中国农业大学学报 2004,9(5):26～31
Journal of China Agricultural University

小鼠孵化囊胚细管法和OPS法玻璃化冷冻保存技术的研究

周 崇 侯云鹏 周光斌 吴通义 金 方 洪琼花 朱士恩
(中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100094)

摘 要 利用小鼠孵化囊胚为模型,为猪孵化囊胚的冷冻保存摸索适宜的方法和条件:在25和37 ℃条件下,用不同含量的玻璃化溶液(EFS和EDFS),对小鼠孵化囊胚实施细管法和OPS法冷冻保存。在25 ℃条件下,细管一步法冷冻保存后的囊胚恢复率仅为32.5%～74.4%,与对照组(100%)差异极显著($P<0.01$);而细管二步法冷冻组用方法C解冻后,孵化囊胚恢复率达87.0%,为细管法最佳组,但仍与对照组有显著差异($P<0.05$)。在37 ℃条件下,改用OPS法冷冻后,以方法A脱出抗冻保护剂,孵化囊胚恢复率最高值为87.2%($P<0.05$)。当采用EDFS30和EDFS40对孵化囊胚冷冻保存后,以方法C脱出抗冻保护剂,恢复率分别高达97.8%和93.3%($P>0.05$)。利用细管法和OPS法2种最佳冷冻-解冻组获得的133和154枚胚胎,分别移植给12和10只假妊娠3～4 d的受体母鼠。使2种冷冻方法均有6只妊娠,各产仔22和36只,产仔率分别为35.5%和39.1%,与对照组(39.8%)差异均不显著($P>0.05$)。证明2种方法对胚胎冷冻后均起到了保护作用。

关键词 小鼠;孵化囊胚;细管法;OPS法;玻璃化冷冻

中图分类号 S814.6 **文章编号** 1007-4333(2004)05-0026-06 **文献标识码** A

Vitrification of mouse hatched blastocysts by straw and OPS mehtod

Zhou Chong, Hou Yunpeng, Zhou Guangbin, Wu Tongyi, Jin Fang, Hong Qonghua, Zhu Shien
(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract To investigate a feasible method and conditions of porcine hatched blastocysts (HB) cryopreservation, the mouse HB was used as a model. The experiments were performed to cryopreserve mouse HB with vitrification solutions (EFS and EDFS), using the straw at 25 ℃ and the open pulled straw (OPS) method at 37 ℃. At 25 ℃, the survival rates of mouse HB of the 1-step straw method was only 32.5% - 74.4%, differed ($P<0.01$) significantly from that of the control. When the embryos vitrified in the 2-step straw method were warmed by method C (rinsed first in 0.3 mol·L^{-1} sucrose for 5 min, then in 0.15 mol·L^{-1} sucrose for 2 min), the survival rates of HB increased to 87.0%, which differed ($P<0.05$) significantly from that of the control. While at 37 ℃, in the OPS method, when the vitrified HB were warmed by method A (rinsed in 0.5 mol·L^{-1} sucrose for 5 min), the highest survival rate of mouse HB of 87.25% was got. And when the embryos were vitrified with EDFS30 or EDFS40 followed by warming in method C, the highest survival rates reached 97.8% and 93.3% respectively, which were similar ($P>0.05$) to that in the control. The embryos derived from the best vitrified group or fresh HB (used as control) after culture for 1 to 3 h were transferred to 3 - 4 d pseudo-pregnant female mice. 22, 36 and 37 fetuses were obtained from 6 of 12 recipients, 6 of 10 recipients and 8 of 12 recipients respectively, which had received 133 HB in straw, 154 HB in OPS and 142 fresh HB respectively. In the pregnant recipients, the percentage of transferred embryos developed to young in the treated groups (35.5% in straw and 39.1% in OPS) and control (39.8%) showed no difference ($P>0.05$). The results demonstrated that the two methods were efficient for the cryopreservation of blastocysts.

