

# 不同电激活参数及 CB 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响

石俊松<sup>1</sup>, 罗绿花<sup>1</sup>, 周 荣<sup>1</sup>, 周 秀<sup>1</sup>, 麦然标<sup>1</sup>, 李紫聪<sup>2</sup>, 吴珍芳<sup>2</sup>

(1 广东温氏食品集团有限公司研究院, 广东 新兴 527439;

2 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**从猪卵巢上获取的卵母细胞经体外培养成熟 42~44 h 后去除颗粒细胞, 选取成熟的卵母细胞进行孤雌激活培养. 试验采用不同的场强、脉冲时程和脉冲次数进行对照试验, 并比较了细胞松弛素 B (CB) 辅助激活对孤雌胚胎发育的影响. 结果显示: 1) 当场强为  $0.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 选取 4 个脉冲时程 (80、100、120、140  $\mu\text{s}$ ) 参数分别进行 1 次、2 次脉冲激活时, 100  $\mu\text{s}$ 、1 次脉冲囊胚率最高, 为  $(42.22 \pm 5.38)\%$ , 但同其他组无显著差异 ( $P > 0.05$ ). 2) 脉冲时程为 100  $\mu\text{s}$ , 选取 4 个场强 ( $0.8, 1.0, 1.2, 1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) 参数分别进行 1 次、2 次脉冲激活时,  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、1 次脉冲囊胚率最高, 为  $(44.04 \pm 0.68)\%$ , 但同其他组无显著差异 ( $P > 0.05$ ). 3) 场强为  $0.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  和  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 选取 4 个脉冲时程 (80、100、120、140  $\mu\text{s}$ ) 进行 1 次脉冲激活时,  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1} + 80 \mu\text{s}$  组囊胚率  $(54.60 \pm 2.86)\%$  均高于其他组, 且极显著高于  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1} + 140 \mu\text{s}$ 、 $0.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1} + 80 \mu\text{s}$  和  $0.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1} + 140 \mu\text{s}$  组 ( $P < 0.01$ ). 4) 用  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、80  $\mu\text{s}$ 、1 次脉冲激活卵母细胞后, 使用 CB 辅助激活 4 h 的囊胚率为  $(54.07 \pm 3.12)\%$ , 极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于不使用 CB 组. 以上结果说明, 电激活中脉冲次数对猪孤雌胚胎发育无显著影响, 且在本试验条件下, 采用  $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  的场强、80  $\mu\text{s}$  的脉冲时程, 并使用 CB 辅助激活 4 h, 能够得到较高囊胚率的猪孤雌激活效率.

**关键词:**猪卵母细胞; 囊胚率; 孤雌激活

中图分类号: S814.8

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0388-05

## Effects of Different Electrical Stimulation Parameters and Cytochalasin B Treatment on Parthenogenetical Development of Porcine Oocytes

SHI Jun-song<sup>1</sup>, LUO Lü-hua<sup>1</sup>, ZHOU Rong<sup>1</sup>, ZHOU Xiu<sup>1</sup>, MAI Ran-biao<sup>1</sup>,  
LI Zi-cong<sup>2</sup>, WU Zhen-fang<sup>2</sup>

(1 Guangdong WENS Foodstuff Group Limited Company Research Institute, Xinxing 527400, China;

2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Oocytes were collected from porcine ovaries, cultured *in vitro* for 42–44 h, and cumulus cells were removed from oocytes. Matured oocytes were selected for parthenogenetical activation. The effect of different field strengths (FSs), pulse durations (PDs), electrical pulse numbers (EPNs), and the influence of cytochalasin B treatment on development of parthenogenetically activated porcine oocytes were investigated. In the first experiment, 4 different PDs (80, 100, 120, 140  $\mu\text{s}$ ) were applied with a single or two  $0.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  pulse(s) to activate the oocytes. The results showed that a single 100  $\mu\text{s}$  pulse of  $0.8 \text{ kV/cm}$  resulted in the highest blastocyst rate of  $(42.22 \pm 5.38)\%$ , but it was not statistically different from the blastocyst rates of other groups ( $P > 0.05$ ). In the second experiment, 4 different FSs ( $0.8, 1.0, 1.2, 1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) were used with a single or two 100  $\mu\text{s}$  pulse(s) to stimulate the oocytes. The

