

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2014.04.020

# 成熟培养液中胎牛血清添加量对山羊卵母细胞体外培养成熟的影响

朱广香<sup>1,2\*</sup>, 马恒东<sup>2,3</sup>, 张华<sup>4</sup>

(1. 四川农业大学生命科学院, 四川雅安 625014; 2. 四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014;

3. 四川南充职业技术学院, 四川南充 637000; 4. 四川省雅安市名山区农业局, 四川名山 625100)

**摘要:** 本研究以屠宰奶山羊的新鲜卵巢为材料, 回收可培养卵丘细胞-卵母细胞复合体(COC)。将可培养 COC 置于 M199 + FBS + 100 IU/mL FSH + 100 IU/mL LH 培养微滴中, 在 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中 39℃ 下培养。进行二因子三水平设计, 比较基础培养液中添加 FBS 体积分数为 0%、10% 和 15% 时, 及培养时间 16 h、24 h、26 h 的成熟率。结果表明: 不添加 FBS 组的成熟率极显著 ( $P < 0.01$ ) 低于其他两组, 而 10% FBS 组与 15% FBS 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 体外培养 16 h 与培养 24 h、26 h 的卵母细胞成熟率分别为 67.6% 与 81.7%、81.7%, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 而后二者间未表现差异。

**关键词:** 胎牛血清 FBS; 卵巢卵母细胞; 体外培养成熟; 山羊

中图分类号: Q959.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2014)04-0588-05

## Effect of Supplemented FBS to the Maturation Medium on the External Mature Culturing of Oocyte from Goats

ZHU Guangxiang<sup>1,2\*</sup>, MA Hengdong<sup>2,3</sup>, ZHANG Hua<sup>4</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan Province 625014, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan Province 625014, China;

3. Nanchong Professional Technic College, Nanchong, Sichuan Province 637000, China;

4. Agriculture Bureau of Mingshan Area, Mingshan, Sichuan Province 625100, China)

**Abstract:** This experiment regarded fresh ovary from slaughtered goats as the material. This kind of COC was placed in M199 + the FBS (0%, 10%, 15%) educates liquid + FSH (100 IU/mL) + LH (100 IU/mL) educates tiny inside, in the CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 100% humidity) under 39℃ temperature descends to educate 16 h, 24 h and 26 h. It is concluded that 10%~15% FBS is beneficial to the maturation *in vitro* of goat follicular oocytes. The maturation rate of oocytes cultured for 24 h, 26 h was significantly higher than that of 16 h ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** FBS; oocytes; IVM; goat

最早对哺乳动物卵母细胞进行体外培养的是德国科学家 Schenk SL。他于 1878 年将兔和豚鼠排卵前的卵母细胞和附睾精子放入相应的子宫液中培养, 发现卵丘细胞分散, 第二极体排出, 进一步培养时有卵裂发生(彭南妮等, 1997)。此后, 人们对卵母细胞体外培养进行了深入研究, 并取得了很好的研究结果(Ursula *et al.*, 1988; 张涌等, 1993; Eppig *et al.*, 1996; 徐照学等, 1998)。卵母细胞体外成熟培养液目前以 TCM199 应用比较广泛(Aktas *et al.*, 1995), 应用其对牛、绵羊、山羊等的卵母细胞进行体

外培养均有 79%~90% 的成熟率, 培养条件主要为: 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气、38.5℃~39℃、饱和湿度, 培养方法多采用微滴法培养(刘灵等, 1992; 张涌等, 1996; Fouladi *et al.*, 1998)。另有研究指出 LH、HCG、FSH 对牛、羊卵母细胞的成熟有显著的促进作用(Ander-son & Albertini, 1976; Singh, 1989; 葛宝生, 1993)。

选择适合的成熟培养条件, 对卵母细胞体外培养成熟是至关重要的。有研究认为在培养液中添加血清能强烈改变细胞功能, 使颗粒膜和膜细胞对卵母细胞减数分裂恢复的抑制失去效果, 同时也能为

