

鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存*

田永胜 陈松林** 严安生 季相山 于过才

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛 266071)

摘要 本文对鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 胚胎进行了玻璃化冷冻保存研究, 筛选出了浓度较低、玻璃化程度较稳定的5种玻璃化液, 冷冻时形成玻璃化的概率在48.1%~100%, 在35~43℃的水浴中解冻时保持玻璃化的概率在44.4%~63.0%; 玻璃化液VSD2在解冻时保持玻璃化的概率最高。对鲈鱼神经胚、20对肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前胚在玻璃化液VSD2中的适应能力及适合于玻璃化冷冻的胚胎时期进行了比较, 结果显示: 不同时期胚胎对玻璃化液的耐受能力不同, 鲈鱼神经胚耐受能力最低, 心跳胚耐受能力最强, 出膜前期胚次之, 心跳胚和出膜前胚适合于进行玻璃化冷冻。对0.5 mol/L蔗糖的洗脱时间进行了选择, 结果显示, 洗脱10~20 min效果较好。利用玻璃化程度较好的VSD2对鲈鱼不同时期胚胎进行超低温(-196℃)冷冻, 获得了2.1%~27.9%的透明胚。将鲈鱼心跳胚冷冻解冻后获2粒复活胚, 培养至出膜期, 成活42~50 h; 出膜前期胚在冷冻解冻后有1粒胚复活, 并且孵化出鱼苗 [动物学报 49(6): 843~850, 2003]。

关键词 鲈鱼 胚胎 玻璃化 冷冻

Cryopreservation of the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by vitrification*

TIAN Yong-Sheng CHEN Song-Lin** YAN An-Sheng JI Xiang-Shan YU Guo-Cai

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(Yellow Sea Fishery Research Institute, CAFS, Key Lab For Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, Shandong, China)

Abstract To improve cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos, we selected five vitrification solutions that could vitrify consistently. The cryoprotectants concentration in the five vitrification solutions were low to reduce toxicity. The vitrification probability of the five solutions was 48.1% - 100% during freezing and 44.4% - 63.0% during thawing at 35 - 43℃ water bath, respectively. VSD2 was more stable during thawing than the other four vitrification solutions and was used to cryopreserve sea perch embryos in the experiment. The durable time of sea perch neurula stage, 20-pair-muscle stage, tail-bud stage, heart-beating stage and prehatching stage in VSD2 was compared and the most suitable stage to cryopreserve by vitrification was selected. We found that the neurula stage sustained the least time in VSD2 and the heart-beating stage was the most suitable stage to cryopreserve by vitrification. The pre-hatching stage was also feasible to cryopreserve by vitrification. The effect of different elution times in 0.5 mol/L sucrose was compared and elution for 10 - 20min in 0.5 mol/L sucrose was found to be efficient. We used VSD2 as vitrification solution to cryopreserve (-196℃) sea perch embryos of different stages and got 2.1% - 27.9% transparent embryos after thawing. Furthermore, two frozen-thawed embryos at heart-beating survived 42 - 50 h after thawing. Another frozen-thawed embryo at pre-hatching stage hatched [Acta Zoologica Sinica 49(6): 843 - 850, 2003].

Key words Sea perch (*Lateolabrax japonicus*), Embryos, Vitrification, Cryopreservation

低温冷冻保存作为动物细胞保存的一条途径, 日益受到人类的重视, 其中玻璃化冷冻保存是一条

简捷而很有潜力的方法 (陈松林, 2002)。所谓玻璃化 (Vitrification) 是液体转变为非晶态的固化过

2003-03-16 收稿, 2003-05-12 修回

* 国家“十五”863项目 (No: 2001AA621100) 和农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题 [This research was funded by a grant from State 863 High-technology R & D Project of China (No. 2001AA621100)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

第一作者简介 田永胜, 男, 38岁, 高级工程师, 博士研究生。研究方向: 鱼类生态生理及低温生物学。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

程(李太武等, 1998)。利用玻璃化方法率先在小鼠胚胎冷冻保存获得成功(Rall *et al.*, 1985), 推动了该方法在哺乳动物胚胎冷冻保存方面的应用, 在牛(Massip *et al.*, 1986; Douchi *et al.*, 1990)、羊(Szell *et al.*, 1989)、兔(Kasai *et al.*, 1992)、小鼠(Zhu *et al.*, 1993)等胚胎玻璃化冷冻保存取得成功。