收稿日期: 2011-11-02

作者简介: 石俊松 (1981—), 男, 硕士; 通信作者: 吴珍芳 (1970—), 男, 教授, 博士, E-mail: wzfemail@163.com

基金项目: 国家科技重大专项 (2011ZX08006)

highest blastocyst rate [ (44.04 ± 0.68)% ] was observed in the group applied with single 100 μs pulse of 1.4 kV · cm<sup>-1</sup>, but it was not statistically different from the blastocyst rates of other groups (*P* > 0.05). In the third experiment, 4 different PDs (80, 100, 120, 140 μs) were used with a single 0.8 kV · cm<sup>-1</sup> or 1.4 kV · cm<sup>-1</sup> pulses to activate the oocytes. The blastocyst rate of the group treated with a single 80 μs pulse of 1.4 kV · cm<sup>-1</sup> reached (54.60 ± 2.86)%, which was significantly higher than that of other groups (*P* < 0.01). In the fourth experiment, one group of oocytes was stimulated only by a single 80 μs pulses of 1.4 kV · cm<sup>-1</sup>, while the other groups was activated with a single 80 μs pulses of 1.4 kV · cm<sup>-1</sup> followed by 4 h-cytochalasin B treatment. The results indicated that the blastocyst rate of the latter group was (54.07 ± 3.12)%, significantly higher than that of the former group (*P* < 0.01). The above results suggested that EPN had no significant effect on parthenogenetical development of porcine oocytes, and 4 h-cytochalasin B treatment to the oocytes after the electrical stimulation by a single 80 μs pulses of 1.4 kV · cm<sup>-1</sup> resulted in a high parthenogenetical blastocyst rate.

**Key words:** porcine oocyte; blastocyst rate; parthenogenetical activation

孤雌生殖(Parthenogenesis)一词最早由Owen提出,是指有性生殖的动物卵母细胞不经过精子的受精作用而被激活,并开始胚胎发育的无性生殖过程。随着哺乳动物细胞核移植研究的开展,卵母细胞孤雌激活的研究开始系统化,特别是1997年“多莉”羊的产生,体细胞核移植技术的成功,作为核移植关键步骤的卵母细胞激活引起更多研究者的重视,促使该领域的研究进入了新的阶段<sup>[1]</sup>。哺乳动物的卵母细胞可以通过多种方式进行激活,目前常用的方法有物理激活、化学激活、生物激活及其相互的联合激活,其中电刺激是最常用的物理激活方法,其原理是卵母细胞在短暂高压直流电脉冲的作用下,膜上磷酸二酯双分子结构的稳定性发生改变,导致膜上形成可恢复的微小孔洞,使膜外Ca<sup>2+</sup>进入膜内促使胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,从而引起卵母细胞的激活,有关这方面的研究已在小鼠<sup>[2]</sup>、兔<sup>[3]</sup>和牛<sup>[4]</sup>上有过报道。细胞松弛素B(Cytochalasin B, CB)可破坏细胞的微管系统,在卵母细胞激活时可抑制第二极体排出,形成二倍体孤雌胚胎。而在孤雌激活中,二倍体孤雌胚胎比单倍体发育能力强,因此常用CB来提高二倍体胚胎比例<sup>[4]</sup>。猪卵母细胞的激活是体细胞核移植技术的关键环节。目前,猪的体细胞克隆效率较其他动物低,除了由于其卵母细胞体外培养质量较差外,人工激活效率不高也是一个主要原因<sup>[5-6]</sup>。因此通过对猪卵母细胞激活方法的研究,可以为猪体细胞克隆效率的提高提供理论和技术支持。本试验目的是建立一种高效的猪卵母细胞孤雌激活方法,为克隆胚胎的激活提供依据,通过对不同电场强度、不同脉冲时程以及不同脉冲次数的对比试验,寻求最佳的参数组合,并对电激活和化学激活的共同作用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与培养液

TCM-199粉剂和Dulbecco's磷酸缓冲液(DPBS)粉剂为Gibco生物化学公司产品,其余化学药品及配制试剂用水如无特殊说明均为Sigma生物化学公司产品。成熟培养液为添加体积分数10%猪卵泡液的改良TCM-199液,猪卵泡液的制备见Yong等<sup>[7]</sup>的报道;洗卵液为DPBS + PVA液。电激活液采用0.3 mol/L甘露醇 + 0.05 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,胚胎培养液为PZM-3培养液,CB辅助激活液为含有5 μg/mL CB的胚胎培养液。

