

胞浆内精子注射技术生产小鼠

Normal Mice Derived from Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

严阿勇, 李明, 安晓荣, 侯健, 关宏, 陈永福, 苟克勉*

YAN A-Yong, LI Ming, AN Xiao-Rong, HOU Jian, GUAN Hong, CHEN Yong-Fu and
GOU Ke-Mian*

中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094

State Key Laboratories for Agrobiotechnologies, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

摘要 以 piezo 操作系统为技术支持, 在掌握小鼠卵母细胞胞浆内精子注射技术(ICSI)的基础上, 进行了 ICSI 技术生产试管小鼠的尝试。来自成年昆明(KM)小鼠附睾尾的新鲜精子, 剪切去尾后, 直接将精子头注射到 B6D2F1 小鼠卵母细胞质中, 注射后 1 h, 83.3% 的卵母细胞存活。6 h 时, 84.0% 的成活卵子成功受精, 形成原核, 排出 PB2。体外培养的 ICSI 胚胎, 卵裂率(98% vs 94.7%)和 4-细胞期胚胎比率(89.5% vs 92.1%)均与培养的体内受精卵没有差异($P > 0.05$);但是, 桑椹胚(63.8% vs 84.2%)和囊胚发育率(25.7% vs 68.4%)极显著地($P < 0.01$)低于对照组。120 枚原核期胚胎移植给 7 只假孕受体后, 4 只受孕小鼠共产出 28 只 ICSI 小鼠(23.3%)。健康成年的 25 只 ICSI 小鼠都没有明显的生理和行为异常。随机选择其中的 20 只小鼠, 分别进行 ICSI 小鼠间、ICSI 与 KM 小鼠间共 12 组的交配, 结果所有雌鼠妊娠产仔。在成功建立小鼠 ICSI 技术的基础上, 成功获得了我国的首例 ICSI 小鼠, 并且证明这些 ICSI 小鼠都具有正常的繁殖后代的能力。

关键词 ICSI, 囊胚, 小鼠, 生殖力

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0305-06

Abstract This paper describes the use of piezo-driven micropipette for intracytoplasmic sperm injection of mice eggs. The head of fresh spermatozoa from KM (Kunming) fertile mice was individually injected into mature oocytes of hybrid mice B6D2F1. Approximately eighty three percent of sperm-injected oocytes survived, and 84.0% of them fertilized normally (extrusion of the second polar body and formation of male and female pronuclei). The eggs fertilized by sperm injection could develop *in vitro* to 2-cell (98% vs 94.7%), 4-cell (89.5% vs 92.1%) stages, no significantly ($P > 0.05$) different from embryos fertilized *in vivo* but there were significantly ($P < 0.01$) few morulae (63.8% vs 84.2%) and blastocysts (25.7% vs 68.4%) developed *in vitro* after further culture *in vitro* in the group of ICSI. When 120 embryos at the pronuclear stage were transferred to seven pseudopregnant KM female, 23.3% of the embryos (0~50%, depending on the host) reached the full term. Except for three that were cannibalized soon after birth, all of the young (25 pups) developed into normal and fertile adult. Here we report the first birth of mouse offspring following ICSI in China. These studies may increase understanding of the fertilization process and of how ICSI works.

Key words mouse, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), offspring

Received: September 20, 2004; Accepted: November 11, 2004.

This work was supported by Grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30270647, 30270956), Beijing Municipal Natural Sciences Foundation, China (No. 5012007) and National High Technology Research and Development Program of China (No. 2002AA206311).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62733453; E-mail: goukm@cau.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30270647; 30270956)、北京市自然科学基金(No. 5012007)和国家“863”高技术研究发展计划(No. 2002AA206311)资助项目。