Rall *et al.* (1985) 首次提出了一种玻璃化液 VS₁: 20.5% DMSO + 15.5% 乙酰胺 + 10% 1, 2-丙二醇 + 6% 的聚乙二醇(PEG: 分子量为 8 000 的非渗透性聚合物), 实现了小鼠胚胎的玻璃化冷冻保存。部分作者用乙二醇、聚蔗糖和蔗糖配制成 EFS40 (Kasai *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1993) 对小鼠桑椹胚和扩张囊胚进行了冷冻保存。利用 15% 甲醇 + 20% 1, 2-丙二醇对泥鳅的胚孔封闭期和胚体转动期胚胎进行了保存(章龙珍等, 2002)。

对于鱼类胚胎冷冻是否成功, 使用合理的玻璃化液是关键因素, 合理的玻璃化液涉及到溶液的组成成分及浓度, 单一成分抗冷剂的毒性相当高, 不易于进行生物样本的保存。一般情况下都是几种不同的抗冻剂以不同浓度组成玻璃化液, 以达到降低单一成分抗冻剂浓度和毒性, 提高溶液玻璃化的能力。用高浓度的低温保护剂可在较慢的冷却速率以及高压条件下实现完全玻璃化(Fahy, 1981), 以此思想为基础, 以后不同的研究者进行了不同玻璃化液的研究, 为生物细胞、组织、器官的保存创造了条件。

鱼类胚胎由于体积大、结构复杂、水含量高、渗透不易控制, 冷冻速率难以掌握等因素, 到目前为止, 鱼类胚胎的超低温保存还未取得突破性进展(陈松林, 2002)。在淡水鱼类胚胎冷冻中取得的最好成绩是: 在鲤鱼胚胎冷冻中 4 粒成活, 3 粒孵出鱼苗, 但实验结果未能重复(Zhang *et al.*, 1989)。泥鳅胚胎利用分段快速降温冷冻方式, 获得 16 粒成活, 1 粒孵化出膜(张克俭等, 1997)。泥鳅胚胎利用总浓度为 35% 的玻璃化液, 快速降温方式冷冻, 获得 4 粒胚孔封闭期胚发育到 18~19 对肌节期, 胚体转动期胚解冻后 24 h 观察到心脏跳动, 但解冻后胚胎未能继续发育成鱼苗(章龙珍等, 2002)。在海水鱼类胚胎冷冻保存方面未见成功报道。

鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 属鲈形目(Perciformes) 鮨科(Servanidae) 花鲈属(*Lateolabrax*), 是我国沿海名贵鱼类, 我国曾拥有丰富的

资源, 产品主要出口韩国、日本等国。但由于近年来过渡捕捞导致资源量锐减, 因此对物种资源的保护是地球环境保护面临的一大课题。本文对鲈鱼的神经胚、肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前胚进行了玻璃化冷冻保存研究。

1 材料与方法

1.1 鱼类及胚胎

本实验用鲈鱼 80 余尾, 体重在 1~5 kg, 对其进行了产前培育, 对其成熟进度进行了控光、控温调节, 以延长其产卵时间。利用宁波市激素制品有限公司生产的 LHRH-A₃ 0.2~0.5 μg/kg、HCG 100 IU/kg 催熟, 3~5 μg/kg LHRH-A₃ 或 300~500 IU/kg HCG 催产, 人工繁殖采卵, 在 11~17 海水中对受精卵进行培育, 分别获取发育至神经胚期、肌节胚期、尾芽期、心跳期、出膜前期、出膜期胚胎, 进行玻璃化冷冻实验。

1.2 化学药品和试剂

利用常见的冷冻保护剂 1, 2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)、甘油(Gly)、乙二醇(EG)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO) 配制玻璃化液。利用 NaCl、KCl、D-葡萄糖(Glucose)、蔗糖(Sucrose) 配制基础液和洗脱液。

1.3 玻璃化溶液及玻璃化解冻温度的选择

在冷冻保存预备实验中对 PG、MeOH、Gly、DMF、EG、DMSO 六种抗冻剂的毒性进行过研究, 其毒性排列为 PG < MeOH < Gly < DMF < EG < DMSO。本实验以毒性最小的 PG 为主因子, 在 15%、20%、25%、30% (v/v) 4 个浓度梯度水平上进行组合, 利用 D15 (陈松林等, 1992) 配制成 A、B、C、D4 组 80 种不同组成、不同浓度的抗冻剂, 利用麦管在液氮中冷冻 10~30 min, 在 42 水浴中迅速解冻, 同时观察冷冻和解冻时玻璃化程度, 实验重复 3 次, 进行玻璃化液的初选。然后将初步选择出的玻璃化液再次装管冷冻, 并在 35~43 温度范围内进行解冻实验, 每升高 1 进行 3 次解冻实验, 共进行 27 次实验, 观察和统计冷冻和解冻时玻璃化和反玻璃化的次数, 选择在此解冻温度范围内玻璃化概率最高的玻璃化液和形成玻璃化较集中的解冻温度范围。