### 1.2 猪卵母细胞的收集及体外成熟培养

从屠宰场获取的卵巢放入37℃左右加有抗生素的生理盐水内,5 h内运回实验室,然后用加有抗生素的生理盐水冲洗3遍,用配有18 G针头的10 mL注射器抽取2~6 mm的卵泡,在体视显微镜下用自制捡卵针捡取卵丘-卵母细胞复合体(COCs),用洗卵液洗3遍后,再用成熟培养液洗2遍,然后放入已在二氧化碳培养箱内平衡4 h以上的成熟培养液中,在39℃、体积分数为5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中成熟培养42~44 h。

### 1.3 成熟卵的孤雌激活及体外培养处理

将成熟培养后的卵母细胞与1 mg/mL透明质酸酶混合,用移液枪反复吹打除去卵丘细胞,以胞质均匀、第一极体排出为成熟标志挑选出成熟的卵母细胞,用激活液洗6遍后转到已铺满激活液的融合槽上,经不同参数的电刺激后,将所有的卵母细胞用胚胎培养液洗3遍,直接培养或者用CB辅助激活液处理4 h后转入到培养液中培养。激活当天计为0 d,第

2天观察并记录卵裂数,第6天观察并记录囊胚数.

## 1.4 试验设计

1.4.1 脉冲时程和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响 猪体外成熟卵母细胞随机分成8组,设4个脉冲时程参数:80、100、120、140  $\mu\text{s}$ ,每个参数分别进行1次和2次脉冲,电场强度(简称场强,下同)全部采用 $0.8\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的参数,激活后的卵母细胞放入CB辅助激活液中处理4 h,然后转入四孔板培养.试验重复4次.

1.4.2 场强和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响 猪体外成熟卵母细胞随机分成8组,设4个场强参数:0.8、1.0、1.2、1.4  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,每个参数分别进行1次和2次脉冲,脉冲时程全部采用100  $\mu\text{s}$ 的参数,其余同1.4.1.

1.4.3 场强和脉冲时程对孤雌胚胎发育的影响 猪体外成熟卵母细胞随机分成8组,场强设2个参数:0.8和1.4  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,分别进行80、100、120、140  $\mu\text{s}$ 脉冲时程的激活,脉冲次数一律为1次,其余同1.4.1.

1.4.4 CB对孤雌激活胚胎发育的影响 将猪体外成熟卵母细胞进行电激活后(参数为 $1.4\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,80  $\mu\text{s}$ ,1次脉冲),随机分成2组,一组直接放入胚胎培养液中培养,一组放入CB辅助激活液中处理4 h,然后转入培养液中培养.试验重复4次.

## 1.5 统计分析

为减少误差,所有试验均在相同季节、相同卵巢来源的情况进行,试验数据的结果以平均数 $\pm$ 标准误差表示,利用SPSS软件进行单因素方差(ANOVA)分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 脉冲时程和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响

在本试验中,场强采用 $0.8\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,脉冲时程分别为80、100、120、140  $\mu\text{s}$ ,分别进行1次和2次脉冲,1次脉冲4个不同脉冲时程的囊胚率分别是 $(33.49\pm 2.83)\%$ 、 $(42.22\pm 5.38)\%$ 、 $(34.29\pm 4.59)\%$ 、 $(31.91\pm 2.93)\%$ (操作卵母细胞数 $n$ 均为100个),2次脉冲4个不同脉冲时程的囊胚率分别是 $(35.30\pm 1.74)\%$ 、 $(41.20\pm 2.41)\%$ 、 $(38.42\pm 1.20)\%$ 、 $(30.08\pm 1.02)\%$ 、 $(n=128)$ .如图1所示,不论是1次脉冲还是2次脉冲,当脉冲时程为100  $\mu\text{s}$ ,囊胚率均高于其他组,但差异均不显著,4个脉冲时程1次与2次脉冲之间差异也均不显著.

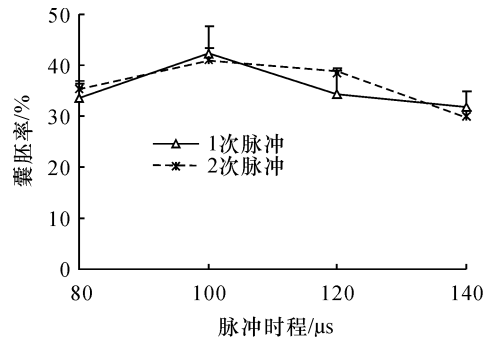


图1 脉冲时程和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响

Fig. 1 Effects of different pulse durations and electrical pulse numbers on parthenogenetical development of porcine oocytes

