

培养基中能量底物对猪胚胎发育的影响

付博^① 房庆昌^② 任亮^② 汪亮^② 孙洪涛^② 别墅^②
马红^{①②} 刘娣^{①②*}

(① 黑龙江省农业科学院 哈尔滨 150086; ② 东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要:旨在探讨丙酮酸和乳酸对猪 (*Sus scrofa*) 胚胎早期发育的影响,将 NCSU-23 培养基中的 5.56 mmol/L 葡萄糖替换为 0.2 mmol/L 丙酮酸、5.7 mmol/L 乳酸,并将此培养基命名为 mNCSU-23。根据实验设计,孤雌胚及核移植胚转移到 mNCSU-23 或 NCSU-23 中培养。激活第 2 天统计孤雌胚及核移植胚中的 5~8 细胞胚胎数。激活第 6 天统计孤雌胚及核移植胚囊胚形成率及囊胚细胞数。实验结果表明,mNCSU/NCSU 处理组的 5~8 细胞胚胎数及囊胚数显著高于对照组 ($P < 0.05$);单纯使用 mNCSU 培养猪胚胎时,囊胚率最低,发育结果最差 ($P < 0.05$)。本研究证实,在体外培养前两天,用乳酸和丙酮酸代替培养基中的葡萄糖对胚胎发育有利。

关键词:猪;能量底物;孤雌胚;核移植胚

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)04-164-07

Effect of Energy Substrates on the Development of Porcine Embryos

FU Bo^① FANG Qing-Chang^② REN Liang^② WANG Liang^② SUN Hong-Tao^②
BIE Shu^② MA Hong^{①②} LIU Di^{①②*}

(① *Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;*

② *College of Life Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China*)

Abstract: This study aimed to investigate the effects of pyruvate and lactic acid on early development of porcine embryos. The NCSU-23 culture medium was modified by replacing 5.56 mmol/L glucose with 0.2 mmol/L pyruvate and 5.7 mmol/L lactic acid, and the modified medium was called mNCSU-23. Parthenogenetic embryos and nuclear transfer embryos were transferred into either NCSU-23 or mNCSU-23 medium. Embryo development to 5-8 cells was observed 2 days after egg activation, and blastocyst rate and the number of nuclei in the blastocyst were determined on day 6. A higher proportion of the embryos reached 5-8 cells at 48 h and blastocysts on day 6 in mNCSU/NCSU treatment (first 48 h in mNCSU-23 medium and thereafter in NCSU-23 medium) group when compared with the control (NCSU/NCSU, first 48 h in NCSU-23 medium and thereafter also in NCSU-23 medium) group ($P < 0.05$). The rate of blastocyst formation in mNCSU-23/mNCSU-23 (first 48 h in mNCSU-23 medium and thereafter also in mNCSU-23 medium) group was the lowest ($P < 0.05$). Our results have demonstrated that replacing glucose with pyruvate and lactic acid during the first 48 h of IVC may be beneficial to the development of porcine embryos.

Key words: Pig; Energy substrate; Parthenogenetic embryos; Nuclear transfer embryos

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划重点项目 (No. 2008BADB2B02), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2008ZX08006-003);

* 通讯作者, E-mail: liudi1963@163.com;