1.4 鲈鱼胚胎在 VSD2 中的平衡时间及适宜玻璃化处理的胚胎时期筛选

将鲈鱼不同时期的胚胎(包括神经期胚、肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前期胚、出膜期胚)在

4 下利用五步法在玻璃化梯度液中逐步平衡, 即将胚胎依次置于 1/4、1/3、1/2、2/3、1 倍的 VSD2 中平衡, 不经冷冻, 直接利用 0.5 mol/L 的蔗糖液洗脱 10 min, 逐次加入 14~17 的海水培养一定的时间, 统计其成活率, 确定胚胎在 VSD2 中合理的平衡时间及可进行玻璃化处理的适宜的胚胎时期。

1.5 不同洗脱时间的选择

利用 VSD2 五步法平衡处理 20 对肌节胚 30 min, 在室温下 (15.5) 直接利用 0.5 mol/L 的蔗糖 2 ml 分别洗脱 5、10、15、20、25 min, 逐次加入海水 2 ml 3 次, 在海水中培养一定的时间, 统计成活率, 实验重复 3 次。

1.6 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻、解冻和培养

将鲈鱼肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜前胚在 4 利用 VSD2 五步法平衡处理一定时间, 将含有胚胎的玻璃化液吸入麦管, 每管吸入 250 μ l, 麦管封口, 置于 -20 预冷 10 min, 使胚胎在低温下进一步平衡, 然后迅速投入液氮; 冷冻一定时间后, 利用 38 水浴快速解冻, 0.5 mol/L 蔗糖 2 ml 洗脱一次 10 min, 再每隔 1 min 加入过滤海水 2 ml 3 次, 后将培养皿加满海水培养 1 h, 统计完整胚胎和透明上浮胚胎数量; 将透明胚移入加有过滤海水的烧杯, 在室温 15~17 培养。每天换水 1/2, 及时清除死卵。

1.7 数据处理

实验数据利用单因素方差分析中最小显著极差法, 进行多重比较, 比较结果用字母标记法在图中标记, 在同一系列中字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 玻璃化液及解冻温度的筛选结果

利用以上六种抗冻剂经不同浓度组合, 冷冻和解冻筛选出 5 种玻璃化程度较好的玻璃化液, 列于表 1。从表 1 可以看出, 不同种类玻璃化液在冷冻和解冻时形成玻璃化的概率不同, 在冷冻时形成玻璃化的百分率在 48.1%~100%, 但在 35~43 的水浴中解冻时能保持玻璃化的百分率在 44.4%~63.0%。VSD2 在冷冻时玻璃化率为 77.8%, 但在解冻时玻璃化率最高为 63.0%。不同的玻璃化液在某一温度范围内解冻时易形成玻璃化, 例如 VSB16 在 38~40 解冻时玻璃化较集中, VSD2 在 37~43 都有玻璃化形成, 说明它对解冻温度

的适应范围较广。本实验选用 VSD2 作为鲈鱼胚胎冷冻保存的玻璃化液。

表 1 玻璃化液组成及解冻温度 (n=27)

Table 1 Vitrification solutions and thawing temperatures (n=27)				
代号 Code	组成 Component	玻璃化程度 (%) Vitrification degree		解冻温度 () Thawing temperature ()
		冷冻 Cryopreservation	解冻 Thawing	
VSB16	20%PG+30%EG	96.3	55.6	38~40
VSC3	25%PG+25%MeOH	48.1	48.1	35~36
VSD2	30%PG+20%MeOH	77.8	63.0	37~43
VSD10	30%PG+20%DMF	59.3	59.3	39~40
VSD14	30%PG+20%EG	100.0	44.4	35~37

2.2 鲈鱼各期胚胎在 VSD2 平衡时间及适宜胚胎的筛选结果

经多次实验将鲈鱼各期胚胎在 VSD2 平衡时间及成活率显示于图 1。从图中可以看出, 神经胚在 VSD2 中的平衡时间较短, 适应性较低, 在其中平衡 20 min, 培养成活率只有 8.5%, 40 min 全部死亡。