### 2.2 场强和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响

在本试验中,脉冲时程采用100  $\mu\text{s}$ ,场强分别为0.8、1.0、1.2、1.4  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,分别进行1次和2次脉冲,1次脉冲4个不同场强的囊胚率分别是 $(32.97\pm 5.89)\%$ 、 $(40.98\pm 2.94)\%$ 、 $(42.33\pm 1.35)\%$ 、 $(44.04\pm 0.68)\%$ 、 $(n=98)$ ,2次脉冲4个不同场强的囊胚率分别是 $(38.53\pm 6.54)\%$ 、 $(28.10\pm 4.14)\%$ 、 $(35.89\pm 5.55)\%$ 、 $(39.18\pm 8.03)\%$ 、 $(n=109)$ .如图2所示,不论是1次脉冲还是2次脉冲,当场强为 $1.4\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,囊胚率均高于其他组,但差异不显著,4个场强1次与2次脉冲次数之间差异也均不显著.

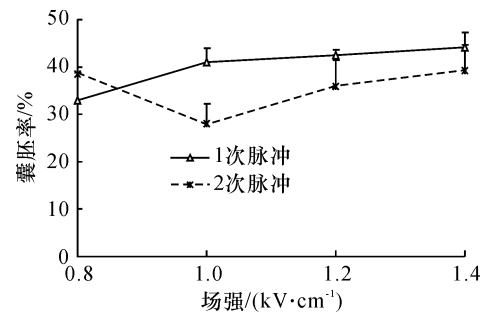


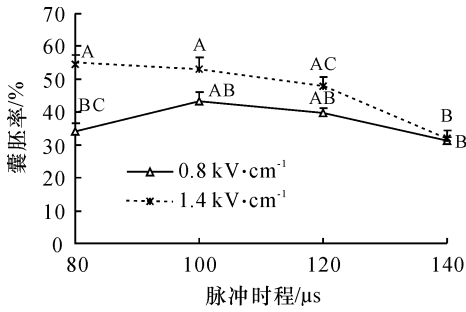
图2 场强和脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响

Fig. 2 Effects of different field strengths and electrical pulse numbers on parthenogenetical development of porcine oocytes

### 2.3 场强和脉冲时程对孤雌胚胎发育的影响

在本试验中均采用1次脉冲,当场强为 $0.8\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,4个脉冲时程参数(80、100、120、140  $\mu\text{s}$ )的囊胚率分别为 $(34.17\pm 2.32)\%$ 、 $(43.20\pm 3.04)\%$ 、 $(39.77\pm 1.40)\%$ 、 $(31.22\pm 1.19)\%$ 、 $(n=98)$ ;当场强为 $1.4\text{ kV}/\text{cm}$ ,4个脉冲时程参数(80、100、120、140  $\mu\text{s}$ )的囊胚率分

别为(54.60 ± 2.86)% (n = 100)、(53.13 ± 3.44)% (n = 103)、(47.71 ± 2.84)% (n = 100)、(32.17 ± 2.31)% (n = 101)。如图3所示,当场强为1.4 kV/cm,4个脉冲时程的囊胚率均高于0.8 kV·cm<sup>-1</sup>,且脉冲时程为80 μs时囊胚率均高于其他组,极显著高于140 μs(场强参数为0.8和1.4 kV·cm<sup>-1</sup>)和80 μs(场强参数为0.8 kV·cm<sup>-1</sup>)组(P < 0.01)。



图中同一脉冲时程,凡标有一个相同大写字母者为差异极不显著(P > 0.01, Duncan's 法)。

图3 场强和脉冲时程对孤雌胚胎发育的影响<sup>1)</sup>

Fig.3 Effects of different field strengths and pulse durations on parthenogenetical development of porcine oocytes

### 2.4 CB处理对孤雌胚胎发育的影响

由表1可以看出,猪卵母细胞电激活后用CB处理4h后,与对照组相比,卵裂率差异不显著(P > 0.05),但囊胚率(54.07 ± 3.12)%极显著高于对照组(27.53 ± 4.60)% (P < 0.01)。说明卵母细胞电激活后用CB处理对孤雌胚胎囊胚率的提高有极显著的作用。

表1 CB处理对孤雌胚胎发育的影响<sup>1)</sup>

Tab.1 Effects of CB treatment on parthenogenetical development of porcine oocytes

