

化学联合激活可明显提高小鼠孤雌胚胎发育率

刘京威 倪和民 郭勇 徐杨 鲍文玉 刘云海*

(北京农学院动物科学技术系 北京 102206)

摘要: 为探讨一种高效的小鼠卵母细胞孤雌激活的方案,进一步提高孤雌囊胚发育率。用不同浓度的氯化锶及不同作用时间的乙醇,并分别联合 6-DMAP 对不同卵龄小鼠卵母细胞进行活化,统计小鼠卵母细胞卵裂率和体外发育状况。结果显示,15~16 h、18~19 h 和 20~21 h 卵龄组卵母细胞经 6 mmol/L SrCl₂ 联合 6-DMAP 处理后,三组的激活率随卵龄增长而升高,其中 20~21 h 卵龄组显著高于 15~16 h、18~19 h 组 ($P < 0.05$),激活胚胎的发育率以 18~19 h 时最高;6 mmol/L 和 10 mmol/L 的 SrCl₂ 联合 6-DMAP 均能有效地激活小鼠卵母细胞,激活率分别为 76.4% 和 83.6%,桑葚胚率分别为 50.0% 和 56.3%;70 ml/L 乙醇联合 6-DMAP 以处理 7 min 组获得了较好的激活率和囊胚发育率,分别为 77.1% 和 42.4%,囊胚率均显著高于 4 min 和 10 min 处理组 ($P < 0.05$)。6-DMAP 与 SrCl₂ 或乙醇联合应用可以有效抑制第二极体的排出,提高激活胚的二倍体比率;孤雌囊胚的平均细胞数显著低于正常受精囊胚 ($P < 0.05$)。不同激活方案对孤雌活化胚的核型和发育能力的作用差异较大,小鼠卵母细胞孤雌激活率与卵龄和激活方案密切相关,其中以卵龄 18~19 h、70 ml/L 乙醇或 10 mmol/L SrCl₂ 联合 6-DMAP 的激活效果较好。

关键词: 小鼠;孤雌激活;乙醇;氯化锶;6-DMAP

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2009)04-135-07

Murine Parthenogenetic Embryonic Development can be Obviously Improved by the Associated Chemical Activation

LIU Jing-Wei NI He-Min GUO Yong XU Yang BAO Wen-Yu LIU Yun-Hai*

(Department of Animal Science & Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The purpose of this study is to establish an efficient way for mouse parthenogenetic activation. Oocytes were recovered from mice at different hours after hCG administration and were denuded of cumulus cells with hyaluronidase. The cleavage and blastocyst rates of mouse oocytes activated with different concentrations of strontium chloride, and different durations of ethanol stimulation with or without 6-dimethylamino-purine, were analyzed. The cleavage rate of oocytes collected at 15 - 16, 18 - 19, 20 - 21 hours were increased after treatment with 6 mmol/L SrCl₂. The cleavage rate of oocytes collected at 20 - 21 hour was significantly higher than that of oocytes collected at 18 - 19 or 20 - 21 hour ($P < 0.05$). The blastocyst rate of oocytes collected at 18 - 19 hour was the highest among different groups. The cleavage rate of oocytes treated with 6 mmol/L and 10 mmol/L SrCl₂ were 76.4%, 83.6%, and the morula rates were 50.0% and 56.3% respectively. The cleavage rate of oocytes treated with 70 ml/L ethanol for 7 min was 77.1%, and the blastocyst rate was also significantly higher than that of the other two groups ($P < 0.05$).

基金项目 北京市教育委员会科技发展计划重点项目(No. KZ200510020013)和面上项目(No. KM200710020006),2007年度教育部留学人员科技活动择优资助项目(启动类);

* 通讯作者, E-mail: yunhai_11@263.net;

第一作者介绍 刘京威,男,硕士研究生;研究方向:动物产科及胚胎工程; E-mail: liujingwei86@sohu.com。

收稿日期:2008-09-24, 修回日期:2009-04-29

The combination of 6-DMAP and SrCl_2 or ethanol, improved the extrusion of second polar body, and the diploid parthenogenetic embryonic rate. The average number of parthenogenetic blastocyst cells was significantly lower than that of normal blastocysts ($P < 0.05$). The cleavage of mouse parthenogenetic embryos depends on both the oocyte age and activation protocols. The parthenogenetic activation for oocytes collected at 18 - 19 hour by treatment with 10 mmol/L SrCl_2 or 70 ml/L ethanol combined with 6-DMAP, was the most efficient approach.

