

牛卵胞质内显微受精中第一极体位置与激活方法研究

原巨强^{1,2}, 陈静波², 赵云程^{2,3}, 海丽且木², 赵晓娥¹, 马保华¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 新疆畜牧科学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3 新疆农业大学 动物科技学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **【目的】**探讨牛卵母细胞胞质内显微受精(ICSI)操作中,卵母细胞第一极体位置以及受精卵化学激活方法对 ICSI 卵体外发育的影响。**【方法】**采集牛卵巢,成熟培养卵母细胞后,调整其第一极体分别位于相当于时钟 6 点和 12 点的位置,进行牛卵母细胞胞质内显微受精,以 ICSI 卵不进行激活处理为未激活组,分别采用乙醇、离子霉素及离子霉素联合 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)激活 ICSI 卵,统计 ICSI 卵的形态完整率、卵裂率和囊胚发育率。**【结果】**第一极体分别位于相当于时钟 6 点和 12 点的位置时,所获得的 ICSI 卵形态完整率(92.9%和 94.0%)、卵裂率(37.1%和 40.0%)和囊胚发育率(12.9%和 12.2%)均无统计学差异($P>0.05$)。未激活组 ICSI 卵的卵裂率较低,不能发育到囊胚;用乙醇或离子霉素激活时,ICSI 卵的卵裂率(25.7%和 27.6%)和囊胚发育率(3.3%和 3.4%)均显著高于未激活组(7.5%和 0)($P<0.05$);用离子霉素与 6-DMAP 联合激活时,ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率分别为 38.9%和 13.9%,显著高于乙醇激活组、离子霉素激活组及未激活组($P<0.05$)。**【结论】**对牛卵母细胞进行 ICSI 操作时,第一极体分别位于相当于时钟 6 点和 12 点位置时,对 ICSI 卵的发育无显著影响;采用离子霉素和 6-DMAP 联合激活,有利于 ICSI 卵的体外发育。

[关键词] 牛卵胞质内显微受精;第一极体;化学激活;囊胚发育率

[中图分类号] S814.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)02-0017-06

Studies on direction of the first polar body and different activation methods in bovine oocytes intracytoplasmic sperm injection

YUAN Ju-qiang^{1,2}, CHEN Jing-bo², ZHAO Yun-cheng^{2,3}, HAI Li-qie-mu²,
ZHAO Xiao-e¹, MA Bao-hua¹

(1 Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3 College of Animal Science and Technology, Xinjiang Agriculture University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: **【Objective】** This study investigated the effect of direction of the first polar body (PB I) and different activation method on the development of the bovine intracytoplasmic sperm injection (ICSI) zygote *in vitro*. **【Method】** Oocytes were collected from ovaries and matured *in vitro*, two directions (6 and 12 o'clock) of the first polar body modulated in oocytes at ICSI were examined, then oocytes after ICSI were treated with ethanol, Ionomycin and Ionomycin combine with 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) for activation, or without activating treat (the control group), the ICSI zygotes modality integrity rate, cleavage rate and blastocyst rate were counted. **【Result】** There were no significant differences in the ICSI zygotes modality integrity rate (92.9% vs. 94.0%, $P>0.05$), cleavage rate (37.1% vs. 40.0%, $P>0.05$), blasto-

* [收稿日期] 2007-03-12

[基金项目] 陕西省重大科技专项计划项目(2006KZ07-G1);西北农林科技大学科研专项(04ZM001)

[作者简介] 原巨强(1981—),男,陕西眉县人,在读硕士,主要从事动物胚胎生物技术研究。

[通讯作者] 马保华(1965—),男,陕西城固人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎生物技术研究。

E-mail: mabaohuaxn@tom.com

cyst rate (12.9% vs. 12.2%, $P>0.05$) between the two directions of the PB I. The ICSI zygotes cleavage rate and blastocyst rate were higher with activated by 7% ethanol (25.7%, 3.3%) and Ionomycin (27.6%, 3.4%) than that with the control group (7.5%, 0) ($P<0.05$), the ICSI zygotes cleavage rate and blastocyst rate were significantly higher with activated by Ionomycin combine with 6-DMAP (38.9%, 13.9%) than those with other groups ($P<0.05$). 【Conclusion】 In conclusion, there were no significant differences in the ICSI zygotes modality integrity rate, cleavage rate, blastocyst rate between the two directions (6 o'clock and 12 o'clock) of the the PB I, activated with Ionomycin followed by 6-DMAP could improve the development of ICSI zygotes.