自然受精过程中, 动物精子依靠自身的能力穿过卵母细胞的透明带, 然后与其质膜发生融合, 最终将雄性遗传物质完整地输送到卵母细胞质中, 生成合子, 开始新的生命过程^[1]。ICSI 技术, 就是通过人工辅助的显微操作技术, 直接将精子(头)注射至成熟卵母细胞质的技术体系。自从世界上首例 ICSI 婴儿在 1992 年出生以来^[2], 西方国家的生育门诊开始用这项技术来克服男性不育症, 获得了巨大的成功, 目前, 仅在美国, 每年就有 7000 个以上的 ICSI 婴儿出生 (<http://www.babycenter.com>)。问题是, 基于伦理和技术的原因, 研究人员不能直接探讨这项技术对 ICSI 婴儿发育的长期影响。因此, 建立 ICSI 技术的动物模型, 特别是小鼠的模型非常必要。遗憾的是, 小鼠卵母细胞的质膜缺乏弹性, 直接注射精子时非常容易死亡。1995 年, 夏威夷医学院的科学家借助 Piezo 操作系统, 成功地获得了 ICSI 小鼠^[3]。随后, 科学家利用这种操作系统, 证明了成熟精子经过冻干^[4,5]、去污剂洗涤、切尾等极端条件处理后, 雌性遗传物质没有被破坏, 能够用 ICSI 技术成功地生产小鼠; 而且, 即使是不能自然受精的球形精子和睾丸精子^[6], 甚至次级^[7]和初级^[8]精母细胞, 也可以借助 ICSI 技术生产小鼠, 为人类不孕症等方面的研究提供了理论依据和实践基础。此外, ICSI 技术已经成为研究精子核成熟、受精机理的有效手段; 更为生产转基因动物提供了一种新方法^[9,10]。除人和小鼠外, 国际上已经成功获得了 ICSI 家兔^[11]、家猫^[12]、绵羊^[13]、牛^[14]、猪^[15]、马^[16]、仓鼠^[17]、恒河猴^[18]、大鼠^[19]、山羊^[20]等主要物种。在我国, ICSI 技术的发展, 还处在初级阶段, 仅仅有 ICSI 婴儿出生和绵羊 ICSI 技术建立^[21]的报道, 还没有利用 ICSI 技术生产动物的论文发表。本文在掌握 Piezo 技术的基础上, 成功地获得了我国的首例 ICSI 小鼠, 为我们的后期研究奠定了比较好的技术基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

实验用 DBA/2 (灰色)、C57BL/6 (黑色) 和昆明 (KM, 白色) 小鼠, 购自中国医学科学院实验动物中心, 在 20~22℃ 恒温、洁净级动物房饲养, 光周期为 6:00~20:00。8 周龄后, C57BL/6 雌鼠与 DBA/2 雄鼠合笼, 繁殖的 F1 代简记为 B6D2F1 (黑色), 用于本实验。除说明外, 所有实验试剂均购自 Sigma 公司。

胚胎培养溶液为 CZB^[22,23] + 5.56 mmol/L D-glucose + 2.5 mmol/L taurine + 2% 必需氨基酸 + 1% 非必需氨基酸 + 4 mg/mL BSA; 操作液为 20 mmol/L HEPES-buffered CZB + 5 mmol/L NaHCO₃, 参照文献^[24]所述方法配制。

Piezo PMM-150FU 操作系统: 购自 PrimeTech LTD 公司(日本, 上海明美科技有限公司经销), 是一种细胞钻孔装置, 由压电陶瓷片层构成, 在一定电压下可以迅速膨胀, 产生很小位移的震动, 安装在显微辅助装置后, 这种震动可以使显微针内的水银快速吸入, 产生吸力, 这种吸力能够容易的将透明带和卵母细胞质膜吸破, 而且机械损伤非常小, 不易使卵

母细胞裂解。参数的具体设定需要根据每根显微操作针调整。

1.2 方法

1.2.1 持卵针和注射针的制备: 分别用硅化的玻璃毛细管制备外径 80~120 μm、内径 20~30 μm 的持卵针和外径约 8 μm 的精子注射针, 并且弯至一定角度, 用 20% 氢氟酸溶液和 ddH₂O 洗涤数秒, 马上使用。

1.2.2 卵母细胞的准备: 6~10 周龄的 B6D2F1 雌鼠, 腹腔注射 7 IU 的 PMSG (天津市华孚高新生物技术公司), 48h 后, 腹腔再注射 7 IU 的 hCG (宁波市激素制品有限公司)。注射 hCG 后 14~15 h, 从输卵管收集卵丘-卵母细胞复合体, 移入 37℃ 预热的 HEPES-CZB + 1 mg/mL hyaluronidase, 保持 5 min, 去除卵丘细胞, HEPES-CZB 洗涤 3 次后, 将 PBI 清晰可见的卵母细胞移入 CZB 培养液, 置入 37℃ 恒温的 5% CO₂ 培养箱备用, 至多保存 1.5 h。

