

牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究^①

田永胜^② 陈松林^③ 严安生*

(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)

(*华中农业大学 武汉 430070)

摘要 对名优经济鱼类牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎的玻璃化冷冻技术方法进行了研究。筛选出了适合于牙鲆胚胎平衡和培养的基础液 BS2,对牙鲆不同时期胚胎在玻璃化液 VS2 中的耐受能力进行了研究,随着平衡时间的延长,胚胎成活率逐渐降低,4—5 对肌节期、16—20 对肌节期、尾芽期表现出对玻璃化液较强的适应能力。对洗脱液的种类和浓度进行了筛选,结果显示 0.125mol/L 蔗糖洗脱成活率最高。在室温(21~22℃)和 6℃下分别对牙鲆不同时期胚胎在 VS1 中的成活率进行了比较研究,结果显示出 15—20 对肌节期在室温下的成活率高于低温,其它时期胚胎低温下的成活率高于室温。利用 VS4、VS2、VS3 分别对牙鲆尾芽期、肌效应期、出膜前期胚胎进行玻璃化冷冻保存,取得了 5 粒成活胚,4 粒孵化出膜,成活时间为 14~67h。

关键词 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*),胚胎,玻璃化,冷冻保存

0 引言

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)隶属于蝶形目(Pleuronectiformes)鲆科(Bothidae)牙鲆亚科(Paralichthyinae)牙鲆属(*Paralichthys*),该属鱼类多分布在南、北美洲东西两岸,有 20 种,在亚洲沿岸只有一种,分布于萨哈林(库叶岛)到中国南海沿岸,主要分布于我国渤海、黄海、东海、南海及朝鲜、日本、俄国远东沿岸,为底栖鱼类,常栖息在 20~50m 海域,栖息地多沙质,有季节性短距离洄游习性,自然繁殖期 4~6 月,繁殖水温 10~17℃。牙鲆是我国黄渤海优良经济鱼类,也是人工养殖的优良品种,在自然环境中由于过度捕捞,近年来产量极大的下降,渔获个体小型化,资源已经衰退^[1],牙鲆作为有利于黄渤海增养殖鱼类,应当采取措施加以保护。

胚胎玻璃化冷冻保存是种质资源长期保存的途径之一^[2],在哺乳动物胚胎的冷冻保存和移植方面研究较多,如小鼠^[3,4]、牛^[5,6]、羊^[7,8]、马^[9]、猪^[10]等动物和人^[11]的卵母细胞、囊胚或胚胎的冷冻保存和移植,取得了一定成绩。在淡水鱼类方面,利用传统的程序降温法仅在鲤^[12]、泥鳅^[13]胚胎的冷冻保存

上取得了成活胚胎,在玻璃化冷冻方面仅在泥鳅胚胎^[14]取得成活胚胎,在海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存方面仅在鲈鱼胚胎^[15]取得成活胚。

本文对适宜的基础液、冷冻保存的胚胎时期、胚胎对不同玻璃化液的适应性、不同种类的洗脱液及对不同温度下胚胎的成活率进行了比较研究,利用 VS4、VS2、VS3 三种玻璃化液对牙鲆不同时期的胚胎进行玻璃化冷冻保存,取得 5 粒成活胚胎,并孵化出 4 尾健全鱼苗。

1 实验材料和方法

1.1 鱼类胚胎

利用黄海水产研究所海阳科学实验基地培育的牙鲆亲鱼,在人工条件下自然产卵,采集受精卵在室温(15~17.5℃)下培育,利用发育至不同时期胚胎:原肠中期、胚孔封闭期、肌节出现期、尾芽期、心跳期、出膜前期做为实验材料。

1.2 基础液的选择

利用 NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃ 配制 5 种不同浓度的溶液,在室温 15~16℃ 下对牙鲆原肠期胚胎进行培养,使其发育至出膜,统

① 863 计划(2001AA621100)资助项目。
② 男,1964 年生,博士,副研究员,研究方向:鱼类生理和低温生物学。
③ 联系人, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn
(收稿日期:2004-03-16)

计其孵化率。选择孵化率最高的溶液做为配制玻璃化液和洗脱液的基础液。

1.3 玻璃化液的配制

利用 BS2 为基础液,在其中加入不同比例的 1, 2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 配制成不同浓度和组成的玻璃化液:

VS1 60% BS2 + 24% PG + 16% MeOH (v/v)

VS2 55% BS2 + 27% PG + 18% MeOH (v/v)

VS3 55% BS2 + 30% PG + 15% MeOH (v/v)