Key words: Mouse; Parthenogenesis; Ethanol; SrCl_2 ; 6-DMAP

动物卵母细胞的孤雌激活是显微受精技术和细胞核移植技术的关键环节^[1],也是发育生物学的重要研究内容。研究哺乳动物卵母细胞的孤雌激活及其相应体外发育的变化,有助于更深入地探索卵母细胞的相关生理反应,了解精卵结合过程中激活动力学、细胞周期阻滞的恢复等生理机制^[2]。经孤雌生殖产生的单倍体和纯合体细胞在遗传育种上有着重要的意义。但是,由于动物品系、取卵时间、激活方法及培养条件的不同,各自所得相应的激活结果也不尽相同,激活率和囊胚率都有待进一步提高^[3]。本实验旨在比较不同激活方式(乙醇、氯化锶、6-DMAP)的激活效果,寻求一个更为优化的小鼠卵母细胞激活方案,为研究动物孤雌胚胎的着床机制和提高孤雌胚胎的后期发育能力提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验选用 8~12 周龄雌性 ICR 系小鼠(北京维通利华实验动物科技有限公司),体重 28 g 左右,动物许可证号为 SCXK(京)2002-2003。饲养条件为人工控温 22~26℃,14L 10D 光照周期,自由饮水取食。

1.2 试剂与仪器 PMSG、hCG 均为宁波市激素制品有限公司产品;葡萄糖、NaCl 等无机试剂均为国产优级纯产品,其余药品和试剂均购于 Sigma 公司。

1.3 卵母细胞及受精囊胚的获取 选择阴门淡粉红色的雌性青年鼠于 20:00 时腹腔注射 PMSG 10 IU/只,间隔 46 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)15 IU/只。注射 hCG 15~21 h 后用颈部脱臼法处死小鼠,无菌法采取输卵管于 HEPES-IL 液中,撕开膨大部取出卵丘-卵母细

胞复合体团。经含 0.2% 透明质酸酶的 HEPES-IL 处理约 3 min,吹打并经胚胎吸管移至新的 HEPES-IL 中,洗 3 次后进行激活处理或放入培养箱中保存待用。将注射 hCG 后的超排母鼠随即与公鼠合笼,次日见栓者于 96 h 处死,打开腹腔,剪下双侧子宫迅速将其置于 PBS 冲卵液中,用 2 ml 注射器吸取 PBS 双向冲洗子宫,将胚胎冲入表面皿中,收集形态正常的囊胚,用 PBS 液清洗后,待用。

1.4 卵母细胞激活方法

1.4.1 SrCl_2 联合 6-DMAP 对不同卵龄小鼠卵母细胞的孤雌激活 取注射 hCG 后 15~16 h、18~19 h、20~21 h 的小鼠卵母细胞,分别用含 6 mmol/L 和 10 mmol/L SrCl_2 联合 2 mmol/L 6-DMAP 的 HEPES-IL 液处理 3 h;然后移入 CZB 液中培养。观察记录卵母细胞的激活和发育情况。

1.4.2 乙醇联合 6-DMAP 对小鼠卵母细胞的孤雌激活 取注射 hCG 后 18~19 h 的小鼠卵母细胞,70 ml/L 乙醇激活 4 min、7 min、10 min 并分别用含 2 mmol/L 6-DMAP 的 CZB 液继续激活 3 h,CZB 液培养。观察激活率、卵裂率和囊胚率。

1.4.3 SrCl_2 和乙醇单独对小鼠卵母细胞的孤雌激活 取注射 hCG 后 18~19 h 的小鼠卵母细胞,70 ml/L 乙醇激活 7 min,10 mmol/L SrCl_2 激活 20 min,CZB 液培养。观察激活率、卵裂率和囊胚率。

1.5 孤雌激活胚的体外培养 将激活后的卵母细胞用 CZB 培养液冲洗 3 遍,移入 30 μl CZB 微滴中培养,每滴 20~30 枚胚胎。用石蜡油封闭,在培养条件为 37℃、5% CO_2 、95% 空气、饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。激活的卵母细

