefei, 230036

Hefei, Anhui, China

June, 2009

本文安徽省国际科技合作计划项目（项目编号 08080703034）支持

Supported by International Sci-tech Cooperation Project of Anhui Province (Grant number 08080703034)。

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得安徽农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：周世贤

时间：2009年6月15日

# 关于论文使用授权的说明

本人完全了解安徽农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意安徽农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：周世贤

时间：2009年6月15日

导师签名：陶勇

时间：2009年6月

## 摘 要

以 ICR 小鼠体内受精胚胎（原核胚）为试验材料，探讨不同的培养液、生长因子及培养气相对小鼠胚胎体外发育的影响，目的在于寻找一种适合于 ICR 小鼠胚胎的培养液成分及培养环境，优化小鼠胚胎体外培养体系。同时也为其它哺乳动物胚胎的体外培养提供参考。

论文包括四个试验，每个试验重复至少 5 次，试验所得到的卵裂率、囊胚率均用平均数±平均标准误表示，而囊胚细胞数用平均数±标准差表示，采用 SAS 统计软件进行分析。具体结果如下：（1）对比研究了 mKSOM、HTF、CZB 三种培养液对小鼠原核胚体外发育的影响。结果显示，三组之间的卵裂率为  $74.1\pm 5.6\%$ 、 $64.3\pm 7.3\%$ 、 $71.9\pm 6.1\%$ ，差异不显著（ $P>0.05$ ）；三组之间的囊胚率分别为  $15.0\pm 6.8\%$ 、 $8.1\pm 4.9\%$ 、 $19.9\pm 7.7\%$ ，囊胚总细胞数为  $66.4\pm 21.7$ 、 $68.0\pm 7.3$ 、 $66.7\pm 16.9$ ，差异都不显著（ $P>0.05$ ），但 mKSOM 组的培养效率较佳。（2）研究了每毫升含 1ng、5ng、10ng EGF 或 10ng bFGF、100ng bFGF 的 mKSOM 对小鼠原核胚体外发育的影响，结果发现，三组含 EGF 的卵裂率分别为  $69.0\pm 10.1\%$ 、 $73.2\pm 5.9\%$ 、 $72.2\pm 8.1\%$ ，各组之间差异不显著（ $P>0.05$ ）；囊胚率分别为  $26.6\pm 12.9\%$ 、 $18.2\pm 7.1\%$ 、 $29.2\pm 15.5\%$ ，10ng/ml EGF 组稍高于其它两组（ $P>0.05$ ），囊胚总细胞数分别为  $62.5\pm 19.9$ 、 $51.0\pm 9.7$ 、 $54.8\pm 15.4$ ，1ng/ml EGF 组略高于其它两组但差异不显著（ $P>0.05$ ）；两组含 bFGF 的卵裂率分别为  $62.9\pm 9.4\%$ 、 $59.0\pm 8.9\%$ ，差异不显著（ $P>0.05$ ）。两组之间的囊胚率分别为  $23.6\pm 7.8\%$ 、 $25.4\pm 7.3\%$  差异也不显著（ $P>0.05$ ）。（3）研究了微孔培养体系(well of the well system ,WOW)法和成组培养法对小鼠原核胚体外发育的影响，结果发现，两组的卵裂率分别为  $93.6\pm 2.4\%$  和  $83.2\pm 4.8\%$  差异不显著（ $P>0.05$ ）；两组的囊胚率分别为  $74.6\pm 5.1\%$  和  $38.2\pm 6.6\%$ ，囊胚总细胞数分别为  $76.2\pm 2.7$ 、 $58.7\pm 4.9$ ，WOW 组显著高于成组培养法，差异显著（ $P<0.05$ ）。（4）研究了 Lung air(肺气)、5%氧气、20%氧气三种不同的培养气相对小鼠原核胚体外发育的影响，结果发现：mKSOM 组的卵裂率分别为  $63.2\pm 5.8\%$ 、 $69.7\pm 5.8\%$ 、 $59.7\pm 5.8\%$ ，三种气相培养差异不显著（ $P>0.05$ ）；囊胚率分别为  $6.7\pm 5.1\%$ 、 $22.6\pm 5.1\%$  和  $6.1\pm 5.1\%$ ，5%的氧气组显著高于其它两组（ $P<0.05$ ），但其它两组差异并不显著，囊胚总细胞数分别为  $39.3\pm 7.1$ 、 $37.2\pm 5.8$ 、 $66.8\pm 7.1$ ，20%的氧气组显著高于其它两组（ $P<0.05$ ），但其它两组差异并不显著；HTF 组的卵裂率分为  $44.1\pm 5.8\%$ 、 $60.2\pm 5.8\%$ 、 $54.8\pm 5.8\%$ ，各组间差异也不显著（ $P>0.05$ ）；囊胚率分别为  $0\pm 0.0\%$ 、 $6.7\pm 5.1\%$  和  $2.8\pm 5.1\%$ ，囊胚总细胞数分别为  $0\pm 0.0$ 、 $23.7\pm 8.2$ 、 $19.0\pm 8.2$ ，各组之间差异不显著（ $P>0.05$ ）；CZB 组的卵裂率分别为  $64.4\pm 5.8\%$ 、

59.7±5.8%、57.9±6.2%，差异也不显著 ( $P>0.05$ )；囊胚率分别为 16.2±5.1%、28.7±5.1% 和 16.4±5.4%，各组之间差异不显著 ( $P>0.05$ )，但 5%氧气培养组的囊胚率最高，囊胚总细胞数分别为 53.8±3.3、43.3±3.6、49.7±5.3，20%氧气组与另外两组差异不显著，但其它两组差异非常显著 ( $P<0.05$ )。此外，培养基 CZB 在三种气相条件下囊胚率都较高，虽然统计学上差异不显著 ( $P>0.05$ )；但是，肺气和 20% O<sub>2</sub> 气相下囊胚总细胞数能显著提高 (53.8±3.3, 49.7±5.3 vs. 43.3±3.6,  $P<0.05$ )。说明 5%氧气组和肺气组的培养气相都可以用于小鼠自然胚的体外培养。

综上所述，小鼠原核胚体外培养的过程中，选择(1)mKSOM 培养基，使用 WOW 法在含 5%氧气的气相条件下；或者(2) CZB+WOW+Lung air 的培养效果都比较好。

**关键词：**胚胎，体外培养，小鼠

## Abstract

To explore the effects on the development of mouse embryos between different culture mediums, growth factors and cultured gas phase, the ICR mice fertilized embryos (pronuclear embryos) were for the test materials. The aim of this study was to find a suitable culture medium composition and cultivation environment of ICR mouse embryo, and optimize the culture system of mouse embryos in vitro. At the same time, it was for reference as well as other mammalian embryos in vitro.

There are four experiments, and all experiments were replicated for more than 5 times. Cleavage rate, blastocyst rate here were denoted with the average  $\pm$  standard error of that average, while the number of blastocyst cells denoted with the average  $\pm$  standard deviation. Results were analyzed by SAS statistical software. Specific results were as follows: (1) comparative study of the effects of the mKSOM, HTF, CZB three culture mediums on development of mouse pronuclear embryos. The results showed that the cleavage rate between the three groups were  $74.1 \pm 5.6\%$ ,  $64.3 \pm 7.3\%$ ,  $71.9 \pm 6.1\%$ , and there were no significant differences ( $P > 0.05$ ). The blastocyst rate among three groups were  $15.0 \pm 6.8\%$ ,  $8.1 \pm 4.9\%$ ,  $19.9 \pm 7.7\%$ , while total cell number of blastocyst were  $66.4 \pm 21.7$ ,  $68.0 \pm 7.3$ ,  $66.7 \pm 16.9$ , no significant differences among them ( $P > 0.05$ ), but the mKSOM group got better efficiency. (2) study the effects of each ml mKSOM containing 1ng, 5ng, 10ng EGF or 10ng bFGF, 100ng bFGF on in vitro development of mouse pronuclear embryos. We found that cleavage rates among three groups containing EGF were  $69.0 \pm 10.1\%$ ,  $73.2 \pm 5.9\%$ ,  $72.2 \pm 8.1\%$ , the difference between these groups was not significant ( $P > 0.05$ ). For the blastocyst rates,  $26.6 \pm 12.9\%$ ,  $18.2 \pm 7.1\%$ ,  $29.2 \pm 15.5\%$ , 10ng/ml EGF group was slightly higher than the other two groups ( $P > 0.05$ ). Total cell number of blastocysts between three groups were  $62.5 \pm 19.9$ ,  $51.0 \pm 9.7$ ,  $54.8 \pm 15.4$ , 1ng/ml EGF group was slightly higher than the other two groups, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). The cleavage rates of the two groups containing bFGF were  $62.9 \pm 9.4\%$ ,  $59.0 \pm 8.9\%$ , without significant differences ( $P > 0.05$ ). While blastocyst rate of the two groups were  $23.6 \pm 7.8\%$ ,  $25.4 \pm 7.3\%$ , no significant differences ( $P > 0.05$ ). (3) The effects of the micropore culture system (well of the well system, WOW) and group culture system on development of mouse prokaryotic embryos. The results revealed that the cleavage rate of the two groups were  $93.6 \pm 2.4\%$  and  $83.2 \pm 4.8\%$ , no significant difference ( $P > 0.05$ ). The blastocyst rate of the two were  $74.6 \pm 5.1\%$  and  $38.2 \pm 6.6\%$ , and the total cell number of blastocyst were  $76.2 \pm 2.7$ ,  $58.7 \pm 4.9$ . WOW system was significantly higher than the group culture, and there were significant differences ( $P < 0.05$ ). (4) The effects of Lung air (lung), 5% oxygen, 20% oxygen three different gas phase cultivation on development of mouse prokaryotic embryos. We found that cleavage rate of mKSOM group were  $63.2 \pm 5.8\%$ ,  $69.7 \pm 5.8\%$ ,  $59.7 \pm 5.8\%$ , There were no significant differences between the three gas phase cultivation ( $P > 0.05$ ). Blastocyst rates of them were  $6.7 \pm 5.1\%$ ,  $22.6 \pm 5.1\%$  and  $6.1 \pm 5.1\%$ , so 5% oxygen group was significantly higher than the other two groups ( $P < 0.05$ ). But difference between the other two groups

was not significant. The total blastocyst cells respectively were  $39.3 \pm 7.1$ ,  $7.2 \pm 5.8$ ,  $66.8 \pm 7.1$ , 20% oxygen group was significantly higher than the other two groups ( $P < 0.05$ ), while the difference between the other two groups was not significant. The HTF group's cleavage rates respectively were  $44.1 \pm 5.8\%$ ,  $60.2 \pm 5.8\%$ ,  $54.8 \pm 5.8\%$ , and each group had no not remarkable differences ( $P > 0.05$ ). The blastocyst rate respectively were  $0 \pm 0.0\%$ ,  $6.7 \pm 5.1\%$  and  $2.8 \pm 5.1\%$ , meanwhile the total cell number of blastocyst respectively were  $0 \pm 0.0$ ,  $23.7 \pm 8.2$ ,  $19.0 \pm 8.2$ . Differences between the groups were not remarkable ( $P > 0.05$ ). The cleavage rates in CZB group were  $64.4 \pm 5.8\%$ ,  $59.7 \pm 5.8\%$ ,  $57.9 \pm 6.2\%$ , Differences were not significant ( $P > 0.05$ ). The blastocyst rates were  $16.2 \pm 5.1\%$ ,  $28.7 \pm 5.1\%$  and  $16.4 \pm 5.4\%$ , and the differences between the groups was not significant ( $P > 0.05$ ). But 5% oxygen culture group had the highest blastocyst rate. The total cell number of blastocyst were  $53.8 \pm 3.3\%$ ,  $43.3 \pm 3.6\%$ ,  $49.7 \pm 5.3\%$ . 20% oxygen group had no significant differences between the other two groups, however difference between the other two groups was significant ( $P < 0.05$ ). In addition, under the conditions of three kinds of gas in CZB medium it showed higher blastocyst rates, although the differences were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). However, the total cell number of blastocyst significantly increased under the lung and 20% O<sub>2</sub> gas (  $53.8 \pm 3.3\%$ ,  $49.7 \pm 5.3\%$  vs  $43.3 \pm 3.6\%$ ,  $P < 0.05$ ). That indicated 5% oxygen group and the group of lung gas can be used to cultivate the mouse pronuclear embryos *in vitro*.