1.2.3 精子的准备: 具有生育能力的 3~6 月龄 KM 雄鼠, 用前 3~7 d 正常交配。实验当天处死, 分离附睾尾, 从远端轻轻挤出精子团, 移入 37℃ 预热的、盛有 0.5 mL CZB 的 Eppendorf 离心管底部, 37℃、5% CO₂ 条件下, 精子上浮 10 min, 然后收集上层 200 μL 活力良好的精子, 转入新离心管中, 马上用于 ICSI 实验。

1.2.4 ICSI 程序: 参照文献^[24]所述, 使用直径 100mm 的细胞培养皿上盖 (Falcon), 准备操作盘; 按照 Piezo 操作系统的要求, 将 4 μL 左右的水银从后部装入注射针中, 轻轻将水银推至针尖处, 在 20~25℃ 室温下, 准备进行显微操作。具体操作前, 首先取 10 枚卵母细胞置于 15 μL 含 3% sucrose 的 HEPES-CZB 操作滴中备用; 然后将 2.5 μL 精子溶液与 5 μL HEPES-CZB + 12% PVP-360 操作滴充分混合; 再将单个精子从尾部吸入注射针, 用 Piezo 脉冲剪切精子, 从颈部断开头和尾 (冻融精子直接吸取自然分离的精子头); 连续剪切 5 个精子后, 将吸入全部精子头的注射针转移到放置卵母细胞的操作滴中, 将精子头逐个注射到卵母细胞质中。注射时, 从时钟 9 点的方向吸住卵母细胞, 使纺锤体保持在 6 点或 12 点的位置, 从 3 点的方向轻轻进针, 同时用 Piezo 脉冲击穿透明带, 将透明带碎片吹出注射针的同时, 将第一个精子头吹至针尖处, 继续进针, 直至针尖插入卵母细胞深处, 几乎贴近对侧质膜时, 用 Piezo 弱脉冲冲击卵母细胞质膜, 将精子头吐出, 回吸注入卵内多余的操作液, 轻轻退针, 完成一次注射。依次操作, 尽快实现该批卵母细胞的注射, 室温放置 5 min, 最后用大量 CZB 溶液洗涤 ICSI 胚胎, 并且移入 CO₂ 箱培养。继续进行第二批卵母细胞的精子头注射, 在注射 hCG 后 17 h, 完成全部卵母细胞的精子注射。

1.2.5 胚胎培养: 胚胎培养使用 4-well 培养盘 (Nunc), 培养体系为 600 μL, 覆盖 300 μL 石蜡油。ICSI 后 1 h, 将成活的 ICSI 胚胎移入另一培养孔, 继续培养 5~6 h, 检查原核形成和 PB2 的排出情况, 受精的标准是形成 1 或 2 个原核和排出 PB2。受精的 ICSI 胚胎继续培养, 每天观察, 分别在 24、48、72 和 96 h 时, 统计 2-c、4-c、桑椹胚和囊胚数。

准备自然受精的体内胚胎时, 6~10 周龄的 B6D2F1 雌鼠注射 hCG 后, 与 3~6 月龄的 KM 雄鼠合笼, 20 h 时, 从阴栓鼠的输卵管收集受精卵, 洗涤后进行培养, 统计不同时期的发育情况。

1.2.6 胚胎移植: 进行 ICSI 实验的前一天晚上, 取自然发情的 KM 雌鼠, 与结扎的 KM 雄鼠合笼。ICSI 当天选择有阴栓的假孕雌鼠作为受体, ICSI 后 6 h, 将约 15~20 枚受精卵移植至受体的单侧输卵管, 分别在 10~11 d 和 19~20 d 时, 检查受体的妊娠和 ICSI 小鼠出生情况。

1.2.7 生殖力检测实验: 一共有 20 只成年 ICSI 小鼠和 6 只 KM 小鼠参加多种组合的随机交配试验。本实验获得的 ICSI 小鼠, 其实是 D6B2F1 ♀ × KM ♂ 的 F2 后代, 被毛有黑色和灰色两种。关于它们的生殖力检测, 分为两种情况, 一种情况是 ICSI 小鼠间的交配和生育能力分析, 即 ICSI ♀ × ICSI ♂ 的 6 组配对实验设计, 为了防止近交, 随机分组时, 避免同一亲本后代间的交配。另外一种情况是 ICSI 小鼠与正常 KM

