

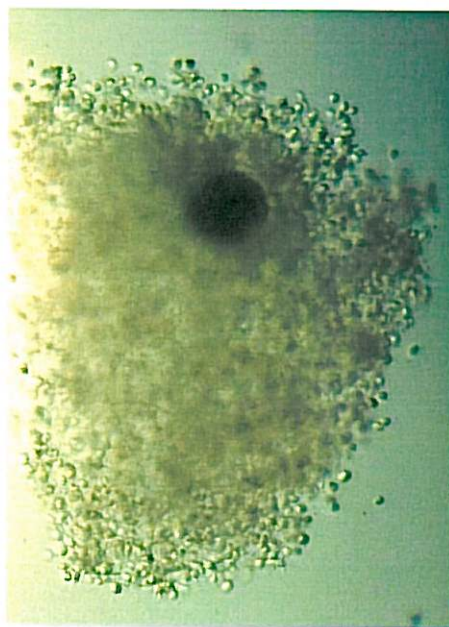


INSTYTUT ZOOTECHNIKI  
Państwowy Instytut Badawczy



Barbara Gajda, Izabela Mandryk  
Katarzyna Poniedziałek-Kempny  
Iwona Rajska

## DOJRZEWANIE *IN VITRO* OOCYTÓW ŚWINI



b - 3/2014

Instytut - praktyce





**INSTYTUT ZOOTECHNIKI**

PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF ANIMAL PRODUCTION

---

**Barbara Gajda  
Izabela Mandryk  
Katarzyna Poniedziałek-Kempny  
Iwona Rajska**

# **Dojrzewanie *in vitro* oocytów świni**

**Kraków 2014**

**Broszura upowszechnieniowa**  
**Nr b-3/2014**

DYREKTOR INSTYTUTU ZOOTECHNIKI PIB  
prof. dr hab. Eugeniusz Herbut

Opracowano:

*w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB*

Kierownik: prof. dr hab. Zdzisław Smorąg

Recenzent: prof. dr hab. *Zdzisław Smorąg*

Opracowanie redakcyjne:  
*mgr Magdalena Bielska*

Projekt okładki  
*mgr Bogusława Krawiec*

Skład komputerowy, druk i oprawa:  
*Maria Makarewicz*

ISBN 978-83-7607-260-2

Niniejsza instrukcja przedstawia stosowane w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego metody hodowli *in vitro* oocytów świni. Metody te są stosowane i optymalizowane w ramach prac badawczych związanych z realizacją tematów statutowych, projektów autorskich oraz Funduszu Badań Własnych IZ PIB, jak również realizowanych prac magisterskich i doktorskich.

*Autorzy*

## Wstęp

Dojrzewanie *in vitro* oocytów jest pierwszym etapem kompleksowej pozaustrojowej produkcji zarodków, na którą w dalszej kolejności składają się zapłodnienie *in vitro* oraz hodowla *in vitro* zarodków.

Dojrzewanie oocyty obejmuje szereg zmian w jądrze i cytoplazmie komórki, które warunkują uzyskanie przez nią dojrzałości i zdolności do zapłodnienia (Kątska-Książkiewicz i in., 2013). Osiągnięcie dojrzałości jądrowej przez oocyt wiąże się z wznowieniem i zakończeniem I podziału mejotycznego oraz rozpoczęciem II podziału i zatrzymaniem go w stadium metafazy II. Jest to uzależnione od jakości morfologicznej i stopnia dojrzałości cytoplazmy oocyty (Kubiak i Szölloši, 1994). Dojrzałość cytoplazmatyczna określa z kolei zdolność oocyty do zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Dojrzałość genomowa jest związana z zakończeniem przez oocyt procesów epigenetycznych (Grad-Mandryk, 2013; Kątska-Książkiewicz i in., 2013). W warunkach *in vitro* wysoki odsetek oocytów nie osiąga jednak dojrzałości (Sun i in., 2001).

Oocyty poddane dojrzewaniu *in vitro* w porównaniu do dojrzałych *in vivo* cechuje znacznie obniżona jakość (Yang i Rajamahendran, 2002), co skutkuje z kolei obniżeniem ich przeżywalności i zdolności do zapłodnienia oraz liczby i jakości uzyskanych zarodków (Abeydeera, 2002). Uważa się, że w czasie dojrzewania *in vivo* oocyt nabywa pełnej dojrzałości cytoplazmy, natomiast w przypadku *in vitro* ten warunek nie zawsze jest spełniony.

