

多种因素对小鼠卵母细胞体外受精效果影响的分析

张景锋^{1,2}, 郝京京¹, 徐秋良^{1,2}, 朱宽佑^{1,2}, 牛 晖^{1,2}, 张长兴^{1,2}

(1. 河南牧业经济学院 动物科技学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省畜禽遗传资源保护工程技术研究中心, 河南 郑州 450046)

[摘 要] 为了探讨不同精子获能时间, 精卵孵育时间, 精子密度以及颗粒细胞对小鼠卵母细胞体外受精的影响, 从而达到对卵母细胞体外受精体系优化的目的。比较了精子获能时间分别为 40 min、60 min、80 min 试验组的受精卵卵裂率。结果表明, 带颗粒细胞卵母细胞(COCs)在三个试验组中卵裂率无显著差异, 不带颗粒细胞卵母细胞(NO)在精子获能时间为 60 min 时卵裂率最高; 比较了精卵孵育时间分别为 2 h、4 h、6 h、8 h 试验组的受精卵卵裂率, 结果显示 COCs 精卵孵育时间 2 h 试验组的效果最好, NO 孵育时间为 6 h 试验组的效果最好; 比较了精子密度分别为 3×10^5 /mL, 3×10^6 /mL, 3×10^7 /mL 试验组受精卵卵裂率, 结果显示 COCs 和 NO 均为 3×10^6 /mL 试验组卵裂效果最好; 比较 COCs 和 NO 的受精卵卵裂率, 结果显示 COCs 与 NO 之间存在显著差异($P < 0.05$), 裸卵卵裂效果显著优于颗粒细胞卵裂效果。试验结果表明, 在卵母细胞体外受精过程中, 精子获能时间 60 min, 精子密度为 3×10^6 /mL, 精卵孵育 6 h, 培养 24 h 后卵裂率最高。

[关键词] 卵母细胞; 精子获能; 精子密度; 体外受精

[中图分类号] S814.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-5228(2021)03-0038-05

doi:10.3969/j.issn.1673-1182.2021.03.007

体外受精是指哺乳动物的精子和卵子在体外人为控制的环境中完成受精过程的技术。这项技术于 20 世纪 50 年代取得了成功, 该技术在濒危动物和优良家畜品种的后代续繁、性别控制、品种资源保存等方面的应用具有重大意义, 最大优点是能够打破时间和空间限制^[1-3]。鉴于此, 科研人员模拟卵母细胞在体内受精和胚胎发育的情况, 研究获得高受精率和高胚胎发育率的方法, 从而提高体外受精的效果^[4-5]。在不同激素对卵母细胞体外受精的影响方面, 有研究者提出促卵泡素(FSH)和胰岛素对小鼠卵母细胞体外成熟有提高作用, 并且胰岛素的效果要比 FSH 的效果更加好, 但是对于体外受精率, 胰岛素添加组要比 FSH 组低 4.6%^[6-7]。李凯等^[8]研究结果显示, 小鼠卵母细胞经过 1 000 ng/mL 雌二醇处理后, 卵裂率低于其它试验组, 这种现象的出现可能是因为高浓度的雌激素对小鼠卵母细胞的受精能力有抑制作用。在不同添加剂对卵母细胞体外受精的影响方面, 有学者提出牛血清白蛋白(BSA)具

有降低小鼠体外受精率的作用, 认为卵母细胞透明带在含有 BSA 的体系中发生硬化^[9]。郭勇等^[10]研究结果证明人的重组促黄体生成素(r-hLH)对小鼠卵母细胞的体外受精有明显的促进作用, 同时对相应胚胎进一步发育产生明显的抑制作用。朱佳伟等^[11]研究结果显示半胱氨酸和胱氨酸通过促进小鼠体外成熟卵母细胞合成谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的方法提高受精率, 这种提高与浓度有很大的关系, 并且只有在 200 μ M 才能显著提高, 更高浓度具有相反的效果。安铁洙等^[12]研究结果表明在 M16 培养液中添加 EDTA 和 L-谷氨酰胺后, 小鼠卵母细胞体外受精率有了明显的提高, 由原来的 26% 提高到 51%, 并且进一步指出这种现象可能是由于 EDTA 与某些金属离子发生螯合作用的结果, 而谷氨酰胺一般被认为是胚胎发育 48 h 内的主要能源物质。沈维干等^[13]提出氟化钠具有明显的生殖毒性, 其对卵母细胞的成熟具有破坏作用, 同时还会降低卵母细胞的受精能力。在不同操作方法对卵