小鼠交配后的生育结果, 具体有 ICSI ♀ × KM ♂ 和 KM ♀ × ICSI ♂ 两个杂交组合, 每个组合各有 3 组, 观察妊娠情况, 统计出生数, 成活后代的性别比例。

1.2.8 统计分析: 实验数据的百分数显著性分析用 *t*-检验。

2 结果

2.1 受精和 ICSI 胚胎的体外发育

利用 Piezo 操作系统, 合计注射的 150 枚卵母细胞中, 1 h 后有 125 枚仍然成活, 活率为 83.3%; 其中 105 (84.0%) 枚激活, 排出 PB2, 出现原核, 实现受精过程 (图 1a)。24 h 和 48 h 后, 分别有 98% (103/105) 和 89.5% (94/105) 的 ICSI 胚胎发生卵裂 (图 1b) 并发育至 4-细胞阶段, 与正常胚胎的发育率没有差异。培养至 72 h 和 96 h 时, 桑椹胚和囊胚 (图 1c) 发育率分别为 63.8% (67/105) 和 25.7% (27/105), 显著低于正常受精卵 84.2% 和 68.4% 的桑椹胚和囊胚率 (表 1)。

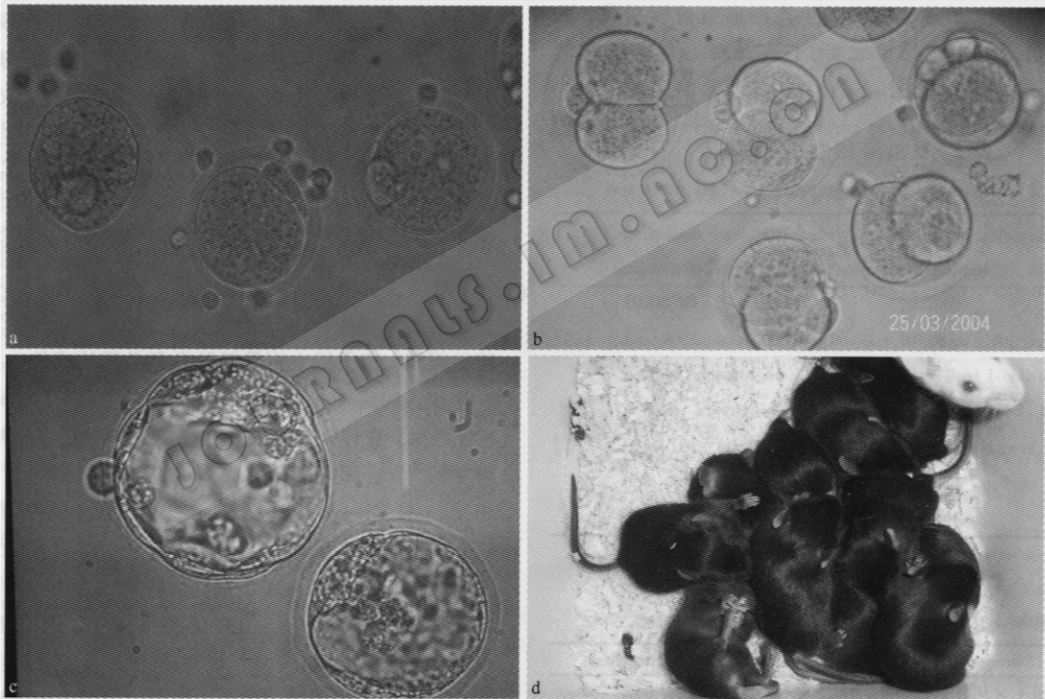


图 1 ICSI 技术生产的胚胎 (a-c) 和小鼠 (d)

Fig.1 Embryos (a-c) and mice (d) produced by ICSI

Fertilized embryos formed pronucleus and excluded the 2nd polar body 6 h post-ICSI (a, × 200) and developed to 2-cell (b, × 200) and blastocyst (c, × 400) stages after 24 and 96 h culture *in vitro*. Pups (B6D2F1 ♀ × KM ♂, black) produced by ICSI with the foster mother (KM, white).

