

几种不同化学激活方法对牛卵母细胞孤雌激活的影响^{*}

李雪峰, 安志兴, 郭继彤, 张 涌

(西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 为确定牛体细胞核移植胚胎的激活条件, 比较了几种不同化学激活方法对牛卵母细胞激活的影响。选择明显具有第一极体的成熟卵母细胞, 随机分为9组: ① Ionomycin (I) + 6-甲氨基嘌呤(D) (D); ② I + D + 细胞松弛素B (CCB) (DC); ③ I + 放线菌酮(X) (IX); ④ I + X + CCB (IXC); ⑤ 体积分数7%乙醇(E) + D (ED); ⑥ E + D + CCB (EDC); ⑦ E + X (EX); ⑧ E + X + CCB (EXC); ⑨ Sr^{2+} + CCB (SC)。Ionomycin 和乙醇的处理时间为5 min, 6-DMA P ± CCB 的处理时间为4 h, 放线菌酮 ± CCB 的处理时间为5 h, Sr^{2+} + CCB 的处理时间为10 h。培养36 h后, 各组卵母细胞的卵裂率分别为72.0%, 75.5%, 81.3%, 85.1%, 81.7%, 82.4%, 74.4%, 78.1%和51.0%; 培养到196 h时, 各组的囊胚发育率分别为18.2%, 24.5%, 7.2%, 11.9%, 11.1%, 19.4%, 6.7%, 12.2%和2.0%。结果表明, 在10 mmol/L Sr^{2+} 内培养10 h不能有效地激活牛卵母细胞, Ionomycin + 6-DMA P ± CCB 以及乙醇 + 6-DMA P + CCB 结合使用可以有效地激活牛卵母细胞。Ionomycin 比乙醇对牛卵母细胞的激活作用强; 6-DMA P 比CHX 的激活效果好, 激活液中CCB 的存在对牛孤雌胚胎的发育有利。

[关键词] 卵母细胞; 孤雌激活; 化学激活; 激活方法; 牛

[中图分类号] Q 132.4; S823.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0043-05

卵母细胞的充分激活是提高核移植效率的关键因素之一, 只有在去核卵母细胞充分激活的情况下, 去核卵才可以指导移入的核发生发育程序重编(re-programming)。能引起牛卵母细胞激活的因素很多, 如电脉冲^[1]、乙醇^[2]、钙离子载体^[3]、放线菌酮^[4]和 Ionomycin^[5]等, 但孤雌激活的胚胎发育能力受激活方法的影响很大, 这主要取决于激活方法引起的 Ca^{2+} 波动等激活反应与正常受精中卵子的激活反应间的差异大小。

核移植胚胎的充分激活是保证胚胎正常发育的先决条件, 在早期进行的胚胎细胞核移植研究中, 普遍采用电脉冲激活核移植胚胎。但电激活效率会受卵母细胞卵龄、激活条件以及融合仪的影响, 在不同仪器上的重复性差, 严重影响了电激活的应用。近年来, 许多研究者已开始使用重复性好、结果较稳定的化学激活方法来激活卵母细胞。由于化学激活方法能大大提高核移植胚胎的激活效率, 近年来已成为小鼠、牛、猪、山羊等体细胞核移植成功的重要原因。

本研究比较了几种不同的化学激活方法对牛卵母细胞激活的影响, 为体细胞核移植胚胎的激活寻找一种或几种高效、稳定的激活方法。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞的采集和体外成熟培养

从屠宰场获得的卵巢表面中抽取未成熟的卵母细胞, 选择具有完整卵丘细胞层及均匀细胞质的卵母细胞, 在预先平衡2 h以上成熟液中进行体外成熟培养(38.5℃、体积分数5%的 CO_2 饱和湿度空气)。体外成熟液为TCM 199中添加0.22 mg/L 丙酮酸钠、10 mmol/L Hepes、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 17- βE_2 、抗生素和体积分数10%胎牛血清(Gibco)。成熟培养23~24 h后, 去除卵母细胞外所有卵丘细胞, 挑选明显具有第一极体的成熟卵母细胞, 按试验设计随机分组。