收稿日期: 2014-01-13 接受日期: 2014-03-23

作者简介: 朱广香(1977~), 女, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程方面的研究

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gxzhu.china@gmail.com

卵母细胞成熟提供所需蛋白质,从而促进卵丘细胞层扩散和卵母细胞发育成熟(Sanbuissho & Threlfall, 1988; Martino *et al.*, 1994)。Sanbuissho 和 Threlfall (1985) 在牛卵母细胞的体外成熟培养液中添加 3 种血清(母牛站立发情时血清、排卵时血清以及排卵后 24 h 血清), 结果发现: 3 种血清对卵母细胞成熟的影响不大, 但对受精率有显著影响, 以添加第一种血清为最佳。目前, 研究者对培养体系中添加血清的有利作用已基本形成共识, 除人胎血清外, 胎牛血清、犊牛血清、新生牛血清和鼠血清都能促进卵母细胞体外发育成熟, 添加量一般为 10%~20% (江金益等, 1989; 刘红林, 范必勤, 1996; 钱云等, 2000a, 2000b)。胎牛血清(fetal calf serum, 简称 FBS) 是在屠宰怀孕母牛时, 通过心脏穿刺采血获取的胎牛血清。FBS 是细胞培养中用量最大的天然培养基, 含有丰富的细胞生长必须的营养成分, 常用于动物细胞的体外培养, 具有极为重要的功能, 能提供对维持细胞指数生长的激素、基础培养基中没有或量很少的营养物, 以及主要的低分子营养物; 提供结合蛋白, 能识别维生素、脂类、金属和其他激素等, 能结合或调变它们所结合的物质活力; 是细胞贴壁、铺展在塑料培养基质上所需因子来源; 起酸碱缓冲液作用; 提供蛋白酶抑制剂, 在细胞传代时使剩余胰蛋白酶失活, 保护细胞不受伤害(Lanza *et al.*, 2000; Remi *et al.*, 2002; 吴宏梅等, 2009; Freshney, 2010)。

近年来, 胚胎移植的商业应用和各种胚胎生物工程方面的研究和开发都需要大量的优质早期胚胎。胚胎的来源和成本已成为制约胚胎生物工程实用化的重要因素, 而获得大量优质早期胚胎的关键在于能否获得大量可受精的成熟卵母细胞。众多学者正致力于研究屠宰家畜卵巢卵母细胞的体外培养成熟和体外受精技术, 以解决胚胎移植所需要的早期胚胎的来源。为了可以使屠宰山羊卵巢卵母细胞这一资源能够用于体外受精和胚胎移植, 本试验主要是从这一实际出发, 选用丙酮酸钠的改良 TCM199 液作为基础培养液, 利用回收利用屠宰场的卵巢卵母细胞进行体外培养, 就成熟培养液中 FBS 添加量对山羊卵母细胞体外培养成熟的影响进行研究, 旨在进一步完善山羊卵巢卵母细胞体外培养成熟液, 探索成熟卵母细胞的低成本来源。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

从四川农业大学附近屠宰场采集刚屠宰本地奶

山羊的新鲜卵巢, 立即放入装有含双抗(青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 mg/mL) 的 37~39℃ 生理盐水保温瓶中, 在 2~3 h 内运回实验室无菌操作间。

### 1.2 试剂与器材

M199 干粉(含 Earle's 盐, GIBCO 公司); 促卵泡激素(FSH, 宁波激素制品厂, 批号 20020102); 促黄体激素(LH, 宁波激素制品厂, 批号 20011115); 标准胎牛血清(FBS, Hyclone 公司, 批号 SH30088.07); CO<sub>2</sub>(雅安沙湾气体供应站); 透明质酸酶(Hyaluridase, Sigma 公司); HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S, AMRESCO 0511, 上海华舜生物工程有限公司分装)。

CO<sub>2</sub> 培养箱 (CEDCO 公司); 倒置显微镜 (OLYMPUS); 实体显微镜 (OLYMPUS); 24 孔培养板 (FALCON 公司); 1/10 000 电子分析天平。

