

不同采集方法对猪卵母细胞的采集效率和成熟率的影响

卿玉波, 魏红江*, 姜河海, 信吉阁, 李红, 许成盛, 查星琴, 潘伟荣, 曾养志

(云南农业大学 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 本研究旨在开发出一种对 COCs 损伤小且采集效率和卵母细胞成熟率高的卵母细胞采集方法。从屠宰场采集来的卵巢运回实验室后随机分为 3 组, 分别用抽吸法、解剖法和刀切过滤法 3 种方法采集 COCs, 然后进行体外成熟培养, 通过对 COCs 采集效率、COCs 完整性及卵母细胞体外成熟率的比较, 研究解剖法、刀切过滤法和抽吸法 3 种采集方法对猪卵母细胞的采集效率和成熟率的影响。结果表明: 每个卵巢采集 COCs 个数, 刀切过滤法显著高于解剖法和抽吸法 ($P < 0.05$), 而解剖法仅为 1.55 个, 显著低于抽吸法 ($P < 0.05$); 采集效率抽吸法最佳, 采集和挑选单个 COCs 的时间显著低于解剖法和刀切过滤法 ($P < 0.05$), 刀切过滤法次之, 但显著低于解剖法 ($P < 0.05$); A、B 级 COCs 比例, 解剖法高达 99.23%, 显著高于其他 2 种方法 ($P < 0.05$), 刀切过滤法与抽吸法差异不显著 ($P > 0.05$); 卵母细胞的成熟率, 解剖法和刀切过滤法都达到 80%, 二者间差异不显著 ($P > 0.05$), 但显著高于抽吸法 ($P < 0.05$); 100 个成熟卵母细胞所需的卵巢数量, 刀切过滤法最少, 仅为 17.4 个, 而解剖法和抽吸法分别高达 80.6 和 90.3 个; 需要的总采集时间 (采集和挑选的时间), 刀切过滤法最低, 仅为 126.6 min, 而解剖法最高, 为 758.9 min。综上所述, 与抽吸法和解剖法相比, 刀切过滤法是一种高效、快速的卵母细胞采集方法。

关键词: 猪卵母细胞; 体外成熟培养; 抽吸法; 解剖法; 刀切过滤法

中图分类号: S828; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)05-0629-06

The Collection Efficiency and Maturation Rate of Porcine Oocytes Influenced by the Collection Methods

QING Yu-bo, WEI Hong-jiang*, JIANG He-hai, XIN Ji-ge, LI Hong, XU Cheng-sheng, CHA Xing-qin, PAN Wei-rong, ZENG Yang-zhi

(Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to improve the effect of oocyte collection method, we investigated the collection efficiency, the proportion of A and B grade oocytes and *in vitro* maturation rate of pig oocytes collected by the dissection method, the knife cutting filtration method and the aspiration method. The number of pig oocytes obtained from each ovary by knife cutting filtration method was significantly higher than those by the dissection method and the aspiration method; the time of collecting and selecting ovary (collection efficiency) by the aspiration method was less than those by the knife cutting filtration method and the dissection method; the proportion of A and B grade oocytes by the dissection methods, reached to 99.23%, was significantly higher than those by the knife cutting filtration method and aspiration method; the maturation rate of pig oocytes by the dissection method and the knife cutting filtration method, reached to 80%, was higher than that by the aspiration method; to obtain 100 oocytes, the least needed ovaries by the knife

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 云南省教育厅科研基金(07Z11542)

作者简介: 卿玉波(1982-), 男, 湖南永州人, 硕士生, 主要从事胚胎生物技术研究, Tel: 0871-5219011, E-mail: qingyubo20@163.com

* 通讯作者: 魏红江, 副教授, E-mail: hongjiangwei@126.com

cutting filtration method was only 17.4 compared with 80.6 and 90.3 by the dissection method and aspiration method. It took only 126.6 min for the whole collection by the knife cutting filtration method, however 758.9 min by the dissection method. The results indicate that the knife cutting filtration method is an efficiency and rapid method for the collection of porcine oocytes in comparison with the aspiration method and the dissection method.