In conclusion, it would be more efficient by the choice of (1) mKSOM medium with the use of WOW with 5% in oxygen under the conditions of the gas, or (2) CZB + WOW + Lung air in the development of the mouse pronuclear embryos *in vitro*.

**Key word:** embryo, *in vitro* culture , mouse

# 目 录

摘 要	
Abstract	
缩略词表	
文献综述 .....	1
引 言 .....	8
1 材料和方法 .....	9
1.1 试验材料 .....	10
1.2 主要试剂 .....	10
1.3 主要仪器 .....	10
1.4 主要试剂与培养液配制.....	10
1.5 小鼠超数排卵.....	11
1.6 小鼠原核胚的采集.....	11
1.7 小鼠原核胚的培养.....	12
1.8 囊胚细胞染色计数.....	12
1.9 试验设计 .....	12
1.10 胚胎发育判定标准.....	13
1.11 统计分析 .....	13
2 结 果 .....	15
2.1 HTF、CZB、mKSOM 对小鼠原核胚体外发育影响 .....	15
2.2 不同浓度 EGF 和 bFGF 的 mKSOM 对小鼠原核胚体外发育的影响 .....	15
2.3 WOW 法对小鼠原核胚体外发育的影响.....	16
2.4 不同的培养气相对小鼠原核胚发育的影响.....	17
3 讨 论 .....	18
3.1 HTF、CZB、mKSOM 对小鼠原核胚体外发育影响 .....	18
3.2 不同浓度的 EGF 和 bFGF 对小鼠原核胚体外发育影响.....	19
3.3 WOW 法对小鼠原核胚体外发育影响.....	20
3.4 不同的培养气相对小鼠原核胚体外发育影响.....	21
4 结 论 .....	22
参考文献 .....	23
致 谢 .....	30
个人简介 .....	32

## 缩略词表

缩略词	英文全称	中文
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
COCs	cumulus-oocyte complexes	卵丘-卵母细胞复合体
EAA	essential amino acid。	必需氨基酸
hCG	human chorionic gonadotrophin	人绒毛膜促性腺激素
Hya	hyaluoronidase	透明质酸酶
HTF	human tube fluid	人输卵管液
IVC	<i>in vitro</i> culture	体外培养
IVEP	<i>in vitro</i> embryo production	体外胚胎生产
M199	medium 199	培养液 199
NEAA	nonessential amino acid。	非必需氨基酸
PMSG	pregnant mare serum gonadotrophin	孕马血清
TCM-199	tissue culture medium	组织培养液
WOW	well of the well system	微孔培养体系
MDC	micro-droplet culture	微滴群体法
SCNT	Somatic cell nuclear transfer	体细胞核移植
CZB	Chatot Ziomek Bavister medium	胚胎培养基
KSOM	potassium simplex optimized medium	钾离子优化培养基
EGF	Epidermal growth factor	表皮生长因子
bFGF	Basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞因子

## 文献综述

进入 21 世纪以来,随着现代科学和技术的发展,尤其生物科技的推广应用,极大地促进了人类社会的发展。作为生物技术的前沿领域之一,胚胎工程主要是指对哺乳动物的胚胎进行某种人为的工程技术操作,然后让它继续发育,获得人们所需要的成体动物的新技术。它主要包括胚胎体外培养、胚胎移植、胚胎保存、胚胎分割、胚胎性别控制、胚胎干细胞、转基因动物构建、试管婴儿、胚胎嵌合、性激素与生长因子、克隆动物等技术。胚胎工程在畜牧良种快繁、遗传资源保护与利用;人类优生优育、不孕不育生殖临床疾病治疗、疾病诊断、药物研发、筛选以及基础研究等诸多方面蕴藏着巨大的应用价值,而备受世人瞩目。

目前,模拟体内环境,开展体外培养已逐渐成为人们获取胚胎,充分利用动物遗传资源的重要选择。然而,遗憾的是,尽管人们已经做了若干尝试,也取得了一些进展,但是体外生产所获胚胎的质量、发育命运仍然无法和体内自然生存环境中所获胚胎相提并论。在体外培养过程中,体外培养所涉及的若干环节,如基础培养液、培养液渗透压、pH 值、能量底物、氨基酸、维生素、培养时胚胎密度、培养气相环境、培养温湿度、培养皿(版)材料、蛋白成分、细胞因子等都会影响胚胎的体外发育效果,也称为人们尝试建立有效、稳定、经济的体外胚胎生产体系的关注对象。

小鼠因为遗传背景清楚、饲养管理容易、周期短、资源丰富、成本低廉已经成为生命科学实验研究中十分重要的、理想的哺乳类模式动物。小鼠已经在发育生物学、细胞生物学、分子生物学、临床医学等学科为科学发展做出了不可磨灭的贡献。小鼠也为动物胚胎工程的建立、发展等发挥了重要的作用,已成为人类生殖临床、动物胚胎生物新技术研发推广之前重要的检验模型。然而,小鼠胚胎体外生产仍存在着很多亟需解决的问题,如体外发育细胞阻滞现象严重、不同遗传背景小鼠对胚胎培养基有不同的发育表现、体外发育胚胎质量不如体内自然胚胎、抗冻性弱、胚胎移植后妊娠率低等,最终影响个体出生后的发育命运和表型。因此,针对胚胎体外培养环节中的关键步骤进行研究,筛选培养基配方、培养方案等,对于建立稳定、有效、经济的小鼠体外生产体系意义重大。本文将就影响小鼠胚胎体外生产的若干因素进行综述,以期得到有益于我们提高小鼠胚胎体外生产效率的启示。

### 1 哺乳动物胚胎体外培养概况

在哺乳动物胚胎学中,以前大量的实验工作都是利用兔胚胎。但是,随着对小鼠生殖生理和遗传学的了解越来越多,发现小鼠不仅遗传背景清楚、饲养管理容易、周期短、而且资源丰富、成本低很快作为实验动物在实验室得到了广泛的应用。1949 年,Hammond[1]首次成功地在体外将 8 个细胞的桑椹胚及一些 4-细胞期的胚胎培养

至胚泡。然而，从 2-细胞期取出的胚胎在培养时，很快就死亡了。随后，Ralph Brinster[2]通过建立的微滴培养技术，可将成批的 2-细胞期的小鼠胚胎培养至囊胚阶段。1958 年，McLaren 和 Biggers[3]将体外培养的囊胚移入假孕雌鼠子宫中后，胚胎正常发育并成功地获得小鼠。同时也为胚胎移植技术打下了一定的基础。

值得关注的是 1978 年世界上第一位试管婴儿在英国诞生以来，人类辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART) 取得了长足的进步[4]。特别是在最近 10 年间，ART 技术的进展更是日新月异，突飞猛进。

克隆羊 Dolly 问世以来，体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术也已经非常广泛的被用于克隆动物和转基因动物的生产，并取得了很快的进步和发展，如猪、牛、猫、鼠等动物都已陆续出生[5]。

## 2 小鼠胚胎基础培养基研发

小鼠着床前胚胎的实验研究始于 20 世纪 50 年代。Whitten 最早用 Krebs-Ringger 碳酸氢盐培养基添加葡萄糖和牛血清白蛋白成功将八细胞鼠胚培养至囊胚阶段第一次实现了在体外对囊胚的培养并证明了胚胎可以在简单培养基中存活并发育[6]。对受精卵体外发育的研究有较长的历史，一直以来，寻求从受精卵到囊胚体外培养的成分明确的培养基早已成为大家的研究目标。

尽管哺乳动物胚胎已经可以成功的在体外发育。然而，胚胎发育还会出现阻滞现象，如小鼠胚胎发生在 2-细胞期、猪胚胎发生在 4-细胞期、牛胚胎发生在 8~16-细胞期、人胚胎发生在 8-细胞期，说明它们的胚胎培养体系还不完善，还没有达到最优，其中必然有些成分不是胚胎发育所需要的，而某些胚胎发育所需的成分在培养液中也没有提供。动物卵母细胞体外成熟、体外受精和胚胎体外培养是保存动物优良基因、充分利用动物优良基因的有效手段，同时也是发育生物学、受精生物学、转基因动物生产、动物克隆等研究领域的基础。因此人们对此进行了大量研究，试图通过对比不同的培养基以及尝试改进培养方法来提高成功率。

## 3 培养基成分改进

为了探讨早期的胚胎发育机制、克服胚胎体外发育阻滞、提高胚胎体外培养的囊胚率，人们做了大量的研究，培养基成分的改进就是其中重要的一部份，优化培养基的方式多种多样，包括改进简单培养基或复合型培养基中的某些成分，采用体细胞与胚胎共同培养[7]等等。

小鼠受精卵和早期胚胎在体外培养时，其发育常停滞于 2-细胞期，此现象称为体外 2-细胞阻滞(2-cell block) [8]。多年来，关于哺乳动物早期胚胎体外发育阻断及其影响因素的研究，国内外学者作了大量报道。Schini 等[9]和 Seshagiri 等[10]首先发现葡萄糖、磷酸盐是造成仓鼠体外发育阻断的主要原因。为了克服这种阻滞，Chatot 等[11]首先采用了“CZB”培养液，提高了乳酸与丙酮酸的比例，增加了谷氨酰胺、EDTA 等

成分，1-细胞胚在此培养液中发育至囊胚的比率明显增高。

KSOM 也是小鼠胚胎培养液中的一种。1993 年, Lawwits 和 Biggers[12]采用简单优化设计, 观察不同培养基作用时胚胎细胞钾离子浓度变化, 将 SOM 液中 NaCl 和 KCl 的浓度由原来的 85mmol/L 和 0.25mmol/L 分别提高到 95mmol/L 和 2.5mmol/L, 得到改良液即 KSOM[13], 在许多品系上都突破了"2-细胞阻滞"取得了较高的囊胚形成率。KSOM 与以往报道[14]的培养基相比, 也显示了较高的囊胚形成率和卵裂球数。

#### 4 培养气相对胚胎体外发育的影响

胚胎体外培养是胚胎工程研究的重要基础条件。因此, 建立稳定可靠的哺乳动物早期胚胎体外培养体系已经成为当前这一领域的重要研究课题之一。在体外培养哺乳动物早期胚胎时, 几乎都会不同程度的发生体外发育阻断(*in vitro block of development*)现象[79]。除培养基外, 影响胚胎培养效果的因素还很多, 其中培养方法也是一个很重要的因素。

目前, 小鼠胚胎体外培养气相通常采用5% CO<sub>2</sub>和95%空气的混合气体; 另一种培养气相是5%CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>和90% N<sub>2</sub>的气体环境[15], 比较接近生殖道的氧浓度[31]。有报道证实用5% O<sub>2</sub>浓度能明显提高囊胚发育率以及ICM 细胞数量。理论上, 低氧可减少培养中自由基和活性氧(ROS)的形成, 而活性氧对细胞有毒害作用, 易造成DNA损伤和脂质过氧化反应。也有研究证实在人胚胎上降低O<sub>2</sub>的浓度可以提高囊胚发育率和囊胚中细胞的数量, 牛胚胎在5% O<sub>2</sub>环境下培养, 较常用的20% O<sub>2</sub>环境能获得更多囊胚发育率和孵化率, 桑椹胚和囊胚中的细胞数量也显著增加。而有些培养基则在普通气相比较好。目前, 两种气相究竟哪种更好还有争议, 还有待于进一步的探索和研究。

#### 5 培养基中的能量底物、氨基酸、维生素对胚胎体外发育的影响

从 Halnlnond 到第一次体外培养胚胎成功到现在, 人们一直在努力探讨早期胚胎发育的机制, 伴随而来的是优化胚胎培养基的研究, 其中能量底物的改进是其中重要的一部分, 而葡萄糖则是受到广泛关注的能量物质之一。

胚胎体外培养过程中胚胎发育的好坏主要取决于培养基中各种营养成分, 而目前培养体系都是在模仿体内的生长环境, 体内输卵管液中含有许多种输卵管细胞分泌的能量底物如葡萄糖、丙酮酸、乳酸、氨基酸、蛋白质、脂肪酸等[16-18], 这些成分对胚胎的生长发育都有一定的作用。肖文伍等[47]研究发现加糖培养基较不加糖培养基的桑椹胚、囊胚形成率高。葡萄糖不仅不会导致2-细胞阻滞, 而且从培养的一开始就应该加入, 因为第3d加入葡萄糖的囊胚形成率低于开始就加糖的形成率, 胚胎培养后期对葡萄糖的利用能力很有限, 而主要以丙酮酸、乳酸和氨基酸为能量代谢的底物。至致密化期以后, 胚胎对葡萄糖的摄入和利用都增加。在不含氨基酸的条件培养液中, 葡萄糖甚至会抑制胚胎的早期卵裂。有研究认为[19-20]葡萄糖是否起抑制作用与培养