鲈鱼 20 对肌节胚在 VSD2 中五步法平衡 20、30、40、50 min, 培养成活率分别为 83.3%、40.0%、17.9%和 10.63%, 较神经胚在 VSD2 中平衡的时间加长, 可见其适应能力增强, 相同时间内成活率也大大提高。16 对肌节胚在 VSD2 中平衡 20 min 成活率为 38.3%, 较 20 对肌节胚成活率低。在实验中发现鲈鱼胚胎发育至 20 对肌节以后其适应能力明显提高。

鲈鱼尾芽胚胎在 VSD2 中分别五步平衡 20、30、40、50 min, 培养成活率分别为 93.8%、42.1%、47.5%和 10.63%。

鲈鱼心跳胚在 VSD2 五步平衡 20、30、40、50、60、70 min, 培养成活率分别为 95.8%、84.1%、73.3%、61.2%、8.44%和 1.75%, 可见心跳期胚对 VSD2 的适应能力明显较尾芽期胚增强, 处理 50 min 成活率提高 50.57%。整体平衡时间延长 20 min。

鲈鱼出膜前胚在 VSD2 中五步平衡 20、30、40、50、60、70 min, 培养成活率分别 89.5%、77.8%、71.6%、30.2%和 9.5%, 其整体平衡时间与心跳胚相同, 在 70 min 以后全部死亡。

鲈鱼出膜期胚 (有个别胚已破膜) 在 VSD2 中只能存活 5~10 min, 而且成活胚极少。

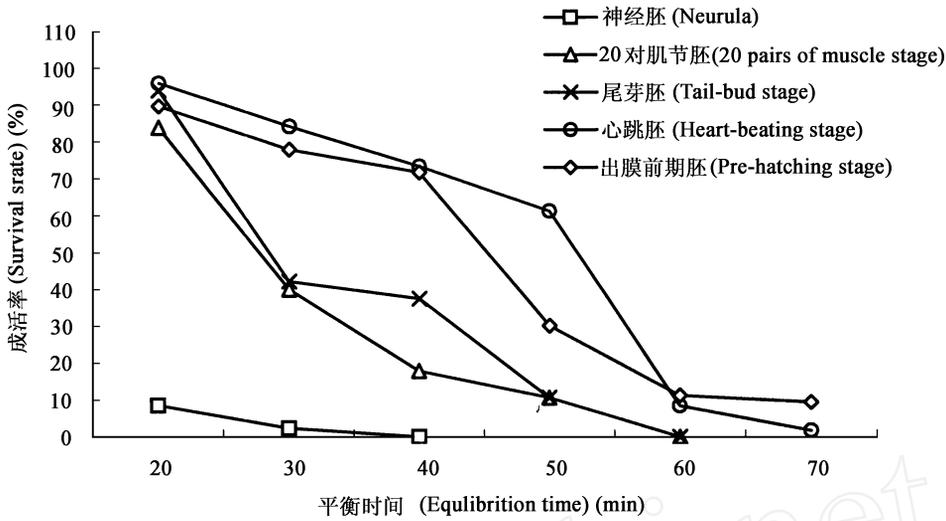


图 1 鲈鱼各期胚在 VSD2 中平均成活率的变化 (n = 3)

Fig. 1 The varying curve of mean survival rates of sea perch embryos in different stages in VSD2

鲈鱼胚胎在 VSD2 中随着平衡时间的延长, 其成活率逐渐降低, 心跳胚和出膜前期胚在 VSD2 中适应时间最长。在鲈鱼胚胎发育过程中, 不同时期胚胎对 VSD2 的适应能力不同, 神经期以前胚对玻璃化液的适应能力最低, 之后适应能力逐渐增强, 至心跳期适应能力最强, 出膜前期胚次之。可见鲈鱼心跳期胚最适合于进行玻璃化液的处理。鲈鱼胚胎较适合的冻前平衡时间见表 2。

表 2 鲈鱼各期胚胎在 VSD2 中较适平衡时间

Table 2 The optimal equilibration time of sea perch embryos in different stages in VSD2