胞体外培养每隔 24 h 统计发育情况,48 h 将胚胎移入含 5.56 mmol/L 葡萄糖的 CZB 微滴中,5 d 时记录囊胚发育率,并进行统计。

1.6 激活胚核型鉴定 激活培养 6 h 后观察核型。1 个原核,2 个极体的为单倍体;2 个原核,一个极体的为二倍体。

1.7 囊胚细胞数 将各处理组囊胚分别经 PBS 清洗 3 次,转移到含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 的 PBS 中,避光孵育 30 min;染色结束后,将胚胎洗涤 3 次,转移到载玻片上,再加 2 μl 甘油于胚胎液滴上,用凡士林在载玻片四角点四个柱,盖上盖玻片,在实体显微镜下小心按压盖玻片,使卵受压后稍微膨大但不至于破碎为宜,用指甲油封片。然后在荧光显微镜下用紫外激发,

观察细胞数。

1.8 数据分析 实验数据用 DPS 进行 χ^2 检验分析差异显著性。

2 结果

2.1 取卵时间对孤雌激活效果的影响 取注射 hCG 后 15~16 h、18~19 h、20~21 h 的卵母细胞在 6 mmol/L SrCl_2 激活液中处理 20 min,再用 2 mmol/L 6-DMAP 处理 3 h。卵裂率分别为 73.0%、76.4%、85.3%,15~16 h 与 20~21 h 组差异显著;18~19 h、20~21 h 组的 8-细胞率及桑葚胚率均显著高于 15~16 h 组;18~19 h 组的囊胚率显著高于 15~16 h 和 20~21 h 组(表 1)。

表 1 6 mmol/L SrCl_2 + 6-DMAP 对不同卵龄的小鼠卵母细胞孤雌激活效果

Table 1 Activation of mouse oocytes collected at different times by 6 mmol/L SrCl_2 and 6-DMAP

卵龄(h) Age of oocyte	处理数 No. of oocyte	卵裂率(%) Cleavage rate	8-细胞率(%) 8-cell rate	桑葚胚率(%) Morulae rate	囊胚率(%) Blastocyst rate
15~16	115	73.0 ^a (84)	41.7 ^a (35)	23.8 ^a (20)	9.5 ^a (8)
18~19	123	76.4 ^{ab} (94)	60.6 ^b (57)	50.0 ^b (47)	25.5 ^b (24)
20~21	116	85.3 ^b (99)	63.6 ^b (63)	52.5 ^b (52)	12.1 ^a (12)

同一列中上标字母不同表示差异显著, $P < 0.05$; 括号内为胚胎个数,下表同。

a, b values with different superscripts within each line are significantly different ($P < 0.05$). No. of embryos in parentheses. As same as follow table.

取注射 hCG 后 15~16 h、18~19 h、20~21 h 的卵母细胞在 10 mmol/L SrCl_2 激活液中处理 20 min,再用 2 mmol/L 6-DMAP 处理 3 h。卵裂率分别为 83.9%、83.6%、78.1%,几组之间差

异无显著性;8-细胞率和桑葚胚率 18~19 h 和 20~21 h 组均显著高于 15~16 h 组;囊胚率 18~19 h 组显著高于 15~16 h 和 20~21 h 组(表 2)。

表 2 10 mmol/L SrCl_2 + 6-DMAP 对不同卵龄的小鼠卵母细胞孤雌激活效果

Table 2 Development of mouse oocytes collected at different times after activation by 10 mmol/L SrCl_2 and 6-DMAP

卵龄(h) Age of oocyte	处理数 No. of oocyte	卵裂率(%) Cleavage rate	8-细胞(%) 8-cell rate	桑葚胚率(%) Morulae rate	囊胚率(%) Blastocyst rate
15~16	124	83.9 ^a (104)	53.8 ^a (56)	28.9 ^a (30)	8.7 ^a (9)
18~19	134	83.6 ^a (112)	67.0 ^b (75)	56.3 ^b (63)	24.1 ^b (27)
20~21	114	78.1 ^a (89)	68.5 ^b (61)	49.4 ^b (44)	10.1 ^a (9)

2.2 SrCl_2 对孤雌激活效果的影响 取注射 hCG 后 18~19 h 的卵母细胞分别在 6 mmol/L、10 mmol/L SrCl_2 激活液中处理 20 min,再用 2 mmol/L 6-DMAP 处理 3 h。两组的卵裂率分别