VS4 55% BS2 + 22.5% PG + 15% MeOH + 7.5%

PVP, PVP 含量为重量百分比。

1.4 不同时期牙鲆胚胎对玻璃化液的适应性

利用玻璃化液 VS2 分别对牙鲆胚孔封闭期、4—5 对肌节期、16—20 对肌节期、尾芽期和心跳期胚胎进行五步法^[5]平衡处理一定的时间(40、50、60、70、80min),直接利用 0.125mol/L 的蔗糖洗脱 10 ~ 15min,加入 14 ~ 16℃ 过滤海水培养,统计成活率。

1.5 不同种类和不同浓度洗脱液筛选

首先将牙鲆尾芽期胚胎利用 VS2 五步法平衡 40min,不经冷冻,分别利用 0.125mol/L 的蔗糖、葡萄糖、半乳糖、海藻糖洗脱 10min,加入过滤海水,在 15 ~ 17.5℃ 的室温下培养 10h,统计成活率。

再在室温下利用 VS2 五步法平衡牙鲆 20 对肌节期胚胎 50min,分别用 0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0mol/L 的蔗糖液洗脱 10min,过滤海水培养 10h,统计成活率。

1.6 不同平衡温度对胚胎成活率的影响

在室温(21 ~ 22℃)和 6℃ 下,在 VS1 中利用五步法分别平衡牙鲆原肠中期、胚孔封闭期、4—5 对

肌节期、15—20 对肌节期、尾芽期、心跳期和出膜前期胚胎 50min;室温下平衡胚胎用 20 ~ 21℃ 的 0.125mol/L 蔗糖 1ml 洗脱,20 ~ 21℃ 过滤海水培养。6℃ 下平衡胚胎用预冷至 6℃ 的 0.125mol/L 蔗糖洗脱,用 6℃ 过滤海水在室温下培养,使其温度逐渐升至室温。培养相同时间后统计成活率。

1.7 牙鲆胚胎玻璃化冷冻、洗脱、培养

在室温下(15 ~ 17.5℃),利用不同的玻璃化液 VS2、VS3、VS4 对牙鲆不同时期的胚胎进行五步法处理一定的时间。吸入麦管 250 μ l,利用酒精灯封口,以 211℃/s 的速率直接投入液氮冷冻保存一定的时间,将麦管从液氮中移出,快速利用 40℃ 的水浴解冻 0.125mol/L 的蔗糖液洗脱 10min,加入过滤海水培养,每天换水 1/2,保持水温在 15 ~ 17℃,及时清除死卵。观察和统计成活卵。

1.8 数据处理

实验数据利用 SPSS 统计软件进行单向方差分析(one way ANOVA),对不同数据组之间均值利用最小显著极差法(LSR)做差异显著性分析。

2 结果

2.1 基础液的选择结果

由表 1 可见,总盐度在 30.68 ~ 38.02 的 5 种基础液 BS1—5,对牙鲆胚胎进行培养,结果显示,这 5 种基础液培养孵化率无显著差异($P > 0.05$),但 BS2 对胚胎培养孵化率最高,为 81.5%;BS5 培养孵化率最低,为 70.73%。

表 1 不同基础液配方选择结果

代号	基础液配方(g/L)						胚胎孵化率(%) (n=3)
	NaCl	KCl	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgCl ₂ ·6H ₂ O	NaHCO ₃	总盐度	
BS1	23.75	0.76	1.36	4.66	0.18	30.68	78.33 ± 16.37
BS2	24.72	0.86	1.46	4.86	0.19	32.09	81.50 ± 5.57
BS3	25.72	0.86	2.36	5.66	0.28	34.88	74.84 ± 6.01
BS4	26.92	1.00	2.06	6.06	0.30	36.34	80.88 ± 6.15
BS5	27.92	1.10	2.30	6.40	0.30	38.02	70.73 ± 10.17

2.2 牙鲆不同时期胚胎对玻璃化液的适应性

由图 1 可见,牙鲆不同期的胚胎在玻璃化液 VS2 中平衡 40 ~ 80min,随着平衡时间的逐渐延长,其成活率逐渐降低,如 16—20 对肌节期胚在 40min 时成活率为(78.13 ± 5.23)% ,50min 成活率(69.41

± 10.77)% ,60min 成活率(68.38 ± 8.25)% ,70min 成活率(63.55 ± 2.13)% ,80min 成活率下降到(50.22 ± 5.35)%。不同时期胚胎在 VS2 中平衡相同的时间,成活率的变化呈“山峰型”,16—20 对肌节胚的成活率相对较高,如在 40min 时,各期胚成活

率由大到小排列为:16—20对肌节期(78.13 ± 5.25)% > 尾芽期(76.83 ± 6.12)% > 4—5对肌节期(74.68 ± 9.56)% > 胚孔封闭期(54.43 ± 7.31)% > 心跳期(12.2 ± 6.68)% ,16—20对肌节期与尾芽期、4—5对肌节期成活率无显著性差异($p > 0.05$),但与胚孔封闭期和心跳期胚胎有显著性差异($p <$