[收稿日期] 2019-12-27 修改日期:2020-06-11

[基金项目] 国家自然科学基金(31601915); 河南牧业经济学院博士科研启动基金项目(51000788)

[作者简介] 张景锋(1986-), 男, 河南滑县人, 讲师, 博士, 从事动物繁殖与发育研究。E-mail:1019985125@qq.com

母细胞体外受精的影响方面,研究者将卵母细胞分为卵丘卵母细胞、裸卵和人为操作的裸卵(即机械裸卵),其中裸卵的体外受精率要比卵丘卵母细胞复合体的体外受精率高。同时,其它研究也证明卵丘和透明带对卵母细胞体外受精起重要的作用^[14-15]。但在体外受精相关研究中,由于试验方法和培养液等条件的不同,试验过程中卵裂率也不尽相同,所以本试验研究不同精子获能时间,精卵孵育时间,精子密度以及颗粒细胞等条件对卵母细胞体外受精的影响,从而探索和优化小鼠卵母细胞体外受精及早期胚胎发育的最适环境。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验所用试验动物为昆明系小白鼠,SPF等级,22~25 g雌鼠,共30只,8~10周龄雄鼠,共10只,购置于郑州大学试验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 矿物油(M8410,500 mL)、透明质酸酶购自Sigma;孕马血清促性腺激素PMSG购自宁波第二激素厂;卵母细胞体外成熟培养液(M2)、精子获能液(HTF)、体外受精液(TYH)、胚胎培养液(KSOM)购自南京爱贝生物科技有限公司;PBS、M199(含Hepes)购自GIBCO;四孔板购自NUNC;塑料细胞培养皿(35 mm)、塑料细胞培养皿(60 mm)购自NEST;一次性针头滤器(0.22 μM)购自Millipore。

1.3 小鼠卵母细胞的体外成熟

选取健康未孕的昆明系雌性小鼠,采用腹腔注射方法注入孕马血清促性腺激素(PMSG),每只小鼠注入10 IU,48 h后颈部脱臼法处死小鼠,剪开腹腔并摘取卵巢。卵巢首先放入PBS中洗去血液和脂滴,再放入提前准备好的体外操作液M199(含Hepes)中,整个操作在37℃恒温板上进行;用1 mL注射器针头刺破卵巢表面的卵泡,释放出卵母细胞。在体式显微镜下用吸卵针挑选出形状规则,胞质均匀的GV期卵母细胞,包括带有颗粒细胞的卵母细胞(COCs)和不带颗粒细胞的卵母细胞(NO),在卵母细胞体外成熟培养液M2中洗2~3次,放入提前做好的M2培养液液滴中洗2~3次,最后放入37℃、5% CO₂培养箱中培养14 h后,排出第一极体的体外成熟卵母细胞进行后续的体外受精试验。

1.4 小鼠卵母细胞的体外受精

1.4.1 小鼠精子的采集和体外获能 选取健康的昆明系雄性小鼠,将小鼠颈部脱臼致死,将睾丸、附睾和输精管一起剪下,放入提前备好的PBS中清洗,洗去脂滴和血液,并使附睾和输精管与睾丸分离,附睾和输精管放入提前平衡好的300 μL HTF中,撕碎附睾和输精管,而后放入CO₂培养箱孵育10 min,使精子游出。精子游出后,HTF中的碎组织剔除后离心,离心时间为3 min,2 000 r/min。离心完毕,弃去上清液,在离心管中加入已经平衡好的200 μL HTF,然后放入37℃、5% CO₂细胞培养箱中进行精子的体外获能,根据不同的获能时间分为40 min、60 min和80 min三个试验组。上述过程均需要在37℃恒温板上进行。