## 2 方法

### 2.1 卵母细胞成熟培养液配制

基础培养液(芮荣, 1996) (M199 干粉 + 2.2 g 碳酸氢钠 + 25 mg 丙酮酸钠 + 4.8 g HEPES + 75 mg 青霉素 + 50 mg 链霉素) 按要求用双蒸水配成 1000 mL, 用孔径为 0.25 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 存放于 4℃ 冰箱中, 使用期为 15 d。FBS 于 56℃ 灭活 30 min 后, 分装成 5 mL/瓶, 于 -20℃ 冰箱中存放。液体石蜡与等体积的双蒸水混合振荡洗涤 3~5 次, 160℃ 灭菌 1 h, 加入一半体积的 M199 液, 存放于 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

参考其他研究(江金益等, 1989; 葛宝生等, 1993), 在无菌操作间内按以下配比方案配制卵母细胞成熟培养液。

成熟培养液 1: 基础培养液 + 10 IU/mL FSH + 20 μg/mL LH;

成熟培养液 2: 基础培养液 + FBS 培养液 (10%) + 10 IU/mL FSH + 20 μg/mL LH;

成熟培养液 3: 基础培养液 + FBS 培养液 (15%) + 10 IU/mL FSH + 20 μg/mL LH。

各种培养液配制好后, 均用孔径为 0.25 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 存放于 4℃ 冰箱中, 使用期为 15 d。待卵母细胞体外成熟培养前 2 h, 将成熟培养液用 0.2 μm 孔径滤膜过滤后, 在 24 孔一次性培养板中, 制成 200 μL 的培养液微滴, 覆盖灭菌石蜡油后置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡, 待用。

### 2.2 卵母细胞的分离及检取

抽吸法: 无菌条件下, 将卵巢用杜氏磷酸缓冲液

(PBS)洗涤 3~5 次。先用带有 12 号针头的 10 mL 一次性注射器抽吸表面直径为 2~6 mm 的外部卵泡,收集的液体置于直径 6 cm 的培养皿中 10 min,去除上清液,用 M199 洗 3 次,放置在恒温板上进行检卵。

**切割冲卵法:**将抽吸后的卵巢置于直径 6 cm 的培养皿,剪去韧带、系膜等结缔组织,沿卵巢门切开,去掉髓质及黄体组织,再用 37~39℃ PBS 液冲洗 2~3 次。之后用手术刀划破表面直径在 2~6 mm 的内部卵泡,以 5 mL 的一次性注射器吸取 M199 液冲洗卵泡腔(1 mL/腔),汇集冲洗液,放置在恒温板上进行检卵。

以卵母细胞周围卵丘细胞形态对卵母细胞进行分类, I 级:由致密多层卵丘卵母细胞层包裹的卵母细胞,其细胞完整,胞质均匀; II 级:卵丘细胞不完全的卵母细胞,卵母细胞胞质均匀; III 级:完全裸露的卵子; IV 级:卵丘细胞层呈蛛网状附着的卵母细胞,但是卵母细胞胞质退化。在日光灯作为光源的实体显微镜下用吸卵管(自制)挑选 I、II 级卵母细胞进行体外培养,而 III、IV 级卵母细胞则因为体外成熟率低或者根本不能成熟而被丢弃。

### 2.3 成熟培养方法

采用常规的微滴法培养:把待培养的 COC 用成熟培养液清洗 1~2 次,移入已平衡的成熟培养液微滴中,每小滴中约 10~20 个 COC,将培养板置于 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中,39℃ 下培养。

实验结果表明,在卵母细胞体外培养过程中,出现卵丘细胞扩散的 COC 中的卵母细胞未必放出第一极体,所以卵丘扩散与否不能够作为卵母细胞成熟的标志,仅仅只能用于初步判断卵母细胞成熟培养的总况,只有去除卵丘细胞后观察到第一极体,并以此为标志来确定卵母细胞成熟(徐少甫等,1993;雷安居等,2002;朱广香等,2003)。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同采集方法的卵母细胞采集数量和成熟率的比较