0.05),在50、60、70、80min对胚胎的处理结果与40min呈现出相似的变化规律,说明4—5对肌节期、16—20对肌节期、尾芽期对玻璃化液的适应能力较强,胚孔封闭期和心跳期对玻璃化液的适应能力较差。

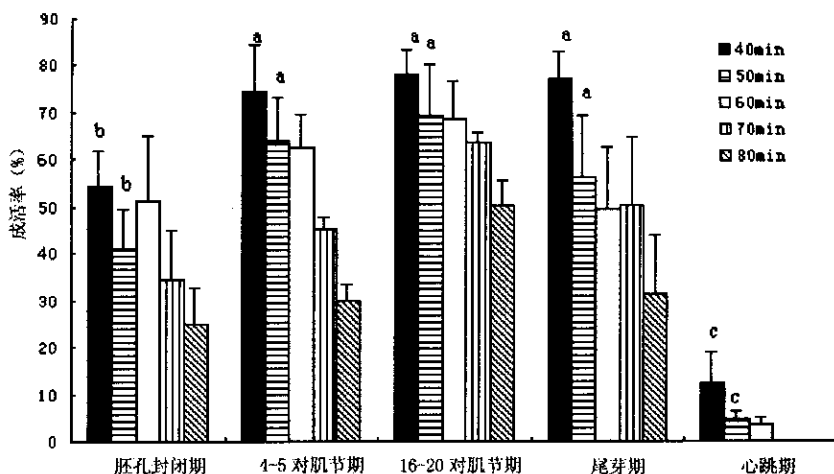


图1 牙鲆不同时期胚胎在VS2中平衡不同时间的成活率(%)($n=3$)

2.3 不同种类和不同浓度洗脱液洗脱结果

由图2可见,利用相同浓度(0.125mol/L)的蔗糖、葡萄糖、半乳糖、海藻糖分别洗脱经VS2平衡处理的牙鲆尾芽期胚胎相同的时间,其成活率分别为(64.97 ± 10.29)%、(63.01 ± 13.71)%、(63.69 ± 5.55)%和(55.79 ± 7.83)% ,相应的孵化率分别为(93.72 ± 6.53)%、(93.32 ± 6.91)%、(94.79 ± 6.51)%、(86.94 ± 6.44)% ,成活率和孵化率都没有显著性差异($p > 0.05$)。

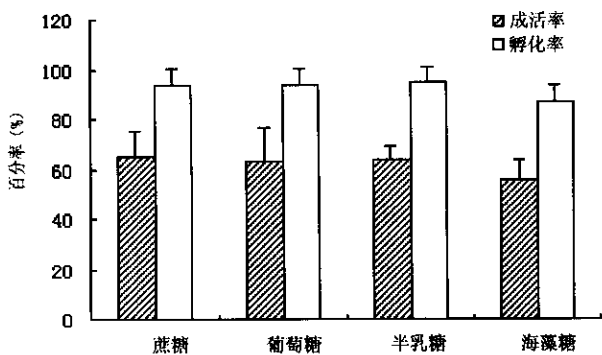


图2 不同种类洗脱液洗脱结果($n=3$)

由图3可见,在常温下分别利用0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0mol/L的蔗糖液洗脱经VS2五步法平衡的牙鲆20对肌节期胚胎,其成活率分别为(51.58

± 7.26)%、(55.89 ± 11.57)%、(27.32 ± 22.26)%、(20.0 ± 5.81)%和(17.05 ± 4.36)% ,0.125mol/L与0.0625mol/L无显著性差异($p > 0.05$),与其它浓度有显著性差异($p < 0.05$),但0.125mol/L蔗糖洗脱成活率最高。

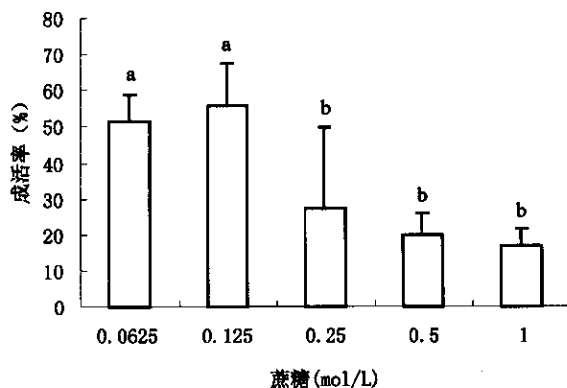


图3 不同浓度蔗糖洗脱成活率($n=5$)