第一作者介绍 付博,男,博士研究生;研究方向:胚胎工程;E-mail: fubohao810@163.com。

收稿日期:2009-12-22, 修回日期:2010-03-15

自从第一头克隆猪问世以来,猪胚胎的体外培养(*in vitro culture*, IVC)技术取得了长足进步。猪胚胎的体外培养是核移植生产克隆猪乃至转基因猪的关键环节。尽管体外培养系统得到了优化^[1],但经过体外培养的核移植胚胎的发育能力远低于体内生产的胚胎。体外培养时间越长,胚胎的发育能力越差。体外培养的条件不适合猪卵母细胞的早期发育,可能是造成这种差异的主要原因。因此,优化猪胚胎体外培养基成为提高猪胚胎生产效率的可行途径。与其他猪胚胎培养基相比,NCSU-23 是一种较为成功的猪胚胎体外培养基^[2]。尽管 NCSU-23 的成分是根据猪胚胎的代谢和营养需求设计的,但该种培养基仍需优化,以进一步提高猪胚胎的发育能力。葡萄糖是多数细胞的主要能量来源物质。猪胚胎的能量代谢研究表明,在胚胎发育的全过程中葡萄糖的代谢通路都处于激活状态^[3]。然而,有研究表明,NCSU-23 培养基中的葡萄糖浓度要高于输卵管液中的葡萄糖浓度^[4]。近期的研究也表明,体外培养系统中前期添加葡萄糖对猪胚胎的后期发育不利^[5]。同时,丙酮酸和乳酸也是哺乳动物胚胎发育过程中的重要能源物质。体外培养前期,将培养液中的葡萄糖替换为丙酮酸和乳酸可能有利于猪胚胎的后期发育。

在本研究中,在体外培养的前期(卵母细胞激活后 48 h),将 NCSU-23 培养基中的葡萄糖替换为丙酮酸和乳酸,旨在研究 NCSU-23 培养基中的能量变化对猪孤雌激活胚、核移植胚发育的影响,为进一步提高猪体细胞核移植效率奠定基础。

1 材料与amp;方法

除特别说明外,所有化学试剂均购自 Sigma Aldrich 公司(St. louse, MO)。猪卵巢采集自哈尔滨市肉联公司屠宰场。NCSU-23 培养基(5.56 mmol/L 葡萄糖)和 mNCSU-23 培养基(0.2 mmol/L 丙酮酸,5.7 mmol/L 乳酸)均为自配培养基,丙酮酸和乳酸浓度根据猪输卵管液能量物质组成确定^[4]。

1.1 卵母细胞体外成熟培养 使用配有 18G 针头的 20 ml 注射器从 3~6 mm 的有腔卵泡中抽吸卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex),采卵液为 TCM-199 (Hank's)。在体视显微镜下,选取表面包裹 3 层以上卵丘细胞、致密而且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs),以组成为 TCM-199 (Earle's) + 10% 猪卵泡液(pFF) + 0.57 mmol/L L-半胱氨酸(L-cysteine) + 10 ng/ml 表皮生长因子(EGF) + 10 IU/ml 孕马血清促性腺激素(PMSG) + 10 IU/ml 人绒毛膜促性腺激素(hCG)的猪卵母细胞体外成熟培养液进行成熟培养(5% CO₂、39℃、饱和湿度)。培养 22 h 后,再将卵母细胞移入无 PMSG 和 hCG 的成熟培养液中继续培养 22 h。

1.2 核供体卵丘细胞分离培养 采取一头母猪的卵巢,收集卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。将成熟培养 44 h 的 COC 移入 0.1% 透明质酸酶(Sigma 产品)中,在 38.5℃ 孵育 4 min,捡取卵母细胞后用等体积 10% FBS DMEM(GIBCO 产品)培养液终止消化,以 1 500 r/min 离心 5 min,收集卵丘细胞,调整单细胞悬液密度为 5 × 10⁵ 个/ml,接种到 35 mm 培养皿中,于 38.5℃、5% CO₂ 饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。细胞生长达到 80% 汇合时进行传代。在显微操作前 1 h 用胰蛋白酶消化、离心,收藏于 4℃ 备用。

1.3 卵母细胞孤雌激活 成熟培养 44 h 后,将成熟的卵母细胞移入脱卵丘液中反复吹打,脱去卵丘细胞。选取卵丘细胞扩散,卵周隙明显、卵黄膜完整且排出第一极体的卵母细胞,先用 39℃ 预温的激活液洗涤 3 遍,并在其中平衡 1 min,再将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中,按照本实验所设定电融合仪参数(激活参数为:1 次脉冲,1.8 kV/cm,30 μs)进行直流脉冲刺激。静置 1 min 之后,移入 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA + 2 mmol/L 6-DMAP 液滴内或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA + 2 mmol/L 6-DMAP 液滴内(根据实验设计),在 39℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养 4 h。再

将其转移到 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA 或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA 胚胎培养液,在 39℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养。

