



# 卵细胞体外成熟(IVM)在小鼠生物净化中的应用\*

杜江涛<sup>1</sup> 武晓静<sup>2</sup> 戴方伟<sup>1</sup> 卢领群<sup>1</sup> 周莎桑<sup>1</sup> 应华忠<sup>1</sup> 郭红刚<sup>1</sup>

(1.浙江省医学科学院浙江省实验动物中心,杭州 310013)(2.杭州市中医院,杭州 310007)

**摘要:**目的 在小鼠生物净化中,从超排后未排卵的卵巢,取卵泡内未成熟卵采用卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)使之在体外成熟并具备受精能力,以提高卵子利用率和作为常规促超排失败的一种补救措施。**方法** 在小鼠生物净化中,取注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢,在实体显微镜下划破卵泡挑选卵丘卵母细胞复合物(COCs),置于成熟液滴中在体外发育成熟。同时以注射 PMSG 和 HCG 后正常超排卵、只注射 PMSG 后取未成熟卵体外成熟和注射 PMSG 和 HCG 后取疑似成熟卵和裸卵体外成熟作为对照。经体外受精、体外胚胎发育后,将2-细胞胚移植到受体输卵管,使其在受体内发育成为成熟的个体。**结果** 注射 PMSG 和 HCG 后未排卵组(A组),卵细胞体外成熟率为 87.0%±3.2%,二胞率为 55.1%±12.3%,囊胚率为 23.1%,移植 41 枚二细胞胚至 2 只受体鼠,出生 5 只幼崽,产仔率 12.2%。只注射 PMSG,48 h 后取未成熟卵组(B组),体外成熟率为 83.9%±3.9%,二胞率为 51.8%±9.3%,囊胚率为 38.5%±13.9%。注射 PMSG 和 HCG 正常超排组(C组),其二胞率为 78.9%±0.6%,囊胚率为 78.0%±3.8%。注射 PMSG 和 HCG 未排卵卵巢,取裸卵和疑似成熟卵(D组),体外成熟培养 0 h,6 h 和 16~18 h,其成熟率、二胞率和囊胚率与其它三组相比均较低且有极显著性差异。A 组和 B 组与正常对照 C 组相比,二胞率均有显著性差异,囊胚率均有极显著性差异。**结论** 卵母细胞体外成熟(IVM)可以作为小鼠生物净化中促超排失败的一种补救措施,并且可以提高珍稀品系小鼠的卵子利用率。

**关键词:**小鼠;卵母细胞;体外成熟(IVM);生物净化

**中图分类号:** Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0053-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.010

随着生命科学和医学研究的不断深入,越来越多的转基因小鼠应用到科学研究中。而在转基因小鼠制备、饲养、运输及品系共享等过程中,极易造成病原微生物的感染,生物净化是目前去除病原微生物感染的有效途径<sup>[1]</sup>。

生物净化主要有剖宫取胎和体外受精-胚胎移植两种方法。剖宫取胎操作相对简单,但存在净化不彻底和难以计算最佳剖宫时间等弊端;而体外受精-胚胎移植则需要掌握扎实的胚胎移植技术<sup>[2]</sup>。

体外受精-胚胎移植法在实际应用中需要大量的成熟卵子,但在超排过程中,由于小鼠年龄、品系、激素用量等许多因素的影响,常常会出现超排失败或只有少量成熟卵子排出现象,造成净化失败。这对于转基因小鼠,特别是一些珍稀转基因品系来说,是一种巨大的资源浪费。本文旨在利用卵母细

胞体外成熟技术(*in vitro* maturation, IVM),深度挖掘未排卵小鼠卵巢内未成熟卵的发育潜力,以提高珍稀转基因小鼠的卵子利用率,同时也作为常规促排卵失败的一种补救措施。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

实体显微镜(LEICA, S8AP0);二氧化碳培养箱(Thermo);超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)。

α-MEM 基础培养液(M4526, Sigma);胎牛血清(22011-8612,浙江天杭生物科技股份有限公司);丙酮酸钠(P4562, Sigma);M2 培养液(M1250,南京爱贝生物科技股份有限公司);获能液/体外受精液(MR-070-D, Millipore);胚胎发育液(MR-121, Millipore);PMSG

收稿日期:2018-10-25

\* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(No.2015KYB093; No.2017KY037);浙江省公益技术应用研究(实验动物)项目(No.2016C37134)