胚胎时期 Stage of embryos	较适平衡时间 (min) Optimal equilibration time	成活率 (%) Survival rate
神经胚 (Neurula)	< 20	< 8.5
20 对肌节胚 (20 pairs of muscle stage)	30 ~ 40	40.0 ~ 17.9
尾芽胚 (Tail-bud stage)	30 ~ 40	42.1 ~ 37.5
心跳胚 (Heart-beating stage)	40 ~ 50	73.3 ~ 61.2
出膜前胚 (Pre-hatching stage)	40 ~ 50	71.6 ~ 30.2

2.3 不同洗脱时间对胚胎成活率的影响

将鲈鱼 20 对肌节胚利用 VSD2 平衡 30 min, 0.5 mol/L 蔗糖洗脱 5、10、15、20、25 min 后, 培养成活率分别为 55.7%、64.9%、70.9%、65.9% 和 29.5%, 可见洗脱 15 min 的成活率最高 (图 2)。方差分析表明: 25 min 洗脱成活率与 5

min、10 min、15 min、20 min 相比, 有显著差异 ($P < 0.05$)。洗脱时间在 5 ~ 20 min 之间的成活率无显著差异 ($P > 0.05$)。

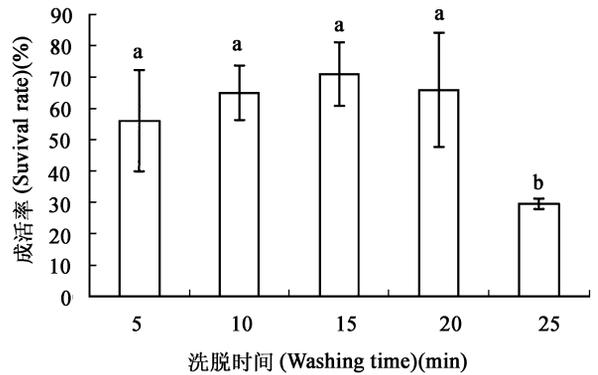


图 2 鲈鱼 20 对肌节胚在不同洗脱时间下的成活率

Fig. 2 Survival rate of sea perch 20 pairs of muscle stage in different elution time

不同字母表示差异显著 (Different letters indicate significant difference, One-Way ANOVA, LSD test, $P < 0.05$)

2.4 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻结果

鲈鱼神经胚在 VSD2 中平衡 30 min, 在 -196 冷冻 60 min 后, 胚胎透明率 6.77% (表 3); 20 对肌节胚在 VSD2 中平衡 20、30、40、50 min, 在 -196 冷冻 22、30、28、34 min 后, 胚胎完整率可达 100%, 胚胎进入海水培养时保持透明上浮率分别为 2.1%、19.5%、13.2%、13.1%; 尾芽期胚在 VSD2 中平衡 30、40、50 min、在 -196 冷冻 47、49、49 h, 完整胚率分别为 100%、97.98%、100%, 胚胎透明率分别为

表 3 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻结果

Table 3 Results of vitrifiable cryopreservation of sea perch embryos

胚胎时期 Stage of embryos	平衡时间(min) Equilibrat on time	冷冻时间(min) Freezing time	总样本数 Total specimens	完整胚率(%) Percentage of intact embryos	透明胚率(%) Percentage of transparent embryos	成活胚数 Numbers of alive embryos	成活率(%) Survival rate	成活时间(h) Alive time
神经胚 (Neurula)	30	60	67		6.77			
20 对肌节 (20 pairs of muscle stage)	20	22	45	100	2.1			
	30	30	40	100	19.5			
	40	28	44	100	13.2			
尾芽期胚 (Tail-bud stage)	50	34	62	100	13.1			
	30	2 820	60	100	5			
	40	2 940	149	97.98	6.04			
心跳胚 (Heart-beating stage)	50	2 940	162	100	13.6			
	30	29	17	91.7	11.8	1	5.88	50
	40	58	47	84.8	8.5	1	2.13	42
出膜前期胚 (Pre-hatching stage)	50	32	41	87.8	27.9			
	40	50	47	82.2				
	50	51	50	88.6				
	60	61	39	100				
	70	50	21	90.5		1	4.76	59