W ostatnich latach w znacznym stopniu zoptymalizowano metody hodowli *in vitro* oocytów zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich, uzyskując nawet do 90% oocytów, które osiągają stadium metafazy II podziału mejotycznego (Mandryk, 2013). Wciąż jednak, jak zaznaczono wyżej, problemem pozostaje uzyskanie przez oocyt dojrzałości cytoplazmatycz-

nej. Jest to prawdopodobnie wynikiem suboptymalnych warunków hodowli *in vitro* oocytów.

Pierwsze udane próby dojrzewania *in vitro* oocytów zostały przeprowadzone w 1955 roku przez Changa. Uzyskał on dojrzałe oocyty, zdolne do zapłodnienia i podjęcia dalszego rozwoju z wyizolowanych pęcherzyków jajnikowych królików poddanych hodowli w warunkach pozaustrojowych. U świni po raz pierwszy oocyty dojrzałe *in vitro* uzyskali McGaughey i Polge w 1971 roku. Najlepszymi kompetencjami rozwojowymi charakteryzują się oocyty uzyskiwane z jajników dojrzałych świń, aspirowane z pęcherzyków o średnicy od 3 do 6 milimetrów. Oocyty świni uzyskują zdolność do zapłodnienia po ok. 42 do 44 godzinach hodowli. Ostatnio wykazano możliwość skrócenia czasu ich dojrzewania do około 18 godzin, pod warunkiem, że oocyty są aspirowane z pęcherzyków o średnicy powyżej 8 mm (Kwak i in., 2013).

W przypadku dojrzewania pozaustrojowego bardzo ważna jest selekcja oocytów (Grad i Gajda 2011 a; 2011 b). Do hodowli przeznaczają się oocyty o niezmienionej morfologicznie, jednorodnej cytoplazmie, otoczone wieloma, ściśle przylegającymi do siebie warstwami komórek wzgórka jajonośnego.

W badaniach nad dojrzewaniem *in vitro* oocytów świni stosowano standardowe pożywki do hodowli oocytów ssaków uzupełnione różnymi składnikami takimi jak surowica płodów bydłowych (FCS), świński płyn pęcherzykowy (pFF), gonadotropiny czy czynniki wzrostu (Abeydeera, 2002; Kątska-Książkiewicz i in., 2013). Jednym z suplementów stosowanych do pożywki do hodowli oocytów i zarodków jest kwas hialuronowy (HA). Jest to wysokocząsteczkowy polisacharyd obecny w płynie pęcherzykowym, jajowodowym i macicznym ssaków. Wykazano, że jego koncentracja w pęcherzykach jajnikowych oraz w płynie jajowodowym świni waha się od 0,04 do 1,83 mg/ml (Kano i in., 1998). Przeprowadzone przez nas wstępne badania potwierdziły korzystny wpływ

dodatku kwasu hialuronowego do pożywki do dojrzewania oocytów na ich rozwój oraz morfologię komórek wzgórka jajonośnego (Poniedziałek-Kempny i in., 2014).

Kolejnym istotnym czynnikiem, oprócz składu pożywki do hodowli *in vitro*, który ma wpływ na dojrzewanie oocytów, są warunki mikrośrodowiska, w jakich prowadzona jest hodowla. Optymalną temperaturą dla dojrzewania oocytów świni jest 39°C, przy zawartości CO<sub>2</sub> w powietrzu wynoszącym 5% oraz maksymalnej wilgotności.

Wyniki dojrzewania *in vitro* oocytów są również uwarunkowane gatunkowo, dlatego opracowując metody hodowli należy uwzględnić fizjologię danego gatunku i zapotrzebowanie oocytu na składniki odżywcze.

W niniejszej instrukcji opisano podstawowe metody pozyskiwania oocytów świni oraz metody hodowli oocytów tego gatunku. Przedstawiono również sposoby oceny jakości oocytów uzyskanych po dojrzewaniu *in vitro*.

### **Metody pozyskiwania oocytów świni**

Do hodowli *in vitro* przeznaczają się oocyty uzyskane poubojowo z jajników zwierząt rzeźnych – 3 metodami:

- a) aspiracja pęcherzyków
- b) nacinanie powierzchni jajnika
- c) izolacja pęcherzyków.

Uzyskane poubojowo jajniki przewozi się w termosie w temperaturze 25-28°C w ciągu 2-3 godzin od uboju. Następnie jajniki przepłukuje się 3-krotnie w roztworze soli fizjologicznej (phosphate buffered saline, PBS) o temperaturze 39°C.