Key words: pig oocytes; *in vitro* maturation culture; the aspiration method; the dissection method; the knife cutting filtration method

卵母细胞在开展体外受精、体细胞核移植等的研究和应用方面具有非常重要的作用。自 Mattiolo 等^[1]用体外成熟的卵母细胞获得试管猪以来,卵母细胞的体外成熟培养已经取得了很大的进展^[2]。卵母细胞的体外成熟受多种因素影响,不同的采集方法是影响因素之一^[3],可以直接影响到卵母细胞的采集数量、采集效率和卵丘细胞的完整程度。能获得较多的卵母细胞数是研究者所期望的,但同时还要考虑到卵母细胞采集的效率和卵丘细胞的完整性,这是因为前者决定着卵母细胞在体外滞留时间的长短,而后者在成熟培养中决定着对卵细胞所需营养的输送,并标志着卵母细胞自身的生长发育阶段^[4]。目前采用的卵母细胞采集方法有抽吸法、解剖法和机械破碎法等。抽吸法虽然操作简便,容易掌握,采集效率较高,但是采集不完全,对卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complex, COCs)的损伤大,需要大量猪的卵巢;解剖法对卵丘细胞破坏少,获得 A 级 COCs 多,但是技术要求高,难掌握,操作费时;机械破碎法获得的卵母细胞多,但是获得卵母细胞大小差异大,对 COCs 的损伤很大,适宜于体外培养的细胞比例不高^[4-5]。COCs 的采集效率不仅与从卵巢采集出来的时间有关,还与从卵泡液中挑选出来的时间长短有关。因此,如何缩短从卵泡液中挑选出 COCs 的时间也显得尤为重要。

本研究通过对 COCs 采集效率、COCs 完整性及卵母细胞体外成熟率的比较,研究了解剖法、刀切过滤法和抽吸法 3 种采集方法对猪卵母细胞的采集效率和成熟率的影响,以期找出一种对 COCs 损伤小,采集效率和卵母细胞成熟率高的卵母细胞采集方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验用的猪卵巢采自云南省昆明市盘龙区白龙寺屠宰场。卵巢收集后用保温瓶 2 h 内运回实验

室,然后用 37.5 ℃ 0.85% 的生理盐水清洗 3 遍,放入 37.5 ℃ 0.85% 的生理盐水的塑料瓶(放入 37.5 ℃ 的水浴锅)中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 COCs 的采集 将清洗好的卵巢随机分为 3 组,分别用抽吸法、解剖法和刀切过滤法 3 种方法采集 COCs。

抽吸法:用 18 号针头的 20 mL 注射器抽吸卵巢上 3~8 mm 的卵泡,在体视显微镜下,用自制玻璃吸管挑选出 COCs,记录 COCs 个数、抽吸的采集和挑选的时间,采集时间是指把 COCs 从卵巢取出所需要的时间,挑选时间是指将 COCs 从卵泡液及其杂质中挑选出来并直至放入成熟培养液中所需要的时间,最后按以下算式计算出采集效率。

采集效率($\text{min} \cdot \text{个}^{-1}$) = (采集 n 个卵巢中的 COCs 所需要的采集时间 + 挑选时间) / n (n 为卵巢个数)。

解剖法:室内温度控制在 25~27 ℃ 之间。在实验台上,将单个卵巢置于直径为 90 mm 的玻璃皿中。用手术刀及眼科镊子将卵巢上直径约 6 mm 的卵泡逐个切出,尽量去除卵巢的结缔组织。在体视显微镜下用前端有极细弯钩的眼科镊子慢慢剥离包在卵泡表面的结缔组织,把卵泡放于 TALP 液中清洗 2 次。在体视显微镜下观察卵泡,选择透明的卵泡,确认卵母细胞所在位置,然后把这个部位放在底部,用 2 把尖端极细的眼科镊子撕破卵泡,对准卵泡内的卵母细胞调好焦距,确认卵母细胞的好坏。自动从卵泡内浮游出的 COCs 为不好的 COCs,不做使用。没有自动浮游出来的 COCs,用 1 把镊子夹住它底部的卵泡内膜,另 1 把镊子夹住卵泡使之倒翻过来,COCs 掉入 TALP 液,最后用自制的玻璃微吸管挑选出 COCs,记录 COCs 个数、解剖的采集和挑选的时间,并按抽吸法计算出采集效率。

