

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

田永胜 刘本伟 陈松林

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

摘要 为避免鱼类胚胎玻璃化冷冻过程中脱玻璃化现象发生, 本文对冷冻过程中温度变化及解冻方法进行了研究。在室温 13℃ 下, 将含有玻璃化液 FVS3 的麦管直接投入到 -196℃ 的液氮中, 麦管内温度达到 -196℃ 时, 所用的时间为 15.46 ± 1.38 s, 降温速率为 800℃/min。对玻璃化麦管在 35~45℃ 水浴中解冻时间进行测定。结果显示, 解冻所需时间在 6.17~7.94 s 之间, 麦管从 -196℃ 升高到 13℃ 的解冻速率为 1500~2000℃/min。当水浴温度从 37℃ 逐步升高到 72℃ 时, 对水浴表面蒸气温度的变化进行了测定, 相应水温下蒸气温度从 25.47℃ 升高到 38.6℃。在麦管中加入不同浓度的玻璃化液 FVS1、FVS2、FVS3 和 FVS4 进行玻璃化冷冻, 然后将麦管分别在 37℃ 水浴中和 28.6℃ 的蒸气中解冻时玻璃化率进行研究。结果显示, 在蒸气中解冻时的玻璃化率明显高于水浴中解冻; 麦管玻璃化率在水浴中解冻时不稳定, 在蒸气中解冻时表现稳定, 玻璃化率随着玻璃化液浓度的升高有逐渐升高的趋势。对含有牙鲆胚胎的玻璃化冷冻麦管分别在 37℃ 水浴和 28.6℃ 蒸气中解冻, 结果表明, 蒸气中解冻时的玻璃化率同样明显高于水浴中解冻。

关键词 牙鲆 胚胎 玻璃化冷冻 温度因子 玻璃化率

中图分类号 Q65 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2008)05-0059-06

Study on temperature factor and vitrification rate in vitrification and thawing process of Japanese flounder embryos

TIAN Yong-sheng LIU Ben-wei CHEN Song-lin

(Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In order to reduce the devitrification of fish embryo during the cryopreservation process, the aspects below were studied: temperature change inside the straws during freezing and thawing processes of vitrification, thawing time of straws in water bath and effect on the vitrification when the straws thawed in water bath and vapor respectively with and without eggs. When the straws loaded with vitrification solution FVS3 were plunged into liquid nitrogen at room temperature, it took 15.46 ± 1.38 seconds for the temperature fell to -196℃ from 13℃ inside the straws, and the cooling rate of the freezing process was 800℃/min. The thawing time was 6.17~7.94 seconds when the vitrified straws were thawed in water bath (37~

国家自然科学基金项目(30570259)资助

收稿日期:2007-06-12;接受日期:2007-07-23

作者简介:田永胜(1964-),男,副研究员,博士,主要从事低温生物学研究。E-mail: tianys@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85844606

45 °C), and the warming rate of the thawing process was 1 500~2 000 °C/min. The temperature of the vapor at the surface of the water changed from 25.47 °C to 38.6 °C when the water temperature changed from 37 °C to 72 °C. The vitrified straws loaded with different vitrification solutions FVS1, FVS2, FVS3, FVS4 were thawed in water bath (37 °C) and vapor (28.6 °C) respectively, and the vitrification rate was also studied. The result showed that the vitrification rate was higher when the straws were thawed in vapor than that in water bath and the process was stable when the straws were thawed in vapor while it was unstable in the water bath. The vitrification rate showed a trend of rising as the concentration of vitrification solution rose. The vitrified straws containing embryos of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were also thawed in water bath and vapor at the temperatures mentioned above. Result showed that the vitrification rate was also higher when the straws were thawed in vapor than that in water bath.

KEY WORDS Japanese flounder Embryos Vitrification Temperature factor
Vitrification rate