1.2 试验设计和方法

本研究比较 Ionomycin (I)、体积分数7%乙醇(E)、6-甲氨基嘌呤(6-DMA P, D)、放线菌酮(cycloheximide, CHX, X)以及细胞松弛素(cytochalasin B, CCB, B)的添加与否对牛卵母细胞激活的影响, 故进行 $2 \times 2 \times 2$ 试验设计, 并比较 Sr^{2+} 对牛卵母细胞的激活效果。试验共分9组: ① I + 6-DMA P (D) (D); ② I + D + CCB (C) (DC); ③ I + CHX (X)

^{*} [收稿日期] 2001-05-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39830280)

[作者简介] 李雪峰(1965-), 男, 内蒙古乌盟人, 副研究员, 在读博士研究生, 主要从事胚胎工程研究。

(IX); ④ I+X+C (IXC); ⑤ E+D (ED); ⑥ E+D+C (EDC); ⑦ E+X (EX); ⑧ E+X+C (EXC); ⑨ Sr^{2+} +CCB (SC)。

1.2.1 **Ionomycin 与 6-DMA P 的激活** 选择明显具有第一极体的成熟卵母细胞,用 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ Ionomycin 激活 5 min, 用培养液洗 3 次后, 在含 2 mmol/L 6-DMA P 或 6-DMA P + $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ CCB 的培养液内培养 4 h, 经培养液洗 3 次后移入胚胎培养液中培养, 分别于培养后 24 和 36 h 检查卵裂率, 培养第 8 天后统计发育到囊胚、扩张囊胚和孵化囊胚的数量。

1.2.2 **Ionomycin 与放线菌酮(CHX)的激活** 卵母细胞在 Ionomycin 内激活 5 min, 用培养液洗 3 次后, 移入含 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ CHX (IX) 或 CHX + $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ CCB (IXC) 的培养液内培养 5 h, 其余步骤同 1.2.1。

1.2.3 **乙醇与 6-DMA P 或 CHX 的激活** 卵母细胞在含乙醇的培养液内激活 5 min, 用培养液洗 3 次后, 移入含 2 mmol/L 6-DMA P (ED) 或 6-DMA P + $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ CCB (EDC) 的培养液内培养 4 h; 或激活后移入含 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ CHX (EX) 或 CHX + CCB (EXC) 的培养液内培养 5 h, 其余步骤同 1.2.1。

1.2.4 **Sr^{2+} + CCB 的激活** 选择明显具有第一极体的卵母细胞, 在含 10 mmol/L SrCl_2 和 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ CCB 的 EBSS (无 Ca^{2+}) 内培养 10 h, 用培养液洗 3 次后移入胚胎培养液中培养, 同上述时间检查卵裂率和囊胚发育率。

1.3 胚胎的体外培养

本试验用于胚胎培养的培养液为 TALP 与 M 199 (1:2) 的混合液, 并加 10 mmol/L Hepes、体积分数 5% FBS、 0.1 mmol/L EDTA、 $100\text{ }\mu\text{mol/(min}\cdot\text{mL)}$ 青霉素和 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素。经激活处理后的卵母细胞在颗粒细胞单层进行共培养, 每 48 h 半量换液 1 次。

所有试验都重复 5 次以上, 数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果

表 1 比较了几种不同化学激活方法对牛卵母细胞孤雌激活的影响。从表 1 可知, 牛卵母细胞经各种化学激活方法处理后, 体外培养 24 h, 各组卵母细胞的卵裂率无明显差异, 但均显著高于 SC 组的卵裂率 ($P < 0.05$)。培养 36 h 后, 各处理组间的卵裂率出现一定的差异, IX, IXC, ED, EDC 组卵母细胞的卵裂率明显高于 D, DC, EX 和 SC 组, 且 SC 组显著低于其他各组 ($P < 0.05$), 表明 Sr^{2+} 不能有效地激活牛卵母细胞。培养到第 8 天时, D, DC 和 EDC 组内囊胚发育率显著高于 IX, IXC, ED, EX, EXC 组, 而 SC 组囊胚发育率最低, 显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。结果表明, Ionomycin 与 6-DMA P ± CCB 以及乙醇与 6-DMA P + CCB 结合使用可以有效地激活牛卵母细胞, 是较理想的化学激活方法。