基中磷酸盐的存在有关。

Biggers等[21]将KSOM培养基中葡萄糖和磷酸盐以不同浓度结合，对远系杂交CFI小鼠1-细胞进行体外培养，结果证实，葡萄糖和磷酸盐对胚胎发育的作用是相互独立的，葡萄糖对囊胚形成没有明显抑制作用。目前葡萄糖是否抑制植入前胚胎的体外发育尚存争论。

Hammer等[22]研究证实小鼠早期胚胎细胞中含有氨基酸转运系统。动物输卵管和子宫液中也都有相当数量的自由氨基酸，早期胚胎上也存在一些特殊氨基酸的载体，胞内具有内源性氨基酸池，实验已证实氨基酸在体外培养中作用非常重要[23-24]。在体外培养液中加入氨基酸有利于克服胚胎的发育阻滞，不仅能促进胚胎的早期发育，而且能增强其植入后的发育能力。

研究证实，胚胎内外各种氨基酸需要保持一定的水平，如果胚胎内某种氨基酸过量或缺乏，胚胎就会通过氨基酸转化系统对胚胎内和环境中的氨基酸进行调节，以满足胚胎正常发育的需要。

此外，在合成培养基中还含有多种维生素。目前，它们对胚胎发育的作用并不十分清楚。人和鼠的合子完全有能力在不含维生素的培养基中分裂并发育形成囊胚。有实验报道，存在于Ham'sF-10中的B12对囊胚扩张有负面影响，已知B族维生素是参与碳水化合物和氨基酸代谢的重要成分，在胚胎发育中发挥何种作用，有待进一步研究。但也有报道说维生素C具清理氧自由基的作用，牛胚胎培养液(CR1aa+ 5% CS)中添加0.1mg/L维生素C不仅不影响卵裂率，还能明显提高囊胚的发育率。

最近又有报道证实了维生素E也具有生物抗氧化作用，通过中和过氧化反应链形成的游离基和阻止自由基的生成使氧化链中断，从而防止细胞膜中脂质的过氧化和由此而引起的一系列损害。在胚胎培养液中添加培养100 $\mu$ mol/L维生素E观察对胚胎体外发育的影响。结果显示一定浓度的维生素E对胚胎发育也有促进作用。

生物活性物质如环氧化酶[25]和谷胱甘肽过氧化物酶[26]，大量的离子如钠离子、氯离子、镁离子、硫酸根离子和碳酸氢根离子等[27]都为早期胚胎提供了养分和适宜的发育环境。

## 6 培养基中添加细胞因子对胚胎体外发育的影响

胚胎发育的环境与其发育潜能关系密切。生理状态下，胚胎在雌性生殖道(输卵管或子宫)内完成种植前发育的全过程，在此过程中，母畜生殖道分泌的生长因子对附植前的胚胎发育起着重要的作用，如胰岛素、胰岛素样生长因子、表皮生长因子(EGF)等。这些生殖道细胞来源的旁分泌因子和胚胎本身的自分泌因子共同承担了促进胚胎发育的作用。在体外培养胚胎过程中，小鼠植入前胚胎存在表皮生长因子的受体，提示可能通过与受体结合进而参与对小鼠早期胚胎的发育调控。EGF是血清和卵泡液中都存在的生长因子，在无血清培养液中加入EGF能促进牛胚胎的发育，增

加蛋白质的合成和囊胚的孵化，但不增加囊胚中的细胞数量，有的研究则认为EGF的作用仅表现在促进孵化，也有研究发现EGF也能增加细胞数量[28]。同样的现象也见于小鼠，EGF能增加小鼠胚胎中蛋白质的合成及囊胚发育和孵化。

近年来，随着生殖医学的发展，各种因子在生殖过程中所起的作用越来越被人们所重视。在体外培养系统中各种因子与胚胎之间的相互作用和影响非常复杂。这是由于正常体内胚胎生长环境的复杂性和不断变化的各种因素所决定的。虽然不同的物种可表现出早期滞育但其引起的原因却有着极大的差别。有研究表明，在培养基中添加IGF-I与Insulin能有效的阻止细胞凋亡[29]，促进细胞的增殖，有研究证实，哺乳动物的子宫及输卵管中均含有胰岛素[30-31]，但Doherty等[32]发现小鼠早期胚胎不能合成胰岛素，提示胚胎在体外培养时，添加胰岛素对胚胎发育可能是非常必要的。Andreas等[33]研究表明，体外培养时，在培养基中添加胰岛素能够增加内细胞团的细胞数并且促进小鼠囊胚的形成，因而对胚胎的发育十分有利。白照岱等[34]也证实了在培养基中加入胰岛素能明显改善小鼠早期胚胎发育。

成纤维细胞生长因子（FGF）是阳离子多肽，最初由Gospodarowicz[35-36]从牛脑垂体和脑组织中分离得到，是体内分布最广泛的生长因子之一，分为碱性(bFGF)和酸性(aFGF)两大类。在胚胎培养过程中，胚胎能够分泌FGF，通过自分泌或旁分泌的方式作用于胚胎，使其发育良好。

## 7 培养方式对胚胎体外发育的影响

目前哺乳动物胚胎体外培养方式最常用的有传统的成组培养法[37]、微滴群体法（micro-drop）[38]和近年来新建立的 Well of the Well(WOW)法培养[39]、微流体培养法（micro-fluid）[40-41]等。

培养液体积的大小和培养液中胚胎的多少也会影响胚胎的体外发育，增加胚胎培养密度可以增加胚胎的发育能力。已经证实小鼠[42]、绵羊[43]、牛[44]的早期胚胎微滴群体培养可以显著提高胚胎的发育能力。杨智敏等[45]也证实多胚胎群体培养有利于小鼠早期胚胎的发育，这是因为胚胎通过自分泌和旁分泌产生多种生长类因子促进体外胚胎的发育。小鼠胚胎培养方式大多使用 4-12 枚/20ul[46]或 20-25 枚/50ul[47]。

## 8 培养基中添加抗氧化化合物对胚胎体外发育的影响

胚胎代谢过程产生的ROS能改变细胞内的一些分子，对胚胎的发育有阻滞或延迟效果，自然情况下，胚胎细胞有多种保护氧化作用的机制，卵泡或生殖道内有次牛磺酸、牛磺酸以及维生素C等物质，这些非酶性物质对胚胎发挥外部抗氧化效应。细胞内的抗氧化作用主要通过一些抗氧化酶来实现的，卵母细胞及胚胎细胞内都有过氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷氨酰半胱氨酸合成酶等物质的转录本的贮存，这些物质对胚胎的正常发育是不可缺少的[48]。

谷胱甘肽(GSH)是一种生物体内应用的抗氧化物。小鼠胚胎直到囊胚时才获得自

身合成GSH的能力，此前有两种来源的GSH被胚胎应用，一种是卵母细胞在生长成熟的过程合成的，可以满足受精后发育过程的需求；另一种是小鼠生殖道分泌的GSH，植入前胚胎会利用这些GSH对抗ROS，保护自己的发育。

## 9 培养基中的蛋白成分对胚胎体外发育的影响

蛋白质是细胞生长发育的必需成分，血清是胚胎培养中添加的主要蛋白质源物质，它在保持细胞的存活、促进生长、维持细胞pH及渗透压的稳定、增加细胞弹性及膜的完整性等方面都发挥着重要作用，但也有人反对使用血清，认为血清可引起未成熟囊胚的形成，改变胚胎的形成，干扰胚胎的超微结构和能量代谢，正因为如此，越来越多的学者认识到有必要采用白蛋白、聚乙烯醇（PVA）等来代替母血血清。

牛血清白蛋白(BSA)是培养液中常用的一种蛋白源物质，能结合培养液中的一些胚胎毒性物质，对胚胎有保护作用，同时也能增加胚胎中的细胞数量。单独使用BSA并不能完全取代血清的作用，而BSA与血清共同使用的情况下，BSA的加入则能促进胚胎的发育。

在有些研究中，大分子物质聚乙烯醇(PVA)可被用来代替BSA添加进培养液并能取得胚胎的发育。而PVA也可与柠檬酸钠和肌醇配合使用，取代血清及BSA在胚胎培养液中添加，并取得很好的培养效果。

采用白蛋白、聚乙烯醇(PVA)或透明质酸等更接近生理状态大分子的血清组成非常复杂，包括生长因子、激素、维生素、矿物质、细胞因子以及其他一些还未确定的物质。血清成分的多样性决定了它对胚胎的影响也是复杂多元的。

## 10 溶液渗透压对胚胎体外发育的影响

哺乳动物胚胎在体外培养的过程中其渗透压需要维持在一定的范围内，如果超出了这个范围，可能会导致胚胎发育受阻。体内输卵管液的生理渗透压为310 mOsM-360 mOsM[49-51]，而各种动物胚胎体外培养条件下所需要的渗透压各有不同，牛胚胎培养液的最佳渗透压为250 mOsM-270 mOsM[52]；猪体外受精胚胎在添加商品氨基酸的培养液最佳渗透压范围是270 mOsM-300 mOsM。

Hadi等[53]报道小鼠胚胎在渗透压为250 mOsM条件下的培养效果显著地优于310 mOsM，如果在渗透压为310 mOsM的胚胎培养液中添加甘氨酸，其就能拮抗过高的渗透压而导致的发育阻滞，改善胚胎的培养条件，提高胚胎的发育效果。

## 11 溶液pH值对胚胎体外发育的影响

胚胎培养液成份配方已有大量研究[54-59]，目前大多数培养液采用NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>缓冲系统，并借助5% CO<sub>2</sub>，维持5.5-6.5% CO<sub>2</sub>浓度以维持含25mmol/L碳酸盐培养液使培养液中[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]/[H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]比值接近20:1，以维持生理性pH(7.2-7.4)[60]。尽管小鼠胚胎可在比较广泛的PH范围(5.9-7.8)内从2-细胞发育到囊胚[61]，但是有研究表明，受精卵或者2-细胞小鼠胚胎短暂地暴露在较低PH溶液里，可以显著降低其发育到胚胎

的能力[62]。因此建议在现实的实验室条件下检测胚胎培养液的PH，使其达到理想的7.2-7.4的PH范围。卢丽华等[63]研究证实CO<sub>2</sub>浓度偏高至5.7%，对2-细胞小鼠胚胎体外发育已有较强的毒性作用。提示胚胎的发育异常与其酸中毒有关。当培养箱内CO<sub>2</sub>浓度升高，培养液中H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>也随之增高，若CO<sub>2</sub>浓度升高不大，胚胎有一定的自我代偿能力，可使K<sup>+</sup>由胚胎内移出，Na<sup>+</sup>和H<sup>+</sup>转入胚胎内，以微调胚胎周边培养液pH的降低，从而代偿性减轻胚胎酸中毒；若CO<sub>2</sub>浓度明显偏高，胚胎的代偿机制则难以调节培养液中[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]/[H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]比率的严重失调，使胚胎处于严重的高钾、低钠的酸性环境，同时还可使培养液中的有机成份如氨基酸等的溶解度和活性成份发生改变，胚胎在逆境发育，故而导致严重的发育异常。

## 12 其它因素

影响胚胎体外培养的因素有很多，除上述的多种影响因素外，配制培养基所使用的水质不同也往往会造成培养效果的差异。不同来源的培养皿，以及再次使用前的清洗方法都会造成胚胎培养效果的差异。刘忠华等[64]采用去离子水配制的CZB培养基，分别用进口新平皿和旧平皿及国产新平皿和旧平皿为培养器皿进行小鼠1细胞胚胎培养对比试验，结果表明进口新平皿与国产新平皿的4细胞发育率及囊胚发育率均无显著性差异；两者与旧平皿间的4细胞发育率和囊胚发育率均呈显著性差异；而进口旧平皿的4细胞发育率和囊胚发育率又均显著高于国产旧平皿的发育率。作者认为可能是由于现用的平皿清洗方法不够完善，致使平皿上的一些有害因子未能清洗掉，或者清洗过程本身又使平皿沾上了一些对细胞有害的因子，从而导致囊胚发育率下降。因此，进行胚胎培养一次性使用国产平皿是较为明智的。此外，不同的遗传背景、卵龄、精子龄等因素都会影响胚胎的体外发育。但随着我们对胚胎体外培养体系不断的研究，将来定能开发出类似于输卵管和子宫生理条件的培养体系，精确模拟胚胎发育的早期环境，为提高胚胎的发育率提供理论基础。