Key words mouse; hatched blastocyst; straw; open pulled straw; vitrification

---

收稿日期:2004-06-11
基金项目:北京市草食性良种及胚胎产业化示范工程项目资助(H022020060420)
作者简介:周 崇,硕士研究生;朱士恩,教授,通讯作者,主要从事胚胎生物技术研究,E-mail:zhushien@cau.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

猪的早期胚胎对低温极为敏感,冷冻保存相对困难[1]。Nagashima 等认为猪囊胚在孵化前后较适合冷冻保存,但效率较低[2]。国内冯书堂等报道将 42 枚猪囊胚和孵化囊胚在 - 20 ℃条件下冷冻后,移植于 3 头受体母猪,其中 1 头妊娠,仅产下 2 头仔猪[3]。到目前为止,国内外在此方面的研究均未获得理想的结果。为解决上述问题,本实验采用来源丰富的小鼠孵化囊胚作模型,为猪胚胎冷冻保存摸索条件。

自 Rall 等[4]发明玻璃化冷冻法成功地冷冻保存小鼠 8-细胞胚胎以来,人们已对各种动物的不同胚胎阶段进行了研究。玻璃化冷冻法虽然避免了在冷冻过程中所受到的物理损伤,但高含量的玻璃化冷冻液对胚胎的化学毒害作用较大[5]。为此,研究者们不断改进玻璃化溶液,采用低毒性保护剂[6]或多种抗冻保护剂混合使用[7],以及分步平衡[8]等措施来降低玻璃化冷冻液的毒性,从而提高冷冻效率。近年来,出现了开放式拉长细管法(open pulled straw,OPS)等各种新型的玻璃化冷冻方法。这些方法极大地提高冷冻降温速度,不仅可以降低玻璃化冷冻所需抗冻保护剂含量,减少冷冻液的化学毒性;并且能快速通过危险温度区域,减少冷冻损伤[9]。目前为止,孵化囊胚的冷冻保存只在小鼠[10]、家兔[11]和猪[12]上有过报道。本研究采用乙二醇、聚蔗糖和蔗糖自行研制成的 EFS 和乙二醇、二甲基亚砜、聚蔗糖和蔗糖配制成的 EDFS 冷冻液,并采用细管和改进的 OPS 法对小鼠孵化囊胚进行玻璃化冷冻保存技术的研究,以探索一种简便、效果稳定、恢复率高的孵化囊胚的冷冻保存方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1) 实验动物。

5～6 周龄的昆明白系小鼠(军事医学科学院实验动物中心提供)。

2) OPS 的制备。

用自制小酒精灯,明火将 0.25 mL 塑料细管(france)拉成直径 0.2 mm,内径 0.15 mm,管壁厚度约为 0.025 mm 的开放式小管。

3) 预处理液和玻璃化溶液。

预处理液: ①体积分数为 10 %的 EG(下同)(ethylene glycol: EG, sigma); ②10 %EG + 体积分数为 10 %D(下同)(DMSO, sigma);基础液均为 PBS,充分混匀后按 3 mg·mL^{-1}添加 BSA(sigma)。

玻璃化溶液: ①EFS 液配制。体积分数为 30 %聚蔗糖(Ficoll 70, sigma)和 0.5 mol·L^{-1}蔗糖(Sucrose, sigma)于 PBS 溶液中混匀即为 FS 液,然后用乙二醇(EG)和 FS 液按体积比为 3∶7 和 4∶6 的比例混匀配制成 EFS30 和 EFS40 玻璃化溶液; ②EDFS 液的配制。用 EG,DMSO 和 FS 液按照体积比为 1.5∶1.5∶7 和 2∶2∶6 的比例混匀配制成 EDFS30 和 EDFS40 玻璃化溶液。

解冻液:0.5,0.3 和 0.15 mol·L^{-1}蔗糖溶液。

1.2　实验方法

1) 孵化囊胚采集。

5～6 周龄的昆明白系雌鼠,自由采食、饮水和控光(每天光照 14 h),购入后经一周以上适应性饲养。腹腔注射 PMSG(天津实验动物中心)和 hCG(宁波市激素制品厂)各 10 IU,2 次注射间隔 48 h。hCG 注射后与性成熟同系公鼠交配,次日检查有阴道栓雌鼠于 hCG 注射后 78～84 h 将子宫摘除,置于含有 mPBS 溶液的表面皿中,在实体显微镜下收集形态正常的桑椹胚,然后移入不含葡萄糖而添加 5 mmol·L^{-1}牛磺酸的 CZB(简称 mCZB)中进行培养,约 48 h 后发育至孵化囊胚备用。