CB辅助激活	卵母细胞数/个	卵裂率/%	囊胚率/%
CB处理组	411	71.32 ± 5.24A	54.07 ± 3.12A
对照组	437	74.33 ± 3.86A	27.53 ± 4.60B

1) 同列数据后凡具有一个相同大写字母者为差异极不显著(P > 0.01, Duncan's 法)。

## 3 讨论

### 3.1 脉冲次数对孤雌胚胎发育的影响

卵母细胞膜上的微孔大小受电场强度、脉冲时程、脉冲次数、电激活液类型等条件的影响,其中1次电刺激只能引起卵母细胞胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度1次升高,多次电刺激可诱导胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度多次升高<sup>[4,8]</sup>。因此Collas等<sup>[4]</sup>提出控制Ca<sup>2+</sup>浓度变化的频率,即控制脉冲次数,对卵母细胞的孤雌发育尤为重

要,但实际试验中脉冲次数对猪孤雌胚胎发育的影响,研究结果也各不相同。刘国世等<sup>[9]</sup>研究表明,增加脉冲次数并不能提高卵子激活后的发育效率;Prochazka等<sup>[10]</sup>认为1次脉冲只是略优于多次脉冲效果,但差异不显著;Onishi等<sup>[11]</sup>认为1次脉冲刺激比用多次脉冲卵母细胞的囊胚发育率要高。而Nagashima等<sup>[12]</sup>发现通过2次电脉冲刺激,卵母细胞卵裂率要高于单次电脉冲。在本试验中,采用0.8 kV·cm<sup>-1</sup>、100 μs和1.4 kV·cm<sup>-1</sup>、100 μs参数时,1次脉冲的囊胚率均高于其他组,但差异不显著,与张德福等<sup>[13]</sup>、吴中红等<sup>[14]</sup>、Lee等<sup>[15]</sup>的研究结果相同,说明脉冲次数对于孤雌激活影响并不显著。

### 3.2 场强和脉冲时程对孤雌胚胎发育的影响

场强和脉冲时程是电激活卵母细胞的两个重要的参数。Zimmermann<sup>[16]</sup>研究发现,场强和脉冲时程之间存在互补的关系,即降低场强,则需要延长脉冲时间来弥补。在本试验中,当采用1.4 kV·cm<sup>-1</sup>的场强时,随着脉冲时程的增加(80 ~ 140 μs),囊胚率逐渐降低;而采用0.8 kV·cm<sup>-1</sup>的场强时,随着脉冲时程的增加(80 ~ 140 μs),囊胚率先上升后下降,说明脉冲时程和场强之间的确存在互补的关系,且当场强较大时,增加脉冲时程反而会不利于胚胎的发育。研究认为<sup>[3,10,15]</sup>,较强的电刺激可以引起较多的Ca<sup>2+</sup>内流,从而使胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度升高更多,使卵母细胞更易激活。但是电刺激过强时,也会对卵母细胞造成三方面的伤害,一是会破坏膜的结构,导致卵母细胞死亡;二是过高浓度的Ca<sup>2+</sup>也易导致染色体解离,出现染色体和核的不正常构建,导致胚胎发育率下降;三是过强的电刺激会使胞质内蛋白质受到损伤,不利于胚胎发育。因此选择合适的场强和脉冲时程参数对胚胎发育至关重要。

且本试验采用1.4 kV·cm<sup>-1</sup>的场强,脉冲时程为80 ~ 140 μs时,其囊胚率均高于0.8 kV·cm<sup>-1</sup>,说明在猪孤雌激活中,在一定范围内场强对胚胎发育的影响要大于脉冲时程。这与Prochazka等<sup>[10]</sup>的报道结果相一致,其猪体外成熟卵母细胞在单次脉冲,脉冲时程为30或100 μs时,1.35 kV·cm<sup>-1</sup>场强的激活率均显著高于0.6 kV·cm<sup>-1</sup>,但其未进一步对胚胎发育进行研究。

### 3.3 CB处理对猪孤雌胚胎的影响

采用单一电脉冲激活的卵母细胞孤雌发育胚胎,大部分为单倍体,而单倍体胚胎的发育能力明显低于二倍体<sup>[4]</sup>。CB能够破坏细胞分裂环的形成,抑

制卵母细胞极体的形成和染色体的排出,所以孤雌激活后的卵母细胞经CB处理后抑制了第二极体的排出,得到了高比例的二倍体胚胎,提高了其发育能力。

因此为了提高卵母细胞孤雌发育效率,研究人员常将电脉冲激活与CB、6-DMAP和CHX等化学物质联合使用<sup>[14,17]</sup>。本试验结果表明经电刺激后的孤雌胚胎经CB处理4h后,能极显著提高囊胚率( $P < 0.01$ ),充分证明了CB在孤雌胚胎后期发育中的重要作用。