2.4 牙鲆不同时期胚胎在不同平衡温度下的成活率

从图4可见,在室温21~22℃下牙鲆不同时期胚胎在VS1中平衡相同的时间,成活率曲线呈“山峰型”。15—20对肌节期成活率最高,为(77.89 ± 10.53)% ,其它时期胚胎成活率较低,原肠中期为(13.77 ± 3.82)% ,胚孔封闭期为(17.97 ± 3.57)% ,

4—5对肌节期为(11.99 ± 2.29)% ,尾芽期为(23.71 ± 8.21)% ,心跳期为(7.14 ± 3.41)% ,出膜前期为(4.11 ± 3.05)%。说明在室温下牙鲈15—20对肌节胚期最适合于在VS1中处理。在6℃下利用VS1平衡牙鲈不同时期胚胎,不同时期胚胎成活率曲线呈“S”形,原肠中期成活率为(68.39 ± 9.02)% ,发育至胚孔封闭期成活率降低到(37.54 ± 8.63)% ,至4—5对肌节期成活率最低,为(33.92 ± 12.26)% ,至15—20对肌节期成活率又开始上升为(43.75 ± 5.97)% ,发育至尾芽期和心跳期成活率最高,分别为(74.07 ± 2.59)%和(78.77 ± 5.63)% ,出膜前期成活率下降至(68.72 ± 10.96)%。

21~22℃和6℃下分别平衡牙鲈不同时期胚胎成活率相比较,可以看出,除15—20对肌节胚在室温下的成活率高于低温之外,其它时期胚胎的成活率低均高于室温。这一点说明,15—20对肌节期适合在室温下进行平衡,其它时期胚胎适合于在低温下平衡。

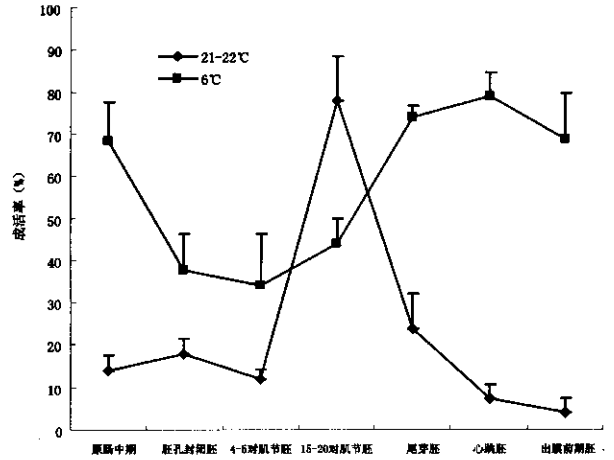


图4 牙鲈胚胎在不同平衡温度下的成活率(%)(n=5)

2.5 牙鲈不同时期胚胎玻璃化冷冻保存结果

表2中记录了利用不同的玻璃化液在不同的胚胎时期,对牙鲈胚胎进行玻璃化冷冻保存成活结果。

表2 牙鲈不同时期胚胎玻璃化冷冻保存结果

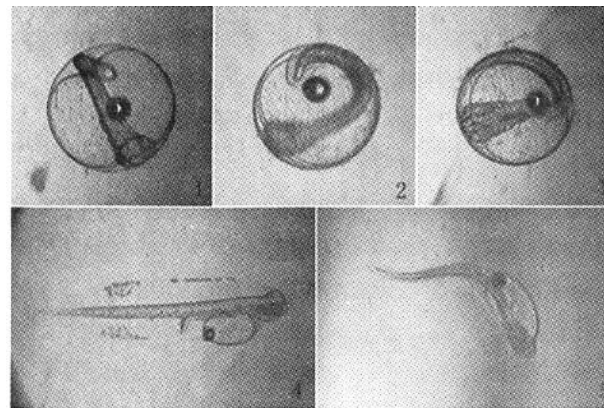
胚胎时期	玻璃化液	平衡时间(min)	冷冻时间	成活胚/样本数(粒)	成活率(%)	孵化胚数	成活时间(h)
尾芽期	VS4	40	7h33min	2/35	5.71	1	67
肌效期	VS2	50	1h31min	2/30	6.67	2	62
出膜前期	VS3	60	2h34min	1/61	1.64	1	14
总成活胚数				5		4	

利用VS4对尾芽期胚胎平衡40min,在液氮中冷冻7h33min,有2粒成活(图5.1),成活率5.71%,其中1尾出膜培养67h(图5.4)。

利用VS2对肌效期胚胎平衡50min,冷冻1h31min,有2粒成活(图5.2),成活率6.67%,2尾出膜培养62h(图5.5)。

出膜前期胚胎利用VS3平衡60min,冷冻2h34min,有1粒成活(图5.3),成活率为1.64%,1尾出膜培养14h。

在以上实验中冻存最短时间为1h33min,最长冻存时间为7h33min,共获得成活胚胎5粒,成活率在1.64%~6.67%,平均成活率4.67%;5粒成活胚中有4粒孵化。成活时间14~67h。