对海水鱼类胚胎超低温冷冻保存研究近年来取得了明显的进展,在鲈鱼 *Lateolabrax japonicus* (田永胜等 2003)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (田永胜等 2005; Chen *et al.* 2005; 于过才等 2004)、大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (田永胜等 2005a, b) 肌节胚、尾芽胚、心跳胚和出膜前胚的玻璃化冷冻保存、程序化冷冻保存研究中取得了复活胚胎,并且孵化出生长正常的鱼苗,同时也证明玻璃化法是解决鱼类胚胎冷冻保存的有效途径,在鱼类胚胎冷冻保存上具有很大的潜力(陈松林 2002)。但是鱼类胚胎的超低温冷冻和解冻过程中,温度剧烈的变化,对于胚胎的成活起着决定性的作用;特别是鱼类胚胎的玻璃化冷冻和解冻过程中的脱玻璃化现象,成为限制鱼类胚胎冷冻成活的瓶颈。另外由于玻璃化冷冻目前还没有专门用来控制快速降温 and 升温过程的系统设备,在胚胎的冷冻过程中完成每一步实验,都要受到人为因素的影响,包括操作的熟练程度、环境的干扰等因素的影响,而且不同的人在操作同一实验时其结果可能会完全不同。为了给鱼类胚胎玻璃化冷冻和胚胎的解冻提供更多更可靠的实验依据,使玻璃化冷冻操作有据可依,作者对玻璃化冷冻和解冻过程中麦管内温度的变化与时间的关系,玻璃化麦管在不同温度水浴中解冻时所需时间,水浴表面蒸气温度的变化规律,有卵和无卵的玻璃化麦管在蒸气中解冻和在水浴中解冻玻璃化率变化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验设备和试剂

在基础液 BS2 (田永胜等 2005) 中,将 1,2-丙二醇和甲醇按 3:2 的比例配制成 32%、35%、40% 和 45% 的玻璃化液 FVS1、FVS2、FVS3 和 FVS4 (Chen *et al.* 2005; 陈松林等 2003),置于室温下备用。准备可调节温度的水浴锅,将水温调至下列实验所需要的温度。25L 液氮罐 1 个,加入 10~15L 液氮备用。在 13 °C 室温下平衡的海水 500ml 盛入烧杯,用于麦管解冻后平衡温度。利用上海理工大学研制的微机控制降温仪测定温度变化,用双笔记录仪描绘温度变化曲线。利用秒表记录冷冻时间和解冻时间。

1.2 玻璃化麦管在冷冻解冻过程中的温度测定

在 12~13 °C 室温下,利用法国生产的 CASSOU 麦管吸取 FVS3 玻璃化液 250 μ l,一端封口,将温度探头插入管内玻璃化液中;在室温下直接将麦管插入液氮中冷冻,至温度平衡在 -196.2 °C;然后将麦管取出,迅速插入 38 °C 水浴中解冻,至温度升至 13 °C 时立即将麦管移入 13 °C 海水中平衡。整个实验过程利用上海理工大学研制的微机控制降温仪测定温度变化,并用记录仪描述温度变化曲线,用秒表测定降温过程中所用的时间。

1.3 玻璃化麦管在不同温度水浴中解冻所需时间测定

在 12~13℃ 室温下,利用法国产 CASSOU 麦管吸取 FVS3 玻璃化液 250 μl ,一端封口,将温度探头插入管内玻璃化液中,将麦管投入液氮中冷冻至 -196℃,然后分别在 35~45℃ 的水浴中解冻,温度每提高 1℃ 进行 6 次实验,在解冻过程中用上海理工大学研制的微机控制降温仪测定温度,用秒表记录麦管进入水浴中至温度达到 12~13℃ 所用的时间。

1.4 水浴表面蒸气温度的测定

利用可调温水浴锅,将水浴温度分别加热到 37 和 38℃,测定水浴表面 5 mm 处的蒸气温度,然后将水浴温度从 38℃ 开始每隔 2℃ 升高 1 次,逐次将水浴温度升高到 72℃,温度每升高 1 次,在水面上 3 个不同点重复测定水浴蒸气的温度。

1.5 无卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率测定

在室温 18~19℃ 下,利用 300 μl 的麦管,分别吸入 250 μl 的玻璃化液 FVS1、FVS2、FVS3 和 FVS4,两端封口,直接投入液氮中玻璃化冷冻 1h,然后将麦管分别在水蒸气和水浴中解冻。麦管在蒸气中解冻方法为:将水浴温度提高到 50℃,此时水浴表面蒸气温度为 28.6℃ 左右,将麦管从液氮中取出,与水面平行放在水浴蒸气中解冻。麦管在水浴中解冻方法为:将水浴温度加热到 37℃,将麦管从液氮中取出直接插入水浴中解冻。每次解冻 10 支麦管,实验重复 3~5 次,解冻的同时观察并统计玻璃化麦管数,计算玻璃化率。

1.6 有卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率测定

在室温 18~19℃ 下,分别利用玻璃化 FVS3 和 FVS4 逐步平衡牙鲆尾芽期胚 40min,将含有胚胎的玻璃化液吸入 300 μl 的麦管,每管吸入 250 μl 的玻璃化液,每管含有胚胎 5 粒,封口后玻璃化冷冻保存,后分别在水浴和蒸气中解冻,冷冻和解冻方法与 1.5 相同,实验重复 9 次,统计麦管在解冻时的玻璃化率。