刀切过滤法:为了缩短从卵泡液中挑选出 COCs 的时间,我们自行开发出了一种新的卵母细

胞采集方法——刀切过滤法,即把卵泡的刀切和 COCs 的过滤 2 种方法进行了有机的结合。具体方法是:将卵巢浸在盛有 TALP 液的培养皿中,左手拿镊子夹住卵巢,右手拿手术刀随机划破 2~6 mm 的卵泡,轻轻地来回摆动卵巢,使卵泡内 COCs 流出。将自制的 40、60、80、100 和 120 目的卵母细胞分离筛(直径为 30 mm,高为 10 mm)从上到下依次重叠,用三脚架固定后放入 100 mL 的烧杯,向 40 目的卵母细胞分离筛中轻轻倒入含卵泡液 TALP 混合液,然后再用 TALP 液清洗培养皿 2 次,清洗液倒入卵母细胞分离筛。不断摇摆三脚架使卵母细胞分离筛上的 COCs 能充分滤过筛网,使 COCs 根据直径大小留在不同的卵母细胞分离筛上。将含有 COCs 的卵母细胞分离筛放入盛有 TALP 液的 35 mm 培养皿, TALP 液的量以卵母细胞分离筛的筛网刚好浸入 TALP 液中为宜。用自制的玻璃微吸管挑选出 COCs,记录 COCs 个数、刀切和过滤以及挑选的时间,并按抽吸法计算出采集效率。

1.2.2 卵母细胞的分级,培养及成熟确定 一般根据卵母细胞外围卵丘细胞的多少及胞质明暗将 COCs 分为 3 个等级:含有 5 层以上的卵丘细胞,胞质均匀较暗的 COCs 为 A 级;含有 3~5 层的卵丘细胞为 B 级;含有少许卵丘细胞或胞质不均匀的畸形卵、裸卵和半裸卵为 C 级。将挑选出的 A、B 级 COCs 移入提前做好且已平衡 2 h 的成熟培养液(TCM-199-PVA+EGF,使用时添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

Pyruvic Acid、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ L-半胱氨酸盐酸、10% (V/V)猪卵泡液(PFF)、 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ EGF)滴中,移入 CO_2 培养箱中培养。培养 38~42 h 后,用含有 0.1% 的透明质酸酶消化,在体视显微镜下挑选出成熟的卵母细胞。成熟的卵母细胞的依据为第一极体排出的细胞质均匀、透明带与胞质间隙明显的卵母细胞。计算出各种方法中的卵母细胞成熟率。

1.2.3 采集效率的计算及其数据分析 试验数据用 SAS 统计软件的 Duncan's 检验方法进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 不同采集方法对卵母细胞采集效率的影响

不同采集方法对卵母细胞采集效率的影响见表 1。每个卵巢采集 COCs 所需时间,解剖法最多,显著高于刀切过滤法和抽取法($P < 0.05$),而刀切过滤法和抽吸法间差异不显著($P > 0.05$);每挑选 1 个 COCs 所花的时间,解剖法最多,其次是刀切过滤法,最后是抽吸法,三者差异显著($P < 0.05$);而每个卵巢采集 COCs 数,刀切过滤法最高达 12.31 个,显著高于解剖法和抽吸法($P < 0.05$),解剖法仅为 1.55 个,显著低于其他 2 种方法($P < 0.05$);采集效率抽吸法最佳,显著低于解剖法和刀切过滤法($P < 0.05$),刀切过滤法次之,但显著低于解剖法($P < 0.05$)。

表 1 不同采集方法对卵母细胞采集效率的影响

Table 1 Effect of different collection methods on the collection efficiency

采集方法 Collection method	卵巢数 (重复次数) No. of ovaries (repeat)	每个卵巢采集 COCs 所需时间/min Time for each ovary	挑选一个 COCs 的时间/min Time for each COCs	每个卵巢采 集 COCs 数 No. of COCs in each ovary	采集效率/ (min·个 ⁻¹) Collection efficiency
解剖法 Dissection	215(5)	5.93 ± 0.63^a	2.58 ± 0.93^a	1.55 ± 0.77^a	9.42 ± 1.01^a
刀切过滤法 Knife cutting filtration	131(5)	1.57 ± 0.23^b	0.53 ± 0.22^b	12.31 ± 4.96^b	7.27 ± 0.77^b
抽吸法 Aspiration	392(5)	1.58 ± 0.27^b	0.16 ± 0.06^c	6.29 ± 1.65^c	2.60 ± 0.66^c

同一列中标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同

Different letters in the same column show significant difference at 0.05 level, the same as below

2.2 不同采集方法对 COCs 完整性的影响

不同采集方法对 COCs 完整性的影响见表 2。A 级比例,三者间差异显著($P < 0.05$),其中解剖法最高,达 87.74%,抽取法最低,仅为 15.95%;B 级比例,刀切过滤法和抽吸法差异不显著($P > 0.05$),但显著高于解剖法($P < 0.05$);A、B 级比例,解剖法