为 76.4% 和 83.6%,桑葚胚率分别为 50.0% 和 56.3%;10 mmol/L 组的卵裂率和桑葚胚率均高于 6 mmol/L 组,但差异不显著;囊胚率两组之间无显著差异(表 3)。

表 3 不同浓度 SrCl₂ + 6-DMAP 对小鼠卵母细胞孤雌激活效果Table 3 Development of oocytes after activation by different concentrations of SrCl₂ and 6-DMAP

处理组 (mmol/L) Group	处理数 No. of oocyte	卵裂率 (%) Cleavage rate	8-细胞 (%) 8-cell rate	桑葚胚率 (%) Morulae rate	囊胚率 (%) Blastocyst rate
6	123	76.4 ^{ab} (94)	60.6 ^b (57)	50.0 ^b (47)	25.5 ^b (24)
10	134	83.6 ^a (112)	67.0 ^b (75)	56.3 ^b (63)	24.1 ^b (27)

2.3 乙醇对孤雌激活效果的影响 取注射 hCG 后 18 ~ 19 h 的小鼠卵母细胞, 分别用 70 ml/L 乙醇激活 4 min、7 min、10 min 并用 2 mmol/L 6-DMAP 激活 3 h。随着激活时间的延长卵裂

率升高, 10 min 组显著高于 4 min 组 (59.6% vs. 83.3%); 三组之间囊胚率无显著性差异, 激活 7 min 组最高 (37.8%) (表 4)。

表 4 乙醇的激活时间对小鼠卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 4 Effect of ethanol treatment durations on the development of murine parthenogenetic embryos

作用时间 (min) Treatment duration	处理数 No. of oocyte	卵裂率 (%) Cleavage rate	8-细胞率 (%) 8-cell rate	桑葚胚率 (%) Morulae rate	囊胚率 (%) Blastocyst rate
4	114	59.6 ^a (68)	88.2 ^a (60)	70.6 ^a (48)	35.3 ^a (24)
7	96	77.1 ^b (74)	73.0 ^b (54)	48.6 ^b (36)	37.8 ^a (28)
10	120	83.3 ^b (100)	80.0 ^a (80)	64.0 ^a (64)	36.0 ^a (36)

2.4 6-DMAP 对孤雌激活效果的影响 取注射 hCG 后 18 ~ 19 h 的小鼠卵母细胞, 分别用 70 ml/L 乙醇处理 7 min、10 mmol/L SrCl₂ 激活液中处理 20 min 单独激活和联合 2 mmol/L 6-DMAP 处理 3 h。各组的激活率都高于 6-DMAP 组, 且

差异显著; 10 mmol/L SrCl₂ 组的卵裂率显著高于 70 ml/L 乙醇组; 联合 6-DMAP 激活的 8-cell 率和桑葚胚率分别高于单独应用乙醇和氯化铋激活组, 且差异均显著 (表 5)。

表 5 不同处理方式对小鼠卵母细胞孤雌激活的影响

Table 5 Effect of different activation treatments on mouse parthenogenetic embryo development

处理组 Group	处理数 No. of oocyte	卵裂率 (%) Cleavage rate	8-细胞 (%) 8-cell rate	桑葚胚率 (%) Morulae rate	囊胚率 (%) Blastocyst rate
6-DMAP	75	25.3 ^a (19)	21.1 ^a (4)	0 ^a	0 ^a
7% 乙醇 Ethanol	77	68.8 ^b (53)	60.4 ^b (32)	28.3 ^b (15)	17.0 ^b (9)
7% 乙醇 Ethanol + 6-DMAP	78	69.2 ^b (54)	70.4 ^b (38)	59.3 ^c (32)	48.1 ^c (26)
10 mmol/L SrCl ₂	93	92.5 ^{bc} (86)	61.6 ^b (53)	33.7 ^b (29)	10.5 ^b (9)
10 mmol/L SrCl ₂ + 6-DMAP	93	83.9 ^{bc} (78)	59.1 ^b (55)	48.4 ^c (45)	24.7 ^b (23)

同一列中无相同上标字母表示差异显著, $P < 0.05$; 括号内为胚胎个数。

a, b, c values with different superscripts within each line are significantly different ($P < 0.05$). No. of embryos in parentheses.