Fot. 1. Roztwór PBS do płukania jajników

### **Aspiracja pęcherzyków**

Najczęściej stosowaną metodą pozyskiwania niedojrzałych oocytów u świń jest aspiracja płynu pęcherzykowego wraz z zawartym w pęcherzyku oocytem. Metoda ta pozwala na uzyskanie 30-60% oocytów w stosunku do liczby użytych do aspiracji pęcherzyków. U świń płyn aspiruje się z pęcherzyków o średnicy 3-6 mm, co warunkuje uzyskanie oocytów o najlepszych kompetencjach rozwojowych.



Fot. 2. Jajnik świni przeznaczony do aspiracji pęcherzyków

Aspirację pęcherzyków przeprowadza się w medium manipulacyjnym – TCM 199 wzbogaconym 10% FCS przy



użyciu strzykawek o pojemności 10 ml z dołączoną igłą o średnicy 1,2 mm.

### **Skład medium manipulacyjnego do wyszukiwania i selekcji oocytów świni:**

(na 50 ml H<sub>2</sub>O):

- |                    |            |
|--------------------|------------|
| 1. TCM-199 (M2520) | – 0,7350 g |
| 2. Kanamycyna      | – 0,0034 g |
| 3. FCS             | – 10%      |

Po rozpuszczeniu wszystkich składników medium manipulacyjne należy zobojętnić do pH 7,0-7,2.

### **Nacinanie powierzchni jajnika**

Nacinanie powierzchni jajnika jest metodą stosowaną u bydła, świń oraz owiec i kóz. Jajnik nacina się za pomocą skalpela lub żyłki. Jest to metoda pozwalająca na uzyskanie nawet dwukrotnie większej liczby oocytów w porównaniu do aspiracji. Ze względu na fakt, iż w metodzie tej oocyty uzyskiwane są także z mniejszych pęcherzyków niż 3-6 mm, wymagana jest dokładna ocena oocytów o wymaganej wielkości.



Fot. 3. Pozyskiwanie oocytów metodą nacinania powierzchni jajnika

### **Izolacja pęcherzyków**

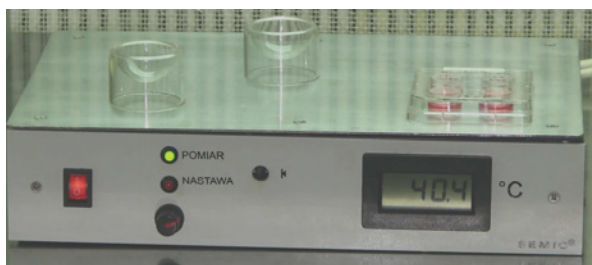
Metoda rozrywania izolowanych pęcherzyków pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego może być stosowana u bydła, świń, a także owiec i kóz. Pozwala na uzyskanie praktycznie wszystkich oocytów zawartych w izolowanych pęcherzykach. Wadą tej metody jest jej wysoka pracochłonność, dlatego z reguły jest stosowana w przypadku uzyskiwania oocytów od zwierząt wartościowych genetycznie lub w przypadku dysponowania małą liczbą jajników.

### **Selekcja niedojrzałych oocytów świni**

Uzyskane oocyty poddaje się selekcji pod względem morfologicznym. Ocenia się wygląd cytoplazmy oraz obecność i stan komórek wzgórka jajonośnego. Niedojrzały oocyt określany jako prawidłowy morfologicznie cechuje się jednolicie granulowaną cytoplazmą oraz otoczony jest spoistą warstwą komórek wzgórka jajonośnego. Oocyty z oznakami atrezji, degeneracji cytoplazmy oraz ze zmianami w komórkach wzgórka jajonośnego, takimi jak zmniejszenie liczby warstw komórek czy też całkowitym ich brakiem są dyskwalifikowane.



Fot. 4. Mikroskop stereoskopowy firmy Nikon do manipulacji i oceny oocytów świni



Fot. 5. Stolik podgrzewczy firmy SEMIC do mikroskopu stereoskopowego

Wyselekcjonowane oocyty klasyfikuje się do 4 grup: 1) „++”; 2) „+”,  
3) „+/-”; 4) „-”.