表 1 不同化学激活方法对牛卵母细胞孤雌激活的影响

Table 1 Effect of different chemical activation on the development of bovine parthenogenetic oocytes

激活方法 Methods of activation			卵裂率/% Percentage of cleavage		囊胚发育率/% Percentage of blastocysts
			24 h	36 h	
Ionomycin	6-DMA P	- CCB	149/264(56.4) ab	190/264(72.0) e	48/264(18.2) g
		+ CCB	98/184(53.3) b	139/184(75.5) de	45/184(24.5) g
	CHX	- CCB	77/139(55.4) ab	113/139(81.3) d	10/139(7.2) i
		+ CCB	195/302(64.6) a	257/302(85.1) d	36/302(11.9) h
乙醇 Ethanol	6-DMA P	- CCB	168/306(54.9) b	250/306(81.7) d	34/306(11.1) h
		+ CCB	185/324(57.1) ab	267/324(82.4) d	63/324(19.4) g
	CHX	- CCB	238/449(53.0) b	334/449(74.4) de	30/449(6.7) i
		+ CCB	156/246(63.4) a	192/246(78.1) de	30/246(12.2) h
	Sr ²⁺ + CCB		89/296(30.1) c	151/296(51.0) f	6/296(2.0) j

本研究中卵母细胞经 Ionomycin 或乙醇激活后, 在相同的条件下培养, 卵母细胞的卵裂率与囊胚发育率表现出与激活方法有关。Ionomycin 激活后同样条件下培养的卵母细胞, 尽管其卵裂率有时会

低于乙醇激活的卵母细胞, 但囊胚发育率一般都高于乙醇激活的卵母细胞, 表明 Ionomycin 对牛卵母细胞的激活作用比乙醇强。

本研究中卵母细胞用 Ionomycin 或乙醇激活后

分别在 6-DMA P 或 CHX 中培养, 卵母细胞的卵裂率与激活方法有关。用 *Ionomycin* 激活卵母细胞时, 在 CHX 内培养的卵母细胞卵裂率显著高于 6-DMA P 内培养的卵母细胞 ($P < 0.05$); 而用乙醇激活时, 6-DMA P 内培养的卵母细胞略高或显著高于 CHX 内培养的卵母细胞 (82.4% vs 78.1%, $P > 0.05$; 81.7% vs 74.4%, $P < 0.05$)。但无论用何种激活方法, 在 6-DMA P 内培养的孤雌生殖胚胎的囊胚发育率显著高于 CHX 内培养的胚胎 ($P < 0.05$)。表明对孤雌激活胚胎的囊胚发育率而言, 6-DMA P 的激活效果比 CHX 的好。