1.4.2 小鼠卵母细胞和精子的孵育 将获能完成后的精子进行离心,时间为3 min,2 000 r/min。离心后弃去上清液,在沉淀物中加入提前平衡好的TYH,混合均匀后调整精子密度,根据不同的精子密度分为 3×10^5 个/mL、 3×10^6 个/mL和 3×10^7 个/mL三个试验组;将体外成熟的卵母细胞COCs和NO分别在TYH中洗2~3次,移入含有精子的TYH中,然后放入37℃、5% CO₂的细胞培养箱进行体外受精,根据不同的受精时间分为2 h、4 h、6 h、8 h四个试验组。整个操作过程均需在37℃恒温板上进行。

1.4.3 小鼠早期胚胎的培养 卵母细胞和精子在TYH中分别培养2 h、4 h、6 h、8 h后,将受精后的卵母细胞从TYH中移出,用预热过的KSOM中洗2~3次,移入平衡好的KSOM中,培养24 h后观察受精卵卵裂情况,并计算卵裂率。

1.5 数据分析

试验数据用SPSS22.00软件进行分析,数据用“平均值±标准差”表示,采用F检验对试验结果进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 精子获能时间对小鼠卵母细胞体外受精的影响

由表1可以看出,在COCs体外受精试验中,精子获能时间40 min、60 min、80 min的试验组间受精卵卵裂率没有显著差异,精子获能时间80 min试验组受精卵卵裂率最高。在NO体外受精试验中,精子获能时间60 min试验组受精卵卵裂率最高,获能时间80 min试验组卵裂率最差。精子获能时间

表 1 精子获能时间对小鼠卵母细胞体外受精的影响

Table 1 Effect of the sperm capacitation time on mouse oocyte fertilization in vitro

获能时间/min The capacitation time	带颗粒细胞卵母细胞 COCs			不带颗粒细胞卵母细胞 NO		
	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate
40	65	22	33.58 ^a ±0.44	58	31	53.28 ^a ±2.07
60	89	31	33.75 ^a ±1.29	82	45	54.60 ^a ±3.99
80	70	25	36.30 ^a ±1.11	58	25	43.22 ^b ±0.79

注:同列数据进行比较,平均数肩标含相同字母表示差异不显著($P>0.05$),字母完全不同且连续表示差异显著($P<0.05$),字母完全不同且不连续表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

Notes: In the same row, means with the same letter superscripts show insignificant difference ($P>0.05$), while the different and continuous letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and the different and discontinuous letter superscripts mean significant difference ($P<0.01$). The same below.

60 min 试验组与精子获能时间 40 min 试验组间无显著差异,与精子获能时间 80 min 试验组间存在显著差异($P<0.05$)。综上所述,精子获能时间对 NO 的卵裂率存在一定影响,精子获能时间为 60 min 试验组的卵裂率最高,精子获能时间对于 COCs 卵裂率不存在显著影响。

2.2 精卵孵育时间对小鼠卵母细胞体外受精的影响

由表 2 可以看出,在 COCs 体外受精试验中,精卵孵育时间为 2 h 的试验组,受精卵卵裂率最高,与精卵孵育时间 4 h、6 h 试验组间均没有显著差异。精卵孵育时间为 8 h 的试验组,受精卵卵裂率最低。精卵孵育时间 2 h、4 h、6 h 试验组与精卵孵育时间 8 h 试验组间存在显著差异,且受精卵卵裂率显著高于精卵孵育时间 8 h 试验组($P<0.05$)。在 NO 体外受精试验中,精卵孵育时间为 6 h 试验组的卵

裂率最高,与精卵孵育时间 2 h 试验组间没有显著差异,与精卵孵育时间 4 h 差异显著($P<0.05$),与 8 h 试验组间存在极显著差异($P<0.01$),而且精卵孵育时间 8 h 的试验组中受精卵卵裂率最低。综上所述,精卵孵育时间对小鼠卵母细胞体外受精结果存在影响,COCs 体外受精结果显示精卵孵育时间 2 h 获得的效果最好,NO 的精卵孵育时间为 6 h 时效果最好。