高达 99.23%,显著高于其他 2 种方法($P < 0.05$),刀切过滤法虽然可以达到 58.54%,但与抽吸法差异不显著($P > 0.05$);C 级比例,解剖法仅为 0.4%,但抽取法高达 58.64%,三者间差异显著($P < 0.05$)。

表 2 不同采集方法对 COCs 完整性的影响

Table 2 Effect of different collection methods on the integrity of COCs

采集方法 Collection method	COCs 数 (重复次数) No. of COCs (repeat)	COCs 分级比例/% Percentage of COCs grade			
		A 级 A grade	B 级 B grade	A、B 级比例 A/B	C 级 C grade
解剖法 Dissection	333(5)	87.74±7.67 ^a	11.49±5.99 ^a	99.23±1.72 ^a	0.40±0.89 ^a
刀切过滤法 Knife cutting filtration	1 612(5)	32.24±5.22 ^b	26.31±4.96 ^b	58.54±8.94 ^b	41.45±6.06 ^b
抽吸法 Aspiration	2 463(5)	15.95±6.03 ^c	25.41±7.33 ^b	41.36±15.43 ^b	58.64±5.52 ^c

2.3 不同采集方法对卵母细胞成熟率的影响

不同采集方法对卵母细胞成熟率的影响见表 3。卵母细胞的成熟率,解剖法和刀切过滤法都达到

80%,二者间差异不显著($P > 0.05$),但显著高于抽吸法的 42.55%($P < 0.05$)。

表 3 不同采集方法对卵母细胞体外成熟率的影响

Table 3 Effect of different collection methods on oocyte maturation rate

采集方法 Collection method	A、B 级 COCs 数 No. of A and B grade COCs	成熟卵母细胞数 No. of oocytes	成熟率/% Maturation rate
解剖法 Dissection	333	270	80.70±4.85 ^a
刀切过滤法 Knife cutting filtration	944	752	79.67±1.58 ^a
抽吸法 Aspiration	1 019	434	42.55±10.14 ^b

2.4 100 个成熟卵母细胞所需的卵巢数量及采集时间

100 个成熟卵母细胞所需的卵巢数量及采集时间见表 4。为了更好的比较 3 种方法的采集效果,我们假设用每个方法体外培养 100 个成熟的卵母细胞,通过卵母细胞成熟率、A、B 级比例、每个卵巢采

集 COCs 个数,换算出 3 种方法需要的卵巢数量和总的时间。结果表明,刀切过滤法需要的卵巢数量最少,仅为 17.4 个,而解剖法和抽吸法分别高达 80.6 和 90.3 个;总共需要的时间(采集和挑选的时间)刀切过滤法最低,仅为 126.6 min,而解剖法最高,为 758.9 min。

表 4 100 个成熟卵母细胞需要的卵巢数量及采集时间

Table 4 The ovaries number and collection time to obtain 100 oocytes

采集方法 Collection method	成熟卵母细胞数量 No. of oocytes	成熟率/% Maturation rate	A,B 级百分比 Percentage of A and B grade oocytes	每个卵巢采集 COCs 数 No. of oocytes per ovary	需要的卵巢数量 No. of ovaries	每个卵巢花费时间/min Time per ovary	总时间/min Total time
解剖法 Dissection	100	0.807 0	0.992 3	1.55	80.6	9.42	758.9
刀切过滤法 Knife cutting filtration	100	0.796 7	0.585 4	12.31	17.4	7.27	126.6
抽吸法 Aspiration	100	0.425 5	0.413 6	6.29	90.3	2.6	234.9

3 讨论

为了减少发情对育肥速度、饲料利用效率的影响,提高肉质的适口性,中国、日本等亚洲国家习惯将公、母猪猪劊后育肥^[6]。在我国传统上习惯在断奶前对小母猪和小公猪进行去势,使得从屠宰场可以采集卵巢的母猪比例仅为 25% 左右,即使 1 个每天屠宰量高达 300 头的屠宰场,全部的卵巢也仅为 150 个左右,如果扣除当中如卵巢囊肿、卵巢萎缩等不能使用的卵巢,则获得的卵巢数量会更少。另外,我国与国外不同,很多地方都是凌晨 02:00 点左右开始屠宰,07:00 点左右结束,卵巢被运回实验室一般都在 08:00 点以后,加上采集、挑选卵泡需要的时间,从获得卵巢到卵母细胞被放入 CO₂ 培养箱中培养所需时间最长可达 8 h 以上。卵巢离体时间越短,体外受精后卵裂率越高,而离体时间越长,体外受精效果越差,卵裂率越低^[7]。王峰等^[8]研究发现,卵巢的保存时间不得超过 6 h,否则卵裂率和 6~8 细胞发育率显著下降。因此,如何快速、高效采集卵母细胞对于研究人员来说就显得非常的重要。