2) 玻璃化冷冻保存。

①细管法

一步法冷冻保存:室温 25 ℃,将各种溶液和实验器具充分平衡,采用 0.25 mL 塑料细管,按顺序依次吸入 0.5 mol·L^{-1}蔗糖溶液(5 cm)—空气(0.5 cm)—玻璃化液(0.5 cm)—空气(0.5 cm)—玻璃化液(1.5 cm)—空气(0.5 cm)—玻璃化液(0.5 cm)—空气(1.0 cm)—0.5 mol·L^{-1}蔗糖溶液(±1.0 cm)吸满。当孵化囊胚装入细管中 1.5 cm 段玻璃化溶液后,经 0.5,1 或 1.5 min 平衡后用膨胀粉封口,随即浸入液氮中冷冻保存。

二步法冷冻保存: 孵化囊胚于装入细管中玻璃化溶液前,首先在 10 %EG(或 10 %EG + 10 %D)溶液中预处理 5 min,然后操作同一步法,胚胎在玻璃化溶液平衡 30 s 后浸入液氮冷冻保存。

解冻:于解冻前 2 h 调节室温(25 ℃)并平衡解冻液,细管由液氮中取出后,在空气中停留约 10 s,平行地浸入 25 ℃水中并轻轻晃动,待管中蔗糖溶液段由乳白变为透明时取出细管,剪掉粉剂封口端,用直径与细管内径相当的金属杆推动棉栓部,使管中内容物连同胚胎流入含有 0.5 mol·L^{-1}蔗糖溶液的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表面皿中,实体显微镜迅速回收胚胎,并移入新鲜0.5 mol·L^-1蔗糖溶液中平衡5 min(方法A),或在0.5 mol·L^-1蔗糖溶液中平衡2 min后,移入0.3 mol·L^-1蔗糖溶液中平衡5 min(方法B);或在0.3 mol·L^-1蔗糖溶液中平衡5 min后,移入0.15 mol·L^-1蔗糖溶液中平衡2 min(方法C),而后用mPBS液洗净置于CO_2培养箱(37 ℃,CO_2体积分数为5%,湿度100%)中培养。

②OPS法

冷冻保存:室温25 ℃,在37 ℃恒温台上进行操作。首先将孵化囊胚用带有1 mL塑料注射针筒的口吸管连接的OPS移入10%EG或10%EG+10%D溶液中分别平衡0.5,1或2 min,然后移入玻璃化溶液中平衡25 s后再吸入OPS中,直接浸入液氮中冷冻保存。

解冻:将解冻用溶液在25 ℃室温下充分平衡后,将OPS由液氮中取出,迅速浸入含有0.5 mol·L^-1蔗糖溶液的表面皿中,在实体显微镜下回收胚胎,然后以方法A(或方法B,C)脱出细胞内部抗冻保护剂,最后用mPBS液洗净后移入mCZB培养液小滴,于CO_2培养箱中培养。

1.3 孵化囊胚正常发育能力的判定

1)体外发育。解冻后的胚胎于培养24 h以内恢复到冷冻前或继续发育的胚胎,判定为具有发育能力。

2)胚胎移植。利用细管法和OPS法的最佳冷冻组,解冻后经2~5 h培养形态正常的孵化囊胚移植于假妊娠3~4 d的受体母鼠的两侧子宫中,每侧移植5~8枚胚胎。

1.4 统计分析

采用χ^2独立性检验。

2 结果

2.1 对照组孵化囊胚恢复率

25和37 ℃条件下,将孵化囊胚在mPBS液中平衡30 min,再移入mCZB液中培养24 h后孵化囊胚恢复率均为100%。

2.2 细管法冷冻解冻后的孵化囊胚恢复率

结果表明(表1),25 ℃条件下的小鼠孵化囊胚分别在EFS30,EFS40,EDFS30和EDFS40中平衡0.5~1.5 min后冷冻保存,解冻后用方法A脱出抗冻保护剂,孵化囊胚恢复率为32.5%~74.4%,与对照组存在极显著差异($P<0.01$)。