## 引 言

胚胎体外培养是胚胎体外生产的关键环节之一，随着动物胚胎工程相关技术如 IVF、SCNT、转基因等研究的深入，迫切需要更加完善和成分明确的胚胎 IVC 体系。目前哺乳动物体外胚胎培养所使用的培养液主要有两类：一类是各实验室经摸索而配制的简单的、化学成分明确的培养液，如 TALP、CZB、HECM-1、WM 等。另一类是复合型培养基即商品培养液，如 TCM199、DMEM、Ham'sF10 等[65]。上述两种培养液的都是模拟胚胎体内发育自然环境的基础上研制出的，由基础盐溶液、碳水化合物、无机离子、抗氧化剂和微量元素等组成，这些物质为哺乳动物早期胚胎发育提供了营养需求。目前，很多胚胎培养液中都含有血清成分，但是血清的添加可能会带来有毒物质对胚胎的毒害作用以及疾病的传播，因此人们开始将目光转向开发无血清的培养液。而在这种情况下，添加成分和含量明确的各种营养因子就显得很重要。

胚胎的发育环境与其发育潜能关系密切，在体外培养系统中，各种因子与胚胎之间的相互作用和影响非常复杂。EGF 是一种多肽类生长因子，能迅速聚集囊胚腔液，促使更多的胚胎孵化，使滋养层的蛋白质合成增加[66]，促使胚泡的发育和成熟。可提高小鼠体外培养胚胎的囊胚率[67]。

在体外培养哺乳动物早期胚胎时，几乎都会不同程度的发生体外发育阻断(in vitro block of development)现象[82]。如牛、羊发生在 8 细胞期，猪常见于 4 细胞期，而小鼠胚胎发育阻断常见于 2 细胞期。研究表明，通过调整胚胎培养基成分、改变培养基渗透压、添加促生长的细胞因子、变换胚胎培养气相环境等都可以不同程度地帮助小鼠胚胎克服发育阻断。

目前，小鼠胚胎体外培养气相通常采用 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气的混合气体，也有研究者使用 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 的气相环境。但是，目前为止，关于上述两种气相对小鼠胚胎发育孰优孰劣还存在很大的争议。一般认为，气相中氧分压接近于体内末梢循环时应该有助于胚胎的发育；而气相中氧分压较高时，可能会增加胚胎发育时活性氧的损伤，不利于胚胎发育。在本研究中，我们将首次尝试用呼出的肺气(Lung Air)，其气相组成更接近胚胎在输卵管、子宫内发育时末梢循环所提供的气相环境，进行早期胚胎体外培养。

本试验以 ICR 小鼠体内受精胚胎(原核胚)为试验材料，比较不同培养液和培养气相以及添加各种生长因子的培养效果。目的是为了寻找一种能有效支持 ICR 小鼠体外胚胎发育的培养体系，优化小鼠胚胎体外培养系统，为提高哺乳动物胚胎体外培养效率提供理论与试验依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验材料

实验动物：雌性和雄性清洁级ICR小白鼠，雌性小鼠为28~35日龄，250只；雄性小鼠为56日龄以上，32只。购自南京盛民科研动物养殖中心。

## 1.2 试剂和药品

TCM199 培养液 (Tissue culture medium199, Sigma, M-7653); 透明质酸酶 (Hyaluronidase, Hya; Sigma, H-3056); 石蜡油 (Mineral Oil, Sigma, M-8410); 孕马血清 (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin, PMSG; 中科院动物所); 人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, hCG; 宁波第二激素厂); 丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate; Sigma, P-2256); 青霉素钠 (Penicillin G; Sigma, P-3032); 链霉素 (Streptomycin Sulfate; Sigma, S-1277); 碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>, Sigma, S4772); 氯化钙 (CaCl<sub>2</sub>, Sigma, C4190); 氯化镁 (MgCl<sub>2</sub>, Sigma, M8266); 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma, A8806); 酚红 (Phenol Red, AMRESCO, 0648); 牛磺酸 (taurine, Tau, 上海化学试剂公司, 20011203)

## 1.3 主要仪器

倒置显微镜 (Nikon, TE300), 实体显微镜 (Olympus, TRPT-4045), CO<sub>2</sub> 培养箱 (SANYO MCO-15A, SANYO Electric Co. Ltd. Japan), 离心机 (TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂), pH 仪 (DELTA 320 型, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 显微图像管理系统 (HemaGSM-2000 型, 珠海黑马医学仪器有限公司)。

## 1.4 主要试剂与培养液配制

**pH 调整液:** 1M HCl 和 1M NaOH

**0.5%Hya:** 称取 20 mg 的透明质酸酶溶于 2 ml 的生理盐水中, 缓慢搅拌使之充分溶解后定容至 4ml, 过滤除菌后分装。

**小鼠胚胎培养液配方 (HTF):** 按表 1 配方配制, 配制完毕后过滤除菌, 置于 4℃ 保存。

**小鼠胚胎培养液配方 (CZB):** 按表 2 配方配制, 配制完毕后过滤除菌, 置于 4℃ 保存。

**小鼠胚胎培养液配方 (KSOM):** 按表 3 配方配制, 配制完毕后过滤除菌, 置于 4℃ 保存。

**孕马血清 (PMSG):** 将 1000 IU 的孕马血清促性腺激素溶于 10 ml 生理盐水中, 0.5 ml 离心管分装。置于 4℃ 保存。

**人绒毛膜促性腺激素 (hCG):** 将 1000IU 的人绒毛膜促性腺激素溶于 10ml 生理盐水中, 0.5 ml 离心管分装。置于 4℃ 保存。

表 1 HTF 胚胎培养液配制

Table 1 Formulation of HTF solution for embryo culture

成分 Ingredient	分子量 M Mol.	使用重量 g/L Weight
NaCl	58.45	5.93852
KCl	74.56	0.34968
CaCl <sub>2</sub>	147.20	0.22642
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.10	0.0506
MgSO <sub>4</sub>	246.50	0.02407
NaHCO <sub>3</sub>	84.02	2.10638
60%乳酸钙	112.10	1.8644(ml)
丙酮酸钠	110.00	0.0363
葡萄糖	198.17	0.55091
BSA	—	4.00
青霉素	—	0.06
链霉素	—	0.05
酚红	—	0.01

注：将配制的 HTF 胚胎培养液调整好 pH 值，滤菌后，保存于 4℃，两周内用完

Note: Check for pH of prepared HTF culture solutions, sterile-filter into a bottle, and store at 4℃ for two weeks.

表 2 CZB 胚胎培养液配制

Table 2 Formulation of CZB solution for embryo culture

成分 Ingredient	分子量 M Mol.	使用重量 g/L Weight
NaCl	58.45	4.7750g
KCl	74.56	0.3601
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.10	0.1606
MgSO <sub>4</sub> (单溶)	120.37	0.1420
NaHCO <sub>3</sub>	84.02	2.1101
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O(单溶)	147.20	0.2502
D-Glucose	180.16	1.000
Sodium lactate	112.10	5.3
Na Pyruvate	110.00	0.030
EDTA·2Na	—	0.040
Glutamine	—	0.15
Streptomycin(mg/ml)	—	0.70
Sodium Penicillin G (U/ml 或 mg/L)	—	0.06

注：将配制的 CZB 培养液调整好 pH 值，滤菌后，保存于 4℃，两周内用完

Note: Check for pH of prepared CZB culture solutions, sterile-filter into a bottle, and store at 4℃ for two weeks.

表 3 KSOM 胚胎培养液配制

Table 3 Formulation of KSOM solution for embryo culture

成分 Ingredient	分子量 M Mol.	使用重量 g/L Weight
NaCl	58.45	5.55
KCl	74.56	0.186
Sodium lactate	112.10	1.12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.10	0.0476
MgSO <sub>4</sub>	120.37	0.0244
NaHCO <sub>3</sub>	84.02	2.10
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.20	0.25
D-Glucose	179.86	0.036
Glutamine	—	0.146
EDTA	—	0.0038
BSA	—	1.00
MEM NEAA	—	5.0
MEM EAA	—	10.0
Sodium Penicillin G	—	0.06
Streptomycin	—	0.05
酚红	—	1.0

注：mKSOM: KSOM 中添加 EAA 和 NEAA; 将配制的 KSOM 胚胎培养液调整好 pH 值, 滤菌后, 保存于 4℃, 两周内用完

Note: KSOM Contain EAA and NEAA; Check for pH of prepared KSOM culture solutions, sterile-filter into a bottle, and store at 4℃ for two weeks.

## 1.5 小鼠超数排卵

选择28~35日龄, 体重大于25g的ICR雌鼠, 腹腔注射PMSG 10IU, 48h后腹腔注射hCG 10IU。选择56日龄以上, 体重大于30g的ICR雄鼠, 按照雌雄2:1的比例进行合笼, 次日清晨检查阴道栓, 有阴道栓的雌鼠于20~23h取卵母细胞-卵丘细胞复合体(COCs)。

## 1.6 小鼠原核胚的采集

注射 hCG 后 22h 左右的母鼠颈椎脱臼法处死, 酒精消毒后剪开腹腔, 沿卵巢端剪取输卵管, 子宫端沿子宫-输卵管结合部剪取, 输卵管放入盛有生理盐水的 35mm 的培养皿中, 转入实验室后, 将输卵管放入盛有洗卵液的 35mm 的培养皿中; 在体视显微镜下先找到输卵管膨大部, 使用 1ml 注射器划破膨大部, 轻轻挤压输卵管两端, 成团的卵母细胞-颗粒细胞复合体就会溢出。

## 1.7 小鼠原核胚的培养

取小鼠原核胚前做胚胎培养碟，50 $\mu$ L/滴或 25 $\mu$ L/滴，上覆盖石蜡油，置于二氧化碳培养箱内 37 $^{\circ}$ C 预热约 4 h。将成团的 COCs 取出放入 500 $\mu$ L HTF 液中，200 $\mu$ L 移液枪轻轻吹打 3~5 次，捡取脱光卵丘细胞的原核胚；没脱净的 COCs 转移到含有 25% 的 0.1% 透明质酸酶的 HTF 原液的小滴中，显微镜下观察卵丘细胞消化情况，待看到只剩下 2 层卵丘细胞时，迅速加入 200 $\mu$ L 的 HTF 培养液终止消化，200 $\mu$ L 移液枪轻轻吹打，待卵丘细胞全部脱落或只剩下 1 层卵丘细胞时，再移入胚胎培养碟中，20 个/50 $\mu$ L 或 10 个/25 $\mu$ L。5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度，37 $^{\circ}$ C 条件下进行培养。移入时记为 0h，24h 观察卵裂率，48h 观察 4 细胞率，72h 观察桑椹胚率，96h 观察囊胚率，120h 观察囊胚孵化率。

## 1.8 囊胚细胞染色计数

胚胎培养到囊胚阶段，收集囊胚，用 Hochest33342 对囊胚进行染色，在荧光显微镜下统计其囊胚细胞总数。具体染色步骤如下：

1.8.1 取出各组囊胚，在 DPBS 中洗涤 3 遍后，再用含 3.7% 多聚甲醛的 DPBS 固定 10 分钟。

1.8.2 将固定后的囊胚转移到含有 10 $\mu$ g/ml Hoechst33342 的 DPBS 中避光室温孵育 10 分钟。

1.8.3 染色结束后，将囊胚转移到载玻片上，尽量少带液体。

1.8.4 尽快盖上盖玻片，在实体显微镜下小心按压盖玻片进行封片。

## 1.9 试验设计

### 试验一 不同的培养基对小鼠原核胚体外发育的影响

将自然受精后的形态正常的小鼠原核胚随机分为三组，分别在 HTF、CZB 和 KSOM 中培养 120 h。观察小鼠原核胚的发育情况，统计分析不同组别的胚胎发育率，以及囊胚总细胞数。试验重复 8 次。