Fot. 6. Oocyt z grupy „++” o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, otoczony rozległą, ścisłą warstwą komórek wzgórka jajonośnego o jednolicie granulowanej cytoplazmie



Fot. 7. Oocyt z grupy „+” o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, otoczony ścisłą warstwą komórek wzgórka jajonośnego o jednolicie granulowanej cytoplazmie



Fot. 8. Oocyt z grupy „+/-” z niewielkimi oznakami atrezji – nieliczne warstwy komórek wzgórka jajonośnego, nieznaczna degeneracja cytoplazmy



Fot. 9. Oocyt z grupy „-” z oznakami atrezji – nieliczne komórki wzgórka jajonośnego, widoczna degeneracja cytoplazmy

Do hodowli przeznaczają się oocyty tylko z 1 i 2 grupy. Selekcję przeprowadza się w medium manipulacyjnym.

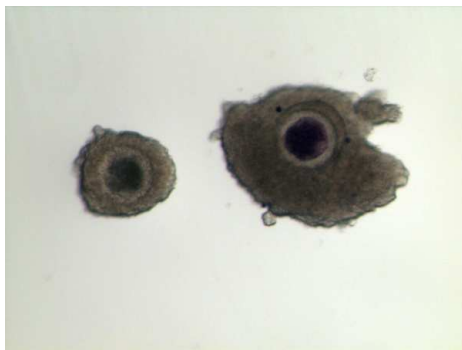


Fot. 10. Naczynko 4-oczkowe do selekcji oocytów

### **Barwienie BCB oocytów świni**

Jedną z przyżyciowych metod selekcji niedojrzałych oocytów jest barwienie brylantowym błękitem krezyli (BCB) będące wskaźnikiem kompetencji rozwojowych oocyty (Opieła i Kątska-Książkiewicz, 2013). Barwienie BCB określa aktywność enzymu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PDH), który jest syntetyzowany w pierwszej połowie fazy S, podczas wzrostu oocyty (Opieła i in., 2008). W oocytach, które ukończyły fazę wzrostu, enzym ten jest inaktywowany i w związku z tym oocyty te wybarwiają się na niebiesko (BCB<sup>+</sup>). Z kolei oocyty, które nadal dojrzewają, pozostają bezbarwne (BCB<sup>-</sup>), gdyż aktywny G6PDH redukuje kolor błękitny w barwniku BCB do związku bezbarwnego. Zwiększona aktywność enzymatyczna G6PDH jest negatywnie skorelowana z kompetencją meiotyczną oocytów, a tym samym z zapłodnieniem i rozwojem zarodkowym.

Uzyskane oocyty umieszcza się w 26μM roztworze BCB w PBS i inkubuje przez 60 minut w 39°C i 5% CO<sub>2</sub>. Następnie przepłukuje się je dwukrotnie w roztworze PBS z dodatkiem 20% FCS i ocenia pod mikroskopem stereoskopowym znajdującym się w komorze laminarnej. Oocyty z wybarwioną cytoplazmą oznacza się jako BCB<sup>+</sup>, a niewybarwione BCB<sup>-</sup>. Po ocenie oocyty umieszcza się w medium do hodowli oocytów.



Fot. 11. Niedojrzałe oocyty świni wybarwione BCB<sup>+</sup>

### **Przygotowanie pożywek do manipulacji i hodowli oocytów świni**

Pożywki przygotowuje się w laboratorium, odważając poszczególne składniki pożywki na wadze analitycznej. Następnie rozpuszcza się je w wodzie 3-krotnie destylowanej, dejonizowanej i filtrowanej lub w gotowej H<sub>2</sub>O do pożywek dostępnej komercyjnie (f. Sigma). Po rozpuszczeniu składników oznacza się pH pożywki za pomocą pasków wskaźnikowych lub aparatu do oznaczania pH w roztworach. Pożywki do pozyskiwania i hodowli *in vitro* oocytów świni powinny posiadać wartość pH 7,0-7,2.

Pożywki przed użyciem filtruje się przy użyciu filtrów miliporowych 0,22 µl Millex-GS (f. Renner).



Fot. 12. Filtr miliporowy 0,22 µl do strzykawek (f. Renner)

Przygotowane pożywki przechowuje się w temperaturze 4°C i wykorzystuje w ciągu 2 tygodni. Przed użyciem pożywki do pozyskiwania i hodowli ogrzewa się do temperatury 39°C i stabilizuje w inkubatorze CO<sub>2</sub>.

### Dojrzewanie oocytów świni

Oocyty morfologicznie prawidłowe hoduje się przez 42-44 godzin do stadium metafazy II. Dojrzewanie oocytów przebiega w dwóch etapach:

- przed-dojrzewanie: oocyty inkubuje się w medium I przez 20-22 godziny
- dojrzewanie właściwe: oocyty przenosi się na 20-22 godziny do medium II.