表 1 ICSI 胚胎的体外发育

Table 1 *In vitro* development of embryos produced by ICSI

	No. of oocytes		Embryos at different stages/%				
	Injected	Survived	Pronucleus	2-c	4-c	Morula	Blastocyst
ICSI	150	125	105 (84.0)	103 (98.0)	94 (89.5)	67 (63.8**)	27 (25.7**)
Fertilized <i>in vivo</i>			76	72 (94.7)	70 (92.1)	64 (84.2)	52 (68.4)

** : Values in the same columns differ significantly (*P* < 0.01).

2.2 移植胚胎的体内发育

显微注射后受精的 120 枚原核期胚胎, 移植给 7 只同期化假孕受体后, 4 只妊娠, 共产出 28 只仔鼠 (图 1d), 平均每 4.3 枚胚胎可以生产 1 只 ICSI 小鼠, 总效率为 23.3% (表 2)。如果单纯统计妊娠受体的产仔情况, 总效率高达 42.4%。发育至成年的 25 只小鼠, 没有明显的异常行为和生理病症, 雌雄分别为 10 和 15 只。被毛颜色分别为黑色和灰色。

2.3 ICSI 小鼠的生殖力

在防止近交的前提下, 随机选择 20 只成年 ICSI 小鼠, 进行杂交实验, 检测它们的繁殖能力, 实验结果见表 3。第一种情况是 ICSI 小鼠内部的生育能力检测, 雌雄各 6 只 ICSI 小鼠, 1:1 随机合笼交配后, 全部雌鼠妊娠并产仔, 平均窝产仔 10.7 (64/6) 只。另外 6 组各 3 只 ICSI 雌性和雄性小鼠分别与 KM 小鼠的交配实验也证明, 3 只 ICSI 雄鼠和 3 只 ICSI 雌鼠均具有正常的生育和受孕能力, 平均窝产仔分别为 11 和 7.3 只, 两种交配实验生产的所有成活后代, 性别比例为 1:1.06。上述结果表明, 这些 ICSI 小鼠都具有繁衍后代的正常生殖能力。

表 2 ICSI 胚胎的妊娠结果

Table 2 Summary of pregnancies of ICSI embryos

Recipients	No. of embryos transferred	Gestation	No. of live offspring/%
A	18	Y	9(50.0)
B	18	N	
C	20	N	
D	18	Y	8(44.4)
E	15	Y	5(33.3)
F	15	Y	6(40.0)
G	16	N	
Total	120	4	28(23.3)

表 3 成年 ICSI 小鼠的生殖力

Table 3 Reproductive potency of ICSI mice

Groups	Fossa	Litter size
ICSI ♀ × ICSI ♂ (average litter size: 10.7)	A	12
	B	11
	C	10
	D	10
	E	11
	F	10
ICSI ♀ × KM ♂ (average litter size: 11.0)	G	11
	H	10
	I	12
KM ♀ × ICSI ♂ (average litter size: 7.3)	J	8
	K	6
	L	9

3 讨论

ICSI 技术的建立, 不仅具有重要的临床意义, 而且成为

生殖生物学研究领域的一项重要技术。利用 ICSI 技术, 可以精确地控制受精时相, 也可以实现异种受精过程, 非常利于研究精子功能和受精时的生理生化变化。因此, 建立模型动物小鼠的 ICSI 技术非常必要。遗憾的是, 小鼠卵母细胞的质膜缺乏弹性, 对显微操作针非常敏感, 即使是造成直径约 1 μm 的膜孔创伤, 也很容易引起卵母细胞的裂解, 直接注射精子时, 膜孔创伤往往达到 10 μm , 而且小鼠的精子尾极长, 注射整个精子的同时, 大量的溶液也被注射到细胞质中, 更易使卵母细胞裂解, ICSI 的成功率几乎为零。我们在预实验中也证明了这一点。夏威夷医学院的科学家发明的 Piezo 操作系统, 克服了这个难点, 可以成功地生产 ICSI 小鼠^[3]; 特别是改进后的直接注射剪切尾后的精子头的方法, 是一种高效的生产体系^[25]。本文利用 Piezo 系统, 成功地获得了我国的首例 ICSI 小鼠, 平均移植 4.3 枚原核胚胎, 能够生产 1 只 ICSI 小鼠, 效率为 23.3%, 与国外的研究结果^[25]相近。注射精子头的 ICSI 技术证明, 精子的直线前进能力、顶体反应与穿透透明带、精卵质膜结合和融合等, 都是自然受精状态下, 保证精子进入卵母细胞的生理过程, 是雄性遗传物质传递的辅助方式, 在人工辅助生殖技术条件下, 不是必需的^[1, 26]。许多物种中, 与雄性受精力密切相关的微管组织中心 (microtubule-organizing centres), 往往源于精子尾部的中心粒^[27-30]。但是, 小鼠^[28]、大鼠^[19]、仓鼠^[17, 28]等啮齿动物的微管组织中心却源于卵母细胞, 因此, 单纯注射精子头的方法可行, 尽管效率明显不同。精子头注射法成功生产 ICSI 小鼠^[30]、仓鼠^[17]和山羊^[20]等的实验暗示我们, 精子尾也不是胚胎发育必需的成份。