1. 尾芽期胚胎利用VS4平衡40min,冷冻7h33min,解冻洗脱后成活,×60; 2. 肌效期胚胎利用VS2平衡50min,冷冻1h31min,解冻洗脱后成活,×60; 3. 出膜前期胚胎利用VS3平衡60min,冷冻2h34min,解冻洗脱后成活,×60; 4. 冷冻成活尾芽期胚胎有1尾孵化出膜,培养67h,×40; 5. 冷冻成活肌效期胚胎孵化出膜,培养62h,×40

图5 玻璃化冷冻成活胚胎和孵化鱼苗

3 讨论

在哺乳动物胚胎的培养和玻璃化液的配制中使用的基础液种类很多,如PBSS^[16]、SPBS^[17]、H-SOF^[9]等,鲤囊胚细胞的冷冻中应用FEM处理细胞和配制1.4mol/L的1,2-丙二醇^[18]。海水鱼类卵的生存环境与其它动物不同,牙鲈胚胎一般在28~35左右的海水中孵化,在其玻璃化冷冻保存中,为了使胚胎不致受到盐度的变化带来的渗透压影响,对基础液进

行了筛选,盐度在30.86~38.02的BS1—5在胚胎培养中成活率无显著差异,但32.09的BS2的培养成活率最高,在生产中牙鲆胚胎最适孵化盐度也为32。因此在牙鲆胚胎玻璃化的配制中使用了BS2。为了防止在玻璃化液配制中产生沉淀,事先对基础液中各种盐离子进行了筛选,发现 $MgSO_4$ 的加入在玻璃化液的配制中易产生沉淀。

牙鲆不同时期胚胎对玻璃化液及冷冻的适应性不同,不同浓度和不同种类的玻璃化液对胚胎的影响也不同,在不同动物胚胎的冷冻保存中使用了不同的玻璃化液和不同时期的胚胎,在日本对虾(*Penaeus japonicus*)胚胎、无节幼体、状幼体对抗冻剂的选择中,在10%甲醇中成活率最高^[19]。对虾晚期胚胎对DMSO和EG的耐受能力最较强,无节幼虫期较适合于进行慢速降温冷冻和玻璃化冷冻^[20]。鲤早期囊胚细胞较晚期囊胚细胞对冷冻敏感^[18]。在室温下牙鲆不同时期胚胎在VS2中平衡结果显示4—5对肌节期、16—20对肌节期、尾芽期胚胎适合于在玻璃化液中平衡,早期和晚期胚胎对玻璃化液的耐受能力较低。在不同时期的胚胎玻璃化冷冻中也显示出尾芽期胚胎易于成活。

胚胎经过玻璃化液处理、冷冻解冻后,玻璃化液的去除是相当重要的一步,在哺乳动物胚胎或组织的冷冻保存中,在37℃应用S—PBS配制的0.25mol/L的蔗糖洗脱兔和猪胚胎组织和皮肤样品^[17]利用DPBS配制1.0mol/L的蔗糖洗脱玻璃化小鼠胚胎^[3],在25~27℃分步利用PBSS配制的1.7mol/L、0.85mol/L、0.4mol/L的半乳糖洗脱玻璃化冷冻的牛卵母细胞^[16]。在鲤胚胎程序化冷冻中利用0.1mol/L蔗糖洗脱抗冻剂^[12]。本文对0.125mol/L蔗糖、葡萄糖、半乳糖、海藻糖对牙鲆胚胎的洗脱效果进行比较选择,结果显示4种糖溶液的洗脱效果无显著差异,但蔗糖的洗脱成活率相对较高。对0.0625~1.0mol/L蔗糖的洗脱效果进行了比较,结果是0.125mol/L蔗糖的洗脱成活率最高。

胚胎在玻璃化液的处理过程中,不同平衡温度对胚胎的成活率有一定的影响。分别在室温(19~21℃)和低温(2~4℃)下利用6mol/L VSD+1mg/mlAFGP平衡小鼠卵母细胞,冻后受精率和发育至胚泡成活率低温高于室温^[21]。利用不同的玻璃化液MVM和RVM分别在20℃和4℃下平衡小鼠桑椹胚、早期囊胚和扩张囊胚,MVM平衡成活率4℃高于20℃,RVM平衡成活率20℃高于4℃^[3]。牛体外受精胚胎在室温(18℃)添加抗冻剂效果明显优于

4℃^[22]。本文利用VS1对牙鲆不同时期的胚胎分别在室温(21~22℃)和6℃进行平衡,不同时期胚胎对温度显示出不同的适应性,16—20对肌节期胚胎在室温下成活率高于低温,其它时期的胚胎在低温下的成活率高于室温,此结果为牙鲆胚胎在玻璃化液中的预平衡提供了依据。