### 试验二 不同浓度 EGF 或 bFGF 的 KSOM 对小鼠原核胚体外发育的影响

自然受精后的形态正常的原核胚随机分为七组，分别在含有 1 $\mu$ g/ml EGF、5 $\mu$ g/ml EGF、10 $\mu$ g/ml EGF、0 $\mu$ g/ml EGF 和含有 100 $\mu$ g/ml bFGF、10 $\mu$ g/ml bFGF、0 $\mu$ g/ml bFGF 的 KSOM 培养液中培养 120h。观察小鼠原核胚发育情况，统计分析不同组别的胚胎发育率。试验分别重复 5 次和 7 次。

### 试验三 微孔培养系统(WOW)对小鼠原核胚体外发育的影响

自然受精后的形态正常的原核胚随机分为二组，分别用 WOW 法、成组培养法进

行培养。培养120 h后观察小鼠原核胚发育情况，统计分析不同组别的胚胎发育率。试验重复11次。

#### 试验四 不同的培养气相对小鼠原核胚体外发育的影响

自然受精后的形态正常的原核胚随机分为三组，分别在含有肺气（4% CO<sub>2</sub>、16% O<sub>2</sub>、78% N<sub>2</sub>、2% H<sub>2</sub>O 的混合气体）、5% O<sub>2</sub>（5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>和 90% N<sub>2</sub>的混合气体）、20% O<sub>2</sub>（20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>和 75% N<sub>2</sub>的混合气体）中培养 120 h。观察小鼠原核胚体外发育情况，统计分析不同组别的胚胎发育率。试验重复 9 次。

#### 1.10 胚胎发育判定标准[65] 见图 1。

**2 细胞：**卵裂球明显，大小对称一致，无碎片；

**4 细胞：**4 个卵裂球细胞连接紧密，细胞间对称均匀分布，无碎片；

**桑椹胚：**卵裂球细胞堆积在一起呈桑椹状；

**囊胚：**卵裂球细胞间致密结合，卵裂球细胞团中形成空腔，透明带变薄，胚胎扩张；

**孵化囊胚：**囊胚和透明带完全分离，并游离到透明带外。

#### 1.11 统计分析

采用 SAS8.1 软件 ANOVA 或 GLM 多因素对试验数据进行统计学分析， $P < 0.05$  差异显著， $P < 0.01$  差异极显著， $P > 0.05$  差异不显著

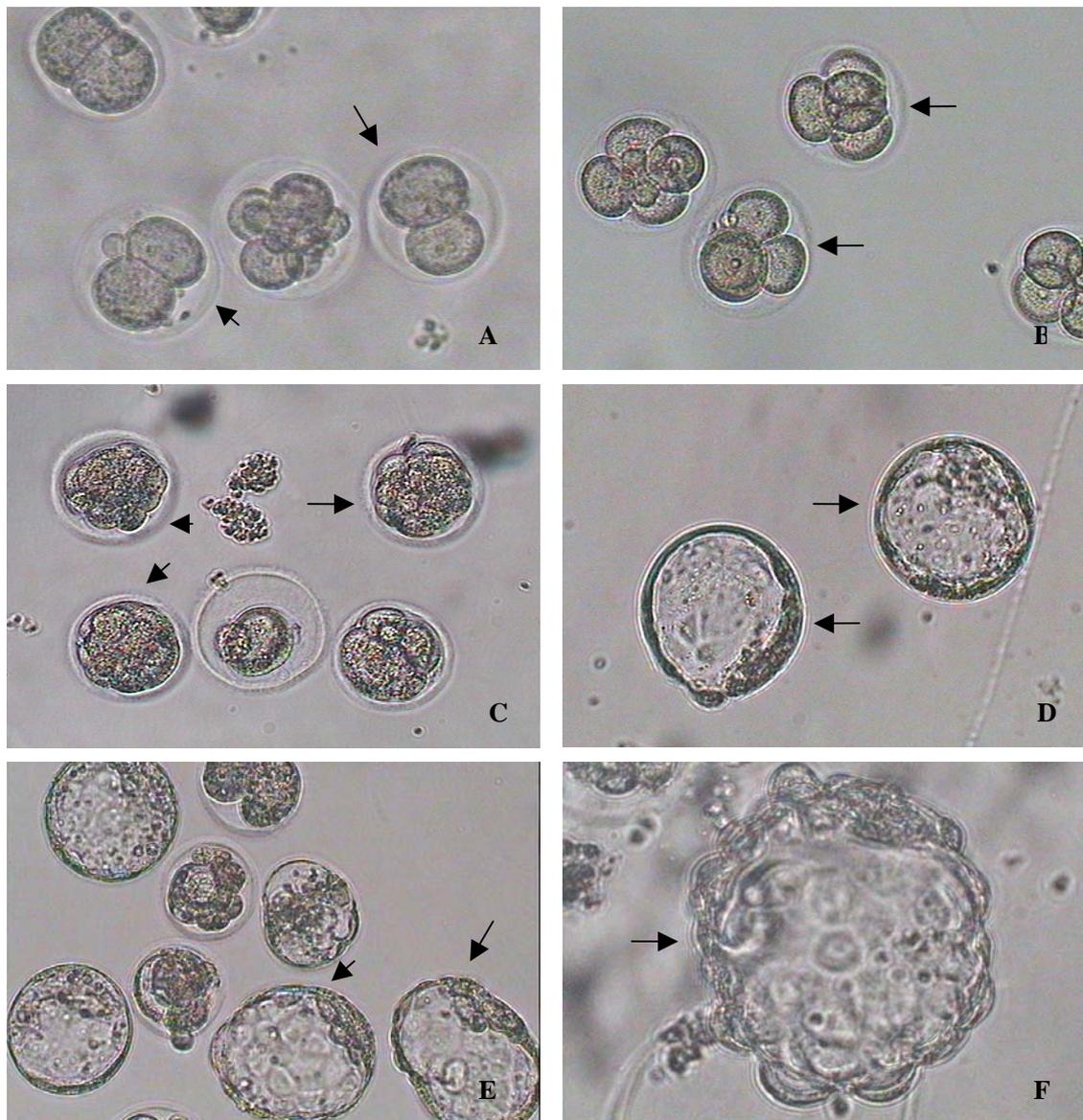


图1 体外培养条件下不同发育阶段的小鼠胚胎[65]

Figure 1 *In vitro* development of mouse embryos derived from oviduct

- A: 2 细胞胚胎,系图中箭头所指,培养 24 h;The arrows show the 2-cell embryo ( $\times 10$ ), 24 h after IVC.
- B: 4 细胞胚胎,系图中箭头所指,培养 48 h;The arrows show the 4-cell embryo ( $\times 10$ ), 48 h after IVC.
- C: 桑椹胚,系图中箭头所指, 培养 72 h; The arrows show the Morula ( $\times 10$ ), 72 h after IVC.
- D: 囊胚,系图中箭头所指, 培养 96 h;The arrows show the Blastocyst ( $\times 40$ ), 96 h after IVC.
- E: 正在孵化的囊胚,系图中箭头所指, 培养 108 h;The arrows show the Blastocyst hatched ( $\times 40$ ), 108h after IVC.
- F: 完全孵化的囊胚,系图中箭头所指, 培养 120 h.The arrow shows the hatched Blastocyst ( $\times 100$ ), 120 h after IVC.

## 2 结 果

### 2.1 HTF、CZB、KSOM 对小鼠原核胚体外发育影响

小鼠原核胚胎分别在 HTF、CZB、mKSOM 三组培养液中培养 120 h 后观察到的发育情况(表 4-1)。结果显示:(2) 三组培养液之间的卵裂率、囊胚率和囊胚总细胞数差异不显著 ( $P > 0.05$ )。mKSOM 组的卵裂率最高, CZB 组的囊胚率高于其它两组, 但是 HTF 组的囊胚总细胞数最多。结果表明, 上述三种胚胎培养液的培养效果无显著差异。

表 4-1 HTF、CZB 和 mKSOM 对小鼠胚胎体外发育影响

Table 4-1 The effect of HTF、CZB 和 mKSOM on the development of mouse embryos *in vitro*

分组 <sup>1)</sup>	培养数	重复数	卵裂数 <sup>2)</sup> (%)	囊胚数 <sup>3)</sup> (%)	囊胚总细胞数
Group	No.presumptive	No. replicates	( Mean±S.E.M)	( Mean±S.E.M)	(Mean±S.D)
	zygotes cultured		No.embryos cleaved(%)	No.blastocysts(%)	Total cell numberof blastocyst
mKSOM	444	8	313(74.1±5.6)	67(15.0±6.8)	66.4±21.7
HTF	348	8	221(64.3±7.3)	38 (8.1±4.9)	68.0±7.3
CZB	357	8	247(71.9±6.1)	86(19.9±7.7)	66.7±16.9

备注: <sup>1)</sup> mKSOM: KSOM 中添加 EAA 和 NEAA; <sup>2)</sup> 卵裂率=卵裂数/培养数; <sup>3)</sup> 囊胚率=囊胚数/培养数;

Notes: mKSOM:KSOM contain EAA and NEAA; cleavage rate = No.embryos cleaved / No.presumptive zygotes cultured; blastocyst formation rate= No.blastocysts / No.presumptive zygotes cultured.

### 2.2 不同 EGF 或 bFGF 含量的 KSOM 对小鼠原核胚体外发育的影响

小鼠原核胚在含有 1ng/ml EGF、5ng/ml EGF、10ng/ml EGF、0ng/ml EGF 和含有 100ng/ml bFGF、10ng/ml bFGF、0ng/ml bFGF 的 mKSOM 培养液中分别培养 120 h 后观察到的发育情况 (表 4-2、3)。

结果显示:(1) 添加 5ng/ml EGF 组的卵裂率稍高于 1ng/ml EGF、10ng/ml EGF 和 0ng/ml EGF 的 mKSOM 组 ( $P > 0.05$ ), 但是添加 10ng/ml EGF 组的囊胚率则稍高于 1ng/ml EGF、5ng/ml EGF 和 0ng/ml EGF 的 mKSOM 组 ( $P > 0.05$ )。 (2) 添加 100ng/ml bFGF 组的卵裂率稍高于 10ng/ml bFGF 和 0ng/ml bFGF 的 mKSOM 组 ( $P > 0.05$ ), 但是添加 10ng/ml bFGF 组的囊胚率则稍高于 100ng/ml bFGF 和 0ng/ml bFGF 的 mKSOM 组 ( $P > 0.05$ )。结果表明, 培养基 mKSOM 中添加上述浓度 EGF 或 bFGF 对小鼠原核胚的体外发育无显著性影响。

表 4-2 不同 EGF 含量的 KSOM 对小鼠胚胎体外发育影响  
Table 4-2 The effect of different EGF levels on the development of mouse embryos *in vitro*

分组 <sup>1)</sup>	培养数	重复数	卵裂数 <sup>2)</sup> (%)	囊胚数 <sup>3)</sup> (%)	囊胚总细胞数
Group	No.presumptive	No.replicates	( Mean±S.E.M)	( Mean±S.E.M)	(Mean±S.D)
	zygotes cultured		No.embryos cleaved(%)	No.blastocysts(%)	Total cell numberof blastocyst
1ng/mlEGF	131	5	84(69.0±10.1)	28(26.6±12.9)	62.5±19.9
5ng/ml EGF	140	5	102(73.2±5.9)	24(18.2±7.1)	51.0±9.7
10ng/ml EGF	162	5	109(72.2±8.1)	37(29.2±15.5)	54.8±15.4
对 照	141	5	95(69.0±4.8)	24(21.0±10.3)	62.7±5.9

备注：卵裂率=卵裂数/培养数；囊胚率=囊胚数/培养数。

Notes:cleavage rate = No. embryos cleaved /No. presumptive zygotes cultured; blastocyst formation rate= No.blastocysts / No.presumptive zygotes cultured.

表 4-3 不同 bFGF 含量的 KSOM 对小鼠胚胎体外发育影响  
Table 4-3 The effect of different bFGF levels on the development of mouse embryos *in vitro*

分组 <sup>1)</sup>	培养数	重复数	卵裂数 <sup>2)</sup> (%)	囊胚数 <sup>3)</sup> (%)
Group	No.presumptive	No.replicates	( Mean±S.E.M)	( Mean±S.E.M)
	zygotes cultured		No.embryos cleaved(%)	No.blastocysts(%)
100ng/ml bFGF	107	7	63(62.9±9.4)	25(23.6±7.8)
10ng/ml bFGF	102	7	59(59.0±8.9)	26(25.4±7.3)
对 照	105	7	59(61.0±10.1)	20(22.1±9.5)

备注：<sup>1)</sup>bFGF: 碱性成纤维细胞因子；<sup>2)</sup>卵裂率=卵裂数/培养数；<sup>3)</sup>囊胚率=囊胚数/培养数；

Notes: bFGF: basic fibroblast growth factors; cleavage rate = No.embryos cleaved / No.presumptive zygotes cultured; blastocyst formation rate= No.blastocysts / No.presumptive zygotes cultured.