表1 25 ℃室温条件下小鼠孵化囊胚细管一步法冷冻后的形态恢复

Table 1 Morphologically normal rates of mouse hatched blastocysts vitrified by the one-step straw method at 25 ℃

冷冻液	平衡时间/s	冻后回收胚数/枚	24 h恢复胚数/枚(恢复率/%)
EFS30	30	44	31(70.5)**
	60	44	27(61.4)**
	90	42	18(42.9)**
EFS40	30	45	27(60.0)**
	60	45	22(48.9)**
	90	40	13(32.5)**
EDFS30	30	43	32(74.4)**
	60	43	26(69.8)**
	90	41	23(56.1)**
EDFS40	30	45	29(64.4)**
	60	44	26(59.1)**
	90	39	14(35.9)**
Control	—	45	45(100)

注:**为与对照组比较差异极显著($P<0.01$)。下同。

在25 ℃条件下,细管二步法采用3种方法脱出抗冻保护剂。其中,方法C脱出抗冻保护剂效果较好,EDFS30和EDFS40组冷冻后孵化囊胚恢复率分别为87.0%和83.7%,但仍与对照组存在显著差异($P<0.05$)。方法B次之,方法A最差,且均与对照组存在极显著差异($P<0.01$)。无论采取何种方式脱出抗冻保护剂,EFS30和EFS40冷冻效果均不理想(表2)。

2.3 OPS法冷冻解冻后孵化囊胚恢复率

由实验结果(表3)看出,在37 ℃条件下OPS法冷冻保存,孵化囊胚在预处理液中平衡30 s,冷冻液中平衡25 s后冷冻的效果较好。孵化囊胚恢复率最高值达80.7%~87.2%($P<0.05$)。

实验结果表明(表4),对OPS法冷冻组解冻后,以3种方法脱出抗冻保护剂。方法C能有效脱出抗冻保护剂,EDFS30冷冻组孵化囊胚恢复率高达97.8%,为本实验最佳组;EDFS40次之,为93.3%,与对照组间差异均不显著($P>0.05$)。EDFS冷冻组采用不同方法脱出抗冻剂效果显著($P<0.05$),而EFS组各方法间差异不明显($P>0.05$)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　不同方法稀释抗冻保护剂对 25 ℃室温条件下小鼠孵化囊胚细管二步法解冻后形态恢复率的影响

Table 2　Effect of diluting procedures of CPAs on the morphologically normal rates of mouse hatched blastocysts cryopreserved by the two-step method at 25 ℃

预处理		冷冻液	平衡时间/ s	抗冻保护剂稀释	24 h 胚胎恢复率/ %
溶液	时间/ s				
10 %EG	300	EFS30	30	A	60/ 84(71. 4) a**
				B	52/ 72(72. 2) a**
				C	90/ 119(75. 6) a**
10 %EG	300	EFS40	30	A	52/ 86(60. 5) b**
				B	48/ 76(61. 8) b**
				C	50/ 78(64. 1) b**
10 %EG + 10 %D	300	EDFS30	30	A	65/ 87(74. 7) c**
				B	57/ 73(78. 1) c**
				C	107/ 123(87. 0) d *
10 %EG + 10 %D	300	EDFS40	30	A	48/ 80(60. 0) e**
				B	60/ 88(68. 2) e**
				C	72/ 86(83. 7) f *
Control	—	—	—	—	45/ 45(100)

注: * 为与对照组比较差异显著($P < 0.05$) ;不同字母表示同一冷冻组中处理方法间差异显著($P < 0.05$) ;预处理液的百分比均为体积分数。下同。

表 3　37 ℃条件下小鼠孵化囊胚 OPS 法冷冻后的形态恢复

Table 3　Survival rates of mouse hatched blastocysts vitrified by the OPS method at 37 ℃

预处理		冷冻液	平衡时间/ s	冻后回收胚数/ 枚	24 h 胚胎恢复率/ %
溶液	时间/ s				
10 %EG	30	EFS30	25	86	72(83. 7) *
	60	EFS30	25	80	65(81. 3) **
	120	EFS30	25	78	60(76. 9) **
10 %EG	30	EFS40	25	88	71(80. 7) **
	60	EFS40	25	87	70(80. 5) **
	120	EFS40	25	64	46(72. 0) **
10 %EG + 10 %D	30	EDFS30	25	94	82(87. 2) *
	60	EDFS30	25	85	72(84. 7) *
	120	EDFS30	25	88	68(77. 3) **
10 %EG + 10 %D	30	EDFS40	25	90	74(82. 2) **
	60	EDFS40	25	80	64(80. 0) **
	120	EDFS40	25	76	52(68. 4) **
Control	—	—	—	45	45(100)