1.4 重构胚构建 卵丘细胞传代 4 次,待细胞生长至汇合时,继续培养 1~2 d 后,消化离心,加 1 ml 操作液重悬细胞备用。重构卵/胚胎构建:将成熟卵母细胞转入含有 10 μg/ml CB 和 5 μg/ml Hoechst33342 的显微操作液(NCSU-23 Hepes 缓冲),利用显微操作盲吸法进行卵母细胞去核,即吸取第一极体及其临近 10%~20% 可能含有卵母细胞核的胞质。在荧光显微镜下观察卵母细胞去核情况(注核针内含有第一极体及细胞核物质为去核成功)。然后用同一注核针将体细胞从去核切口放入卵周隙,用注核针点压透明带,使供核细胞与卵母细胞接触紧密。操作一批结束后将供体细胞-卵胞质重构胚转移到 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA 或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA 中,在 39℃、5% CO₂、饱和湿度条件下恢复 1.5 h。

1.5 重构胚融合激活 重构胚用 39℃ 预温的激活液洗涤 3 遍,并在其中平衡 1 min,再将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中,用实心玻璃针拨动重组卵,使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行,进行直流脉冲刺激(激活参数为一次脉冲,1.8 kV/cm,30 μs)。静置 1 min 之后,将卵母细胞用 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA 或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA 洗涤 5 遍,然后将卵母细胞转移到矿物油覆盖并在二氧化碳培养箱中预平衡至少 4 h 的 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA + 2 mmol/L 6-DMAP 液滴内或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA + 2 mmol/L 6-DMAP 液滴内,在 39℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养 4 h。其间 6-DMAP 处理 1 h 后,在体视显微镜下判定融合(供核细胞融合入受体胞质内即为融合的重构胚)。

1.6 胚胎培养 将融合激活后的重构胚在 NCSU-23 + 4 mg/ml BSA 或 mNCSU-23 + 4 mg/ml BSA 中洗涤 3 遍,然后根据不同的实验设计,将激活胚或融合激活胚移入 NCSU-23 培养基或改良的 NCSU-23 (mNCSU-23) 中。融合激

活 48 h 后记录 5~8 细胞数,144 h 后记录囊胚形成率。取出第 6 天的囊胚,在含 3.7% 多聚甲醛的 DPBS 中洗涤 3 遍后固定 5 min,将固定后的囊胚转移到含 10 μg/ml Hoechst33342 的 DPBS 中,在避光的暗盒中室温孵育 5 min,染色结束后,将囊胚转移到载玻片上甘油液滴内,尽量少带液体,用凡士林/石蜡在其四角点 4 个柱,再轻轻压盖玻片,最后用指甲油封片。然后在荧光显微镜的紫外光激发下观察囊胚细胞染色情况并计数^[6]。

1.7 实验设计

1.7.1 能量底物对猪孤雌激活胚发育的影响(实验一) 卵母细胞孤雌激活后,移入 NCSU-23 或 mNCSU-23 中,在 5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养。具体处理如下。

NCSU-23/NCSU-23:孤雌激活卵母细胞移入 NCSU-23 培养 48 h 然后移入新鲜的 NCSU-23 继续培养至 144 h。mNCSU-23/mNCSU-23:孤雌激活卵母细胞移入 mNCSU-23 培养 48 h 然后移入新鲜的 mNCSU-23 继续培养至 144 h。mNCSU-23/NCSU-23:孤雌激活卵母细胞移入 mNCSU-23 培养 48 h 然后移入新鲜的 NCSU-23 继续培养至 144 h。

1.7.2 能量底物对猪核移植重构胚发育的影响(实验二) 核移植重构胚融合激活后,移入 NCSU-23 或 mNCSU-23 中,在 5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养。具体处理如下。

NCSU-23/NCSU-23:核移植重构胚移入 NCSU-23 培养 48 h 然后移入新鲜的 NCSU-23 继续培养至 144 h。mNCSU-23/NCSU-23:核移植重构胚移入 mNCSU-23 培养 48 h 然后移入新鲜的 NCSU-23 继续培养至 144 h。