卵母细胞的采集方法对获得卵母细胞的数量和采集的时间影响很大^[9]。目前国内外对猪、牛和羊卵巢 COCs 的采集主要用抽吸法,关于用不同采集方法从卵巢获取 COCs 数量及其卵丘细胞完整程度和体外成熟率的比较研究很多^[10-13]。目前只有南木甲等^[14]和 Das 等^[15]在绵羊和水牛上做过不同采集方法采集效率 (min · 个⁻¹) 的比较研究,对猪的研究少之又少。本研究结果表明,用抽吸法每个卵巢获得的 COCs 数量为 6.29 个,显著低于刀切过滤法的 12.31 个 ($P < 0.05$),这与陈晓宇等^[5]的报道相似,而用解剖法从每个卵巢上获得的 COCs 数量仅

为 1.55 个,这是因为在采集时仅挑选直径约 6 mm 的卵泡,剥离包在卵泡表面的结缔组织难度较大,稍不注意就会弄破卵泡而被迫丢弃,加上最后还要去除自动从卵泡内浮游出来的 COCs,因此导致每个卵巢获得的 COCs 数量较少。本研究把 COCs 的采集时间分为每个卵巢采集 COCs 所需时间和每挑选 1 个 COCs 所需时间两部分。研究表明,抽吸法的采集效率为 2.60 min · 个⁻¹,显著高于刀切过滤法的 7.27 min · 个⁻¹ ($P < 0.05$)。陈晓宇等^[5]虽然对不采集方法采集 COCs 的时间进行了比较,但是没有详细说明采集时间是专指从卵巢采集出 COCs 的时间,还是指从卵巢采集出 COCs 的时间加上从卵泡液中挑选出 COCs 的时间,本研究的采集时间抽吸法为 1.58 min · 个⁻¹ 卵巢,解剖法为 5.93 min · 个⁻¹,两个研究间的差异可能与采集时间的计算办法和每个卵巢采集的 COCs 数量不同有关。

卵母细胞的采集方法还影响到卵丘细胞的完整程度和成熟率^[16]。本研究中,解剖法获得的 A 级 COCs 的比例最高,达到 87.74%,B 级 11.49%,C 级仅占 0.40%,这可能与卵泡直径和卵泡内 COCs 能否自动浮游出来的严格挑选分不开。刀切过滤法得到的 A、B 级的 COCs 比例高于抽吸法,但差异不显著 ($P > 0.05$),这是因为抽吸法容易伤及卵母细胞外的卵丘细胞,出现不完整的 COCs^[10]。卵丘细胞的存在和扩散对卵母细胞的成熟及其以后的发育是必须的,它可为卵母细胞的成熟提供必需的营养物质^[17]。本研究中,解剖法和刀切过滤法的卵母细胞成熟率高达 80%,显著高于抽吸法 ($P < 0.05$),这可能是因为解剖法和刀切过滤法获得 A 级 COCs 比例远远高于 B 级比例,相反,抽吸法获得的 A 级