在水生动物胚胎冷冻保存研究方面,Chao对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)胚胎和早期幼虫的冷冻研究较多,利用程序化冷冻获得最78%胚胎成活率,但利用玻璃化冷冻获得14%的成活率^[23],Gwo对其桑椹胚、囊胚、担轮幼虫对抗冻剂的适应能力、抗冻剂的浓度、平衡时间、降温程序进行了选择研究^[24]。Philippe对太平洋牡蛎冷冻耐受能力进行了研究,结果显示出冷冻的耐受能力与胚胎的质量相适应^[25]。鱼类胚胎冷冻与哺乳动物和有壳水生动物相比较,在胚胎的规格、抗冻剂的选择、渗透能力、冷冻和解冻等方面都有一定的困难。鱼类胚胎冷冻成活只有少数几例,在淡水鱼类,利用程序降温在鲤胚胎冷冻中获得4粒成活,3粒孵出鱼苗,但实验结果未能重复^[12]。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^[13]。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粒胚孔封闭期胚胎发育到18—19对肌节期,但解冻后胚胎未能继续发育成鱼苗^[14]。在海水鱼类胚胎冷冻保存方面只在鲈鱼取得3粒成活胚^[15]。

本文通过对基础液的选择、胚胎对玻璃化液适应性的选择、不同平衡温度对胚胎成活率的影响、洗脱液种类和浓度的选择等实验,对牙鲆胚胎玻璃化冷冻方法进行优化选择,利用VS2、VS3、VS4三种玻璃化液,通过五步法平衡,实现了牙鲆尾芽期、肌效应期、出膜前期胚胎玻璃化冷冻-解冻成活,共成活胚胎5粒,有4粒孵化出膜,成活率在1.64%~6.67%。成活时间在14~67h。在同一种鱼实现了不同时期胚胎的冷冻成活,说明本研究的采用的五步法平衡、0.125mol/L蔗糖一步洗脱,采用系列玻璃化液进行冷冻保存的方法较适宜于牙鲆胚胎的冷冻保存。

参考文献

- [1]《中国渔业资源调查和区划》编写委员会. 中国浅海滩涂渔业资源. 浙江科学技术出版社,1987:62-63
- [2]陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. 水产学报,2002,26(2):161
- [3]Cseh S, Horlacher W, Brem G, et al. Vitrification of mouse

- embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology*, 1999, 52 : 103
- [4] Men H S, Chen J C, Ji W Z, et al. Kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology*, 1997, 47 : 1423
- [5] Donnay I, Auquier Ph, Kaidi S, et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts : methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, 1998, 52 : 93
- [6] Lazar L, Špak J, Dávid V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts the open pulled straw method. *Theriogenology*, 2000, 54 : 571
- [7] Isabelle Begin, Bhim Bhatia, Hernan Baldassarre, et al. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to 4-cell embryos using the cryoloop(CLV) and solid-surface vitrification(SSV) methods. *Theriogenology*, 2003, 59 : 1839
- [8] Martinez A G, Matkovic M, Pessi H D, et al. Cryopreservation of ovine embryos : slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 1998, 49 : 1039
- [9] Oberstein N O, Donovan M K, Bruemmer J E, et al. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw cryoloop or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 2001, 55 : 607
- [10] Berthelot F, Martinat-Botté F, Locatelli A, et al. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 2000, 41 : 16
- [11] Tetsunori Mukaida M D, Sanae Nakamura B S, Tatsuhiro Tomiyama M D, et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertility and Sterility*, 2001, 3 : 618
- [12] Zhang X S, Zhao L, Hua T C, et al. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Letters*, 1989, 10 : 271
- [13] 张克俭 楼允东 张饮江等. 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温 and 复温速率的研究. 水产学报, 1997, 21 (4) : 366
- [14] 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌等. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究. 水产学报, 2002, 26(3) : 213
- [15] 田永胜, 陈松林, 严安生等. 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻保存. 动物学报, 2003, 49(6) : 843
- [16] Francois Le Gal and Alban Massip. Cryopreservation of cattle oocytes : effects of meiotics stage cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology*, 1999, 38 : 290
- [17] Silvestre M A, Saeed A M, Escribá M J, et al. Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. *Theriogenology*, 2002, 58 : 69
- [18] Silvia Leveroni Calvi and Gérard Maisse. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. *Aquat Living Resour*, 1999, 12(1) : 71
- [19] Jin-chywan Gwo and Cheng-Hui Lin. Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. *Theriogenology*, 1998, 49 : 1289
- [20] Samuel Newton S and Subramoniam T. Cryoprotectant toxicity Penaeid Prawn embryos. *Cryobiology*, 1996, 33 : 172
- [21] O'Neil L, Paynter S J, Fuller B J, et al. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins : the effect of temperature. *Cryobiology*, 1998, 37 : 59
- [22] 洪武 李荣凤 旭日干. 平衡方法及平衡和解冻温度对牛体外受精胚胎玻璃化冷冻保存效果的研究. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1995, 26(1) : 85
- [23] Chao N H, Liao I C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 2001, 197 : 161
- [24] Gwo J C. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology*, 1995, 43 : 1163
- [25] Philippe R. Cooling and freezing tolerances in embryos of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* : methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, 1991, 92 : 43