3 讨论

3.1 *Ionomycin* 和乙醇对牛卵母细胞的激活结果

Ionomycin 是一种近年来发现的高效 Ca^{2+} 载体, 也是一种有效的人工激活剂, 已被人们广泛地应用于哺乳动物卵母细胞的激活中^[5~7]。*Ionomycin* 与 Ca^{2+} 载体 A 23187 不同的是, *Ionomycin* 并不直接引起 Ca^{2+} 的跨膜转运, 而是动员细胞内的 Ca^{2+} , 依次触发 Ca^{2+} 内流^[8]。由于其对细胞质内游离 Ca^{2+} 变化产生的这种二向性作用, 故可以被有效地用来消耗小鼠细胞内 Ca^{2+} 储存^[9]。尽管 *Ionomycin* 能激活卵母细胞, 但这种激活的卵母细胞无原核形成, *Ionomycin* 只有与蛋白质磷酸化抑制剂 6-DMA P 和蛋白质合成抑制剂 CHX 协同作用, 才可以有效地激活牛卵母细胞。在 Susko-Parrish 等^[10]的研究中, 卵母细胞用 *Ionomycin* 处理后立即用 6-DMA P 处理, 得到了高比例的原核形成率 (76%) 和囊胚发育率 (21%)。本研究用相同的方法激活牛卵母细胞后得到了类似的结果, 卵裂率为 72%, 囊胚发育率 18%, 进一步证实了这种激活方法的效率。

乙醇是发现较早的一种化学激活剂, 其对卵母细胞的激活主要是通过水解细胞膜上 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₂) 产生 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP₃), 从而诱发细胞内源钙释放到细胞质, 提高了细胞胞内的钙浓度^[11]。哺乳动物 M II 期卵母细胞在含有 7%~8% 乙醇的培养液中培养 5~7 min, 可以激活卵母细胞使其形成原核, 甚至可以发育到囊胚。尽管乙醇对卵母细胞的激活无种间特异性, 但不同动物卵母细胞对乙醇激活的反应不同。

本研究也用乙醇较好地激活了牛卵母细胞, 但从得到的结果来看, 乙醇激活后同样条件下培养的卵母细胞, 尽管其卵裂率与 *Ionomycin* 激活后的相近, 但囊胚发育率略低, 证明乙醇对牛卵母细胞的激

活作用不如 *Ionomycin* 强。

3.2 6-DMA P 和 CHX 对牛卵母细胞的激活结果

6-DMA P 是蛋白质磷酸化抑制剂, 它能阻止蛋白质的磷酸化进而抑制成熟促进因子 (MPF) 和细胞静止因子 (CSF) 的活性, 同时也抑制了第二极体的排放, 保证了孤雌激活卵母细胞的染色体为二倍体。由于第二极体的排放被抑制, 将乙醇或 *Ionomycin* 激活后的卵母细胞, 立即在含 6-DMA P 的培养液内培养, 第二个原核的形成被抑制, 卵母细胞只形成一个二倍体的原核^[12]。CHX 是蛋白质合成抑制剂, 它主要抑制了卵母细胞维持在 M II 所需要的 MPF 和 CSF 的合成, 进而使卵母细胞内 MPF 活性迅速下降, 卵母细胞脱离 M II 期, 完成第二次减数分裂, 导致卵母细胞激活, 但 CHX 不抑制蛋白质的磷酸化, 故不影响构成纺锤体的微管蛋白的活性, 也就不影响第二极体的排出^[3]。

6-DMA P 与 CHX 在对卵母细胞的激活机制以及产生的细胞反应上有所不同。经 6-DMA P 处理的卵母细胞, MPF 的一个亚基 cdc2 的磷酸化发生较早, 丝裂激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的去磷酸化较早, cyclin B 的积累和 cdc2 的去磷酸化导致了有丝分裂前 MPF 的再活化; 而 CHX 激活的卵母细胞上 cdc2 的磷酸化发生较晚。cyclin B 的降解是 MPF 迅速失活的主要原因, 在 6-DMA P 激活的卵母细胞上 MPF 活性低是由 cdc2 的磷酸化来维持; 而在 CHX 激活的卵母细胞上, cyclin B 合成的抑制维持了 MPF 处于较低水平。在细胞表现上, 6-DMA P 激活的卵母细胞在激活后 4 h 就观察到原核的形成; 而 CHX 处理的卵母细胞只有在处理后 8 h 才观察到原核的形成, 而且 CHX 只有与 CCB 协同作用才能抑制第二极体的排放^[3]。本研究却发现用 CHX 激活牛卵母细胞时, 未发现第二极体排放明显增加, 卵裂率不受 CHX 是否 CCB 协同作用的影响, 而 CHX 与 CCB 协同作用明显增加了囊胚发育率, 造成这种差异的原因有待于进一步研究。本研究中, 卵母细胞用 *Ionomycin* 或乙醇激活后, 在 6-DMA P 内培养的孤雌生殖胚胎的囊胚发育率显著高于 CHX 内培养的胚胎。结果表明, 对孤雌激活胚胎的囊胚发育率而言, 6-DMA P 的激活效果比 CHX 好。该结果与 Booth 等^[13]的结果相同, 他们也发现用 6-DMA P 激活牛卵母细胞得到的囊胚发育率比 CHX 高。