2.4　胚胎移植效果

利用细管法和 OPS 法最佳组 ,解冻后经体外培养 2～5 h 形态恢复的孵化囊胚进行子宫移植。结果细管法的胚胎移植妊娠率为 50 %(6/ 12) ,产仔率为 35. 5 %(22/ 62) ;OPS 法的胚胎移植妊娠率为 60 %(6/ 10) ,产仔率为 39. 1 %(36/ 92) 。与对照组比较(67. 0 % , 39. 8 %) 差异均不显著($P > 0.05$) (表 5) 。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表4 不同方法稀释抗冻保护剂对37 ℃条件下小鼠孵化囊胚OPS法冷冻后形态恢复率的影响

Table 4 Effect of diluting procedures of CPAs on the morphologically normal rates of mouse hatched blastocysts cryopreserved by the OPS method at 37 ℃

预处理		冷冻液	平衡时间/s	抗冻保护剂稀释	24 h胚胎恢复率/%
溶液	时间/s				
10 %EG	30	EFS30	25	A	72/86(83.7)a *
				B	74/87(85.1)a *
				C	79/90(87.8)a *
10 %EG	30	EFS40	25	A	71/88(80.7)b **
				B	62/73(84.9)b *
				C	78/90(86.7)b *
10 %EG+10 %D	30	EDFS30	25	A	82/94(87.2)c *
				B	83/90(92.2)c
				C	125/128(97.8)d
10 %EG+10 %D	30	EDFS40	25	A	74/90(82.2)e **
				B	56/66(84.8)ef *
				C	84/90(93.3)f
Control	—	—	—	—	45/45(100)

表5 胚胎移植结果

Table 5 Results of embryo transfer

冷冻温度/℃	组别	受体妊娠率/%	移植胚胎数		产仔率/%
			总数	妊娠受体	
25	细管法	6/12(50)	133	62	22/62(35.5)a
37	OPS法	6/10(60)	154	92	36/92(39.1)a
—	Control	8/12(67)	142	93	37/93(39.8)a

注:相同字母为差异不显著($P>0.05$)。

3 讨 论

1)作为实验材料,孵化囊胚即将与子宫建立联系,冲取时间较难掌握且回收胚数少。因此,本实验以采取桑椹胚阶段胚胎为主,经体外培养发育到孵化囊胚后供实验使用。

2)玻璃化冷冻成功与否与玻璃化溶液有很大关系。高含量抗冻保护剂对胚胎具有化学毒性作用,含量越高其毒性作用越大[6]。实验证明,随着胚胎的不断发育,细胞膜的通透性增强[13]。玻璃化溶液中的渗透性抗冻保护剂如乙二醇和二甲基亚砜分子量较小,其通过胚胎细胞膜的速度较快[14],在短时间(25～30 s)内使细胞内外达到平衡程度,即浸入液氮中冷冻保存。本研究结果表明,采用EFS冷冻组无论用细管法还是OPS法,其孵化囊胚最高恢复率均与对照组(100 %)有显著性差异($P<0.05$)。说明高含量EG的冷冻液不适合于小鼠孵化囊胚冷冻保存。这与Zhu等[11]的研究结果一致。可能是由于EG渗入含量过高,化学毒性增大而影响了胚胎的冷冻效果。为避免单一抗冻保护剂含量过高产生的毒性作用,本实验将EG和DMSO组合使用,结果EDFS30的冷冻效果高达97.8 %,EDFS40也达到93.3 %,与对照组均无显著性差异($P>0.05$)。证明此2种抗冻剂组合使用后,既提高了抗冻剂的渗透性,又缓解了DMSO的化学毒性,玻璃化状态形成的比较彻底[14],起到了互补作用。