Key words: bovine intracytoplasmic sperm injection; first polar body; chemical activation; blastocyst rate

胞质内显微受精 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) 技术, 是 20 世纪 80 年代后期发展起来的新型辅助体外受精技术, 这一技术借助显微操作, 将精子(或精子细胞)直接注入卵胞质内, 使精子越过透明带和卵质膜而完成受精过程。因此被广泛应用于揭示受精机理的研究, 在提高优良种公畜精子的利用率、保存野生动物遗传资源及挽救珍稀动物等方面具有现实意义。

自 Hosoi 首先在家兔上成功运用 ICSI 技术以来, 如何改进影响 ICSI 技术效率的因素成为该研究领域的重点^[1]。Silva 等^[2]认为, 卵细胞刚完成第一次减数分裂逸出第一极体后停滞在 M II 期, 此时第一极体可能和纺锤体相毗邻, 显微注射过程中确定第一极体的位置后, 才能保证注射时不损伤纺锤体。但在人的 ICSI 研究中, 关于极体位置有不同的观点, Westerlaken 等^[3]认为, 第一极体位于相当时针 6 点位置的受精率比 12 点高、胚胎质量好; 但 Stodart 等^[4]认为, 第一极体位于相当于时针 6 点和 12 点时人的 ICSI 临床结果没有明显差异。Kim 等^[5]将猪的球形精子细胞和球形精子细胞核分别注入到提前电激活的卵母细胞质内, 体外培养囊胚率分别为 25% 和 27%。Li 等^[6]将马的显微受精卵分别用离子霉素 (Ionomycin)、乙醇 (Ethanol)、噻汞撒 (Thimerosal)、三磷酸肌醇 (Inositol-1, 4, 5-triphosphate) 激活, 结果噻汞撒对提高马的注射卵激活率和正常受精率的效果优于其他几种激活剂。

由于 ICSI 技术受到诸多因素的影响, 目前 ICSI 卵的发育率还不能达到生产上的要求, 从而影响 ICSI 技术在实际生产中的推广和应用。

本试验研究了牛卵母细胞第一极体所处位置及采用不同激活方法对牛 ICSI 卵体外发育的影响, 旨在为进一步利用性别分离精子体外生产性别控制胚胎奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛卵巢 屠宰场采集屠宰后 30 min 内的牛卵巢, 置于 37 °C 生理盐水的保温罐中 2 h 内带回实验室。

1.1.2 主要仪器及试剂 主要仪器包括倒置相差显微镜 (Olympus 公司)、体视显微镜 (北京泰克公司)、CO₂ 培养箱 (Heraeus 公司)。

试剂包括透明质酸酶 (Hyaluronidase)、细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB)、聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone, PVP)、乙醇、离子霉素、6-二甲基氨基嘌呤 (6-Dimethylaminopurine, 6-DMAP) 等, 均为 Sigma 产品。

1.2 操作液的配制

1.2.1 采卵液 M199 培养液 + 体积分数 2% 胎牛血清 (FBS) + 5 IU/mL 肝素 + 100 IU/mL 青霉素 + 100 IU/mL 链霉素。

1.2.2 卵母细胞成熟培养液 M199 培养液 + 体积分数 10% 牛卵泡液 + 0.055 mg/mL 丙酮酸钠 + 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes) + 2.2 mg/mL NaHCO₃ + 0.075 mg/mL 青霉素 + 0.050 mg/mL 链霉素 + 10% 新生牛血清 (NBS)。