**3.1.1 采集方法对卵母细胞采集数量、质量的影响**对 120 个卵巢分别采用抽吸法和切割冲卵法,采集山羊卵巢有腔卵母细胞,比较两种方法对采集数量的影响,其分离效果见表 1。

表 1 不同回收方法的卵母细胞回收率、成熟率比较  
Table 1 Comparison of two isolating methods in recovery rate and maturation rate

回收方法 Method	卵巢总数(个) No. ovaries	检取卵母细胞数(个) No. of cumulus oocytes complexes		卵母细胞数/卵巢数 Mean of oocytes per ovaries		卵母细胞回收率 个/卵巢 Recovery rate	培养成熟率(%) Maturation rate
		I、II 级	III 级	I、II 级	III 级		
抽吸法 Aspiration	47	33	242	0.70 <sup>A</sup>	5.15 <sup>A</sup>	5.85(275/47)	81.8(27/33)
切割法 Slicing	73	138	153	1.89 <sup>B</sup>	2.10 <sup>B</sup>	3.99(291/73)	82.6(114/138)
合计 Total	120	171	395	1.43	/	4.72(566/120)	/

注:A、B,  $P < 0.01$ ; 同列角码不同大写字母表示差异极显著

Note: A; B,  $P < 0.01$ ; The same column angular yard indicated that different uppercase letters show extremely significant difference

从表中可看出,采用抽吸法和切割法每个卵巢分别可获得 5.85 个和 3.99 个卵母细胞,其中,可培养的卵丘卵母细胞分别为 0.70 个和 1.89 个,不可培养卵分别为 5.15 和 2.10 个。结果表明,用抽吸法每个卵巢回收卵总数高于切割法,但是 I、II 级的可用卵数低于切割法,III 级卵数高于切割法,两者差异均极显著( $P < 0.01$ )。表明卵母细胞采集方法对卵母细胞数量和质量有显著影响。本试验中,从每个卵巢获得可用卵数量看,切割法优于抽吸法,这与 Pawshe 等(1994)和 Mogas(2002)在山羊上的研究结果相似。试验中山羊卵巢卵母细胞的抽吸法回收数量高于切割法,但大部分为不可用卵,这是造成抽吸

法可用卵母细胞数量降低的主要原因,推测应该是由于山羊卵母细胞和卵丘细胞连接较疏松,抽吸过程由于吸力作用,造成裸卵,使可用卵母细胞数量减少。而且,试验中还发现由于山羊卵巢体积小,用抽吸法费力又费时。本研究证明,切割法是采集山羊卵巢卵母细胞的一种简单而有效的方法。

**3.1.2 采集方法对卵母细胞体外成熟的影响**将抽吸法和切割法采集到的卵母细胞,在各种培养条件均相同的情况下,用相同的成熟培养液 2 进行体外成熟培养,比较两种方法对卵母细胞体外成熟的影响(表 1)。从表中可以看出,抽吸法回收的卵母细胞经体外培养,成熟率为 81.8%(27/33);切割法

采集的卵母细胞,成熟率为 82.6% (114/138);两者差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3.2 不同体积分数 FBS 和培养时间的卵母细胞体外成熟率

根据试验设计,本试验将回收的 I 级和 II 级卵母细胞培养于 3 种不同培养液(成熟培养液 1、2、3)中,培养结果见表 2。从表中可以看出,未添加血清的成熟培养液 1 共培养了 32 个卵母细胞,但直至培养结束也未获得成熟卵母细胞。而成熟培养液 2 和

成熟培养液 3 均获得了 81.7% 的成熟率。培养基中不添加 FBS 与添加体积分数为 10% 和 15% 时,成熟率差异极显著( $P < 0.01$ ),而添加 10% FBS 组和添加 15% 组则未表现差异。同时从表中也可看出,培养时间对卵母细胞成熟率的影响。培养 16 h 时卵母细胞的成熟率为 67.6%,继续培养至 24 h、26 h 时成熟率为 81.7%,16 h 的成熟率与 24 h、26 h 的成熟率差异显著,而培养 24 h 与 26 h 的成熟率未表现差异。