### 2.3 微孔培养(WOW)对小鼠原核胚体外发育的影响

自然受精后的小鼠原核胚随机分为三组，分别进行 WOW 法、成组培养法培养，培养 120 h 后观察各组胚胎的发育情况（表 4-4、图 2）。

结果显示：（1）卵裂率水平上，WOW 系统高于对照组。但差异不显著 ( $P>0.05$ )；（2）囊胚率和囊胚总细胞数水平上，WOW 法显著高于对照组 ( $P<0.05$ )。结果表明，小鼠原核胚使用 WOW 法的培养效果较佳。

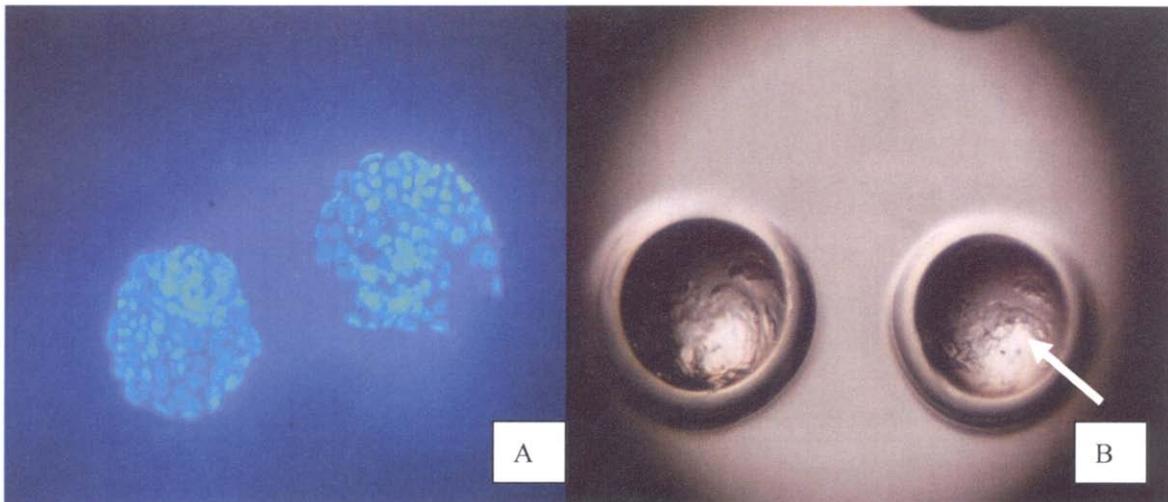


图 2 WOW 法培养的小鼠胚胎-囊胚期

Figure 2 *In vitro* development of mouse embryos use wow system-blastocyst

A: 囊胚,染色图片; A:The Picture show blastocyst that was contained

B: wow 法生产小鼠囊胚 (箭头所指; The Picture show blastocyst that was cultured by wow system (arrow pointing)

表 4-4 微孔培养体系(WOW)对小鼠原核胚体外发育的影响

Table4-4 The effect of WOW on the development of mouse embryos *in vitro*

分组 <sup>1)</sup>	培养数	重复数	卵裂数 <sup>2)</sup> (%)	囊胚数 <sup>3)</sup> (%)	囊胚总细胞数
Group	No.presumptive	No.	( Mean±S.E.M)	( Mean±S.E.M)	(Mean±S.E.M)
	zygotes cultured	replicates	No.embryos cleaved(%)	No.blastocysts(%)	Total cell number of blastoc:
WOW	120	11	111(93.6±2.4)	88(74.6±5.1) <sup>a</sup>	76.2±2.7 <sup>a</sup>
对照	120	11	101(83.2±4.8)	47(38.2±6.6) <sup>b</sup>	58.7±4.9 <sup>b</sup>

备注: 卵裂率=卵裂数/培养数; 囊胚率=囊胚数/培养数。同一栏内上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Notes: cleavage rate = No.embryos cleaved / No.presumptive zygotes cultured; blastocyst formation rate= No.blastocysts / No.presumptive zygotes cultured. Different superscripts in the same column denote significant difference ( $P<0.05$ )

## 2.4 不同的培养气相对小鼠原核胚发育的影响

自然受精后的原核胚随机分为三组, 分别使用肺气、5% O<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> 进行培养, 培养 120 h 后观察各组胚胎的发育情况 (表 4-5)。

结果显示: (1) 卵裂率水平上, 肺气组的 mKSOM 和 CZB 培养液培养的胚胎卵裂率差异不显著 ( $P>0.05$ ) 但都显著高于 HTF 组 ( $P<0.05$ ), 而且以 CZB 培养液组为最高; 5% O<sub>2</sub> 组的 mKSOM 培养液的效果最优。但是与其它两种差异不显著 ( $P>0.05$ ) 其它两组之间的培养效果差异也不显著; 20% O<sub>2</sub> 组的 mKSOM 培养液的效果最优。但是每组

之间差异都不显著 ( $P>0.05$ )。(2) 囊胚水平上, 肺气组的 CZB 培养液培养效果最优, 与 mKSOM 组差异不显著 ( $P>0.05$ ) 但显著高于 HTF 组 ( $P<0.05$ ); 5% O<sub>2</sub> 组的 CZB 培养液的效果最优。培养效果略高于 mKSOM ( $P>0.05$ ), 但是显著的高于 HTF 组 ( $P<0.05$ ); 20% O<sub>2</sub> 组的 CZB 培养液的效果最优。但是各组之间差异都不显著 ( $P>0.05$ )。综合上述表明, 5% O<sub>2</sub> 组的 mKSOM 培养液以及肺气组的 CZB 培养液的培养效果都最佳。

表 4-5 不同的培养气相对小鼠胚胎体外发育影响

Table 4-5 Different gas environment on the development of different periods mouse embryos *in vitro*

气相 <sup>1)</sup>	培养基 <sup>2)</sup>	培养数	卵裂数 <sup>3)</sup> (%)	囊胚数 <sup>4)</sup> (%)	总细胞数
Gas	Culture media	No.presumptive	( Mean±S.E.M)	( Mean±S.E.M)	(Mean±S.E.M)
phase		zygotes cultured	No.embryos cleaved(%)	No.blastocysts(%)	Total cell numberof blastocyst
肺气 (lung air)	mKSOM	108	67(63.2±5.8) <sup>a</sup>	9(6.7±5.1) <sup>bc</sup>	39.3±7.1 <sup>bc</sup>
	HTF	110	49(44.1±5.8) <sup>b</sup>	0(0.0±0.0) <sup>c</sup>	—————
	CZB	110	70(64.4±5.8) <sup>a</sup>	23(16.2±5.1) <sup>ab</sup>	53.8±3.3 <sup>a</sup>
5%O <sub>2</sub>	mKSOM	105	73(69.7±5.8) <sup>a</sup>	28(22.6±5.1) <sup>a</sup>	37.2±5.8 <sup>bc</sup>
	HTF	105	64(60.2±5.8) <sup>ab</sup>	10(6.7±5.1) <sup>bc</sup>	23.7±8.2 <sup>c</sup>
	CZB	105	64(59.7±5.8) <sup>ab</sup>	29(28.7±5.1) <sup>a</sup>	43.3±3.6 <sup>b</sup>
20%O <sub>2</sub>	mKSOM	114	68(59.7±5.8) <sup>ab</sup>	8(6.1±5.1) <sup>bc</sup>	66.8±7.1 <sup>a</sup>
	HTF	112	57(54.8±5.8) <sup>ab</sup>	4(2.8±5.1) <sup>bc</sup>	19.0±8.2 <sup>c</sup>
	CZB	125	77(57.9±6.2) <sup>ab</sup>	30(16.4±5.4) <sup>ab</sup>	49.7±5.3 <sup>ab</sup>

注: 卵裂率=2细胞数/原核胚数; 囊胚率=囊胚数/原核胚数。不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )

Notes: the rate of 2-cell embryos=No. of 2-cell embryos/ No. of 1-cell embryos; the rate of 4-cell embryos= No. of 4-cell embryos/ No. of 1-cell embryos; the rate of blastocyst formation=No. of blastocysts/ No. of 1-cell embryos. Different superscripts in the same column denote significant difference ( $P<0.05$ )

## 3 讨 论

### 3.1 HTF、CZB、KSOM 对小鼠原核胚体外发育的影响

哺乳动物胚胎体外发育受到很多因素的影响，其中培养基是个很重要的基础因素。目前，哺乳动物胚胎体外培养常用的培养液有HTF[68]、SOF[69]、KSOM[70]、CR1aa[71]、G1[69]、G2[72]和CZB[47]等，而小鼠胚胎体外培养使用的培养液主要有KSOM、CZB和HTF。尽管上述各种胚胎培养液都能支持哺乳动物胚胎的体外发育。但是，胚胎在体外培养液中仍然会出现一定程度的发育阻滞。刘忠华等[64]比较了用去离子水配制的Whitten、CZB、SOM 和KSOM 培养基培养体内取出的昆明小鼠1细胞胚胎的效果。结果发现，CZB 培养基中囊胚发育率极显著地高于其他3种培养基。结果说明，在昆明小鼠早期胚胎的培养中确实存在发育阻断现象，而CZB 培养基可以成功的克服昆明小白鼠胚胎早期的体外发育阻断。肖文伍等也比较了M16、G1、CZB三种培养基对胚胎从受精卵到囊胚的培养效果，结果显示在克服2细胞阻滞方面，M16效果最差，CZB效果最好。桑椹胚和囊胚的形成效率也以CZB最高，差异极显著。叶荣等[68]比较了M16、BWW、CZB和HTF四种小鼠胚胎体外培养基础液对小鼠自然受精胚发育的影响，发现在整个培养过程中，HTF的培养效果最佳。

很多研究结果表明，采用简单培养基能获得较高的囊胚发育率[73]，但得到的囊胚的冷冻存活率不及经复杂培养基培养获得的囊胚。简单培养基由几种常规无机盐类并添加能量底物如丙酮酸钠和葡萄糖组成，而复杂培养基则含有除这些成分以外的维生素、氨基酸、嘌呤、核苷酸及微量表面活性剂等诸多成分。

氨基酸在胚胎体外发育过程中起着非常重要的作用，这一点在其他哺乳类如绵羊[74]、猪[75]、和地鼠[76]上也已经得到证实。这些研究均表明氨基酸能够有效地提高受精卵的囊胚发育率、孵化率及囊胚细胞数。本实验中所用到的三种培养基中只有mKSOM中添加了氨基酸，而其获得的囊胚率也稍高于其它两组培养基，Lane和Gardner等[77]的研究也证实了氨基酸是早期胚胎细胞功能的主要调节者，通过调节胚胎能量生产方式促进囊胚腔的形成、滋养层细胞数量的增加及孵化率的提高。

在本试验中，三种培养基培养的胚胎其卵裂率、囊胚率和总细胞数之间均无显著性差异 ( $P>0.05$ )。但mKSOM组培养的囊胚率稍高于其它两组。上述实验结果说明在培养基中添加氨基酸可以提高小鼠自然胚在体外的培养效果。其机理可能在于，胚胎在形成囊胚的过程中，会吸收大量的氨基酸[78]，此时若是胚胎培养液中的氨基酸水平低就会影响囊胚的形成。适量的添加反而会提高培养效果。

### 3.2 不同浓度的 EGF 和 bFGF 对小鼠原核胚体外发育的影响

以往的研究证实,小鼠早期胚胎体外发育过程中,胚胎源性生长因子参与胚胎发育的自分泌调控,能使早期胚胎在简单培养液内发育至囊胚期。但仅靠这些内源性生长因子,胚胎生长缓慢,囊胚发育率低,囊胚细胞数少。由此可见,植入前胚胎的充分发育需来自母体生殖管道的额外分泌生长因子的参与。这些外源性生长因子的缺乏会阻碍胚胎发育。

EGF是一种多肽类生长因子,最初由小鼠颌下腺中分离出来,是由53个氨基酸组成的单链多肽,通过与胞膜上的受体结合,诱发胞内酪氨酸激酶区自身磷酸化,通过胞内一系列信号分子的介导作用,调控细胞增殖相关蛋白的转录,从而影响细胞的增殖与分化。