作者简介:杜江涛(1986—),男,实习研究员,硕士,研究方向:实验动物学.E-mail: djtao1986@126.com

通信作者:郭红刚(1976—),男,助理研究员,研究方向:实验动物学.E-mail: sxguohonggang@163.com

(160926)和 HCG(160820)均购自宁波第二激素厂。

## 1.2 实验动物

待净化转基因小鼠,雌鼠 4~6 周龄,雄鼠 8 周龄,来源于科研用小鼠。

清洁级 ICR 小鼠,雌鼠 4~6 周龄,雄鼠 6~8 周龄。来源于上海斯莱克实验动物公司,使用许可证号:SCXK(沪)2017-0005。

以上动物均饲养于浙江省医学科学院实验动物中心屏障系统隔离包内,动物饲养合格证号:SYXK(浙)2014-0008。自由采食饮水,光照 12 h/d(7:00-19:00)。

## 1.3 结扎公鼠的制备

6~8 周龄 ICR 雄鼠,1%戊巴比妥钠麻醉后切开后腹部皮肤和肌肉,暴露两侧输精管,无菌弯镊在酒精灯火焰上烧烫后迅速将输精管夹断。将断开的输精管小心放置原位,撒上少许青霉素粉后缝合肌肉皮肤,1 个月后使用。

## 1.4 小鼠超排

实验分组:A 组:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢,取卵泡内未成熟卵体外培养;B 组:只注射 PMSG,48 h 后取卵泡内未成熟卵体外培养;C 组:注射 PMSG 和 HCG 后,输卵管内取成熟卵(正常超排组)直接进行体外受精;D 组:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢,取卵泡内裸卵和疑似成熟卵体外培养。下文均简称 A 组、B 组、C 组和 D 组。

下午 5 点,小鼠 4 周龄 5 IU/只,5~6 周龄 7.5 IU/只,腹腔注射 PMSG,48 h 后注射相同剂量 HCG,16~18 h 后收集成熟卵母细胞、未成熟卵母细胞、裸卵和疑似成熟卵。只注射 PMSG 组则在注射 PMSG 46~48 h 后取未成熟卵,体外成熟培养 16~18 h 后进行体外受精与体外胚胎培养(具体方法详见 1.6)。

## 1.5 培养基准备

体外成熟培养液按参考文献配制,主要成分为: $\alpha$ -MEM 基础培养液,5%胎牛血清(FBS),3ng/mL EGF,50mIU/mL rhFSH,0.25 mmol/L 丙酮酸钠,青霉素与链霉素各 0.5%<sup>[3]</sup>,0.2  $\mu$ m 滤膜过滤后分装冷冻备用。

采卵前一天,用直径 35 mm 培养皿分别做 IVM 液、获能液/受精液、KSOM 培养液等液滴,上覆石蜡油,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内过夜孵育。

## 1.6 精子获能、体外受精与未成熟卵 IVM

**1.6.1 精子获能:**采卵前 1 h,颈椎脱臼处死雄鼠,在 1:200 稀释万洁消毒液中浸泡消毒,置于干净卫

生纸上吸干液体。无菌手术器械取其两侧附睾尾,剔除多余脂肪组织,在无菌滤纸上回来回滚动数次除去血渍,放入提前过夜孵育的获能皿的石蜡油中。用无菌镊夹住附睾尾使其绷紧,并用 1 mL 无菌注射器针头刺破附睾尾,将溢出的精液移到获能液滴中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中获能 1 h。

**1.6.2 体外受精:**净化用转基因雌鼠,HCG 注射 16~18 h 后,颈椎脱臼处死,1:200 稀释万洁消毒液中浸泡消毒,取其两侧卵巢和输卵管,将其置于提前预热至 37  $^{\circ}$ C 的 M2 培养液中。M2 培养液中再次清洗后,放在无菌滤纸上吸干液体,然后转到提前过夜孵育的受精液滴皿的石蜡油中。靠近受精液滴,找到输卵管膨大部,用 1 mL 无菌注射器划破膨大部,将卵子移到受精液滴中。未见膨大部的卵巢则置于 M2 培养液中,37  $^{\circ}$ C 保温备用。

取在培养箱中获能 1 h 的获能液滴皿,显微镜下检查精子活力和精子数量。用移液器吸取获能液滴周边精子 10  $\mu$ L(约含精子 200 个/ $\mu$ L),加入到已移入卵子的受精液滴中(50~100 个)。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中受精 4 h,然后将所有卵子转至胚胎发育液 KSOM 中。