1.2.3 精子获能液 1.12 mol/L NaCl + 2.7 mmol/L KCl, 25.1 mmol/L NaHCO₃ + 0.4 mmol/L NaH₂PO₄ · 2H₂O + 10.0 mmol/L 乳酸钠 + 1.0 mmol/L 丙酮酸钠 + 20 mg/mL 牛血清白蛋白 (BSA) + 5.0 mmol/L Hepes + 20 ng/mL 肝素 + 0.075 mg/mL 青霉素 + 0.050 mg/mL 链霉素。

1.2.4 PVP 液 用精子获能液配制成体积分数 5% PVP 液。

1.2.5 细胞松弛素 B (CB) 液 用卵母细胞成熟培养液配制 5 μg/mL CB 工作液。

1.2.6 乙醇液 用卵母细胞成熟培养液稀释无水乙醇,配制成体积分数7%的乙醇液。

1.2.7 离子霉素液 取1 mg 离子霉素,直接在原管中加入2.677 mL 二甲基亚砜(DMSO)混匀,100 μL /支分装,−20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。使用时用卵母细胞成熟培养液10 mL 将1管储存液配制成5 $\mu\text{mol/L}$ 工作液。

1.2.8 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)液 称量0.017 7 g 6-DMAP 溶于570 μL DMSO 中制备成储存液,100 μL /支分装,−20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。使用时用卵母细胞成熟培养液10 mL 将1管储存液配制成1.9 mmol/L 工作液。

1.2.9 ICSI 卵体外培养液 M199 培养液+2.2 mg/mL NaHCO_3 +0.055 mg/mL 丙酮酸钠+20 mmol/L Hepes+100 IU/mL 青霉素+100 IU/mL 链霉素。

1.3 牛卵母细胞的获得与成熟培养

用生理盐水冲洗采回的牛卵巢,剔除卵巢表面的结缔组织及附着的输卵管,用体积分数75%酒精浸泡1 min。生理盐水再次冲洗后,连同培养皿放置在已预热的婴儿保育箱内。用10 mL 注射器(预先吸取1~2 mL 已预热平衡的采卵液)抽吸卵巢表面2~8 mm 卵泡中的卵泡液,吸取约5 mL 卵泡液后,将注射器内的液体缓缓注入直径60 mm 培养皿中。重复以上操作。抽吸完成后,将抽吸液置于体视显微镜下检出胞质均匀、有3层以上卵丘包裹的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)。将COCs 洗涤3遍,每组30~40枚COCs 移入含2 mL 卵母细胞成熟培养液的24孔培养板培养孔中,置38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 、饱和湿度条件下成熟培养24 h。

1.4 牛精子的准备

牛冷冻精液解冻前2 h,在 CO_2 培养箱中平衡精子获能液,取商品化牛冷冻精液细管一支,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻15~20 s,用吸管吸取少量解冻后的精液,小心置于含有2 mL 精子获能液的离心管底部,浮育30 min后,活精子上游。

1.5 牛卵母细胞的胞质内显微受精

将1.3中成熟培养24 h后的COCs,移入含1 g/L 透明质酸酶且无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS液内消化2 min,用卵母细胞成熟培养液洗涤,获裸卵。选择进行胞质内显微受精的卵母细胞,卵母细胞要求第一极体形态呈球形、无碎片,且胞浆内无内含物、无大块颗粒样暗区、无空泡、无折光颗粒,将已选出的卵

母细胞用含5 $\mu\text{g/mL}$ CB的卵母细胞成熟培养液作用3~5 min,再用卵母细胞成熟培养液洗涤后进行显微注射。在显微操作仪上安装卵母细胞固定管(内径为20~30 μm)和精子注射管(内径6~8 μm)。在直径60 mm 培养皿中,自前而后制作3个50 μL 小液滴,前面的液滴为PVP液(加入获能精子悬液),中间液滴为卵母细胞成熟培养液(放置约30~50枚待注射卵母细胞),后面液滴为PVP液(不含精子)。液滴上覆盖石蜡油。