#### **Skład medium I do hodowli oocytów świni (na 30 ml H<sub>2</sub>O):**

1. TCM-199 (M5017) – 0,28500 g
2. Kanamycyna – 0,00200 g
3. NaHCO<sub>3</sub> – 0,06000 g
4. L-cysteina – 0,00120 g
5. Płyn pęcherzykowy – 10%
6. FCS – 10%



7. dAMP	– 0,00098 g
8. eCG	– 10 IU
9. hCG	– 10 IU

**Skład medium II do hodowli oocytów świni (na 30 ml H<sub>2</sub>O):**

1. TCM-199 (M5017)	– 0,28500 g
2. Kanamycyna	– 0,00200 g
3. NaHCO <sub>3</sub>	– 0,06000 g
4. L-cysteina	– 0,00120 g
5. Płyn pęcherzykowy	– 10%
6. FCS	– 10%

**Przygotowanie płynu pęcherzykowego**

Jednym ze składników pożywki do hodowli oocytów jest płyn pęcherzykowy, który przygotowuje się w laboratorium. Płyn aspiruje się z pęcherzyków jajnikowych, następnie wiruje 15 minut x 500 obrotów, w probówkach Falcon o pojemności 15 ml. Po odwirowaniu klarowny supernatant rozdziela się po 0,5 ml do jałowych probówek Eppendorf i przechowuje w zamrażarce.

**Inne pożywki używane do hodowli *in vitro* oocytów świni**

- North Carolina State University uzupełnione tauryną i hipotauryną (NCSU-23)
- North Carolina State University uzupełnione sorbitolem (NCSU-37)
- TALP (zmodyfikowany płyn Krebsa-Ringera).

**Warunki hodowli oocytów świni**

Oocyty hoduje się na szalkach w kroplach 100 µl pożywki, pod olejem mineralnym. W każdej kropli umieszcza się 10-12 oocytów.



Fot. 13. Szalka z kroplami pożywki przeznaczonymi do hodowli oocytów

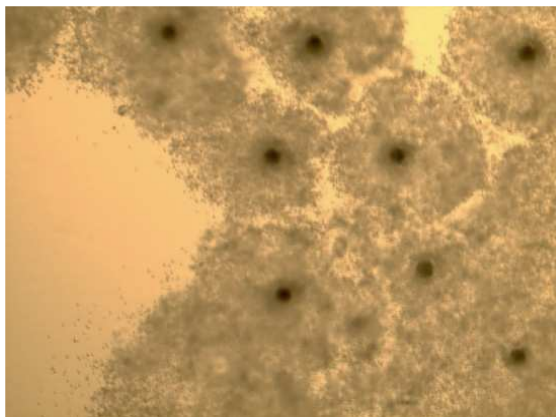
Hodowlę przeprowadza się w inkubatorze z regulowanym przepływem CO<sub>2</sub>, w temperaturze 39°C, atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu i maksymalnej wilgotności.



Fot. 14. Inkubator CO<sub>2</sub> firmy Sanyo

## Ocena dojrzałych *in vitro* oocytów świni

Po 42-44 godzinach hodowli oocyty ocenia się pod względem morfologii cytoplazmy i wyglądu komórek wzgórka jajonośnego. Dowodem dojrzałości oocytu jest rozproszenie warstw komórek wzgórka jajonośnego oraz obecność w przestrzeni okołoołtkowej I ciała kierunkowego, którą można stwierdzić dopiero po usunięciu komórek ziarnistych.

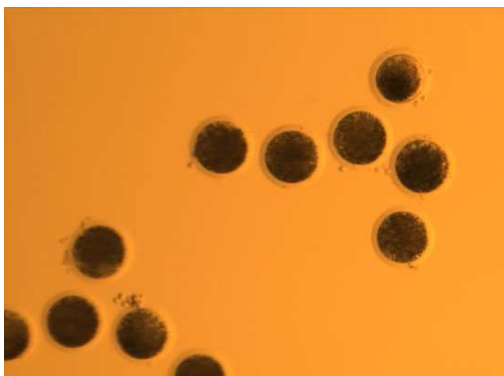


Fot. 15. Grupa oocytów świni dojrzałych *in vitro*

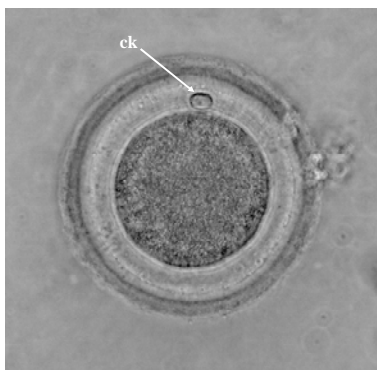


Fot. 16. Oocyt świni dojrzały *in vitro* z widoczną rozproszoną warstwą komórek wzgórka jajonośnego

Komórki wzgórka jajonośnego usuwa się enzymatycznie przez umieszczenie oocytów w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% hialuronidazy na kilka minut. Po tym czasie pozostałe komórki usuwa się mechanicznie.