**1.6.3 未成熟卵 IVM:**取 M2 中保存的未超排卵卵巢,实体显微镜下用镊子将卵巢周边的脂肪及输卵管剥离干净,M2 中清洗 2~3 次后,转入事先 37  $^{\circ}$ C 预热的  $\alpha$ -MEM 中。用 1 mL 注射器针头划破卵泡,释放卵丘卵母细胞复合体(COCs)。无菌玻璃管在酒精灯火焰上烤热熔化后迅速拉至直径比 COCs 稍粗的玻璃针(提前准备),用口吸管吸取至少有 3 层颗粒细胞包裹的 COCs,转至另一皿干净的  $\alpha$ -MEM 中。捡卵结束后将所有的 COCs 转至事先在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜孵育的 IVM 液滴中,清洗 2~3 次后转至 200  $\mu$ L 大液滴,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 16~18 h,然后进行体外受精。精子获能、体外受精方法同上。体外受精 4 h 后转至胚胎发育液 KSOM 中。

取注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢卵泡内的裸卵和疑似成熟卵(卵丘颗粒细胞已扩散),分为三组进行实验:直接受精;体外成熟培养 6 h 后受精和体外成熟培养 16~18 h 后受精。受精 4 h 后转至胚胎发育液 KSOM 中。

## 1.7 受体小鼠的挑选、合笼与胚胎移植

体外受精当天下午 5 点左右,挑取阴门红肿发情的 ICR 雌鼠,与结扎雄鼠 1:1 合笼交配。于次日早上挑取有阴栓的小鼠(即受体小鼠),无菌环境下

从隔离包转至超净工作台。

受体小鼠 1% 戊巴比妥钠麻醉,背部剃毛,75% 酒精,碘酊再 75% 酒精消毒。在卵巢位置剪一纵向小口,依次剪开皮肤、肌肉、腹膜后,用镊子找到脂肪垫,将其和卵巢、输卵管一起拉出。用脂肪夹夹住脂肪垫,固定好卵巢和输卵管,在显微镜下找到输卵管膨大部并将其调整至最高位。玻璃针最前端吸取 3 个气泡,然后吸取 20~30 个 2-细胞胚,在输卵管膨大部前端进针,将 2-细胞胚吹至膨大部。当三个气泡均吹至膨大部时,说明全部 2-细胞胚已经移植到输卵管膨大部内。

## 2 结果

### 2.1 A 组和 B 组与 C 组卵细胞体外成熟率、二胞率、囊胚率及出生率

注射 PMSG 和 HCG 后,未排卵卵巢(A 组),取卵泡内未成熟卵体外培养,3 次重复实验,其成熟率为:88.6% (62/70), 83.3% (45/54), 89.2% (66/74)。二胞率为:67.1% (47/70), 42.6% (23/54), 55.4% (41/74)。13 枚二细胞胚胎体外发育,有 3

枚发育至囊胚,囊胚发育率为 23.1% (3/13)。将 41 枚二细胞胚胎移植到 2 只受体鼠体内,其中 1 只生出 5 只幼崽,产仔率为 12.2% (5/41)。

只注射 PMSG, 48 h 后取卵泡内未成熟卵(B 组), 4 次体外成熟培养,其成熟率为:79.3% (65/82), 88.1% (140/159), 82.4% (131/159), 86.0% (92/107)。二胞率为:59.8% (49/82), 44.0% (70/159), 43.4% (69/159), 59.8% (64/107)。囊胚率为:36.7% (18/49), 58.6% (41/70), 30.4% (21/69), 28.1% (18/64)。

注射 PMSG 和 HCG 后,输卵管内取成熟卵(C 组),直接进行体外受精,受精后二胞率为:79.5% (167/210), 79.0% (233/295), 78.3% (195/249)。囊胚率为:73.7% (123/167), 79.8% (186/233), 80.5% (157/195)。见表 1。

A 组与 B 组相比,其成熟率和二胞率均无显著性差异( $P>0.05$ )。A 组二胞率与 C 组相比,有显著性差异( $P<0.05$ )。B 组二胞率与 C 组相比,有极显著性差异( $P<0.01$ )。A 组和 B 组与 C 组相比,囊胚率均有极显著性差异( $P<0.01$ )。

表 1 A 组、B 组和 C 组卵细胞体外发育结果

Table 1 Oocytes *in vitro* development results of group A, B and C.