5.0%、6.04%、13.6%；心跳期胚在 VSD2 中平衡 30、40、50 min，在 -196 冷冻 29、58、32 min，胚胎完整率分别为 91.7%、84.8%、87.8%，透明率分别为 11.8%、8.5%、27.9%。在 VSD2 中平衡 30、40 min 各有 1 粒胚成活（分别简称为 H30、H40），成活率分别为 5.88% 和 2.13%。在镜下观察心跳正常，H30 形态正常，H40 腰部有膨大（图版：A、B），与未冻卵相比较卵膜表面较粗糙。H30、H40 发育 30 h 至出膜前期（图版：C、D），心跳正常，胚体转动，但浮力稍有下降，在水中呈半漂浮状态，H40 培育 42 h 后死亡，但身体已出现色素。H30 培育 42 h 后沉入水底，但心跳正常，身体出现大块色素斑，为出膜后体征，培育 50 h 后死亡。

出膜前期胚在 VSD2 中五步平衡 40、50、60、70 min，在 -196 冷冻 50、51、61、50 min，其胚胎完整率分别为 82.2%、88.6%、100% 和 90.5%。在 VSD2 中 70 min 平衡胚成活 1 粒（简称 P70，见图版：E），成活率为 4.76%，培养 49 h 孵化出鱼苗（图版：F）。

3 讨论

3.1 关于玻璃化液及玻璃化形成

本文利用具有较低毒性和较强玻璃化形成能力的 1, 2-丙二醇（华泽钊等，1994）与甲醇、甘油、二甲基甲酰胺、乙二醇、二甲亚砜在不同的浓度梯度下组合，形成的 80 种浓度在 30%~60% 的抗冻剂，经冷冻和解冻，对海水鱼类玻璃化液进行了较系统的选择。为尽可能地避免在解冻过程中的反玻璃化问题，对玻璃化液的解冻温度进行了研究，发现不同玻璃化液解冻时在某一温度范围内易形成玻璃化，其中 VSD2 在 37~43 的水浴中解冻时，玻璃化率最高。使用该液在鲈鱼的胚胎玻璃化冷冻保存中获得心跳胚和出膜前期胚的成活，成活率在 2.13%~5.88%。

3.2 关于鲈鱼胚胎在 VSD2 中平衡时间及最适宜玻璃化胚胎的筛选

关于不同时期鱼类胚胎在冷冻保存中适应能力，拟石首鱼尾芽胚比桑椹胚耐受能力强（Robertson *et al.*, 1988），草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）原肠以前胚胎对低温和 DMSO 非常敏感，在原肠期以后，随着胚胎发育的进行，胚胎对低温和 DMSO 的耐受能力也在逐渐提高（章龙珍等，1992），斑马鱼（*Brachydanio rerio*）早期胚胎对冷冻最敏感，心跳胚对冷冻降温的耐受力最强（Zhang *et al.*, 1995）。

鲈鱼胚胎在 14 ~ 18 温度范围内, 约需 80 h 完成胚胎发育, 从受精卵开始至出膜, 在不同的发育时期, 胚胎对外界环境的适应能力在逐渐变化, 各时期胚胎在 VSD2 中的适应能力也明显不同。这一特点直接影响着胚胎玻璃化冷冻过程和方法的选择, 而且不同的鱼类及同一种鱼类不同繁殖时期的胚胎对同一种玻璃化液的适应能力也不同。从鲈鱼胚胎在 VSD2 中的存活时间和适应能力看, 神经胚对玻璃化液的适应能力较差, 20 对肌节至心跳胚对玻璃化的适应能力较强, 都较适合于进行玻璃化处理, 但心跳胚最好。

3.3 关于不同洗脱时间对成活率的影响

选择合适的洗脱液对玻璃化液进行洗脱, 洗脱时间不同, 对玻璃化液的脱除程度和及时进入海水培养时间的掌握都很重要, 洗脱时间太短, 不利于玻璃化液的脱除, 洗脱时间过长, 也会出现渗透失衡, 影响成活率。关于这一点目前也未见到专门的研究资料。本文对 0.5 mol/L 蔗糖在 5 ~ 25 min 内的洗脱效果进行了研究, 发现洗脱 15 min 成活率最高, 10 ~ 20 min 无显著差异。

3.4 关于鲈鱼胚胎超低温冷冻

本文利用自己筛选配制的 VSD2 对海水鱼类鲈鱼神经胚、20 对肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜期胚在不同时间段里进行了多次实验, 取得了 2.1% ~ 27.9% 透明胚, 在心跳期和出膜前期胚的玻璃化冷冻中, 在 3 次不同的平衡时间和冷冻时间, 其它步骤完全相同的实验中, 取得 3 粒成活胚, 1 粒孵化出膜, 成活时间在 42 ~ 59 h。结果显示, 利用 VSD2 可进行鲈鱼胚胎玻璃化的冷冻保存, 在解冻时的水浴温度在 37 ~ 42 易保持玻璃化, 采用繁殖盛期的心跳胚和出膜前期胚易于冷冻处理。利用本文实验思路和方法进行鲈鱼胚胎玻璃化冷冻保存可重复。