3.3 Sr^{2+} 对牛卵母细胞的激活

Sr^{2+} 与 Ca^{2+} 是属于同族的二价阳离子, Sr^{2+} 可

以取代 Ca^{2+} 的位置, 通过钙泵进入细胞内而引起 Ca^{2+} 波动升高, 导致卵母细胞的激活。 Sr^{2+} 可以引发一个较长时间的 Ca^{2+} 波动过程, 可能是在细胞内 Sr^{2+} 不被消耗, 但同时又可模拟 Ca^{2+} 而诱发内源性 Ca^{2+} 的释放, 其诱发的 Ca^{2+} 波动与正常受精过程中 Ca^{2+} 的波动极为相似^[14], 尽管 Sr^{2+} 可以诱导卵母细胞激活, 但对 Sr^{2+} 作用的研究仅限于对卵母细胞的激活, Wakayama 等^[15] 在小鼠体细胞核移植的研究中首次使用了 Sr^{2+} 作为核移植胚胎的激活剂, 他们将核移植后的胚胎置于含 10 mmol/L Sr^{2+} 和 $5 \mu\text{g/mL}$ CCB 的培养液内 6 h, 核移植胚胎被激活, 并用此方法得到了体细胞核移植小鼠。山羊卵母细胞在 10 mmol/L Sr^{2+} 内培养 6 h 激活率极低 (2%), 培养 12 h 可以使 80.4% 的卵母细胞激活 (郭继彤, 未发表资料)。本研究用 10 mmol/L Sr^{2+} 激活牛卵母细胞 10 h, 结果激活率仅为 51%, 可能是激活时间不够引起激活率较低。

3.4 CCB 对牛卵母细胞的激活

细胞松弛素 B (CCB) 广泛地被应用于哺乳动物细胞核移植研究中, 由于其作用主要是抑制细胞内微管和微丝的形成, 使得卵母细胞内细胞骨架松弛, 增加了细胞的柔韧性, 有利于显微操作; 同时, CCB 破坏了纺锤体的形成, 抑制了极体的形成和染色体的排出, 保证了核移植胚胎的染色体倍数。无 CCB 时, 融合到激活卵子中的间期核会发生染色体单倍化现象^[16]。Smith 和 Wilmut^[17] 认为在无 CCB 时, 激活时诱发的微丝依赖性机制会影响供体核的染色体倍数, 从而引起早期操作胚胎的发育阻止。

本研究中发现, 卵母细胞在相同条件下激活后, 卵母细胞的卵裂率不受培养液中是否含有 CCB 的影响, 但在含有 CCB 的培养液中培养的卵母细胞, 其囊胚发育率高于无 CCB 培养液中培养的卵母细胞, 一些组间的差异显著。表明 CCB 的存在对牛孤雌生殖胚胎的体外发育有利。

[参考文献]