因电激活难以操作且易受操作者水平影响,而单一的化学激活操作较为简便,所以目前仍有较多的实验室采用一种或几种联合的化学激活方法。但从已报道的研究结果来看<sup>[9,18-22]</sup>,不论是采用何种化学试剂进行单一激活或者是联合激活,如离子霉素、乙醇、A23187、6-DMAP、乙基汞硫代水杨酸、二硫苏糖醇、氯化铯、CHX等,其效果均不如电激活。因此本试验建立了场强 $1.4 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、脉冲时程为 $80 \mu\text{s}$ 、1次脉冲的电激活模式,并联合CB处理4h获得了较高的囊胚率( $54.07 \pm 3.12$ )%,为提高猪孤雌激活效率及克隆胚胎的激活提供了一定的技术参考。

#### 参考文献:

- [1] 陈大元. 动物繁殖生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] ONODERA M, TSUNODA Y. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro* [J]. Gamete Res, 1989, 22(3): 277-283.
- [3] OZIL J P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation [J]. Development, 1990, 109(1): 117-127.
- [4] COLLAS P, FISSORE R, ROBL J M, et al. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes [J]. Mol Reprod Dev, 1993, 34(2): 212-223.
- [5] 黄雅琼, 石德顺, 杨素芳, 等. 不同激活方法对猪体外成熟卵母细胞孤雌发育的影响 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(5): 581-587.
- [6] LAI L X, PARK K W, SUN Q, et al. Early *in vitro* development of fertilized nuclear transfer pig oocytes [J]. Theriogenology, 2001, 55(1): 277.
- [7] YONG H Y, PYO B S, HONG J Y, et al. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4  $\mu\text{m}$  diameter injection pipette [J]. Human Reprod, 2003, 18(11): 2390-2396.
- [8] COLLAS P, BARNES F L. Parthenogenetic development of bovine oocytes [J]. Biol Reprod, 1992, 47: 65.
- [9] 刘国世, 曾申明, 吴中红, 等. 不同激活方法对猪体外成熟卵母细胞孤雌发育的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(6): 615-620.
- [10] PROCHAZKA R, KANKA J, SUTOVSKY P, et al. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse [J]. Reprod Fertil, 1992, 96(2): 725-734.
- [11] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. Sci, 2000, 289(5482): 1188-1190.
- [12] NAGASHIMA H, YAMAKAWA H, SAITO S. Transplantation of porcine blastomere nuclei into oocytes collected from prepubertal gilts [J]. Reprod Dev, 1992, 38(1): 73-78.
- [13] 张德福, SCHELLANDER K. 猪卵母细胞电激活参数的研究 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2001, 19(4): 254-257.
- [14] 吴中红, 邢凤英, 刘国世, 等. 猪体外成熟卵母细胞的电激活及其激活后的体外培养 [J]. 中国农业科学, 2002, 35: 1537-1542.
- [15] LEE J W, TIAN X C, YANG Xiang-zhong. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine [J]. Mol Reprod Dev, 2004, 68(1): 51-57.
- [16] ZIMMERMAMMNN U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena [J]. Biochim Biophys Acts, 1982, 194: 227-277.
- [17] ZHU Jie, TELFER E E, FLETCHER J, et al. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes [J]. Biol Reprod, 2002, 66(3): 635-641.
- [18] TAO Tao, MACHATY Z, LALANTHA R, et al. Optimisation of porcine oocytes activation following nuclear transfer [J]. Zygote, 2000, 8(1): 69-77.
- [19] KOO D B, KANG Y K, CHOI Y H, et al. Developmental potential and transgenic expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells [J]. Mol Reprod Dev, 2001, 58(1): 15-21.
- [20] 吴中红, 邢凤英, 曾申明, 等. 猪体外成熟卵母细胞激活方法的比较 [J]. 自然科学进展, 2003, 13(5): 485-489.
- [21] 习海涛, 张运海, 刘亚, 等. 猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活参数研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 31-34.
- [22] 李光鹏, 孟庆刚, 魏鹏, 等. 亚胺环己酮对猪卵母细胞人工孤雌激活作用的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(5): 416-420.