2.3 精子密度对小鼠卵母细胞体外受精的影响

由表 3 可以看出,在 COCs 体外受精试验中,精子密度 3×10^5 /mL 试验组的受精卵卵裂率最高,精子密度为 3×10^5 /mL 试验组与精子密度为 3×10^6 /mL 试验组之间没有显著差异,精子密度为 3×10^7 /mL 试验组与精子密度 3×10^6 /mL 试验组、精子密度 3×10^5 /mL 试验组间存在显著差异($P<0.05$),

表 2 精卵孵育时间对小鼠卵母细胞体外受精的影响

Table 2 Effect of sperm-egg incubation time on mouse oocyte fertilization in vitro

精卵孵育时间/h The incubation time	带颗粒细胞卵母细胞 COCs			不带颗粒细胞卵母细胞 NO		
	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate
2	69	25	36.09 ^a ±0.78	52	29	49.06 ^{ab} ±5.07
4	68	23	34.12 ^a ±1.13	52	25	45.37 ^b ±2.59
6	89	31	33.75 ^a ±1.29	82	45	55.99 ^a ±1.59
8	69	22	32.75 ^b ±2.10	47	20	42.61 ^c ±0.43

表 3 精子密度对小鼠卵母细胞体外受精的影响

Table 3 Effect of sperm density on mouse oocyte fertilization in vitro

精子密度/(bar/mL) The sperm density	带颗粒细胞卵母细胞 COCs			不带颗粒细胞卵母细胞 NO		
	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate
3×10^5	49	16	34.68 ^a ±1.06	52	24	44.64 ^b ±1.66
3×10^6	89	31	33.75 ^a ±1.29	82	45	55.99 ^a ±1.59
3×10^7	42	13	32.62 ^b ±0.61	46	21	42.37 ^c ±0.46

显著低于精子密度为 3×10^6 /mL 和精子密度为 3×10^5 /mL 试验组的受精卵卵裂率。在 NO 体外受精试验中,精子密度为 3×10^6 /mL 试验组的卵裂率最高。精子密度 3×10^6 /mL 试验组的卵裂率显著高于精子密度 3×10^5 /mL 试验组 ($P < 0.05$), 而且极显著高于精子密度 3×10^7 /mL 试验组 ($P < 0.01$)。综上所述,精子密度对于卵母细胞卵裂率有影响,NO 和 COCs 体外受精过程中,均是当精子密度为 3×10^6 /mL 时,受精卵的卵裂效果最好。

2.4 颗粒细胞对小鼠卵母细胞体外受精的影响

由表 4 可以看出,在小鼠卵母细胞体外受精过程中,NO 的卵裂率与 COCs 的卵裂率之间存在显著差异 ($P < 0.05$),NO 的卵裂率要显著高于 COCs 的卵裂率。

表 4 颗粒细胞对小鼠卵母细胞体外受精的影响

Table 4 Effect of granulose cells on mouse oocyte fertilization in vitro

卵母细胞 Oocyte	总数 The total number	卵裂数 The cleavage number	卵裂率/% The cleavage rate
带颗粒细胞卵母细胞 COCs	89	31	33.75 ^a ± 1.29
不带颗粒细胞卵母细胞 NO	82	45	55.99 ^b ± 1.59

3 讨论

在卵母细胞体外受精过程中,将获能后的精子与体外培养成熟的卵母细胞进行精卵孵育时发现,在 COCs 体外受精过程中,精卵孵育 2 h 试验组的卵裂率最高,达到 36.09%;在 NO 体外受精过程中,精卵孵育 6 h 试验组的卵裂率最高,达到 55.99%。而江楠等^[16]研究小鼠卵母细胞体外受精的结果显示精卵共孵育 2 h 时,受精率达到 85.4%,囊胚形成率达到 75.6%。与本研究结果相差 20%,对比之后发现原因可能是由于精子体外获能与受精液不同所造成的。本文所用的精子获能液为 TYH 获能液,体外受精液为 HTF,而江楠等^[16]在卵母细胞培养,精子获能,体外受精以及胚胎早期培养时所用培养液均为 HTF,并且在培养液中添加了牛血清清蛋白,计量为 4 g/L。在 HTF 体外受精液含有高钙配方,这可能是造成出现上述结果的原因。