他人的实验发现, 注射同种精子生产的 B6D2F1 品系 ICSI 胚胎, 在体外发育过程中, 囊胚率与正常受精卵的发育率相同^[3, 25], 说明这种品系小鼠的 ICSI 胚胎适合体外培养。相反, C57 等一些品系小鼠, 它们的 ICSI 胚胎在体外培养时, 不能很好地发育^[24, 31]。本实验中, 注射至 B6D2F1 卵母细胞中的精子来自 KM 小鼠, 这些 ICSI 受精卵的体外囊胚发育率显著低于对照, 但在受孕小鼠中, 原核卵发育至个体的效率却高达 42.4%。说明 B6D2F1 ♀ × KM ♂ 胚胎也适宜在 CZB 溶液中培养。但是, 培养效率低下的原因, 可能是多方面的, 其中一点, 可能有操作溶液中蔗糖的负面效应。添加蔗糖的目的, 是为了防止注射过程中卵母细胞的裂解。我们在初期实验时, 没有注意到蔗糖的问题, 缺乏充分的洗涤过程, 结果体外发育的囊胚率非常低, 只有 9%; 这种情况下培养的 82 枚 2-细胞期 ICSI 胚胎, 移植给 5 只受体后, 只有 1 只受孕, 只出生了 3 只后代, 全程发育的效率远远低于原核期胚胎。后来, 经过充分洗涤的胚胎, 囊胚率提高至 25.7%, 目前, 相关的改进还在研究中。

本文中提供精子的 KM 雄鼠, 在 ICSI 实验前, 已经验证了它们有正常生育后代的能力, 因此, 我们获得的 ICSI 小鼠, 也有继续繁衍后代的能力。但是, ICSI 的技术风险和生物学风险客观存在, 特别是灵长类的 ICSI 技术。在国外进行的恒河猴 ICSI 实验中, 精子和卵母细胞两方面的异常现