表 2 不同体积分数的 FBS 及培养时间对成熟率的影响  
Table 2 Maturation rate influenced by different volume FBS and duration

成熟培养液 Maturation medium	培养 COC 数(个) No. of cultured oocytes	培养时间(h) Duration of maturation culture					
		16		24		26	
		成熟 COC 数 (个) No. of maturated oocytes	成熟率(%) Maturation rate	成熟 COC 数(个) No. of maturated oocytes	成熟率(%) Maturation rate	成熟 COC 数(个) No. of maturated oocytes	成熟率(%) Maturation rate
1	32	0	0 <sup>A</sup>	0	0 <sup>A</sup>	0	0 <sup>A</sup>
2	71	48	67.6 <sup>B</sup>	58	81.7 <sup>C</sup>	58	81.7 <sup>C</sup>
3	71	48	67.6 <sup>B</sup>	58	81.7 <sup>C</sup>	58	81.7 <sup>C</sup>

注:A;B,A;C, $P < 0.01$ ;同列角码不同大写字母表示差异极显著

Note:A;B,A;C, $P < 0.01$ ; The same column angular yard indicated that different uppercase letters show extremely significant difference

## 4 讨论

采集方法对卵母细胞体外成熟的影响与 Pawshe 等(1994)的研究相似,同国内刘海军等(2001)在山羊上的研究结果也相一致,进一步证实了回收方法仅仅影响可用于培养的卵母细胞回收数量,而不影响其体外培养成熟率。

在本试验中,山羊卵巢卵母细胞在添加 10% 和 15% FBS 的成熟培养液成熟率远远高于未添加组(0%)。结果表明添加 10%~15% FBS 可能是山羊卵巢卵母细胞体外培养成熟的必要条件。这一结果与刘泽隆和张涌(1999)对牛卵泡卵母细胞体外培养所得结果一致。

培养成熟时间的长短对卵母细胞体外成熟也是个重要的影响因素。刘泽隆和张涌(1999)曾研究过体外成熟 16 h、20 h 与 24 h 的牛卵母细胞成熟率的差异,认为培养 16 h 的卵母细胞的成熟率与培养 20 h、24 h 的差异显著,而培养 20 h 与 24 h 时的成熟率差异不显著。本试验研究证实了这一结论在羊卵巢卵母细胞体外培养中也是成立的,此试验结果与施巧婷等(2001)所得研究结果相一致,进一步确认山羊卵巢卵母细胞体外培养成熟的时间为 24~26 h。

目前关于屠宰山羊卵巢卵母细胞适宜生产的体外培养成熟液应结合精子的体外获能、受精卵的体外发育和胚胎移植技术等相关研究,对此可进行进一步探索和试验,从而为改良我国山羊品种打下坚实基础。

## 5 参考文献

- 葛宝生,梁冠生,刘建民,等. 1993. 绵羊卵泡体外成熟的研究[J]. 兽医大学学报, 13(1): 66-69.
- 江金益,钟声,范必勤. 1989. 奶牛体外受精研究[J]. 江苏农业学报, 5(4): 1-8.
- 雷安居,高志敏,杨春荣,等. 2002. 牛卵母细胞的体外成熟培养[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 30(4): 95-97
- 刘海军,侯蓉,张美佳,等. 2001. 山羊卵母细胞体外成熟体外受精研究[J]. 天津农业科学, 7(3): 35-38.
- 刘红林,范必勤. 1996. 哺乳动物卵母细胞的体外成熟[J]. 畜牧与兽医, 28(4): 180-183.
- 刘灵,张涌,钱菊汾. 1992. 山羊卵巢卵母细胞的体外成熟[J]. 西北农业大学学报, 20(增刊): 107-110.
- 刘泽隆,张涌. 1999. 牛卵泡卵母细胞体外成熟的研究[J]. 西北农业大学学报, 27(2): 17-20.
- 彭南妮,薛立群,陈可毅,等. 1997. 哺乳动物卵母细胞体外培养[J]. 湖南农业大学学报, 23(6): 594-598.
- 钱云,师蔚群,丁家桐. 2000a. 哺乳动物体外受精的研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 17(1): 26-28.
- 钱云,师蔚群,丁家桐. 2000b. 哺乳动物体外受精的研究进展[J].