将注射管插入不含精子的PVP液滴中反复吹吸润洗,之后将注射管插入PVP液滴(加入获能精子悬液),选择1个精子,以垂直于精子尾巴中段的方向,猛然划过,使精子尾部打折以确定质膜破裂,然后将精子从尾部吸入注射管开口端。移入不含精子的PVP液滴中,将精子吹出,稍微洗一下再将其吸入注射管,移动固定管和注射管到含卵母细胞的卵母细胞成熟培养液滴中,固定卵母细胞,并使卵母细胞第一极体位于相当于时钟12点或6点的位置,注射管在相当于时针3点的位置穿过透明带,向着相当于时针9点的方向刺入,先回吸少量细胞质,确定卵质膜已破,再将精子及微量PVP液注入卵胞质中央。随后轻轻撤出注射管,释放卵母细胞。注射时注意尽量避开核区。

1.6 牛ICSI卵的化学激活

注射完毕后,将ICSI卵置于ICSI卵体外培养液中洗3次并培养30 min后,分别用体积分数7%乙醇,5 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素,5 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素处理5 min、再用1.9 mmol/L 6-DMAP 处理3 h 3种方法以激活ICSI卵,另设不进行激活处理的ICSI卵为未激活组(对照组)。

1.7 牛ICSI卵的体外培养

ICSI卵激活处理结束后,用ICSI卵体外培养液清洗3遍,移入含ICSI卵体外培养液的24孔培养板中,置于38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 、饱和湿度条件下体外培养,培养24 h后观察ICSI卵的卵裂率,培养48 h后,半量换液1次,再培养3~4 d,观察并记录发育到囊胚阶段的胚胎数,评定ICSI卵的体外发育能力。

1.8 数据统计分析

统计试验数据用 χ^2 检验进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 第一极体位置对牛ICSI卵体外发育的影响

由表1可知,将体外成熟培养的卵母细胞(图

1)反复吹打,得到注射用卵(图 2),将卵母细胞极体置于相当于时钟 6 点或 12 点的位置,注射后 ICSI 卵形态完整率、卵裂率和囊胚发育率,均无统计学差异($P>0.05$),只是将第一极体置于相当于时针 6 点时,注射后的 ICSI 卵形态完整率和囊胚发育率均略高于极体置于相当于时针 12 点时。

表 1 第一极体位置对牛 ICSI 卵体外发育的影响

Table 1 Influence of dirction of the first polar body on bovine ICSI zygotes development				%
极体位置 Positions of the first polar body	卵母细胞数 No. of oocytes	ICSI 卵形态完整率 Modality integrity rate of ICSI zygotes	ICSI 卵卵裂率 Cleavage rate of ICSI zygotes	ICSI 卵囊胚发育率 Clastocyst rate of ICSI zygotes
6	226	95.9(210/226)	37.1(78/210)	12.9 (27/210)
12	218	94.0(205/218)	40.0(82/205)	12.2 (25/205)

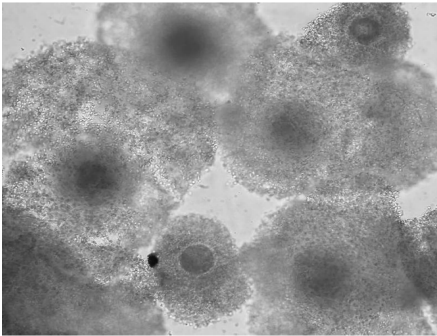


图 1 体外成熟培养 24 h 的牛卵母细胞(100×)
Fig. 1 Oocytes were matured *in vitro* for 24 h (100×)