组别	处理方法	实验次数	成熟率/%	二胞率/%	囊胚率/%	移植二胞数	产仔率/%
A	注射 PMSG 和 HCG 后,取卵泡内未成熟卵	3	87.0±3.2	55.1±12.3	23.1	41	12.2
B	只注射 PMSG, 48 h 后取未成熟卵	4	83.9±3.9	51.8± 9.3	38.5±13.9	/	/
C	注射 PMSG 和 HCG 后,取输卵管内成熟卵	3	/	78.9± 0.6	78.0± 3.8	/	/

### 2.2 D 组不同成熟培养时间卵细胞体外成熟率、二胞率及囊胚率

注射 PMSG 和 HCG 后未排卵的卵巢,取卵泡内裸卵和疑似成熟卵(D 组),体外成熟培养时间分为三组:成熟培养 0 h(即直接进行体外受精);成熟培养 6 h 和成熟培养 16~18 h。受精后成熟培养 0 h 两次重复实验二胞率为 10.2%、15.6%,囊胚率为 0.0%、22.7%;成熟培养 6 h 二胞率为 5.7%,囊胚率为 0.0%;成熟培养 16~18 h 两次重复实验二胞率为 1.3%、18.6%,囊胚率为 0.0%、3.3%。(详见表 2)。

表 2 D 组卵细胞体外发育结果

Table 2 Oocytes *in vitro* development results of group D

总卵数	成熟培养时间/h	受精后二胞率/%	体外发育囊胚率/%
141	0	15.6(22/141)	22.7(5/22)
49	0	10.2(5/49)	0(0/5)
53	6	5.7(3/53)	0(0/3)
161	16~18	18.6(30/161)	3.3(1/30)
79	16~18	1.3(1/79)	0(0/1)

D 组中体外成熟培养 0 h、6h 和 16~18 h,其二胞率和囊胚率与组 A、B、C 相比均有极显著性差异。

## 3 讨论

### 3.1 超数排卵

通过超数排卵获得大量整齐优质的卵子是生物净化、转基因、克隆等研究的基础之一。影响超排的因素有很多,如:供体雌鼠的品系、年龄与体质量、激素的注射剂量和注射时间、环境因素(温度、湿度和噪声)等<sup>[4]</sup>。

我们在试验中,对不同品系小鼠一律采用:3~4 周腹腔注射 5 IU PMSG 和 HCG;5~6 周注射 7.5 IU PMSG 和 HCG;而对 7 周及以上则注射 10 IU PMSG 和 HCG,两种激素注射间隔时间均为 48 h。结果表明,C57BL/6 J 小鼠超排效果最好且稳定。宋绍征等<sup>[5]</sup>研究发现在相同剂量激素条件下,ICR 小鼠和 C57BL/6 J 小鼠的超排效果显著优于 BALB/c 小鼠

和 FVB 小鼠,我们试验结果与其相一致,原因可能是近交系的遗传因素导致 BALB/c、FVB、129 等小鼠的繁殖能力较差。

3~4 周小鼠相较于其它周龄小鼠,可获得最好的超排效果,这与徐平<sup>[6]</sup>的研究结果相一致,这可能是性成熟后的小鼠固有的性周期和性激素对外源性的超排激素(PMSG 和 HCG)有影响。

关于小鼠超排最合适的激素用量,目前国外多采用 eCG/PMSG 和 HCG 各 5IU 或各 7.5IU 剂量<sup>[3, 7-9]</sup>,国内有的采用 PMSG 和 HCG 各 5IU 或各 10IU 剂量。而我们在试验过程中,则根据小鼠年龄体质量的不同做了适当调整。

年龄较大雌鼠和一些近交系小鼠(BALB/c、FVB、129 等)的超排效果一直较差,甚至无排卵,正是这些问题的存在,迫使我们寻找一种新的方法来提高卵子利用率,卵母细胞体外成熟则为解决这一问题提供了新的途径。

### 3.2 卵母细胞体外成熟

卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)是一项重要的辅助生殖技术和研究工具。因其可以生产成熟卵子被广泛应用于各研究领域,如:人类不孕症治疗、家畜人工育种中的胚胎生产、克隆、干细胞和转基因技术等<sup>[9]</sup>。