1.8 统计分析 实验数据用 Mean ± SE 表示。实验一中的卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数的数据用 SPSS 17.0 的 ANOVA 过程进行分析。实验二中的卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数的数据用 SPSS 17.0 的 Independent-Samples *t*-test 过程进行分析。每个处理重复 3 次。当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

猪孤雌胚胎和核移植胚胎的早期发育潜力的评判指标主要包括囊胚率和胚胎细胞计数。卵母细胞激活后 48 h 观察 5 ~ 8 细胞数,激活后 144 h 观察囊胚数和囊胚细胞数。

2.1 能量底物对猪孤雌激活胚发育的影响

由表 1 数据可知,卵母细胞体外培养第 2 天,mNCSU-23/NCSU-23 处理组与 mNCSU-23/

mNCSU-23 处理组的 5 ~ 8 细胞数显著高于 NCSU-23/NCSU-23 处理组。3 个不同处理的囊胚率差异显著,其中,mNCSU-23/NCSU-23 处理组囊胚率最高,而 mNCSU-23/mNCSU-23 处理组囊胚率最低。各处理囊胚细胞数无显著差异(图 1,表 1)。提示 mNCSU-23 培养基可能有助于胚胎发育,但体外培养后期添加 mNCSU-23 对孤雌胚胎发育不利,且能量底物的变化对囊胚细胞数无显著影响。

表 1 培养基中能量底物对孤雌胚体外发育的影响

Table 1 Effect of energy substrate in culture system on the development of parthenogenetic embryos *in vitro*

培养类型 Type of culture	培养卵数 No. of treated oocytes	5 ~ 8 细胞数 No. of 5 - 8 cells (Mean ± SE) (%)	囊胚数 No. of blastocysts (Mean ± SE) (%)	囊胚细胞数 No. of blastocyst cells (Mean ± SE)
NCSU-23/NCSU-23	150	27 (18.0 ± 2.3) ^b	60 (40 ± 3.4) ^b	36.5 ± 1.5 ^a
mNCSU-23/mNCSU-23	160	45 (28.1 ± 1.1) ^a	33 (20.7 ± 2.6) ^c	37.5 ± 3.8 ^a
mNCSU-23/NCSU-23	155	45 (29.0 ± 2.5) ^a	103 (66.6 ± 3.7) ^a	38.0 ± 2.6 ^a

同列数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$), 所标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

Different letters in the same row mean significant difference between the treatments ($P < 0.05$), and the same letter in the same row means the absence of significant difference between treatments ($P > 0.05$). The same is applied below.

表 2 培养基中能量底物对核移植胚体外发育的影响

Table 2 Effect of energy substrate in culture system on the development of somatic nuclear transferred embryos *in vitro*

培养类型 Type of culture	培养卵数 No. of treated oocytes	5 ~ 8 细胞数 (%) No. of 5 - 8 cell (Mean ± SE)	囊胚数 (%) No. of blastocysts (Mean ± SE)	囊胚细胞数 No. of blastocyst cells (Mean ± SE)
NCSU-23/NCSU-23	120	14 (18.3 ± 3.6) ^b	7 (10.0 ± 1.4) ^b	36.0 ± 1.5 ^a
mNCSU-23/NCSU-23	122	24 (35.1 ± 2.5) ^a	14 (19.6 ± 1.1) ^a	39.6 ± 2.4 ^a

2.2 能量底物对猪核移植重构胚发育的影响

卵母细胞去核情况,注核针内含有第一极体及细胞核物质,去核成功(图 2)。由表 2 数据可知,核移植重构卵体外培养第 2 天,mNCSU-23/NCSU-23 处理组 5 ~ 8 细胞数显著高于 NCSU-23/NCSU-23 处理组。mNCSU-23/NCSU-23 处理组囊胚率显著高于 NCSU-23/NCSU-23 处理组。各处理囊胚细胞数无显著差异(图 3,表 2)。提示 mNCSU-23 培养基可能有助于核移植重构胚胎发育,能量底物的变化对核移植重构囊胚细胞数无显著影响。