Study on vitrification technique of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos

Tian Yongsheng, Chen Songlin, Yan Ansheng*

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(* Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract

The method for cryopreserving Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification was investigated in the present study. The basic extender BS2 suitable to equilibrate and cultivate the Japanese flounder embryos was selected. The endurable capacity of embryos in different stages to vitrification solution VS2 was studied. The survival rate of embryos decreased gradually along with the prolongation of treatment time in VS2 and stronger suitable ability to VS2 was observed in 4-5 pairs somite, 16-20 pairs somite and tail-bud. The type and concentration of elution solutions were chosen and the results showed that survival rate was highest when the 0.125mol/L sucrose was used as elution solution. The effect of treatment temperature (21 ~ 22°C and 6°C) in VS1 on survival rate of Japanese flounder embryos was also studied. The survival rate of 15-20 pairs somite was higher in room temperature (21 ~ 22°C) than in 6°C and the survival rate of other stages was opposite to 15-20 pairs somite. As a result, successful samples of tail-bud muscle-effect and pre-hatching stage after cryopreservation were got by using VS4, VS2 and VS3 as vitrification solutions. Whole 5 survival embryos were obtained, of which 4 hatched out. The survival time varied from 14 to 67h under no-breeding condition.

Key words : Japanese flounder, embryos, vitrification, cryopreservation

作者: 田永胜, 陈松林, 严安生, Tian Yongsheng, Chen Songlin, Yan Ansheng
作者单位: 田永胜, 陈松林, Tian Yongsheng, Chen Songlin(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), 严安生, Yan Ansheng(华中农业大学, 武汉, 430070)
刊名: 高技术通讯 ISTIC EI PKU
英文刊名: CHINESE HIGH TECHNOLOGY LETTERS
年, 卷(期): 2005, 15(3)
被引用次数: 8次

参考文献(25条)

1. 《中国渔业资源调查和区划》编写委员会 中国浅海滩涂渔业资源 1987
2. 陈松林 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[期刊论文]-水产学报 2002(02)
3. Cseh S;Horlacher W;Brem G Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions[外文期刊] 1999
4. Men H S;Chen J C;Ji W Z Kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols[外文期刊] 1997
5. Donnay I;Auquier Ph;Kaidi S Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts:methodological studies and developmental capacity[外文期刊] 1998
6. Lazar L;pak J;Dávid V The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts the open pulled straw method[外文期刊] 2000
7. Isabelle Begin;Bhim Bhatia;Hernan Baldassarre Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods[外文期刊] 2003
8. Martinez A G;Matkovic M;Pessi H D Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification[外文期刊] 1998
9. Oberstein N O;Donovan M K;Bruemmer J E Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw cryoloop or conventional slow cooling methods[外文期刊] 2001
10. Berthelot F;Martinat-Botté F;Locatelli A Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method[外文期刊] 2000
11. Tetsunori Mukaida M D;Sanae Nakamura B S;Tatsuhiko Tomiyama M D Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique[外文期刊] 2001
12. Zhang X S;Zhao L;Hua T C A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos 1989
13. 张克俭;楼允东;张饮江 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温 and 复温速率的研究 1997(04)
14. 章龙珍;鲁大椿;柳凌 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究[期刊论文]-水产学报 2002(03)
15. 田永胜;陈松林;严安生 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻保存[期刊论文]-动物学报 2003(06)
16. Francois Le Gal;Alban Massip Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotics stage cycloheximide treatment, and vitrification procedure[外文期刊] 1999(4)
17. Silvestre M A;Saeed A M;Escribó M J Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs[外文期刊] 2002
18. Silvia Leveroni Calvi and Gérard Maisse.Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres

1999(01)