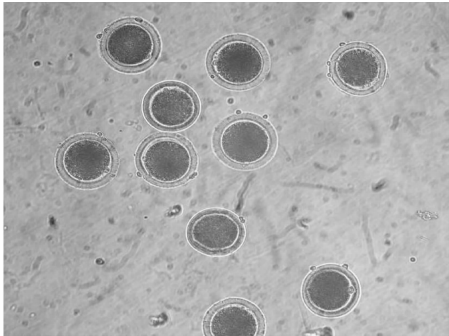


图 2 体外成熟培养 24 h 的牛裸卵(100×)
Fig.2 Nude eggs were matured *in vitro* for 24 h (100×)

2.2 不同激活方法对牛 ICSI 卵体外发育的影响

不同激活方法对牛 ICSI 卵体外发育的影响见 表 2。体外培养的 ICSI 卵卵裂和囊胚发育情况见图 3。

表 2 不同激活方法对牛 ICSI 卵体外发育的影响

Table 2 Influence of different activation methods on bovine ICSI zygotes development				%
激活方法 Activation method	卵母细胞数 No. of oocytes	ICSI 卵形态完整率 Modality integrity rate of ICSI zygotes	ICSI 卵卵裂率 Cleavage rate of ICSI zygotes	ICSI 卵囊胚发育率 Clastocyst rate of ICSI zygotes
未激活组 Contral	156	93.6(146/156)	7.5(11/146) a	0 a
乙醇 Ethanol	164	92.3(152/164)	25.7(39/152)b	3.3(5/152)b
离子霉素 Ionomycin	153	94.8(145/153)	27.6(40/145)b	3.4(5/145)b
离子霉素+ 6-DMAP Ionomycin + 6-MAP	150	96.0(144/150)	38.9(56/144)c	13.9(20/144)c

注:同列数据后标不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note: The different letters denote significance difference in a list of data($P<0.05$).

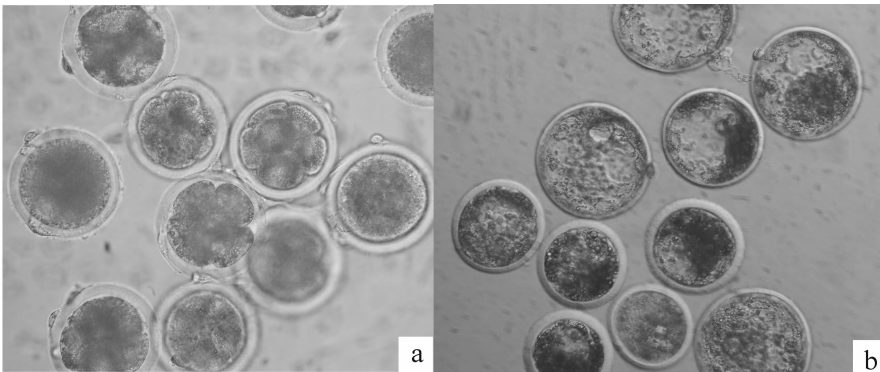


图 3 体外培养的牛 ICSI 胚胎(200×)
a. ICSI 胚胎发育到 8-细胞胚;b. ICSI 胚胎发育到囊胚
Fig. 3 ICSI zygotes were cultured *in vitro* (200×)
a. Developmental period from ICSI zygotes to 8-cell embryos;b. Developmental period from ICSI zygotes to blastocysts

表2表明,未激活组牛 ICSI 卵的卵裂率低,无囊胚发育。乙醇激活组牛 ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率分别为 25.7%和 3.3%,离子霉素激活组牛 ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率分别为 27.6%和 3.4%,以上两组之间差异不显著,但均显著高于未激活组($P<0.05$)。用离子霉素与 6-DMAP 联合激活时,牛 ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率分别为 38.9%和 13.9%,卵裂率和囊胚发育率均明显提高,与未激活组、乙醇激活组和离子霉素激活组差异显著($P<0.05$)。因此选择离子霉素与 6-DMAP 联合激活法,有利于提高牛 ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率。