小鼠卵母细胞体外成熟一般是在注射 eCG/PMSG 44 或 48 h 后直接从卵泡中取未成熟卵体外培养<sup>[10-12]</sup>,而我们在生物净化中则是针对注射 PMSG 和 HCG 后未排卵的卵巢。为了比较注射 HCG 对卵巢卵泡内未成熟卵体外发育的影响,我们设置了两组试验:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵组(A 组)和只注射 PMSG,48 h 后取未成熟卵组(B 组),同时以注射 PMSG 和 HCG 后正常超排卵组(C 组)作为对照。结果发现:注射 HCG 对卵泡内未成熟卵体外成熟、体外受精、体外胚胎发育等并无影响,A 组与 B 组的成熟率、二胞率均无显著性差异( $P>0.05$ )。因 A 组体外受精后大部分二细胞胚胎用于移植,只有很少一部分(13 枚)用来做体外胚胎发育,所以 A 组与 B 组的囊胚率并无可比性。A 组的二细胞胚胎做了 3 次移植试验,分别移植 34、23 和 41 枚二细胞胚,但因受体等各种因素的影响,只成功了一次。41 枚二细胞胚移植到两只受体小鼠输卵管内,其中一只成功受孕生出 5 只小鼠(2 雄 3 雌),5 只小鼠性成熟后相互交配可产下正常的后代,说明通过 IVM 技术出生的小鼠是健康可育的<sup>[13]</sup>。

但是,注射 HCG 可导致超排后的卵巢质地松软,卵巢表面缺少较好的卵泡,卵泡内部大部分为裸卵或卵丘颗粒细胞已经扩散的卵(疑似成熟卵)。与只注射 PMSG 相比,注射 HCG 后获得的质量较好的卵丘卵母细胞复合物(COCs,至少有三层颗粒细胞包裹)大大减少。但是只要有颗粒细胞包裹的 COCs,在体外成熟培养 16~18 h 后,颗粒细胞均会扩散,经体外受精后大部分可卵裂至二细胞胚胎,其成熟率和受精率均较理想。

A 组、B 组与正常超排卵对照组(C 组)相比,卵细胞成熟率、二胞率和囊胚率均有显著性差异,说明在现有的技术条件下,卵细胞体外成熟仍不能完全模拟其体内发育环境和条件,对卵细胞成熟的机理有待进一步研究。

PMSG 和 HCG 注射后未排卵卵巢,卵泡内有大量裸卵和疑似成熟卵(卵丘颗粒细胞已扩散卵),为了进一步挖掘这部分卵子的利用价值,我们分三组进行试验:体外成熟培养 0 h(直接进行体外受精)、体外成熟培养 6 h 后体外受精和体外成熟培养 16~18 h 后体外受精。直接进行体外受精组,两次重复实验,受精后二胞率分别为 15.6%(22/141)和 10.2%(5/49),囊胚率分别为 22.7%(5/22)和 0%(0/5)。说明在这些裸卵和疑似成熟卵中,有真正的成熟卵,但只是占很少一部分比例。体外成熟培养 6 h 组二胞率为 5.7%(3/53),囊胚率为 0%(0/3);体外成熟培养 16~18 h 组,两次重复实验,二胞率分别为 18.6%(30/161)和 1.3%(1/79),囊胚率分别为 3.3%(1/30)和 0%(0/1)。说明在这些裸卵和疑似成熟卵中,只有很少一部分可以在体外成熟培养后获得受精能力。不管是直接进行体外受精,还是体外成熟培养 6 h、16~18 h 后进行体外受精,裸卵和疑似成熟卵受精后的二胞率、囊胚率都不尽如人意。分析其原因可能是这部分卵子,由于没有卵丘颗粒细胞的包裹,所以在体外成熟培养中不能很好地接受成熟因子的调控<sup>[8]</sup>。然而,只注射 PMSG(B 组)的卵泡中,大部分是有颗粒细胞包裹的未成熟卵,裸卵只有很少一部分,并且未见到有疑似成熟卵。由此得出结论:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢卵泡内大量的裸卵和疑似成熟卵是 HCG 作用的结果,至于为什么没有排出原因尚不清楚。