- 动物科学与动物医学, 17(2): 27-29.
- 芮荣. 1996. 山羊卵巢腔前卵泡卵母细胞体外发育与成熟的研究 [D]. 西北农业大学博士论文: 1-91.
- 施巧婷, 黄俊, 杨梅, 等. 2001. 不同成熟时间对牛卵母细胞发育及去核效率的影响[J]. 草食家畜, (2): 1-3.
- 吴宏梅, 刘帅, 包阿东, 等. 2009. 不同胎牛血清对动物细胞体外培养的影响[J]. 中国畜牧兽医, 34(4): 96-99.
- 徐少甫, 成国祥, 成勇, 等. 1993. 超排山羊卵母细胞体外成熟的初步研究[J]. 江苏农业学报, 14(2): 61-67.
- 徐照学, 辛晓玲, 王仁耀, 等. 1998. 山羊卵泡卵母细胞体外受精及受精卵的体外发育[J]. 中国兽医学报, 18(5): 506-509.
- 张涌, 刘素娟, 李勇, 等. 1996. 山羊小腔卵泡卵母细胞的体外成熟和体外受精[J]. 西北农业大学学报, 24(2): 12-16.
- 张涌, 刘素娟, 李裕强, 等. 1993. 山羊大腔卵泡卵母细胞的体外成熟和体外受精[J]. 河北农业大学学报, 21(1): 45-48.
- 朱广香, 马恒东, 郝泽东, 等. 2003. 屠宰山羊卵巢有腔卵母细胞体外培养[J]. 四川农业大学学报, 21(2): 161-163.
- Aktas H, Wheeler MB, Rosenkrans Jr CF, *et al.* 1995. Maintenance of bovine oocytes in prophase of MI by high cAMP[J]. J Reprod Fertil, 105: 207-235.
- Anderson E, Albertini DF. 1976. Gapjunctions between the oocytes and companion follicle cells in the man Malian ovary[J]. J Cell Biol, 71: 680-686.
- Freshney R. 2010. Culture of animal cell: A manual of basic technique. 6th ed[M]. New York: Wiley-Sons:149-175.
- Fouladi Nashta AA, Waddington D, Campbell KHS. 1998. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods [J]. Biol Reprod, 59: 255-262.
- John J Eppig, Marilyn J O'Brien. 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles[J]. Biol Reprod, 54: 197-207.
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, *et al.* 2000. Extension of cell lifespan and telomere length in animal cloned from senescent somatic cell [J]. Science, 288: 665-669.
- Martino A, Palomo MJ, Mogas T, *et al.* 1994. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization [J]. Theriogenology, 42(5): 859-873.
- Mogas T, Martino A, Palomo MS, *et al.* 2002. Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVM [J]. J Reprod Fertil, 9: 53.
- Pawshe CH, Totev SM, Jain SK. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization[J]. Theriogenology, 42: 117-125.
- Remi T, Fumito Y, Yoshihisa K, *et al.* 2002. Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellowameleon, in rat cortical primary cultures[J]. Brain Research, 956(2): 221-229.
- Sanbusissho A, Threlfall WR. 1988. Frequency of twins from friestian cows in a warm day climate[J]. Theriogenology, 29(1): 226.
- Sanbusissho A, Threlfall WR. 1985. The effect of estrous cow serum on maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes *in vitro* [J]. Theriogenology, 23(1): 226.
- Singh G. 1989. *In vitro* fertilization of buffalo oocytes matured *in vitro* [J]. Theriogenology, 31(1): 255.
- Ursula SÜss, Kathelijne WÜthrich, Gerald Stranzinger. 1988. Chromosome configuration and time sequence of the first meiotic division in bovine oocyte maturation *in vitro*[J]. Biol Reprod, 38: 871-880.