2.5 不同处理方式对孤雌激活核型的影响 激活 6 h 后观察核型, 单独用乙醇和 SrCl₂ 激活后, 单倍体比例分别为 81.7% 和 79.1%, 二倍体比例分别为 18.3% 和 20.9%。乙醇和 SrCl₂ 联合 6-DMAP 处理后二倍体比例分别为 65.2% 和 78.9%, 其中 SrCl₂ 联合 6-DMAP 形成的单倍

体 (21.1%) 显著低于乙醇联合 6-DMAP 组 (34.8%) (表 6, 图 1 A, a)。

2.6 不同处理方式对孤雌激活囊胚细胞数的影响 激活后第 5 d, 将收集的各处理组囊胚染色, 统计细胞数。结果表明, 各处理组的囊胚细胞数均显著低于体内受精胚 ($P < 0.05$); 而各

处理组之间没有显著差异(图 2,图 1E,e)。

表 6 不同处理方式对小鼠卵母细胞
孤雌激活核型的影响

Table 6 Effect of different activation treatments
on mouse parthenogenetic karyotype

处理组 Group	激活数 No. of the activated oocytes	单倍体 Haploid (%)	二倍体 Diplont (%)
乙醇 Ethanol	175	81.7 ^a (143)	18.3 ^a (32)
SrCl ₂	134	79.1 ^a (106)	20.9 ^a (28)
乙醇 Ethanol + 6-DMAP	164	34.8 ^b (57)	65.2 ^b (107)
SrCl ₂ + 6-DMAP	166	21.1 ^c (35)	78.9 ^b (131)

同一列中上标字母不同表示差异显著, $P < 0.05$; 括号内为胚胎个数。

a, b, c values with different superscripts within each line are significantly different ($P < 0.05$). No. of embryos in parentheses.

4 讨论

卵龄直接影响卵母细胞的激活效果^[4]。在对小鼠、牛^[5]和兔^[6]的卵母细胞激活的研究中均发现,活化率随卵母细胞的老化而增加^[7]。本实验对不同卵龄的昆明小鼠卵母细胞用 6 mmol/L 和 10 mmol/L SrCl₂ 激活,结果都表明,注射 hCG 后 15 h 的卵母细胞就获得了较高的激活率,与 18 h 组差异不显著。这可能是由于 Sr²⁺ 激活会引起一个较长 Ca²⁺ 波动持续时间^[8],且从激发的 Ca²⁺ 波动来看, Sr²⁺ 的激活与精子激活极为相似造成的。有学者认为老化的卵母细胞对 Ca²⁺ 的敏感性增强。Web 等^[9]认为,卵龄的延长使卵母细胞质老化,维持减数分裂阻断的物质降解,使其更易被激活。由本实

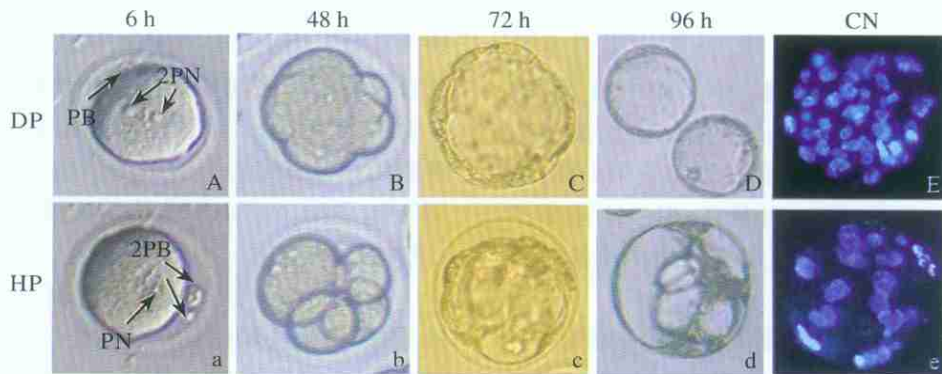


图 1 7%乙醇 + 2 mmol/L 6-DMAP 激活胚原核的形成、发育时序及囊胚染色分析

Fig. 1 Pronuclear formation, development, and blastocyst cell analysis of embryos activate by 7% ethanol + 2 mmol/L 6-DMAP