综上所述,卵母细胞体外成熟(IVM)可以作为生物净化中小鼠促排卵失败的一种补救措施,并且可以提高一些珍稀转基因品系小鼠的卵子利用率。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 杜江涛,宋晓明,戴方伟,等. 小鼠腺病毒荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 实验动物科学, 2017, **34**(3): 49-54.
- [ 2 ] 李娜,杨秋龙,李思璧,等. 模型动物生物净化方法的探讨[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2014, **32**(5): 84-88.
- [ 3 ] Zhang Y, Shao L, Xu Y, *et al.* Effect of anti-Mullerian hormone in culture medium on quality of mouse oocytes matured in vitro [J]. PLoS One, 2014, **9**(6): e99393.
- [ 4 ] 刘丽均,郁丽丽,朱权凤,等. 生物工程技术在实验小鼠生物净化上的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2009, **19**(11): 63-66.
- [ 5 ] 宋绍征,王怡,王宝珠,等. 激素剂量、小鼠品系及周龄对超数排卵的影响[J]. 实验动物科学, 2011, **28**(4): 5-8.
- [ 6 ] 徐平. 不同日龄和品系小鼠超排卵、体外受精及受孕率的比较研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, **11**(2): 78-81.
- [ 7 ] Zeng H T, Richani D, Sutton-McDowall M L, *et al.* Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2014, **91**(2): 47.
- [ 8 ] Sugiura K, Pendola F L, Eppig J J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism [J]. Dev Biol, 2005, **279**(1): 20-30.
- [ 9 ] Richani D, Wang X, Zeng H T, *et al.* Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence [J]. Mol Reprod Dev, 2014, **81**(5): 422-435.
- [ 10 ] Gilchrist R B, De Vos M, Smitz J, *et al.* IVM media are designed specifically to support immature cumulus-oocyte complexes not denuded oocytes that have failed to respond to hyperstimulation [J]. Fertil Steril, 2011, **96**(2): e141.
- [ 11 ] Frank L A, Sutton-McDowall M L, Russell D L, *et al.* Effect of varying glucose and glucosamine concentration in vitro on mouse oocyte maturation and developmental competence [J]. Reprod Fertil Dev, 2013, **25**(8): 1095-1104.
- [ 12 ] Albus F K, Sasseville M, Lane M, *et al.* Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes [J]. Hum Reprod, 2010, **25**(12): 2999-3011.
- [ 13 ] Eppig J J, O'Brien M J, Wigglesworth, K, *et al.* Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring [J]. Hum Reprod, 2009, **24**(4): 922-928.

Application of Oocytes *In Vitro* Maturation in Mice Biological Purification

DU Jiangtao<sup>1</sup>, WU Xiaojing<sup>2</sup>, DAI Fangwei<sup>1</sup>, LU Lingqun<sup>1</sup>, ZHOU Shasang<sup>1</sup>, YING Huazhong<sup>1</sup>, GUO Honggang<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

(2. Hangzhou Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China)

**Abstract: Objective** In mice biological purification, ovaries that did not ovulate after ovarian stimulation, were dissected and immature oocytes were isolated from follicles, then subjected to *in vitro* maturation for the ability of fertilization. By IVM, our aim was to improve oocytes utility ratios and as a remedial measure when conventional hyperstimulation fails. **Method** In mice biological purification, COCs were isolated by puncturing of ovarian follicles with a needle, that did not ovulate after PMSG and HCG stimulation, then subjected immediately to maturation in IVM culture. At the same time, the normal superovulation after PMSG and HCG injection, the immature oocytes *in vitro* maturation after PMSG injection, and suspected matured oocytes and nude oocytes *in vitro* maturation after PMSG and HCG injection were used as controls. After IVM and IVF, the 2-cell embryos were introduced to oviducts of the pseudo-pregnant foster mothers, and developed matured individuals *in vivo*. **Result** Ovaries that did not ovulate after PMSG and HCG injection (group A), the mature rate of immature oocytes was 87.0%±3.2%, 2-cell rate was 55.1%±12.3%, blastocyst rate was 23.1%, 41 2-cell embryos were introduced to oviducts of two pseudo-pregnant foster mothers, and 5 cubs were born, the birth rate was 12.2%. PMSG injection only, immature oocytes were obtained 48 h later (group B), *in vitro* maturation rate was 83.9%±3.9%, 2-cell rate was 51.8%±9.3%, blastocyst rate was 38.5%±13.9%. The normal superovulation after PMSG and HCG injection (group C), 2-cell rate was 78.9%±0.6%, blastocyst rate was 78.0%±3.8%. The suspected matured oocytes and nude oocytes were obtained from ovaries that did not ovulate after PMSG and HCG injection (group D), matured *in vitro* 0 h, 6h and 16~18 h, the mature rate, 2-cell rate and blastocyst rate were all lower than the other three groups and had significant differences. The 2-cell rate of group A and group B had significant differences, and blastocyst rate had extremely significant differences compared with group C. **Conclusion** Oocytes IVM can be used as a remedial measure when conventional hyperstimulation fails, and also can be used to improve rare strains of mice oocytes utility ratios.

**Key words:** mice; oocyte; IVM; biological purification