3 讨 论

本研究的结果表明,mNCSU-23/NCSU-23

的处理组合对孤雌囊胚及核移植囊胚的形成均有促进作用。

葡萄糖是哺乳动物胚胎早期发育的重要能源物质。但由于在发育前期,胚胎不能高效代谢葡萄糖^[7],培养基中高浓度的葡萄糖会导致发育阻滞。早期的研究证实,在胚胎发育的前期和后期,胚胎的代谢活性和能量需求有差异^[8]。Rieger 的研究也发现,卵母细胞激活后的 48 h 是胚胎基因组激活的关键期,且基因组激活后,葡萄糖的代谢水平才显著升高^[9]。因此,在胚胎培养前期,找到可替代葡萄糖的能量底物有可能促进胚胎的体外发育。除葡萄糖外,乳酸和丙酮酸也是胚胎早期发育所需的重

要能量底物。根据猪输卵管液中能量物质的组成^[4]，在胚胎体外培养的前期，将培养基中的葡萄糖替换为 0.2 mmol/L 丙酮酸和 5.7 mmol/L 乳酸可能有利于猪孤雌激活胚及核移植胚的发育。丙酮酸的浓度为 0.2 mmol/L 主

要是因为其浓度过高会影响囊胚的质量^[10]。有研究证实，乳酸可降低小鼠 2 细胞胚胎中丙酮酸的氧化水平，并调节丙酮酸的代谢和吸收^[11-12]。

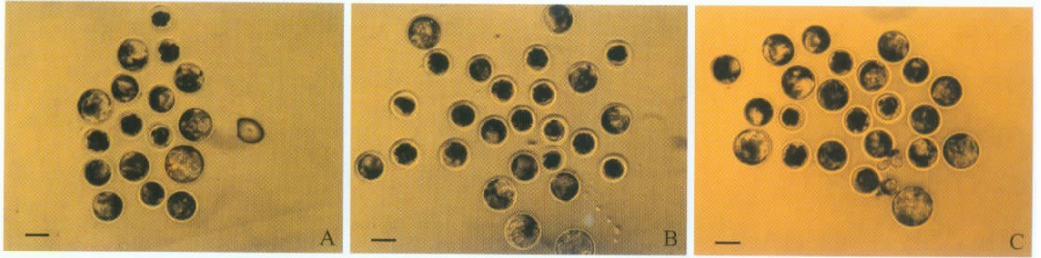


图 1 猪孤雌囊胚

Fig. 1 Porcine parthenogenetic embryos at blastocysts stage

A: NCSU-23/NCSU-23; B: mNCSU-23/mNCSU-23; C: mNCSU-23/NCSU-23. Bar = 100 μm

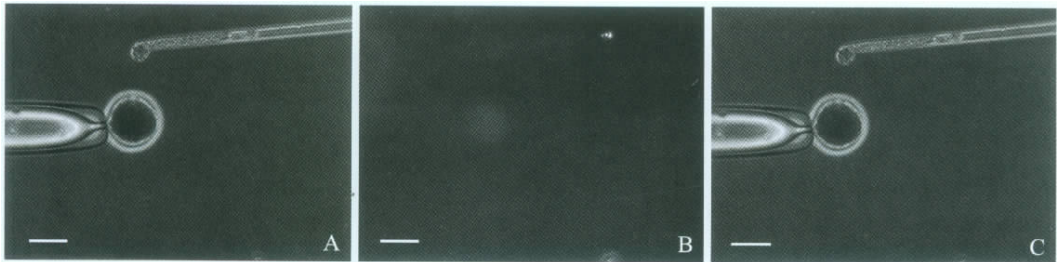


图 2 卵母细胞 Hoechst 染色

Fig. 2 Enucleated oocytes stained with Hoechst

A: 相差视野; B: 荧光视野; C: 相差视野 + 荧光视野。标尺 = 100 μm

A: Phase contrast images; B: Epifluorescent images; C: Phase contrast images + epifluorescent images. Bar = 100 μm