Fot. 17. Oocyty dojrzałe *in vitro* pozbawione komórek ziarnistych



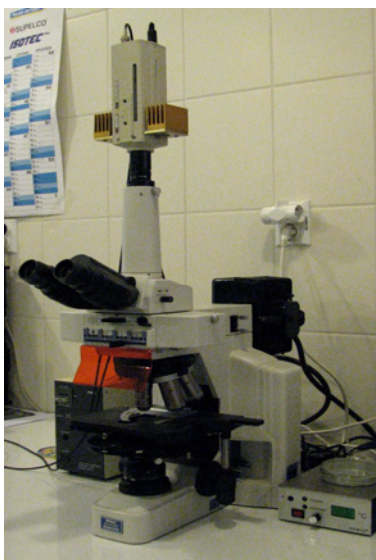
Fot. 18. Oocyt dojrzały *in vitro* z widocznym I ciałkiem kierunkowym

### **Ocena dojrzałości jądra oocytu - barwienie DAPI**

Oocyty utrwała się w 4% paraformaldehydzie przez 60 minut w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnie przepłukuje się w 50  $\mu$ l roztworu PBS-PVP (sól fizjologiczna buforowana fosforanami z dodatkiem poliwinylpirolidonu w ilości 0,1  $\mu$ g/ml PBS). Następnie oocyty inkubuje się w rosnącym gradiencie (50-, 70-, 100% w PBS) Vecta Shield z DAPI (Victor Laboratories, Burlingame, CA) (DAPI- 4', 6-tiamino-2-fenylindol) w celu wybarwienia DNA przedjądrza i ciała kierunkowego. Ocenę przeprowadza się pod mikroskopem epifluorescencyjnym za pomocą filtra o długości fali 358-461 nm. Przedjądrze i ciało kierunkowe w oocytach dojrzałych wybarwia się na kolor niebieski (DNA wybarwione DAPI).



Fot. 19. Mikroskop stereoskopowy firmy Nikon do wyszukiwania ciała kierunkowego w oocytach świni



Fot. 20. Mikroskop fluorescencyjny Eclipse E600 firmy Nikon

## Wykaz wyposażenia

### 1. Aparatura

- Komora laminarna
- Mikroskop stereoskopowy np. Nikon SMZ-10A
- Mikroskop stereoskopowy np. Nikon SMZ-1270
- Stolik podgrzewany + płytką grzejną jako urządzenie dodatkowe do mikroskopu stereoskopowego (prod. firmy SEMIC)
- Mikroskop fluorescencyjny (do oceny dojrzałości oocytu po wybarwieniu DAPI) np. Nikon ECLIPSE E600
- Inkubator CO<sub>2</sub> (z automatyczną regulacją dwutlenkiem węgla) np. MCO-17AIC (f. SANYO) lub Galaxy 48R (f. Eppendorf)
- Butla z dwutlenkiem węgla

- Waga laboratoryjna np. MSA125P-100-DA (f. Sartorius)
- Lodówka z zamrażarką
- Autoklaw

## 2. Drobny sprzęt laboratoryjny

Pipety automatyczne o poj.:

- 0,5 – 10  $\mu$ l + jednorazowe sterylne końcówki
- 2 – 20  $\mu$ l + jednorazowe sterylne końcówki
- 20 – 200  $\mu$ l + jednorazowe sterylne końcówki
- 100 – 1000  $\mu$ l + jednorazowe sterylne końcówki
- 500 – 2500  $\mu$ l + jednorazowe sterylne końcówki
- Statyw do pipet automatycznych

Holder - Pipeta do usuwania komórek wzgórka jajonośnego (np. f. Vitrolife)

- Kończówki do Holdera – np. nr kat. 14301, 14302, 14306, 14313 (f. Vitrolife)

## 3. Szkło i plastiki laboratoryjne

Szkło:

- Naczynka wagowe + szpatułki
- Naczynka embriologiczne z wklęsłym dnem – wzór użytkowy nr 112506
- Szkiełka zegarkowe o średnicy 40 mm