3)OPS法的冷冻降温速度高达20 000 ℃·min^{-1},是细管法的10倍[9]。OPS法自发明之后,就充分显示出其优越性。继而在小鼠、牛、水牛等多种动物的卵母细胞[7,9,15]及猪胚胎[16]冷冻保存方面取得了较理想的效果。在本研究中,虽然冷冻操作时温度升高至37 ℃,使抗冻保护剂的渗透速度加快,相对化学毒性增强。但由于OPS法冷冻降温速度快,使胚胎与高含量抗冻保护剂接触的时间短(<30 s),相对降低了化学毒性对胚胎的影响,同时冷

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

冻时冰晶的减少同样也降低了冷冻损伤[17] ,同样能达到理想的冷冻效果。上述研究结果为今后猪胚胎的冷冻保存提供了参考。

4)解冻时细胞内部的抗冻保护剂必须及时脱出,以解除其对胚胎的化学毒性作用[5,8]。在实际操作中,胚胎的每一种冷冻方法都对应一个最适宜的解冻操作程序(包括解冻速度、解冻液、处理时间和顺序等)。以往的研究主要集中在抗冻保护剂的筛选及其优化组合上,对解冻时脱出抗冻保护剂方法研究不多。本研究的结果表明,EDFS 冷冻组解冻后的孵化囊胚在 0.3 mol·L^{-1}蔗糖中平衡 5 min 后,移入 0.15 mol·L^{-1}蔗糖中平衡 2 min 能有效脱出抗冻保护剂。另外,胚胎移植结果证明,冷冻后的孵化囊胚移植妊娠率和产仔率与新鲜囊胚对照组没有显著性差异,说明冷冻方法是可行的,尽管本实验尚未用该方法对猪胚胎冷冻的效果做进一步研究,但可能为解决猪胚胎冷冻的技术提供重要参考。

参 考 文 献

[1] Polge C, Wilmut I, Rowson L E A. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos [J]. Cryobiology, 1974,11: 560

[2] Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages[J]. Theriogenology, 1992,37: 839～850

[3] 冯书堂,李绍楷,张元钰,等. 猪冷冻(-20 ℃)胚胎在我国移植成功[J]. 畜牧兽医学报,1993,24(1):41～44

[4] Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 ℃ by vitrification[J]. Nature, 1985, 313: 573～575

[5] Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu S E, et al. Hight survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method [J]. Biol Reprod, 1992,46: 1042～1046

[6] Kasai M, Komi J H, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreser vation in low toicity vitrification solution without appreciable loss of viability [J]. J Reprod Fertil, 1990,89: 91～97

[7] Zhu S E, Zeng S M, Wu T Y, et al. Vitrification of Bovine Oocytes by Open Pulled Straw [J]. Journal of China Agricultural Science,2002,35(6): 700～704

[8] Zhu S E, Kasai M, Otoge H, et al. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution[J]. J Reprod Fertil, 1993,98: 139～145

[9] Vajta G, Kuwayama M, Holm P, et al. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification[J]. Mol Reprod Dev, 1998,51: 53～58

[10] Zhu S E, Sakurai T, Edashige K, et al. Cryopreservation of zona-hatched mouse blastocysts[J]. J Reprod Fertil, 1996,107(1): 37～42

[11] Zhu S E, Zeng S M, Zhang Z C. Cryopreservation of rabbit hatched blastocysts by vitrification[J]. Chinese Journal of Rabbit Farming, 2001,3: 15～18

[12] Kobayashi S, Takei M, Kano M, et al. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants[J]. Cryobiology, 1998,36:20～31

[13] Jackowski S, Leibo S P, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova [J]. J Exp Zool, 1980,212: 329～341

[14] 朱士恩. 小鼠扩张囊胚细胞膜对不同抗冻保护剂通透性的测定[J]. 中国农业大学学报,1998,3(5): 110～113

[15] Dhali A, Manik K S, Das S K, et al. Vitrification of Buffalo(Bubalus bubalis) oocytes[J]. Theriogenology, 2000,53: 1295～1303

[16] Vajta G, Holm P, Greve T, et al. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method[J]. Acta Vet Scand, 1997,38: 349～352

[17] Bumsoo Hana, John C Bischof, Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing [J]. Cryobiology, 2004, 48:8～21

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net