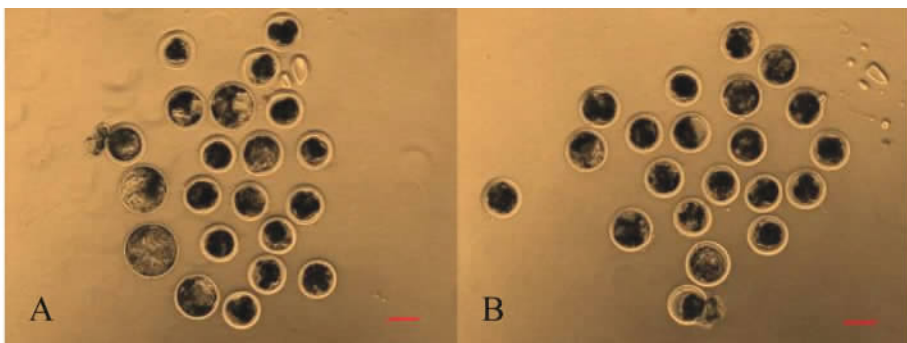


图 3 猪克隆囊胚

Fig. 3 Porcine nuclear transfer embryos at blastocysts stage

A: mNCSU-23/NCSU-23; B: NCSU-23/NCSU-23. Bar = 100 μm

本实验结果表明,对孤雌激活胚和核移植胚来说,在体外培养前期,使用 mNCSU-23 培养基的处理组 5~8 细胞数显著高于使用 NCSU-23 处理组,而后期使用 mNCSU-23 培养基的处理组囊胚率显著低于使用 NCSU-23 处理组。说明培养基中前期添加丙酮酸和乳酸对卵裂有益,且有助于胚胎发育;但培养基中持续添加丙酮酸和乳酸则不利于发育后期囊胚的形成,且葡萄糖在胚胎发育的后期仍然起着不可替代的作用。胚胎体外培养 48 h 后,胚胎发育由母型调控转移到合子型调控,葡萄糖的代谢途径得以激活,胚胎开始利用葡萄糖供能^[9]。本实验结果证实,如果此时缺乏葡萄糖供能,胚胎发育能力会下降。发育前期,胚胎利用丙酮酸和乳酸供能,而葡萄糖为非必需^[13-14];在胚胎发育的前期,培养基中高浓度的葡萄糖会导致胚胎发育阻滞现象^[15-19]。另外,在胚胎发育的前期,高浓度的葡萄糖在代谢的过程中会增加氧自由基的含量,从而造成卵母细胞的氧化损伤。丙酮酸不但在线粒体呼吸和细胞的分裂中起重要作用,而且能抵抗过氧化造成的细胞毒^[20]。这也可能是胚胎发育前期添加丙酮酸有利的一个原因。总之,培养基中的能量底物对胚胎发育的影响深远且复杂,其具体机制还有待进一步研究。