3 讨 论

3.1 显微受精注射时不同第一极体位置对 ICSI 卵体外发育的影响

显微注射受精过程中,首先要选择第一极体完整的卵细胞用于胞质内显微受精,完整的第一极体是正常核成熟的体现,正常核成熟是正常受精的必要条件。Ebner 等^[7]报道,选择极体形态呈球形、无碎片的卵母细胞进行胞质内显微受精,通常可得到较高的受精率和优质胚胎率。同时显微注射过程中还要注意第一极体的位置,多项研究表明,约 90% 卵母细胞的纺锤体位于第一极体附近的位置,故显微受精注射时多用第一极体作为卵母细胞纺锤体位置的定位参照^[8],注射管应尽量避免卵子的纺锤体及染色体存在的部位,否则尖锐的注射管可能会损伤纺锤体,卵子将无法恢复第二次减数分裂。Blake 等^[9]认为,第一极体在相当于时针 7 点或 11 点位置的胚胎质量比 6 点或 12 点好。Asch 等^[10]认为,显微操作时,注射针从相当于时针 3 点的位置穿破卵母细胞膜,针尖开口向下,则注射针下方的胞浆及胞质显微结构更有可能因回吸引起丢失和破坏,使卵母细胞易于退化,进而影响受精和胚胎发育。精子在卵母细胞内沉积的位置及其与纺锤体的距离也非常重要,当精子注入卵母细胞内后,距离纺锤体越近,就有可能更好更早地激活卵母细胞,使之受精;距离越远,则受精延迟,胚胎的发育也相对缓慢,因此极体位于相当于时针 6 点时有较高的受精率,也利于胚胎的早期发育。Blake 等^[9]认为,第一极体在相当于时针 8 点处时注入精子最好,这样精子注入在纺锤体附近,但不在纺锤体中。近年来的研究发现,在一些动物的 MⅡ 卵母细胞中,第一极体的位置并不能准确定位纺锤体的位置,传统的穿刺部位

选择,可能会损伤纺锤体和/或造成染色体异常^[11]。本试验选择牛卵母细胞的第一极体在相当于时针 6 点和 12 点位置,比较其对 ICSI 卵发育效果的影响,结果显示,ICSI 卵的形态完整率、卵裂率和囊胚发育率差异均不显著($P>0.05$)。由此可见,注射时极体置于相当于时针 6 点或 12 点的位置,对牛 ICSI 卵的发育并无显著影响。

3.2 不同激活方法对 ICSI 卵体外发育的影响

在哺乳动物的正常受精过程中,精子首先与透明带上的受体结合,然后穿过透明带,精卵质膜发生融合,同时精子激活了卵子,卵子中的某些物质激活精子,促进精核解聚,卵子被激活后便恢复第二次减数分裂,形成雌原核,并启动 DNA 的合成和第一次卵裂。这是一个精卵互动从启动到完成的过程。然而在 ICSI 过程中,精子在注射管中穿越了透明带和卵质膜而被直接注入卵胞质,精子自然激活卵子的过程被省略,卵子也会因此得不到足够的激活刺激。

在兔和人的 ICSI 研究中发现,卵子受到微注射管的穿刺和卵胞质被少量回吸的刺激,就可以被激活^[12-13]。但是不同动物对这种机械刺激的反应不同,马、牛、羊等动物卵子单独受到注射管的刺激还不足以激活,所以需要另外的人工激活^[14]。如 Li 等^[6]的研究发现,将马精子注入牛卵母细胞中,如果没有额外的刺激,胞质内显微受精后的卵子没有一个可以形成雄原核或分裂,所以对卵子进行辅助人工激活是十分必要的。作为卵母细胞激活的中间调节物,细胞质内游离 Ca^{2+} 浓度变化在卵母细胞受精激活及人工活化过程中具有重要作用^[14]。IA23187、乙醇、离子霉素和离子霉素+6-DMAP 等被广泛应用于核移植重组胚胎和显微受精卵的激活,这些激活剂均可以使卵母细胞内 Ca^{2+} 浓度短暂升高,从而达到与正常受精过程相似的效果。Keefe^[15]证实,用 IA23187 对牛的注射卵进行激活处理,可以促进雄原核的形成和卵裂。Goto^[16]用同样的方法激活牛的卵子得到 15%的卵裂率和 7%的囊胚发育率,较不激活注射卵的发育率明显提高。Rho 等^[17]报道,分别用离子霉素和离子霉素+6-DMAP激活牛的注射卵,卵裂率和囊胚发育率分别是 16.5%, 3.8% 和 61.2%, 23.9%。Sansinena 等^[18]分别采用离子霉素和离子霉素+6-DMAP 激活 ICSI 胚胎,分裂率(33%, 63%)和囊胚发育率(13%, 38%)差异显著($P<0.05$),表明离子霉素+6-DMAP 对激活 ICSI 胚胎进一步发育有显著的促进作用。本试验发现,胞质内显微镜受精不进行激