COCs 比例却低于 B 级比例,最终导致解剖法和刀切过滤法的卵母细胞成熟率高于抽吸法。

如果在 3 种方法中把 COCs 采集效率、COCs 完整性及卵母细胞体外成熟率进行单独比较,我们无法得出哪一种方法较为理想的结论。因此,我们得假设用每个方法体外培养 100 个成熟的卵母细胞,通过卵母细胞成熟率、A、B 级比例、每个卵巢采集 COCs 个数,换算出 3 种方法需要的卵巢数量和总的时间。本研究中,解剖法虽然获得 A、B 级的比例和 COCs 成熟率最高,但因方法难以掌握,并且只从卵巢中挑选直径约 6 mm 的卵泡等,导致需要大量的卵巢(80.6 个)数量和最长的时间(758.9 min),解剖法虽获得 A、B 级 COCs 比例高达 99.23%,卵母细胞的成熟率高达 80%,但不仅每个卵巢采集 COCs 个数最低,仅为 1.55 个,而且采集效率也显著低于刀切过滤法和抽吸法($P < 0.05$),方法难以掌握;抽吸法虽然单个卵巢的采集效率最高,但因 A、B 比例和成熟率较低,导致所需卵巢的数量最多,采集和挑选需要的总时间也远远高于解剖法。刀切过滤法是通过刀片划破卵泡而使 COCs 自然流出,然后通过卵母细胞分离筛将杂质层层过滤使得杂质量不断减少,最后使 COCs 仅仅过滤到最底部的两个卵母细胞分离筛上的一种特殊方法,它对卵丘细胞的损伤要比抽吸法小得多,有近 80%的卵母细胞成熟率,而且单个卵巢采集 COCs 数量最高,使得其所需的卵巢数量最少,仅为 17.4 个,是抽吸法和解剖法的 1/5,总共需要的采集时间也就最低,仅为 126.6 min。

4 结 论

抽吸法虽采集效率最佳,但卵母细胞的成熟率低,解剖法虽获得 A、B 级 COCs 比例、卵母细胞的成熟率高,但每个卵巢采集 COCs 个数、采集效率最低;刀切过滤法每个卵巢采集 COCs 个数高于解剖法和抽吸法,而且 100 个成熟卵母细胞所需的卵巢数量最少,总采集时间最低。因此,与抽吸法和解剖法相比,本试验中开发出的刀切过滤法是一种高效、快速的卵母细胞采集方法。

参考文献:

[1] MATTIOLO M, BACCI M L, GALEATI G, et al. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 1989, 31(6):1201-1207.

- [2] 秦鹏春, 吴光明. 猪卵巢卵母细胞体外成熟与体外受精的研究 [J]. *中国农业科学*, 1995, 28(3):58-66.
- [3] 林 峰, 史明艳, 陈玉霞, 等. 山羊卵泡卵母细胞的采集及体外成熟效果研究 [J]. *中国农学通报*, 2007, 23(11):12-15.
- [4] 陈晓宇, 刘 东, 李青旺, 等. 猪卵巢卵母细胞的收集和体外成熟培养 [J]. *上海农业学报*, 2003, 19(2):75-78.
- [5] 陈晓宇, 刘 东, 李青旺, 等. 不同收集方法对猪卵母细胞体外成熟培养的影响 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2003, (1):24-25.
- [6] 王仲文. 去势对提高商品猪肉质与增重增效的关系 [J]. *中国猪业*, 2007, (8):38-39.
- [7] 文国艺. 广西本地猪体外受精研究初步 [J]. *广西农业科学*, 2000, (4):194-195.
- [8] 王 峰, 钱菊芬. 牛卵巢的保存与卵巢内卵母细胞采集的研究 [J]. *西北农业学报*, 2003, 12(4):12-16.
- [9] PAWSHE C H, TOTTEY S M, JAIN S K A. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization [J]. *Theriogenology*, 1994, 42:117-125.
- [10] 叶 荣, 陈学进, 杨利国, 等. 牛卵母细胞的采集方法和卵巢贮存条件对其体外成熟的影响 [J]. *苏州大学学报(自然科学版)*, 2004, 20(3):78-82.
- [11] CHOI Y H, HOCHI S, BRAUN J, et al. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries [J]. *Theriogenology*, 1993, 40(5):959-966.
- [12] WANI N A, WANIA G M, KHANA M Z, et al. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep [J]. *Small Rumin Res*, 2000, 36(1):63-67.
- [13] WANI N A, WANIA G M, KHANA M Z, et al. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization procedures in sheep [J]. *Small Rumin Res*, 1999, 34(1):71-76.
- [14] 南木甲, 张雁平. 不同采卵方法及卵巢所处性周期阶段对绵羊卵母细胞体外成熟的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(7):137-139.
- [15] DAS G K, JAIN G C, SOLANKI V S, et al. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo [J]. *Theriogenology*, 1996, 46(8):1403-1411.
- [16] MARTINO A, PALOMO M J, MOGAS T, et al. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization [J]. *Theriogenology*, 1994, 42(5):859-873.
- [17] FUKUI Y, SHAKUMA Y. Maturation of bovine oocytes culture *in vitro*; relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells [J]. *Biol Reprod*, 1980, (22):669-673.