在猪胚胎发育前期,培养基中添加丙酮酸及乳酸可促进猪孤雌激活胚及核移植胚卵裂,加快其发育速度;且有利于提高孤雌激活胚及核移植胚的囊胚率。

参 考 文 献

- [1] Bureau M , Bailey J L , Sirard M A . Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote* , 2000 , 8 (2) : 139 - 144 .
- [2] Machúty Z , Day B N , Prather R S . Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* , 1998 , 59 (2) : 451 - 455 .
- [3] Sturmey R G , Leese H J . Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* , 2003 , 126 (2) : 197 - 204 .
- [4] Nichol R , Hunter R H , Gardner D K , et al . Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* , 1992 , 96 (2) : 699 - 707 .
- [5] Kim H S , Lee G S , Hyun S H , et al . Improved *in vitro* development of porcine embryos with different energy substrates and serum. *Theriogenology* , 2004 , 61 (78) : 1381 - 1393 .
- [6] 潘登科,刘吉,冯书堂,等. 氧分压、培养基及生长因子对猪体细胞克隆胚胎体外发育的影响. *中国农业科学* , 2008 , 41 (4) : 1186 - 1191 .
- [7] Thompson J G , Simpson A C , Pugh P A , et al . Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* , 1992 , 31 (4) : 253 - 257 .
- [8] Houghton F D , Thompson J G , Kennedy C J , et al . Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* , 1996 , 44 (4) : 476 - 485 .
- [9] Rieger D . Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* , 1992 , 37 (1) : 75 - 93 .
- [10] Park Y , Hong J , Yong H , et al . Effect of exogenous carbohydrates in a serum-free culture medium on the development of *in vitro* matured and fertilized porcine embryos. *Zygote* , 2005 , 13 (3) : 269 - 275 .
- [11] Wales R G , Whittingham D G . Metabolism of specifically labelled pyruvate by mouse embryos during culture from the two-cell stage to the blastocyst. *Aust J Biol Sci* , 1970 , 23 (4) : 877 - 887 .
- [12] Lane M , Gardner D K . Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* , 2000 , 62 (1) : 16 - 22 .
- [13] Kikuchi K , Onishi A , Kashiwazaki N , et al . Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol Reprod* , 2002 , 66 (4) : 1033 - 1041 .
- [14] Yoshioka K , Suzuki C , Tanaka A , et al . Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* , 2002 , 66 (1) : 112 - 119 .
- [15] Scott L , Whittingham D G . Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev* , 1996 , 43 (3) : 336 - 346 .
- [16] Kishi J , Noda Y , Narimoto K , et al . Block to development in cultured rat 1cell embryos is overcome using medium HECM-1. *Hum Reprod* , 1991 , 6 (10) : 1445 - 1448 .
- [17] Miyoshi K , Funahashi H , Okuda K , et al . Development

- of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J Reprod Fertil*, 1994, 100(1): 21-26.
- [18] Kim J H, Niwa K, Lim J M, et al. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod*, 1993, 48(6): 1320-1325.
- [19] Thompson J G, Simpson A C, Pugh P A, et al. Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 1992, 31(4): 253-257.
- [20] Wilding M, Fiorentino A, De Simone M L, et al. Energy substrates, mitochondrial membrane potential and human preimplantation embryo division. *Reprod Biomed Online*, 2002, 5(1): 39-42.

《动物学杂志》投稿注意事项

1 稿件的投寄

稿件通过本刊的电子信箱投寄 (E-mail: journal@ioz.ac.cn; Word 文件作附件), 同时邮寄打印稿一份。打印稿小四号字单面 1.5 倍行距打印。作者在投稿的同时务必出具公函或作出承诺, 稿件不能一稿多投和侵权。

2 论文的格式要求

题目 应言简意赅。中文题目字数一般不超过 20 个字; 英文题目不超过 10 个实词, 实词首字母大写。

作者 署名入应是对论文的全部或部分内容做出主要贡献, 并能对文章内容负责的人。

单位 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

摘要 中文摘要放在文首。内容包括: 研究目的、方法、结果 (主要数据) 和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面, 其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

关键词 一般为 3~5 个, 中英文对应, 分别列在中英文摘要下面。

前言 结合文摘阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

正文 材料与方法的来源及方法的出处应详细陈述; 结果的数据要完整, 微观形态的稿件应有实验照片作为依据; 文字叙述要简洁明了, 与图表内容相互呼应; 讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论, 以达到解决问题或得出结论的目的。

全文书写规格 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词, 应先写出中文名称后, 再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名 (种属名用斜体, 属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

①**小标题**: 应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码, 左顶格编排, 如“1”(一级标)、“1.1”(二级标)、“1.1.1”(三级标)。

②**图表**: 力求精选, 反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码, 在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制; 照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片, 应注明长度标尺和放大倍数。

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献。本刊文献的著录格式采用顺序编码制, 即以文献在文中出现的先后顺序连续编码, 加方括号标注在文中引用处, 文后文献表的文献要与文中一致, 并按文中的顺序排列, 多名作者在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

①**期刊**: 作者. 题名. 刊名, 出版年, 卷(期)号: 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, 22(5): 40-43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Tesudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 38-45.

②**专著**: 作者. 书名. 版本 (第一版不标注). 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳. *动物生态学原理*. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 329-330.

[4] Jiang Z G. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 160-164.

③**论文集**: 作者. 题名//编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究//中国动物学会. *中国动物科学研究*. 北京: 中国林业出版社, 1999: 59-64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China//Song D X. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997: 395-399.