本实验首先于mKSOM培养基中分别添加了1ng/ml EGF、5ng/ml EGF、10ng/ml EGF、0ng/ml EGF和100ng/ml bFGF、10ng/ml bFGF、0ng/ml bFGF,然后对胚胎的体外发育状况进行观察。结果显示,添加5ng/ml EGF组的卵裂率最高,但与其它各组差异不显著( $P > 0.05$ )。而囊胚率则是添加10ng/ml EGF组稍高,但与其它各组差异也不显著( $P > 0.05$ )。可见,培养基中添加EGF有助于胚胎的体外发育,但效果不明显。白照岱等用添加0~100ng/ml EGF的CZB培养液对小鼠早胚进行体外培养,结果以添加0.1ng/ml浓度的培养基培养效果最为明显。在10ng/ml EGF的添加组不仅扩展囊胚率显著低于其他添加组,而且在大多数囊胚,即使是形态较好的囊胚都发现有较多细胞碎片。由此可见,当添加浓度过高时,它不仅可抑制胚胎的发育,而且可对胚胎细胞产生损害作用,提示本实验效果不明显的原因可能是添加的量稍高。该结果与Brice等人的实验结果基本相符。这说明,EGF在小鼠早胚体外发育中虽可参与对胚胎细胞分化的调节,但对胚胎细胞的增殖却无明显促进作用。

鉴于试验一中EGF的添加对小鼠胚胎体外发育没有促进作用,因此,试验二进一步研究了不同bFGF浓度的添加量对小鼠胚胎体外发育是否有影响。结果显示,添加100ng/ml bFGF组的卵裂率略高于10ng/ml bFGF和0ng/ml bFGF的KSOM组( $P > 0.05$ ),但是添加10ng/ml bFGF组的囊胚率则稍高于100ng/ml bFGF和0ng/ml bFGF的KSOM组( $P > 0.05$ )。说明添加不同浓度bFGF的mKSOM培养基对小鼠胚胎体外发育没有明显的促进作用。而有研究表明,在无蛋白质的培养基中添加碱性成纤维促进因子(bFGF)对兔胚泡发育有促进作用,而且认为添加bFGF能够克服阻滞,提高胚胎发育率[79]。这与本实验的结果不一致,原因可能有(1)物种、品系差异;(2)添加时机可能不恰当;(3)添加浓度不适宜。因此,尚需进一步研究bFGF对小鼠胚胎发育的真实作用。

### 3.3 不同培养方法对小鼠原核胚体外发育的影响

目前,关于提高胚胎体外培养效果方面,人们将重点关注的是胚胎培养液这一胚胎直接的生活环境,并不断尝试改变、丰富培养液成分,使得体外培养取得了一定的进步。但关注培养方法对胚胎的影响则比较少见。自2000年,Vajta等发明了新的培养方法——WOW培养法[39],人们逐渐将该法推广到人、猪胚胎的体外培养上,并取得了较为满意的效果。鉴于此前WOW法培养主要是针对无透明带(zona-free)的胚胎设计的,本文则尝试利用小鼠的有透明带的自然胚,与传统的群体培养法进行了比较,以确定WOW是否也对小鼠有透明带的胚胎体外培养有益?从表4-4可以看出,WOW培养法的小鼠囊胚率为 $74.6\pm 5.1\%$ ,显著优于传统微滴群体法( $38.2\pm 6.6\%$ )( $P<0.05$ );进一步证明了Vajta等人的研究结果。在囊胚总细胞数——衡量胚胎质量的指标之一方面,WOW培养法的囊胚细胞数为 $76.2\pm 2.7$ ,而对照组的为 $58.7\pm 4.9$ ;WOW组也显著高于对照组( $P<0.05$ ),上述结果表明WOW法的确能促进胚胎体外囊胚率形成率、提高囊胚质量。Lopes等认为由于胚胎置于WOW孔中所以很少的培养液(约 $0.04\mu\text{L}$ )置于胚胎附近,在这种情况下,胚胎自分泌的一些有利于胚胎发育的因子不易被稀释,这样,胚胎附近形成一个类似体内的微环境,有助于胚胎的发育[80]。本实验所得到的结果也是WOW法培养囊胚率最高,与上述观点一致。但也有部分相反的报道,同时也有大量的观点支持本实验的结果,认为WOW法可以获得良好的发育率。

胚胎在进行体外培养时,微滴方式培养有助于胚胎体外发育。而WOW法培养时,由于胚胎之间相互隔离,且每枚都位于WOW中,不但可以使胚胎分泌的一些因子不被稀释以自分泌方式作用于自身,还可以阻止有毒物质作用于正常胚胎从而得到良好的发育率。同时,胚胎代谢的有害物质很容易被稀释到WOW孔以外的培养液中[81]而且也避免了没有激活的卵母细胞或停止发育的胚胎对正常的胚胎负面作用[82-83]。WOW培养法缺点就是胚胎可能黏附在WOW孔壁上,这样很难从孔中分离出来。在培养液中添加适量的蛋白质,使其在孔壁上形成一层保护膜就可以避免上述情况的发生。

而共培养法则进一步模仿了体内环境,消除了一些毒害因素,提高了胚胎的质量和发育率。但是一些技术上和一些不确定不稳定因素,会使胚胎很容易污染。在群培养过程中适量的培养液和恰当的培养方法也有助于胚胎的发育,但是在群培养过程中,死亡的胚胎必然裂解一些有毒物质影响正常胚胎的发育。

### 3.4 不同的培养气相和培养基对小鼠原核胚发育的影响

在体外培养哺乳动物早期胚胎时,几乎都会不同程度的发生体外发育阻断(in

vitro block of development) 现象[84]。除培养基外，影响胚胎培养效果的因素还很多，其中培养气相也是一个很重要的因素。

目前，小鼠胚胎体外培养气相通常采用 5% CO<sub>2</sub> 和 95 % 空气的混合气体；另一种培养气相是 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 和 90% N<sub>2</sub> 的气体环境[15]，理论上，低氧可减少培养中自由基和活性氧 (ROS) 的形成，而活性氧对细胞有毒害作用，易造成 DNA 损伤和脂质过氧化反应[85]。有研究表明有的培养基在低氧环境下更有利于胚胎发育，而有些培养基在普通气相比较好。

本试验中对比了肺气 (4% CO<sub>2</sub>、16% O<sub>2</sub>、78% N<sub>2</sub>、2% H<sub>2</sub>O 的混合气体)、5% O<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> 三种培养气相的培养效果，结果表明 5% O<sub>2</sub> 的气相条件下的 mKSOM 培养液培养效果显著高于其它组，而其它两组的培养效果差异不显著。但肺气组的囊胚率稍高于 20% O<sub>2</sub> 组。实验结果说明低氧更有利于胚胎的体外发育，20% O<sub>2</sub> 组的囊胚率最低可能是由于氧气浓度过高所致。Orsi 和 Leese 报道将 O<sub>2</sub> 浓度从 20% 降低到 5% 可以增加小鼠胚胎的发育能力和细胞数目。尽管小鼠胚胎可以在较高浓度的 O<sub>2</sub> 条件下发育，但是低浓度生理性的 O<sub>2</sub> 环境更有利于胚胎的发育。这与本实验的 5% O<sub>2</sub> 组囊胚率最高、20% O<sub>2</sub> 组囊胚率最低的结果相符。Hoppe 和 Pitts[86] 报道 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 和 90% N<sub>2</sub> 的气体环境可以增加早期卵裂阶段胚胎的存活率。

除此之外，本实验中培养基 mKSOM 和 CZB 在支持小鼠原核胚发育时对气相具有不同的偏好性，mKSOM 偏好 5% O<sub>2</sub> 气相，而 CZB 适应性更广些，在三种气相下均能支持小鼠原核胚很好的发育，所以，CZB 也是小鼠体内原核胚体外发育时的理想培养基；肺气不仅能有效地支持小鼠原核胚体外发育而且还能够与 CZB 培养基协同起作用提高胚胎发育的质量。

## 4 结 论

选用 mKSOM 培养基，使用 WOW 法在含 5%氧气的气相条件下或者选用 CZB 培养基使用 WOW 法在肺气中的培养效果都比较好。

## 参考文献

- [1] Hammond J. Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1949, 163: 28~29
- [2] Brinster RL. A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* 1963, 32: 205~208
- [3] McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature*, 1958, 182: 877~878
- [4] 王艳玲, 曹云霞. 胚胎体外培养的研究进展. *国外医学妇幼保健分册*, 2004, 15(4): 219~222
- [5] 张利生, 陈大元. 克隆动物发育过程中基因组的重编程. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(6): 881~884
- [6] Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1956, 177:96
- [7] Yeung WSB, HoPe, Lai EYL, *et al.* Improved development human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum ReProd*, 1992, 7(8): 114~15
- [8] 日本 NAME 学会编. 哺乳动物的发育工程. 谢厚祥译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1986, 7~8
- [9] Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured ham ster embryos is caused by phosphate and glucose[J]. *Biol Reprod*, 1988, 39(6): 1183~1192
- [10] Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos[J]. *Biol Reprod*, 1989, (40) : 598~60
- [11] Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD *et al* . An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* [J]. *Reprod Fertil* , 1989, 86 : 679
- [12] Lawitts JA, Biggers JD. Culture of preimplantation embryos[J]. *Methods Enzymol* 1993, 225: 153~64
- [13] Erbach GB, Lawitts JA, Biggers JD *et al* . Differential Growth of the Mouse Preimplantation Embryo in Chemically Defined Media[J]. *Biology of reproduction*, 1994, 50: 1027~1033
- [14] Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE *et al.* Differential growth of the mouse preimplantaion embryo in chemically defined media[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50: 1027~33
- [15] Gopichandran N, Leese HJ. The effect of paracrine / autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 2006, 131(2): 269~277

- [16] Wang GJ, Hirotada T, Biqin F *et al.* Analysis of fatty acid contents in mouse embryo and reproductive tract fluid by gas chromatography. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 1999, 15(3): 151~156
- [17] Shaw JL, Smith CR, Diamandis EP. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. [J] *Proteome Res*, 2007, 6(7): 2859~2865
- [18] Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ *et al.* Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod*, 2008, 75(3): 496~503
- [19] Scott L, Whittingham DG. Influence of genetic background and media components On the development of mouse embryos in vitro. *Mol. ReProd Dev*, 1996, 43: 336~346
- [20] Quinn P, Horstman FC. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the Preimplantation embryo in vitro. *Human ReProd*, 1998, 13(Suppl.4): 173~183
- [21] Biggers JD, McGinnis LK. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development in vitro. *Hum. Reprod.* 2001, 16: 153~163
- [22] Hammer MA, Kolajova M, Léveillé M *et al.* Glycine transport by simple human and mouse embryos. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 419~426
- [23] Cho J, Park S, Chung H *et al.* Improved development of ICR mouse 2-cell embryos by the addition of amino acids to a serum-, phosphate-and glucose-free medium. [J] *Vet Med Sci*, 2002, 64(9): 797~801
- [24] Liu Z, Foote RH. Effects of amino acids on the development of in-vitro matured / in-vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum Reprod*, 1995, 10(11): 985~2991
- [25] Kodithuwakku SP, Miyamoto A, Wijayagunawardane MP. Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 2007, 133(6): 1087~1094
- [26] Rottmayer R, Ulbrich SE, Kölle S *et al.* A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, 2006, 132(4): 637~648
- [27] Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM *et al.* I on concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology*, 2007, 168(4): 538~548