Plastiki:

- Probówki wolnostojące Falcon o poj. 50 ml – kat. nr P15-G
- Probówki stożkowe Falcon o poj. 15 ml – kat. nr P15-C
- Probówki Eppendorf Safe-Lock PCR Clean o poj. 0,5 ml – kat. nr 0030 123 301
- Probówki Eppendorf Safe-Lock PCR Clean o poj. 1,5 ml – kat. nr 0030 123 328
- Strzykawki jednorazowe o poj. 5, 10 i 20 ml
- Igły do strzykawek 1,2 x 40 mm
- Filtry miliporowe 0,22  $\mu$ l Millex-GS (prod. firma Renner)
- Szalka Petriego „BD Falcon” 100 x 15 mm

- Szalka Petriego „BD Falcon” 60 x 15 mm
- Szalka Petriego “BD Falcon” 60 x 15 mm IVF Round Dish
- Naczynka plastikowe 4-oczkowe (prod. Nunc)
- Zlewki plastikowe o poj. 500 ml

#### 4. Materiały medyczne

- Kompresy jałowe z gazy 13-nitkowej o wymiarach 7 x 7 cm
- Rękawice jałowe
- Trzonek do skalpela + wymienne ostrza nr 22
- Pęsety anatomiczne
- Nożyczki okulistyczne

#### 5. Płyny i pożywki

- Płyn do płukania jajników: PBS Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline a’ 500 ml – kat. GIBCO nr 14040-091
- Płyn do manipulacji z oocytami: Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline a’ 100 ml – kat. Sigma nr D-4031
- Albumina surowicy bydłowej (BSA), frakcja V a’ 25 g – kat. Sigma nr A-4919
- Surowica płodów bydłowych (FCS) a’ 100 ml – kat. Sigma nr F-7524
- Pożywka TCM-199 – kat. Sigma nr M2520
- Pożywka TCM-199 – kat. Sigma nr M5017
- Płyn pęcherzykowy – przygotowany w laboratorium

#### 6. Odczynniki

- H<sub>2</sub>O op. 100 ml – kat. Sigma nr W3500
- Kanamycyna op. 5 g – kat. Sigma nr K1377
- Sodium Bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) op. 500 g – kat. Sigma nr S5761
- L-cysteina op. 25 g – kat. Sigma nr C7352
- Hialuronidaza op. 500 mg – kat. Sigma nr H3506



- N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dAMP) op. 25 g – kat. Sigma nr D0260
- Brilliant Cresyl Blue (BCB) op. 10 g – kat. Sigma nr B5388
- Gonadotropin from pregnant mare serum (eCG) op. 50 IU – kat. Sigma nr G4527
- Chorionic gonadotropin human (hCG) op. 50 IU – kat. Sigma nr C8554
- Olej mineralny op. 500 ml – kat. Sigma nr M8410
- Kit Vecta Shield z DAPI (f. Victor Laboratories, Burlingame, CA)
- 10 N roztwór NaOH – przygotowany w laboratorium

**Dodatkowe wyposażenie:**

- Paski wskaźnikowe pH 6,2-8,2 – kat. nr 715753288 (prod. firmy Avantor Performance Materials Poland)
- Termos do transportu jajników do laboratorium
- Okulary ochronne używane podczas aspiracji pęcherzyków jajnikowych