参考文献 (References)

- Chen, S. L. 2002 Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos. *Journal of Fisheries of China* **26** (2): 161 ~ 168. [陈松林 2002 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. 水产学报 **26** (2): 161 ~ 168.]
- Chen, S. L., X. T. Liu, D. C. Lu, L. Z. Zhang, C. J. Fu and J. P. Fang 1992 Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp. *Acta Zool. Sin.* **38** (4): 413 ~ 424. [陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 章龙珍, 傅朝君, 方建平 1992 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液超低温冷冻保存的研究. 动物学报 **38** (4): 413 ~ 424.]
- Douchi, O., H. Takakura and K. Imai 1990 Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *J. Anim. Reprod.* **36** (1): 69 ~ 72.
- Fahy, G. M. 1981 Prospects for vitrification of whole organs. *Cryobiology* **18**: 617.
- Hua, Z. Z. and H. S. Ren 1994 *Cryobiological Medical Technology*. Beijing: Science Press. [华泽钊, 任禾盛 1994 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社.]
- Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida 1990 A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* **89**: 91 ~ 97.
- Kasai, M., Y. Hamaguchi, S. E. Zhu, T. Sakurai and T. Machida 1992 High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* **46**: 1 042 ~ 1 046.
- Li, G. W., C. Y. Zheng and B. Tang 1998 *Cryobiology*. Changsha: Hunan Science and Technology Press. [李广武, 郑从义, 唐兵 1998 低温生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社.]
- Massip, A., P. Van Der Zwalman, B. Scheffen and F. Ecotors 1986 Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryoletters* **7**: 270 ~ 273.
- Rall, W. F. and G. M. Fahy 1985 Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature* **313**: 573 ~ 575.
- Robertson, S. M., A. L. Lawrence, W. H. Nell, C. R. Arnold and G. Mccarty 1988 Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum. *Progressive Fish-Culturist*. **50**: 148 ~ 154.
- Szell, A., J. N. Shelton and K. Szell 1989 Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* **26**: 297 ~ 301.
- Zhang, K. J., Y. D. Lou, Y. J. Zhang and P. Wu 1997 Studies on cryopreservation of three freshwater fishes embryos. *Journal of Fisheries of China* **21** (4): 366 ~ 372. [张克俭, 楼允东, 张饮江, 吴萍 1997 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温和复温速率的研究. 水产学报 **21** (4): 366 ~ 372.]
- Zhang, L. Z., D. C. Lu, L. Liu, F. Guo and J. M. Zhang 2002 Research on cryopreservation of oriental weather fish embryo with vitrification solutions (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Fisheries of China* **26** (3): 213 ~ 217. [章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 郭峰, 张洁明 2002 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究. 水产学报 **26** (3): 213 ~ 217.]
- Zhang, L. Z., D. C. Lu, S. L. Chen and J. P. Fang 1992 Effects of several factors on the survival rate of fish embryos before cryopreservation. *Freshwater Fisheries* **1**: 20 ~ 24. [章龙珍, 鲁大椿, 陈松林, 方建平 1992 鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响研究. 淡水渔业 **1**: 20 ~ 24.]
- Zhang, T. and D. M. Rawson 1995 Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* **32** (3): 239 ~ 246.
- Zhang, X. S., L. Zhao, T. C. Hua and H. Y. Zhu 1989 A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* em-

- bryos. *Cryo Letters* **10**: 271 ~ 278.
- Zhu, S. E., M. Kasai, H. Otoge, T. Sakurai and T. Machida
1993 Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrifi-
- cation in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. Fertil.* **98**:
139 ~ 145.