DP. 二倍体(A~E); HP. 单倍体(a~e)。A. 2倍体原核; B. 8~16细胞; C. 囊胚; D. 扩张囊胚; E, e. 囊胚 H33342染色; a. 单倍体原核; b. 4细胞; c. 早期囊胚; d. 囊胚。PB. 极体; PN. 原核; CN. 细胞数。

DP. Diploid parthenotes (A - E); HP. Haploid parthenotes (a - e). A. Diploid pronucleus; B. 8 - 16 cells; C. Blastocyst; D. Expanded blastocyst; E, e. Blastocyst staining by H33342; a. Haploid pronucleus; b. 4-cells; c. Early blastocyst; d. Blastocyst. PB. Polar body; PN. Pronuclei; CN. Cell number.

验孤雌激活后培养结果看,随着卵龄的延长,激活胚胎的发育能力增强,18~19 h 组的囊胚发育率高于 15~16 h 组和 20~21 h 组。说明卵龄影响了激活后胚胎的发育能力,过早和过迟都不利于小鼠卵母细胞的充分激活。

Sr²⁺ 可以取代 Ca²⁺ 而通过细胞膜上的钙离子通道进入细胞内,并能置换出内质网和线粒

体中的内源 Ca²⁺,增加胞质内游离的 Ca²⁺ 浓度,引起 Ca²⁺ 依赖的皮质反应,激活卵母细胞^[10]。本实验结果表明,用 6 mmol/L 和 10 mmol/L 的 SrCl₂ 处理 20 min,均可以有效激活小鼠的卵母细胞,获得较高的桑囊胚发育率。说明 SrCl₂ 对小鼠卵母细胞有很好的激活作用^[11]。乙醇可通过水解细胞膜上 4,5-二磷酸

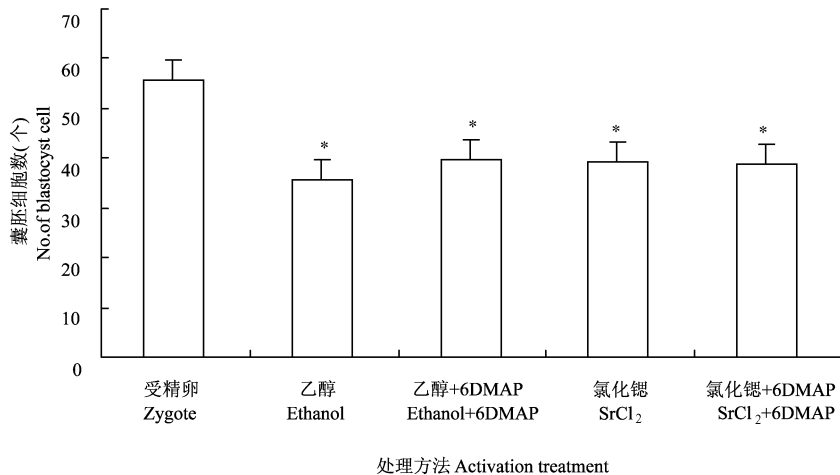


图2 不同激活方式的囊胚细胞数

Fig. 2 Blastocyst cell number after different activation treatments

* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。* Significant differences are indicated by $P < 0.05$.

磷脂酰肌醇产生 1,4,5-三磷酸肌醇,从而诱发细胞内源钙释放到细胞质,提高细胞内钙浓度^[12],从而激活卵母细胞。本实验中用 7% 的乙醇分别处理 4、7、10 min 的结果表明,随着处理时间的延长,卵母细胞的激活率逐渐升高,激活胚的发育率以 7 min 时最高,但各组差异不显著。说明 7% 的乙醇可以有效激活小鼠的卵母细胞。