- [28] Palasz AT, Thundathil J, Verrall RE *et al.* The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocyte and embryos in culture[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 58: 229~240
- [29] Dusan F, Gabika K, Pavol R *et al.* Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro[J]. *Theriogenology*, 2004, 61(4): 745~755
- [30] Rappolee DA, Werb Z. The role of growth factors in early mammalian development [J]. *Adv Dev*, 1994, 4(1): 411
- [31] Kapur S, Tamada H, Dey SK *et al.* Expression of insulin-like growth factor- I(IGF-I) and its receptor in the periimplantation mouse uterus, and Cell-specific regulation of IGF-1 gene expression by estradiol and Progesterone[J]. *Biol Reprod*, 1992, 46(2): 208~219
- [32] Doherty AS, Temeles GL, Schultz RM. Temporal pattern of IGF I expression during mouse preimplantation embryo genesis[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 37(1): 2126
- [33] Andreas Herrler, Claudia A, *et al.* Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis[J]. *Bio RePro*, 1998, 59:1302~1310
- [34] 白照岱, 刘凯, 邮鲁军. 胰岛素对小鼠早期胚胎体外发育的影响. *生殖医学杂志*, 2004, 13(5): 286~290
- [35] Gospodarowicz D. Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts [J]. *Nature*, 1976, 70(2): 395~405
- [36] Gospodarowicz D. Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor [J]. *Biol chem*, 1975, 81(17) : 5364~5368
- [37] Mulnard JG. Studies of the regulation of mouse ova in vitro. *Churchill*, 1965, 123~138
- [38] Raty S, Walters EM, Davis J, Zeringue H, Beebe DJ, Rodriguez-Zas SL *et al.* Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture. *Lab Chip* 2004, 4: 186~90
- [39] Vajta G, Peura TT, Holm P *et al.* New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well(WOW) system[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55: 256~64
- [40] Beebe DJ, Wheeler MB, Zeringue H *et al.* Microfluidic technology for assisted reproduction[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 125~136
- [41] Gomez-Sjoberg R, Leyrat AA, Pirone DM, Chen CS, Quake SR. Versatile, fully

- automated, microfluidic cell culture system. *Anal Chem* 2007, 79: 8557~8563
- [42] Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod*, 1992, 7(4): 558~562
- [43] Gardner DK, Lane M, Spitzer A *et al.* Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod*, 1994, 50(2): 390~400
- [44] Ferry L, Mermillod P, Massip A *et al.* Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, 1994, 42(3): 445~453
- [45] 杨智敏, 谭兵兵, 谭晓珊. 体外受精时程和胚胎培养方式对小鼠早期胚胎发育潜能的影响. *遵义医学院学报*, 2007, 30(2): 129~131
- [46] 王敏康, 张田, 王晓燕 等. 几种克服昆明小鼠22细胞胚胎发育阻滞的培养液研究. *动物学报*, 2000, 46(1):81~87
- [47] 肖文伍, 邹亚芬, 刘登华 等. 小鼠早期胚胎的体外培养研究. *华中科技大学学报*, 2003,6: 593~596
- [48] Guerin P, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings [J]. *Hum. Reprod. Update*. 2001, 7: 175~189
- [49] Li R, Whitworth K, Lai L *et al.* Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(9): 1228~1235
- [50] Van Winkle LJ, Haghghat N, Campione AL. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganics in oviductal fluid [J]. *Exp Zool*, 1990, 253: 215~219
- [51] Borland RM, Biggers JD, Lechene CP, Taymor ML. Elemental composition of fluid in the human fallopian tube[J]. *Reprod Fertil*, 1988, 58: 479~482
- [52] Liu Z, Foote RH. Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by in vitro fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media [J]. *Assist Reprod Genet*, 1996, 13(7):562~568
- [53] Hadi T, Hammer MA, Algire C *et al.* Similar effects of osmolarity, glucose, and

- phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females. *Biol Reprod*, 2005, 72(1): 179~187
- [54] Mognetti B, Leppens G & Sakkas D. The development of preimplantati on mouse parthenogenones *in vitro* in absence of glucose: influence of thematernally inherited components. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43(4): 421~427
- [55] Nureddin A , Epsaro E & Kiessling AA. Purines inhibit the development of mouse embryos *in vitro* [J]. *Reprod Fertil*, 1990, 90(2): 455~464
- [56] Antila E, Koskinen J, Niemela P & Saure A. Steroid metabolism by mouse p reimplantation embryos *in vitro*. *Experientia*, 1977, 33(10): 1374~1375
- [57] Devreker F, VandenBergh M , Biramane J, Winston RL , Englert Y & Hardy K. Effects of taurine on human embryo development *in vitro*. *Hum Reprod*, 1999, 14(9): 2350~2356
- [58] Davidson A, Vermesh M, Lobo RA & Paulson RJ. The temporal effects of changes in *in vitro* fertilizati on culture media on the one-cell mouse embryo system [J]. *In Vitro Fert Embryo Transf*, 1988, 5(3): 149~152
- [59] Bastias MC, McGee Belser ST, Bryan SH & Vasquez JM. *In vitro* deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F210 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. *Fertil Steril*, 1993, 60(5): 876~880
- [60] Gardner DK, Lane MW, Lane M. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst developmet and differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 57:256~261
- [61] Brinster RL. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1965, 110: 439~441
- [62] Scott LF, Sundaram SG, Smith S. The relevance and use of mouse embryo bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program. *Fertil.Steril.* 1993, 60: 559~568
- [63] 卢丽华, 朱伟杰. 不同高浓度CO<sub>2</sub>对2-细胞小鼠胚胎体外发育的影响. *生殖与避孕*, 2003, 23(3):135~137
- [64] 刘忠华, 谭景和, 贺桂馨. 小鼠1-细胞胚胎体外培养条件的研究. *解剖学报*, 1999, 30(4): 376~378
- [65] 孟祥辉. 氨基酸对小鼠胚胎体外发育的影响: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2002
- [66] Kane MT *et al.* The role of nutrients peptide growth factors and co-culture cells in

- development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, 1992, 38: 279~313
- [67] Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1990, 87: 4756~4760
- [68] 叶荣, 陈学进, 杨利国 等. 昆明小鼠早期胚胎体外发育阻滞原因分析. *中国兽医学报*, 2004, 24(4): 402~404
- [69] Krisher RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod*, 1999, 60(8): 1345~1352
- [70] Biggers JD, Summers MC, Ginnis LK. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Hum Reprod Update*, 1997, 3: 125~135
- [71] Rosenkrans CF, First NL. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 1991, 35: 266
- [72] Jones GM, Trounson AO, Gardner DK *et al.* Evaluation of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod*, 1998, 13: 169~177
- [73] Rorie RW *et al.* In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology*, 1994, 42(3):397~403
- [74] Gardner DK *et al.* Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod*, 1994, 50(2): 390~400
- [75] Rosenkrans Charles F *et al.* Pig blastocyst development in vitro is affected by amino acids. *Anim. Sci*, 1989, 67(6): 1503~1508
- [76] Gardner DK *et al.* Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Biol. Reprod*, 1993, 36(3): 313~319
- [77] Lane M *et al.* Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *Reprod.fert*, 1997, 14(7): 398~403
- [78] Booth PJ, Watson TJ, Leese HJ. Prediction of porcine blastocyst formation using morphological, kinetic and amino acid depletion and appearance criteria determined during the early cleavage of in vitro-produced embryos. *Biol Reprod*, 2007, 77: 765~

- [79] Hrabe de Angelis M , Grundker C, Herrmann BG *et al.* Promotion of gas t rulation by maternall growth factor incultured rabbit blastocysts[J]. Cell Tissue Res, 1995, 282(1) : 147~1541
- [80] Lopes A, Ottosen LDM, Greve T *et al.* Microsensor oxygen measurements around in-vitro developing cattle embryos:preliminary observations[J]. Theriogenology, 2003, 59: 345
- [81] Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse[J]. Biol. Reprod, 2003, 69: 1109~1117
- [82] Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K *et al.* Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of in-vitro fertilized mouse embryos[J]. Hum. Reprod, 1995, 10: 382~385
- [83] Jones GM, Trounson AO, Gardner DK *et al.* Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy[J]. Hum. Reprod, 1998, 13: 169~177
- [84] Yin , HL and XL. Chen Study on the oocyte maturation and fertilization *in vitro* of mouse. *Hereditas* (Beijing)1989, 11(3): 18~22
- [85] Orsi NM, Leese HJ. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: Role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. Mol. Reprod. Dev. 2001, 59: 44~53
- [86] Hoppe PC, Pitts S. Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol. Reprod, 1973, 8: 420~426

## 致 谢

值此论文即将完成之际，首先向导师陶勇副教授致以崇高的敬意和最诚挚的感谢！在三年的求学生涯中，陶老师兢兢业业的工作作风、严谨的治学态度、宽厚仁慈的为人、广博的学识以及对科研敏锐的洞察力和深邃的思维潜移默化地感染着我，使我受益终身。三年的耕耘和收获无不凝聚着导师辛勤的汗水，衷心感谢陶老师对我的辛勤培养、殷切教诲及生活上的关心照顾以及对我人生之旅的热情引导！

感谢章孝荣教授，在这三年中给我学习和实验上无微不至的关心和帮助，无论是在课题的选题，还是在研究的方向上都得到了章老师的支持。您严谨的治学态度和孜孜不倦的工作精神是我一生学习的楷模！

感谢张运海老师我实验最艰难的时候给予我无私的帮助，在他指导我这段时间，传授给了我一些先进的实验技术和方法，同时对我试验的内容给予了切切实实的建议，使我的试验得以顺利完成。

感谢曹鸿国老师和刘亚老师在实验方面给我细心的指导，并为我指点迷津，帮助我开拓研究思路，精心点拨、热忱鼓励，使我能在有限的时间内顺利完成学业。曹老师和刘老师无论在业务水平还是在科研态度上，都是我学习的榜样。

感谢李运生老师在试验过程中给予我的帮助，他象兄长一样时时关注着我的试验，及时帮我解决问题，尤其在仪器使用、试剂和耗材的订购方面。

已经毕业的师兄师姐在各行各业所做出的骄人成绩也一直是我这三年来乃至今后很长一段时间学习的榜样，是你们一直激励着我，给我树立了前进的方向。

感谢王琳、殷慧群博士在实验过程中给予的帮助。

感谢同窗白海、胡敏兰、程晋、张卫琴、薛奕杰、杨玉敏、张玉琴、马成勋、徐伟、朱亮、陈涛、侯文文、习海涛等三年来的亲密相处，他们在试验过程中和生活及学习上给予了我巨大的关心、帮助、支持和鼓励，和他们在一起让我感受到了大家庭的温暖，与他们在一起的时光永远是快乐和美好的。

感谢二年级的师弟师妹李丰银、宋锐、王磊、孙雪萍、王维、曹祖兵、陆文昊、阮崇美、蒲勇、丁彪、许金根、黄伟玲、王索路、张育军等在繁忙的学习之余毅然承担了实验室的基础工作，保证了实验的顺利进行。

感谢一年级的师弟师妹葛利、曹海峰、随刘才、冯颖、季索菲在实验、清洗、消毒各种实验器材方面的帮助，感谢宿舍的各位患难弟兄对我试验的理解，在生活和学习上给予我极大的支持，在一起生活的时间不是太长，但彼此兴趣相投，建立了深厚的友谊。

感谢研究生处和动物科技学院的各位领导老师默默无闻地为我们所作出的种种辛勤劳动。

最由衷的感谢留给培养我长大含辛茹苦的家人，是他们用最朴实最无私的关切，一直支持和鼓励我走过来，每每想到此，我深感拥有无尽的动力。

感谢多年来所有关心、支持和帮助过我的人。

七年了，我将离开这个培养我的母校----安徽农业大学，每每想到此，心情久久不能平静，农大的一草一木都已深深铭刻于心中。

寥寥数字，无以回报，谨以此篇文献上。衷心地感谢关心和帮助我的老师、同学和朋友，致以最诚挚的敬意和谢意！

## 个人简介

周世贤，女，汉族，1982年生于安徽省灵璧县，2002年考入安徽农业大学畜牧水产学院动物科学专业，2006年被免试就读安徽农业大学动物遗传育种与繁殖专业，师从陶勇副教授，从事动物胚胎工程方面的研究。

在读研究生期间，参加了安徽省科技攻关计划“肉山羊规模化高效健康养殖关键技术与示范”（06013112B），安徽省十五重大科技攻关专项--“牛、羊胚胎工程产业化技术研究”（项目编号：01603006），安徽省十五科技攻关二期专项--“牛羊胚胎移植工程技术产业化”（项目编号：04003005），安徽省自然科学基金（项目编号：050410202）、安徽省教育厅自然科学基金(项目编号：2005KJ176)、国家自然科学基金（项目编号：30600432）和安徽省优秀青年科技基金（项目编号：06041081），并辅助导师做了大量的工作。

### 在读期间发表的学术论文：

- 1、周世贤，陶勇，杜文鹏，张志忠，易刚，王根红. 松鼠猴血液生理指标的测定. 野生动物杂志，2008，29（2）：72~73
- 2、孟祥辉，陶勇，张志忠，易刚，王根红，周世贤，丁建平. 黑鹿睾丸及精子的形态学观察. 动物学杂志，2008，43（4）：122~126