图版说明 (Explanation of Plate)

图 版 (Plate)

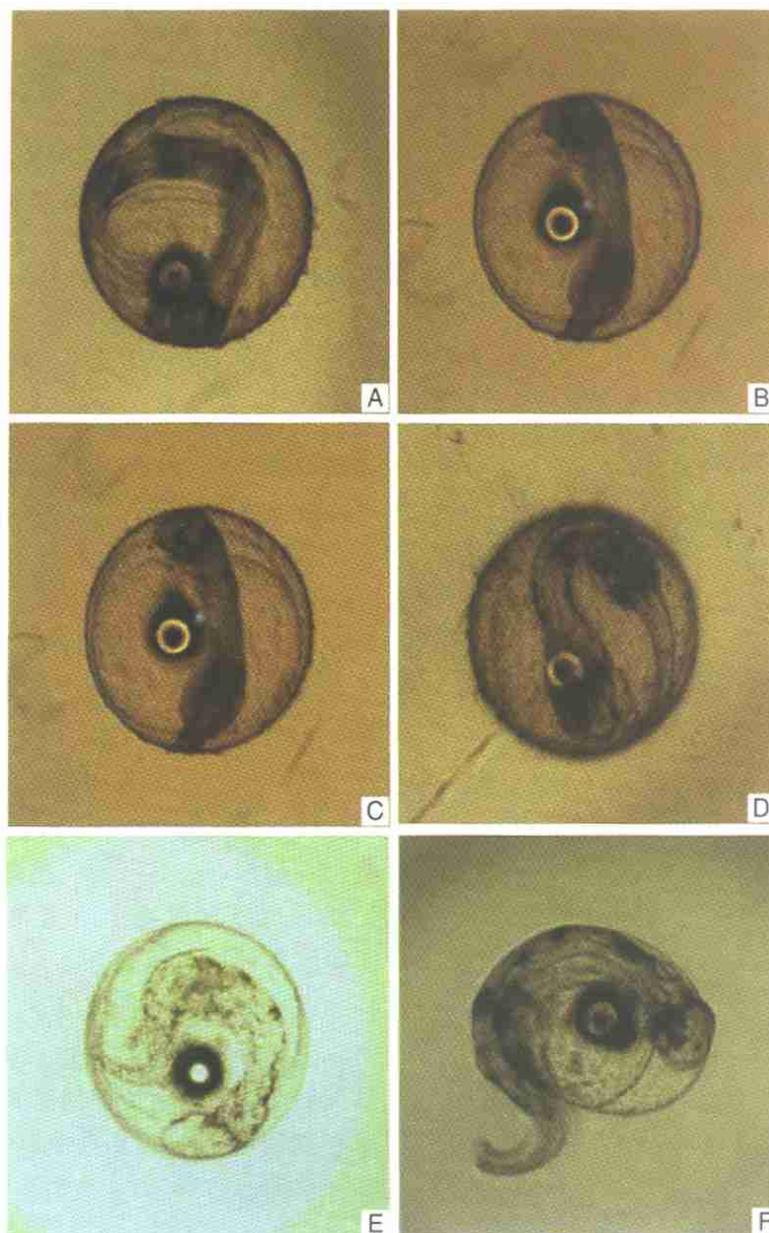
- A. H30: 心跳胚在 VSD2 中平衡处理 30 min, 在 - 196 冷冻 29 min 后, 洗脱培养成活。与未冻卵比较卵膜表面较粗糙 (H30: the survived heart beating stage after elution. It was equilibrated for 30 min in VSD2 and frozen for 29 min in liquid nitrogen. The surface of the heart beating stage was coarser than that of the natural embryo) ×60
- B. H40: 心跳胚在 VSD2 中平衡处理 40 min, 在 - 196 冷冻 58 min 后, 洗脱培养成活, 胚胎腰部有膨大 (H40: the survived heart beating stage after elution. It was equilibrated for 40 min in VSD2 and frozen for 58 min in liquid nitrogen. The tail of embryo swelled) ×60
- C. H30: 培养 30 h 至出膜期, 培养至 50 h 死亡, 与未冷冻胚胎相比较无明显区别 (H30: the hatched heart beating stage after culture for 30 h. It died after culture for 50 h and was not significantly different from natural embryos) ×60
- D. H40: 培养 30 h 至出膜期, 至 42 h 死亡 (H40: the hatching stage after culture for 30 h. It died after culture for 42 h) ×60
- E. H70: 出膜前期胚在 VSD2 中平衡处理 70 min, 在 - 196 冷冻 50 min 后, 洗脱培养成活 (H70: the survived pre-hatching stage after elution. It was equilibrated for 70 min in VSD2 and frozen for 50 min in liquid nitrogen) ×60
- F. H70: 孵化出膜, 成活 59 h, 尾部弯曲 (H70: hatched fry. It survived for 59 h and the tail curled) ×60

田永胜等：鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存

TIAN Yong-Sheng *et al.* : Cryopreservation of the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by vitrification

图版

Plate



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)