在研究颗粒细胞对小鼠卵母细胞体外受精的影响过程中,将培养成熟后的卵母细胞分为 COCs 以及 NO 两个试验组,试验结果显示 NO 卵裂率达到 55.99%,COCs 卵裂率仅为 33.75%,两者之间存在显著差异,NO 卵裂率要显著高于 COCs 卵裂率。

这个试验结果与刘淑娟等^[17]在昆白系小鼠体外受精一文中指出的结果不同,颗粒细胞对于小鼠的体外受精有一定的促进作用,并且指出,颗粒细胞可增加精子对透明带的敏感性,具有防止透明带变硬和延长卵母细胞寿命的作用。而有研究进一步指出,去除卵丘细胞的卵母细胞的受精率要低于没有去除卵丘细胞的卵母细胞受精率,并指出原因可能是由于经过透明质酸酶处理的卵母细胞的透明带结构发生了改变,导致受精率下降。试验结果存在差异的原因是多方面的,精子获能液,体外受精液,胚胎培养液的不同,均有可能出现与其他科研人员结果不一致的情况。其中,在胚胎培养阶段,很多研究者采用卵裂培养液 G1,囊胚培养液 G2,可以得到较高的卵裂率。段彪等^[18]在精子获能时间及精卵共孵育时间对小鼠体外受精和胚胎发育的影响一文中采用 G-IVF 作为受精液,以 G1/G2 作为胚胎发育液,在获能时间 60 min,受精时间为 6 h 的情况下受精率达到 86.4%,卵裂率达到 85.4%。这个结果比本文用 HTF 作为受精液,KSOM 作为胚胎培养液的卵裂率高出近 30%。出现这种情况的原因是由于 G1/G2 系统中存在不同成分的组合,这些成分之间有互补效应。G1/G2 系统含有氨基酸,而 KSOM 培养液中没有。其中,G1 培养液中含有一些非必需氨基酸以及谷氨酰胺,这些对于小鼠早期胚胎的卵裂率有一定的提高作用,而在 G2 培养液中,则包括有 G1 培养液中所含有的成分和一些必需氨基酸,对于不含有谷氨酰胺的必需氨基酸则有助于提高 8 细胞以后的胚胎发育^[19]。

参考文献:

- [1] LIU H J, LIU R M. Dynamic changes in chromatin and microtubules at the first cell cycle in SCNT or IVF goat embryos [J]. Cell Biol Int, 2018, 42(10): 1 401-1 409.
- [2] TETSUKA M, TANAKADATE M. Activation of HSD11B1 in the bovine cumulus oocyte complex during IVM and IVF [J]. Endocr Connect, 2019, 8(7): 1 029-1 039.
- [3] RUBESSA M, BOCCIA L, DI F S. In Vitro Embryo Production in Buffalo Species (Bubalus bubalis) [J]. Methods Mol Biol, 2019, 2006: 179-190.
- [4] TAKEUCHI M, SEKI M, FURUKAWA E, et al. Improvement of implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth factor and 4-hydroxyestradiol [J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(8): 557-570.
- [5] TRUONQ T, GARDNER D K. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse

- [J]. Hum Reprod, 2017, 32(12): 2 404-2 413.
- [6] MASAO JINNO, BRUCE A, SANDOW, et al. Enhancement of the developmental potential of mouse oocytes matured in vitro by gonadotropins and ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) [J]. Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1989, 6(1): 36-40.
- [7] 乌日琴, 邓新燕, 陈颖青, 等. 小鼠卵母细胞体外成熟、体外受精的效果观察[J]. 中国试验动物学报, 1999, 7(2): 81-85.
- [8] 李凯, 赵雁伟, 郭勇, 等. 雌二醇和孕酮对小鼠卵母细胞体外成熟的影响[J]. 中国试验动物学报, 2008, 16(4): 293-297.
- [9] MACEDO S, LOPES J S, ROCHA A, et al. Effect of Different Media and Protein Source on Equine Gametes: Potential Impact During In Vitro Fertilization [J]. Reprod Domest Anim, 2015, 50(6): 1 039-1 046.
- [10] 郭勇, 夏国良, 雷蕾, 等. 人的重组促黄体素对小鼠卵母细胞体外受精的影响[J]. 中国试验动物学报, 2001, 9(4): 227-229.
- [11] 朱佳伟. GSH 对小鼠卵母细胞体外成熟体外受精的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [12] 安铁洙, 谭建华, 岳占碰, 等. 小鼠体外受精及胚胎发育的影响因素[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 191-193.
- [13] 沈维干, 王丽, 荀爱华, 等. 氟化钠对小鼠卵母细胞成熟和体外受精的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(3): 171-173.
- [14] SMITZ J, ANCKAERT E, VERHEYEN G, et al. An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield [J]. Hum Reprod, 2017, 32(10): 2 056-2 068.
- [15] HOURVITZ A, FADINI R, BRAMBILLASCA F, et al. Differential regulation of cumulus cell transcription during oocyte maturation in vivo and in vitro [J]. Int J Dev Biol, 2017, 61(6/7): 433-437.
- [16] 江楠, 王玉洁, 徐营, 等. 超短时精卵共孵育时间对小鼠体外受精的影响[J]. 解剖学报, 2013, 44(2): 279-283.
- [17] 刘淑娟. 昆白系小鼠体外受精[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [18] 段彪, 杜海燕, 张荣, 等. 精子获能时间及精卵共孵育时间对小鼠体外受精和胚胎发育的影响[J]. 中国临床医师, 2013, 7(7): 3 011-3 014.
- [19] 杨勇. 小鼠胚胎序贯培养与传统培养的对比研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.

Effect of Various Factors on Mouse Oocytes in Vitro Fertilization

ZHANG Jingfeng^{1,2}, HAO Jingjing¹, XU Qiuliang^{1,2}, ZHU Kuanyou^{1,2}, NIU Hui^{1,2}, ZHANG Changxing^{1,2}

(1 College of Animal Science, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan, 450046, China;

2 Henan Engineering Technology Research Center of Livestock and Poultry Genetic Resources Protection, Zhengzhou, Henan, 450046, China)

Abstract: To investigate the effects of different sperm capacitation time, sperm incubation time, sperm density and granulosa cells on in vitro fertilization of mouse oocytes, so as to optimize in vitro fertilization system of oocytes, the fertilized ovum cleavage rate of the experimental group at 40 min, 60 min and 80 min were compared respectively. The results showed that there was no significant difference in the cleavage rate of COCs in the three groups at the capacitation time, and NO had the highest cleavage rate at the capacitation time of 60 min. The cleavage rate of fertilized eggs in the experimental group with incubation time of 2 h, 4 h, 6 h and 8 h, were also studied respectively, which showed that the COCs group with incubation time of 2h had the best effect, while the NO group with incubation time of 6h had the best effect. The cleavage rate of fertilized eggs in the experimental group with sperm density being 3×10^5 /mL, 3×10^6 /mL and 3×10^7 /mL were compared respectively, showing that both COCs and NO had the best cleavage effect in the 3×10^6 /mL group. Comparing the cleavage rate of fertilized eggs with COCs and NO, the results showed that there was a significant difference between COCs and NO, and the cleavage effect of naked eggs was significantly higher than that of granulosa cells ($P < 0.05$). In the process of in vitro fertilization of oocytes, the sperm capacitation time was 60min, the sperm density was 3×10^6 /mL, the sperm and eggs were incubated for 6 h, and the cleavage rate was the highest after 24 h.

Key words: oocyte; sperm capacitation; sperm density; fertilization in vitro