实验中我们还采用了 6-DMAP,一方面,它是蛋白质磷酸化抑制剂,能阻止 p34 蛋白上的第 161 位酪氨酸磷酸化,导致 MPF 失活,促进卵母细胞减数分裂的恢复^[13]。从结果看出,只用 6-DMAP 不能有效激活小鼠卵母细胞,乙醇和 SrCl₂ 联合 6-DMAP 后的胚胎发育能力比单独激活组显著提高。另一方面,6-DMAP 能抑制卵母细胞第二极体的排出,诱发卵母细胞形成一个二倍体的单原核,实现孤雌发育的目的^[14]。从对激活后 6 h 出现的核型分析表明,无论是乙醇还是 SrCl₂,联合 6-DMAP 后显著提高了孤雌二倍体胚胎的比率。其中,SrCl₂ 联合 6-DMAP 组出现了较高比率的 2 原核 2 倍体,进一步证明了 SrCl₂ 能够更好地模拟卵母细胞的受精作用。Raz 等^[15]的研究认为,激活剂导致细胞内源性 Ca²⁺ 较低浓度的上升就可以诱发

皮质反应,而较高浓度的 Ca²⁺ 才能诱导减数分裂的复始。因此,我们认为,较高浓度的 SrCl₂ 或较长的处理时间都能充分激活卵母细胞,使其发育到囊胚阶段。从实验结果看,单独用乙醇激活可以获得较高比率的单倍体孤雌胚胎,用 SrCl₂ 联合 6-DMAP 则可以获得较高比率的二倍体孤雌胚胎。

一般认为由于孤雌激活胚缺乏雄性基因组,导致细胞质和细胞核的功能存在一定程度的缺陷,孤雌胚胎比受精胚胎的囊胚率低^[16],从我们对孤雌胚胎囊胚的细胞计数看,不同激活方法的孤雌囊胚细胞数没有显著差异,但都显著低于受精胚胎的囊胚细胞数。说明影响孤雌胚胎后期发育能力可能是由于孤雌胚胎本身所造成的,目前对造成这种差异的具体机制,尤其是影响孤雌胚胎发育到囊胚阶段的探讨还不太,今后需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈大元编著. 受精生物学 受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社, 2000, 252 ~ 259.
- [2] Sagata N. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Cell Biology*, 1996, (6): 22 ~ 28.
- [3] 袁水桥, 罗光彬, 张晓华等. 哺乳动物卵母细胞孤雌激活的研究进展. *动物科学与动物医学*, 2004, 21 (12): 1 ~

- 3.
- [4] Mizutani E, Jiang J Y, Mizuno S, *et al.* Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes *in vitro*. *Reprod Dev*, 2004, **50**:139 ~ 146.
- [5] Ito J, Kato M, Hochi S, *et al.* Effect of enucleation on activation of cytosolic factor activity in matured rat oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2007, **9**:257 ~ 266.
- [6] Yamano S, Nakagawa K, Nakasaka H, *et al.* Fertilization failure and oocyte activation. *J Med Invest*, 2000, **47**(1): 1 ~ 8.
- [7] 邓满齐, 范必勤. 电刺激不同卵龄小鼠卵母细胞激活及胞质 Ca^{2+} 变化. *农业生物技术学报*, 1993, **1**(1): 77 ~ 82.
- [8] Jones K T, Whittingham D G. A comparison of sperm and IP3-induced Ca^{2+} release in activated and aging mouse oocytes. *Dev Biol*, 1996, **178**:229 ~ 237.
- [9] Web M, Kowlett S K, Marot B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J Embryo Exp Morphol*, 1986, **95**:131 ~ 145.
- [10] Ma S F, Liu X Y, Miao D Q, *et al.* Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology*, 2005, **64**: 1 142 ~ 1 157.
- [11] Kishigami S, Bui H T, Wakayama S, *et al.* Successful mouse cloning of an outbred strain by Trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. *J Reprod Dev*, 2007, **53**: 165 ~ 170.
- [12] Machaty Z, Prather R S. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Rep Rod Fertil Dev*, 1998, **10**(7/8): 599 ~ 613.
- [13] 石德顺, 杨素芳, 谭世俭. 6-二甲氨基嘌呤对牛卵母细胞孤雌发育的影响. *广西农业生物科学*, 2001, **20**(1): 1 ~ 5.
- [14] Vikas D, Lisa C, Darlene P, *et al.* Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes. *Stem Cells*, 2008, **26**:756 ~ 766.
- [15] Raz T, Ben-Yosef D, Shalgi R. Segregation of the pathways leading to cortical reaction and cell cycle activation in the rat egg. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 94 ~ 102.
- [16] Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva I, *et al.* Development of parthenogenetic rat embryos. *Biol Reprod*, 2003, **68**(3): 829 ~ 836.