象,如显微注射对卵母细胞染色体的机械刺激^[32]、精子核的异常^[18,33],甚至外源DNA的可能污染^[34],都曾引起整个社会对人类ICSI技术的严重关注。另外,还涉及到使用活力不强的精子、或者不成熟的生殖细胞^[35]、生理缺陷遗传的可能性等。相反,在其它动物方面,ICSI技术可以用于死精子^[5]、转基因精子^[19,36,37]、畸形精子^[38]、不育精子^[39]、基因剔除精子^[40]、初级生殖细胞^[7]等特殊后代以及转基因动物^[9,10,34]的生产。所有这些成功实例,为哺乳动物的受精机理、人类不孕症等方面的研究提供了理论依据和实践基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 2002, **296**: 2183 - 2185
- [2] Palermo G, Joris H, Devroey PA *et al.* Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 1992, **340**: 17 - 18
- [3] Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction*, 1995, **52**: 709 - 720
- [4] Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DC *et al.* Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 2001, **98**: 13501 - 13506
- [5] Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 639 - 641
- [6] Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 1995, **121**: 2397 - 2405
- [7] Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biology of Reproduction*, 1995, **53**: 855 - 862
- [8] Kimura Y, Tateno H, Handel MA *et al.* Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 1998, **59**: 871 - 877
- [9] Perry AC, Rothman A, las Heras JI *et al.* Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**: 1071 - 1073
- [10] Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H *et al.* Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 1999, **284**: 1180 - 1183
- [11] Deng M, Yang XJ. Full term development of rabbit oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Molecular Reproduction & Development*, 2001, **59**: 38 - 43
- [12] Pope CE, Johnson CA, McRae MA *et al.* Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Sciences*, 1998, **53**: 221 - 236
- [13] Gomez MC, Catt JW, Evans G *et al.* Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 1998, **49**: 1143 - 1154
- [14] Goto K, Kinoshita A, Takuma Y *et al.* Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Veterinary Research*, 1990, **127**: 517 - 520
- [15] Martin MJ. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, 2000, **63**: 109 - 112
- [16] Li X, Morris LH, Allen WR. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*, 2001, **121**: 925 - 932
- [17] Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T. Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biology of Reproduction*, 2002, **67**: 534 - 539
- [18] Hewitson L, Dominko T, Takahashi D *et al.* Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature medicine*, 1999, **5**: 431 - 433
- [19] Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A *et al.* Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Research*, 2002, **11**: 221 - 228
- [20] Wang B, Baldassarre H, Pierson J *et al.* The *in vitro* and *in vivo* development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. *Zygote*, 2003, **11**: 219 - 227
- [21] Gou KM (苟克勉), An XR (安晓荣), Tian JH (田见晖) *et al.* Sheep transgenic embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica (实验生物学报)*, 2002, **35** (2): 103 - 108
- [22] Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD *et al.* An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 1989, **86**: 679 - 688
- [23] Chatot CL, Lewis JL, Torres I *et al.* Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biology of Reproduction*, 1990, **42**: 432 - 440
- [24] Szczygiel MA, Yanagimachi R. Assisted Reproduction: Protocol 5. Intracytoplasmic Sperm Injection. In: Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (eds.). *Manipulating the Mouse Embryo: a laboratory manual*, 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: pp.565 - 597
- [25] Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K *et al.* Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biology of Reproduction*, 1996, **55**: 789 - 795
- [26] Ramalho-Santos J, Moreno RD, Sutevsky P *et al.* SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Developmental Biology*, 2000, **223**: 54 - 69
- [27] Navara CS, First NL, Schatten G. Phenotypic variations among paternal centrosomes expressed within the zygote as disparate microtubule lengths and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 1996, **93**: 5384 - 5388
- [28] Navara CS, Wu GJ, Simerly C *et al.* Mammalian model systems for exploring cytoskeletal dynamics during fertilization. *Current Topic of Developmental Biology*, 1995, **31**: 321 - 342

- [29] Hewitson L, Simerly C, Schatten G. Cytoskeletal aspects of assisted fertilization. *Seminars on Reproductive Medicine*, 2000, **18**: 151 - 159
- [30] Luetjens CM, Payne C, Schatten G. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *The Lancet*, 1999, **353**: 1240
- [31] Akutsu H, Tres LL, Tateno H *et al.* Offspring from normal mouse oocytes injected with sperm heads from the *azh/azh* mouse display more severe sperm tail abnormalities than the original mutant. *Biology of Reproduction*, 2001, **64**: 249 - 256
- [32] Kawase Y, Iwata T, Toyoda Y *et al.* Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice. *Molecular Reproduction & Development*, 2001, **60**: 74 - 78
- [33] Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reproductive Biomedicine Online*, 2002, **5**: 117 - 124
- [34] Chan AW, Luetjens CM, Dominko T *et al.* Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live rhesus monkey births. *Molecular Human Reproduction*, 2000, **6**: 26 - 33
- [35] Hewitson L, Martinovich C, Simerly C *et al.* Rhesus offspring produced by intracytoplasmic injection of testicular sperm and elongated spermatids. *Fertility & Sterility*, 2002, **77**: 794 - 801
- [36] Meng X, Akutsu H, Schoene K *et al.* Transgene insertion induced dominant male sterility and rescue of male fertility using round spermatid injection. *Biology of Reproduction*, 2002, **66**: 726 - 734
- [37] Hirabayashi M, Kato M, Aoto T *et al.* Rescue of infertile transgenic rat lines by intracytoplasmic injection of cryopreserved round spermatids. *Molecular Reproduction & Development*, 2002, **62**: 295 - 299
- [38] Burrue VR, Yanagimachi R, Whitten WK. Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads. *Biology of Reproduction*, 1996, **55**: 709 - 714
- [39] Kuretake S, Maleszewski M, Tokumasu A *et al.* Inadequate function of sterile *tw5/tw32* spermatozoa overcome by intracytoplasmic sperm injection. *Molecular Reproduction & Development*, 1996, **44**: 230 - 233
- [40] Yanagimachi R, Wakayama T, Kishikawa H *et al.* Production of fertile offspring from genetically infertile male mice. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 2004, **101**: 1691 - 1695