活处理的卵母细胞,其体外发育率很低,不能发育到囊胚阶段,说明注射管的机械刺激不足以激活牛卵子;单独使用乙醇、离子霉素激活时,均能明显提高 ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率,而采用离子霉素和 6-DMAP 联合激活时,ICSI 卵的卵裂率和囊胚发育率进一步提高。可见,采用离子霉素与 6-DMAP 联合对 ICSI 卵激活,更有利于其体外发育。

〔参考文献〕

- [1] Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, et al. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa[R]. Proceedings of 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin; [s. n.]1988; 331-333.
- [2] Silva C P, Kommineni K, Oldenbuty R, et al. The polar body does not predict accurately the location of the meiotic spindle in mammalian oocytes[J]. Fertility and Sterility, 1998, 2(70): 361.
- [3] Westerlaken L A, Helmerhorst F M, Hermans J, et al. Intracytoplasmic sperm injection; position of the polar body affects pregnancy rate[J]. Human Reproduction, 1999, 10(14): 2565-2569.
- [4] Stoddart N R, Fleming S D. Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o'clock during ICSI does not affect clinical outcome[J]. Human Reproduction, 2000, 15(7): 1580-1585.
- [5] Kim N H, Shin J S, Kim C, et al. Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei [J]. Theriogenology, 1999, 51(8): 1441-1449.
- [6] Li G P, Seidel G E, Squires E L. Intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes with stallion spermatozoa [J]. Theriogenology, 2003, 59: 1143-1155.
- [7] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients [J]. Human Reproduction, 2002, 17(9): 2415-2418.
- [8] Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI [J]. Human Reproduction, 2003, 18(6): 1289-1293.
- [9] Blake M, Garrisi J, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development [J]. Fertility and Sterility, 2000, 73(1): 31-37.
- [10] Asch R, Simerly C, Ord T, et al. The stages at which human fertilization arrests; microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans[J]. Human Reproduction, 1995, 10: 1897-1901.
- [11] Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys [J]. Nature Medicine, 1999, 5(4): 431-433.
- [12] Hosoi Y, Iritani A. Rabbit microfertilization[J]. Molecular Reproduction and Development, 1993, 36: 282-284.
- [13] Palermo G D, Cohen J, Alikani M, et al. Intracytoplasmic sperm injection; a novel treatment for all forms of male factor infertility [J]. Fertility and Sterility, 1995, 63: 1231-1240.
- [14] Chen S H, Seidel J G E. Bovine oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection [J]. Theriogenology, 1997, 48: 1265-1273.
- [15] Keefer C L. New techniques for assisted fertilization [J]. Theriogenology, 1990, 33: 101-112.
- [16] Goto K. Bovine microfertilization and embryo transfer [J]. Molecular Reproduction and Development, 1993, 36: 288-290.
- [17] Rho G J, Wu B, Kawarsky S, et al. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection [J]. Molecular Reproduction and Development, 1998, 50: 485-492.
- [18] Sansinena M J, Taylor S A, Taylor P J, et al. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection; Effect of chemical activation treatments and culture conditions [J]. Animal Reproduction Science, 2007, 99(3-4): 342-353.