- [1] Aoyagi Y, Kameyama K, Takeda T. Artificial activation of bovine oocytes matured in vitro by electric shock or exposure to ionophore A 23187[J]. Theriogenology, 1992, 37: 188
- [2] Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol[J]. Gamete Res, 1987, 16: 243- 249
- [3] Liu L, Yang X. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes[J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 1- 7.
- [4] Bodo S, Dinnyes A, Baranyai B, et al. Comparison of different treatments for parthenogenetic activation of bovine oocytes matured in vitro[J]. Acta Vet Hung, 1998, 46(4): 493- 500
- [5] De La Fuente R, King W A. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes[J]. Biol Reprod, 1998, 58(4): 952- 962
- [6] Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, et al. Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases[J]. Mol Reprod Dev, 2000, 55(4): 422- 432
- [7] Loi P, Ledda S, Fulka J, et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols[J]. Biol Reprod, 1998, 58(5): 1177- 1187.
- [8] Morgan A, Jacob R. Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane[J]. Biochem J, 1994, 300: 665- 672
- [9] McGuinness O M, Moreton R B, Johnson M H, et al. A direct measurement of increased divalent cation influx in fertilized mouse oocytes[J]. Development, 1996, 122: 2199- 2206
- [10] Susko-Parrish J L, Leibfried-Rutledge M L, Northcutt D L, et al. Inhibition of protein kinases after induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion[J]. Dev Biol, 1994, 66: 729- 739
- [11] Machaty Z, Prather R S. Strategies for activating nuclear transfer oocytes[J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10: 599- 613
- [12] Ledda S, Loi P, Kulka J Jr, et al. The effect of 6-dimethylaminopurine on DNA synthesis in activated mammalian oocytes[J]. Zygote, 1996, 4: 7- 9
- [13] Booth P J, Holm P, Vaita G. Comparison between 6-dimethylaminopurine and cycloheximide activation treatments for bovine nuclear transfer[J]. Theriogenology, 1999, 51: 197.
- [14] Kline D, Kline J T. Repetitive calcium transients and the roles of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse eggs[J]. Gamete Res, 1992, 18: 363- 374
- [15] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei

- [J]. Nature, 1998, 394: 369- 374
- [16] Czołowska R, Waksundzka M, Kubiak J Z, et al Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II. mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres[J]. J Cell Sci, 1986, 84: 129- 133
- [17] Smith IC, Whit I Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vitro of sheep embryos after nuclear transplantation[J]. Biol Reprod, 1989, 40: 1027- 1035

Effect of different chemical activations on the development of bovine parthenogenetic embryos

L I Xue-feng, AN Zhi-xing, GUO Ji-tong, ZHANG Yong

(College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The cleavage and development of bovine oocytes activated by different chemical activative procedures were investigated. Matured oocytes were grouped into 9 treatments randomly: (1) Ionomycin (I) + 6-DMA P (D); (2) Ionomycin + 6-DMA P + cytochalasin B (CCB) (DC); (3) Ionomycin + Cycloheximide (CHX) (IX); (4) Ionomycin + CHX + CCB (IXC); (5) 7% ethanol + 6-DMA P (ED); (6) ethanol + 6-DMA P + CCB (EDC); (7) ethanol + CHX (EX); (8) ethanol + CHX + CCB (EXC); (9) Sr^{2+} + CCB (SC). The treatment time for Ionomycin or 7% ethanol, 6-DMA P $\pm$ CCB, CHX $\pm$ CCB and Sr^{2+} + CCB were 5 min, 4 h, 5 h and 10 h, respectively. The cleavage rates of each group were 72.0%, 75.5%, 81.3%, 85.1%, 81.7%, 82.4%, 74.4%, 78.1% and 51.0% respectively after cultured for 36 h and blastocyst rates were 18.2%, 24.5%, 7.2%, 11.9%, 11.1%, 19.4%, 6.7%, 12.2% and 2.0% respectively after cultured for 8 days. These results indicate that bovine oocytes can be activated by D, DC and EDC effectively, whereas oocytes cannot be stimulated effectively by 10 mmol/L Sr^{2+} for 10 h. Ionomycin has strong activation effect when compared with ethanol, while 6-DMA P is more effective than cycloheximide in activating bovine oocytes. Cytochalasin B is advantageous for the development of bovine parthenogenetic embryos.

Key words: oocytes; parthenogenesis; chemical activation; activation procedure; bovine