**Fotografie wykonali:**

Prof. dr hab. Barbara Gajda

Prof. dr hab. Lucyna Kańska-Książkiewicz

Dr inż. Jolanta Opiela

Dr inż. Izabela Mandryk

Mgr inż. Katarzyna Poniedziałek-Kempny

Mgr inż. Iwona Rajska

## Literatura

- Abeydeera L.R. (2002). *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57: 257–273.
- Chang M.C. (1955). Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit. *Science*, 121: 867–869.
- Grad I., Gajda B. (2011 a). Porcine oocytes: *in vitro* maturation and fertilization. Proc. of symp. “Molecular Biology Tools in Improvement of Quality of Animal Products, Animal Health and Reproduction”, Animbiogen in EU, IGiHZ PAN, Jastrzębiec, 10-11.03.2011, p. 7.
- Grad I., Gajda B. (2011 b). Wstępne wyniki hodowli i zapłodnienia *in vitro* oocytów świni. Mat. VI Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu, Połańczyk 8-10.09.2011, s. 107.
- Grad-Mandryk I. (2013). Uzyskiwanie, dojrzewanie i zapłodnienie *in vitro* oocytów świni. W: Gajda B., Smorąg Z. Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni – aspekty biologiczne i biotechnologiczne. Ośrodek Wydawnictw Naukowych ICB PAN, Poznań, ss. 23–33.
- Kano K., Miyano T., Kato S. (1998). Effects of glycoaminoglycans on the development of *in vitro*-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 58: 1226–1232.
- Kątska L. (1985). Określenie warunków hodowli *in vitro* izolowanych oocytów bydłęcych. *Rocz. Nauk. Zoot. Monogr.*, 23: 83–116.
- Kątska L. (1997). *Biotechnologia Zwierząt*. Wyd. Zwierzychowski L., Jaszczak K., Modliński J.M. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, ss. 431–471
- Kątska-Książkiewicz L., Gajda B., Bochenek M., Gogol P., Wieczorek J., Grad-Mandryk I., Smorąg Z. (2013). Pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków, kriokonserwacja gamet i zarodków oraz regulacja płci świń. W: Smorąg Z., Słomski R., Cierpka L. Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji. Ośrodek Wydawnictw Naukowych ICB PAN, Poznań, ss. 275–282.

Kątska L., Opiela J. (2008). Uzyskiwanie niedojrzałych oocytów zwierząt gospodarskich i ich dojrzewanie *in vivo* i *in vitro* w aspekcie wykorzystania potencjału rozrodczego samicy. Roczn. Nauk. Zoot. Monogr. Rozpr., 38: 7–13.

Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Antosik P., Woźna M., Bukowska D., Brussow K.P., Jaśkowski J.M. (2011). Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin  $\beta 2$  (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. Theriogenology, 75: 152–153.

Kubiak J.Z., Szölloši M.S. (1994). Ultrastruktura i funkcja komórki. Tom 6 – oogeneza. W: Bilińska S., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J., Przełęcka A., Wydawnictwo PWN Warszawa, ss. 217–247.

Kwak S.S., Yoon J.D., Cheng S.A., Jeon Y., Lee E., Hyun S.H. (2013). The new system of shorter porcine oocyte *in vitro* maturation (18 hours) using  $\geq 8$ mm follicles derived from cumulus-oocytes complexes. Theriogenology, 81: 291–301.

Mandryk I. (2013). Optymalizacja warunków hodowli zarodków uzyskanych po zapłodnieniu metodą ICSI świeżych i kriokonserwowanych oocytów świni. Pr. dokt., wyd. IZ PIB Balice.

McGaughey R.W., Polge C. (1971). Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. J. Exp. Zool., 176: 383–395.

Opiela J., Kątska-Książkiewicz L. (2013). The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). Reprod. Biol., 3:177–183.

Opiela J., Kątska-Książkiewicz L., Lipiński D., Słomski R., Bzowska M., Ryńska B. (2008). Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax and developmental competence following IVP in cattle. Theriogenology, 69: 546–555.

Poniedziałek-Kempny K., Gajda B., Smorąg Z. (2014). Effect of hyaluronan on maturation of porcine oocytes. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe Bydgoszcz- Inowrocław 18-20.09.2014.

Smorąg Z., Gajda B., Mandryk-Grad I. (2013). Effect of high concentration of hyaluronan in culture medium on development competence and quality of porcine embryos. 9<sup>th</sup> International Conference on Pig Reproduction, Olsztyn, 9-12.06.2013.

Sun Q.Y., Wu G.M., Lai L., Park K.W., Cabot R., Cheong H.T., Day B.N., Prather R.S., Schatten H. (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocytes maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*, 122: 155–163.

Yang M.Y., Rajamahendran R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 70: 159-169.

## SPIS TREŚCI

Wstęp.....	4
Metody pozyskiwania oocytów świni.....	6
Aspiracja pęcherzyków.....	7
Nacinanie powierzchni jajnika.....	8
Izolacja pęcherzyków.....	9
Selekcja niedojrzałych oocytów świni.....	9
Barwienie BCB.....	13
Przygotowanie pożywek do manipulacji i hodowli oocytów <i>in vitro</i> świni.....	14
Dojrzewanie oocytów świni.....	15
Przygotowanie płynu pęcherzykowego.....	15
Inne pożywki używane do hodowli <i>in vitro</i> oocytów świni...	16
Warunki hodowli oocytów świni.....	16
Ocena dojrzałych <i>in vitro</i> oocytów świni.....	18
Ocena dojrzałości jądra oocyta – barwienie DAPI .....	20
Wykaz wyposażenia.....	21
Literatura.....	25