19. [Jin chywan Gwo;Cheng Hui Lin Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp \(Penaeus japonicus\) embryos, nauplii and zoea](#)[外文期刊] 1998(7)
20. [Samuel Newton S;Subramoniam T Cryoprotectant toxicity Penaeid Prawn emryos](#)[外文期刊] 1996(1)
21. [O'Neil L;Paynter S J;Fuller B J Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature](#)[外文期刊] 1998(1)
22. [洪武;李荣凤;旭日干 平衡方法及平衡和解冻温度对牛体外受精胚胎玻璃化冷冻保存效果的研究](#) 1995(01)
23. [Chao N H;Liao I C Cryopreservation of finfish and shellish gametes and embryos](#)[外文期刊] 2001
24. [Gwo J C Cryopreservation of oyster \(Crassostrea gigas\) embryos](#)[外文期刊] 1995
25. [Philippe R Cooling and freezing tolerances in embryos of the pacific oyster,Crassostrea gigas:methanol and sucrose effects](#) 1991

本文读者也读过(10条)

1. [田永胜.陈松林.于过才.季相山.TIAN Yong-Sheng.CHEN Song-lin.YU Guo-cai.JI Xiang-Shan 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存](#)[期刊论文]-[水产学报](#)2005, 29(2)
2. [任鹏 杂色鲍和大黄鱼微卫星标记的筛选](#)[学位论文]2008
3. [刘东.白宝海.邱黎明 虹鳟四倍体的诱导试验](#)[期刊论文]-[中国水产](#)2006(7)
4. [丁浩.田永胜.武鹏飞.刘洋.陈松林.DING Hao.TIAN Yong-sheng.WU Peng-fei.LIU Yang.CHEN Song-lin 利用显微注射技术冷冻保存牙鲆胚胎](#)[期刊论文]-[中国水产科学](#)2008, 15(5)
5. [郑春静 温度休克诱导大黄鱼四倍体的初步研究](#)[期刊论文]-[中国水产](#)2006(3)
6. [孙毅.张秋金.王义权.SUN Yi.ZHANG Qiu-Jin.WANG Yi-Quan 文昌鱼胚胎的程序化冷冻保存](#)[期刊论文]-[动物学报](#)2007, 53(3)
7. [刘波.曾志南.叶金聪.林向阳.郭明忠.林光纪.LIU Bo.ZENG Zhi-nan.YE Jin-cong.LIN Xiang-yang.GUO Ming-zhong.LIN Guang-ji 太空搭载卤虫诱变效应的AFLP分子标记检测](#)[期刊论文]-[台湾海峡](#)2008, 27(4)
8. [章龙珍.鲁大椿.柳凌.郭峰.张洁明 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究](#)[期刊论文]-[水产学报](#)2002, 26(3)
9. [王军.吴惠仙.杨新鑫.马玉清.钱龙.李思发.王成辉.WANG Jun.WU Huixian.YANG Xinxin.MA Yuqing.QIAN Long.LI Sifa.WANG Chenghui 中国和匈牙利白斑狗鱼群体遗传变异的微卫星标记分析](#)[期刊论文]-[中国水产科学](#) 2011, 18(3)
10. [李军.丁福红.陈雄芳.肖志忠 真鲷胚胎程序冷冻保存方法研究](#)[会议论文]-2003

引证文献(9条)

1. [田永胜.刘本伟.陈松林 牙鲆胚胎玻璃化冷冻及解冻过程中的温度因子与玻璃化率](#)[期刊论文]-[海洋水产研究](#) 2008(5)
2. [黄晓荣.庄平.章龙珍.冯广朋.刘鉴毅.张涛.赵峰.侯俊利 超低温冷冻对中华绒螯蟹胚胎形态结构的影响](#)[期刊论文]-[水产学报](#) 2012(11)
3. [姜静.田永胜.翟介明.陈松林 超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#) 2014(4)
4. [武鹏飞.丁浩.田永胜.陈松林 显微注射抗冻剂对牙鲆\(Paralichthys olivaceus\)胚胎毒性及冷敏感性的影响](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2009(16)
5. [丁浩.田永胜.武鹏飞.刘洋.陈松林 利用显微注射技术冷冻保存牙鲆胚胎](#)[期刊论文]-[中国水产科学](#) 2008(5)
6. [刘本伟.陈松林.田永胜.孔晓瑜.王春花 不同抗冻剂对牙鲆胚胎毒性研究以及玻璃化颗粒冷冻保存方法的应用](#)[期刊论文]-[中国水产科学](#) 2007(5)

7. 熊良伟, 王帅兵, 王权 我国水产生物技术的研究进展[期刊论文]-生物技术通报 2010(8)
8. 朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 高风英, 杨丽萍 鱼类遗传改良研究综述[期刊论文]-中国水产科学 2010(1)
9. 陈松林 水产生物技术研究的回顾、最新进展及前景展望[期刊论文]-水产学报 2007(6)

引用本文格式: 田永胜, 陈松林, 严安生, Tian Yongsheng, Chen Songlin, Yan Ansheng 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究[期刊论文]-高技术通讯 2005(3)