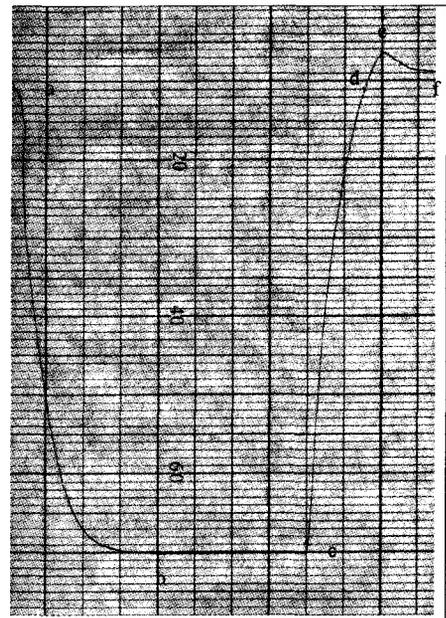
1.7 数据处理

实验数据利用 SPSS 统计软件中单因素方差分析(One way ANOVA)进行处理,不同数据组之间均值利用最小显著极差法(LSR 法)进行多重比较,比较结果用字母标记法(a, b, c, d...),在图表中表示标准差的马齿上方的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 玻璃化麦管在液氮中冷冻和水浴解冻过程中温度变化

图 1 显示了 FVS3 玻璃化液利用麦管进行冷冻和解冻过程中温度的变化曲线,整个曲线呈“u”字型;a~b 为降温过程,温度从 13℃ 降到 -196.20℃,b~c 为麦管在液氮中的平衡过程,c~d 为麦管在 38℃ 水浴中解冻过程,d~e~c 为将麦管从 38℃ 水浴中移入 13℃ 海水中平衡的过程,a, b, c, d, e, f 各点的温度分别为 13、-196.20、-196.20、13、23.44 和 16.48℃。在麦管冷冻过程中温度从 13℃ 降



a, b, c, d, e, f 各点的温度分别为 13、-196.20、
-196.20、13、23.44 和 16.48℃

The temperature of a, b, c, d, e and f were 13, -196.20,
-196.20, 13, 23.44 and 16.48℃, respectively

图 1 麦管中玻璃化液在冷冻和
解冻过程中温度变化曲线

Fig. 1 Temperature curve of vitrification solution
in straws during cooling and thawing

到 $-196.20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 所用的时间为 $15.46\pm 1.38\text{ s}$ ($n=12$)。可见在无胚胎的情况下将含有玻璃化液的麦管从室温($13\text{ }^{\circ}\text{C}$)降至 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$,降温速率大约在 $800\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

2.2 玻璃化麦管在不同水浴温度中解冻的时间

表1和图2显示了玻璃化麦管在 $35\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻时所需时间的变化情况,在此温度范围内,将麦管内玻璃化液温度升至 $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,冷冻玻璃化麦管解冻时间随着温度的升高而逐渐缩短,最长时间 $7.94\pm 0.73\text{ s}$,最短时间 $6.17\pm 0.51\text{ s}$ 。在 $35\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻时间与 $42\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻时间相比有显著性差异($P<0.05$), $38\sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻时间无显著性差异($P>0.05$); $38\sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻时间为 $6.67\pm 0.49\text{ s}\sim 7.24\pm 0.36\text{ s}$ 。从 $35\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的解冻时间来看,麦管从 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升高到 $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的解冻速率约在 $1\ 500\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 2\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

2.3 水浴表面蒸气温度测定结果

图3显示了水浴温度在 $37\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内时,水浴表面蒸气的温度变化,随着水浴温度的升高,表面蒸气的温度也随之升高。在此范围内水浴表面蒸气的温度在 $25.47\sim 38.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间变化。根据数据分析结果将水浴表面蒸气温度的变化划分为11个区间:水浴温度在 $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,表面蒸气温度在 $25.47\sim 25.67\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $42\sim 46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $26.57\sim 27.5\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $48\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $28.4\sim 28.6\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $52\sim 54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $29.73\sim 30.33\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $56\sim 58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $31.3\sim 31.67\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $60\sim 62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $32.27\sim 32.7\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $64\sim 68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $35.73\sim 37.13\text{ }^{\circ}\text{C}$;水浴温度为 $70\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,蒸气温度为 $38.27\sim 38.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以上11个温度划分区间内, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下蒸气温度由于实验误差造成反常外,在每一个区间内水浴表面蒸气温度无显著性

表1 玻璃化麦管在不同水浴温度下解冻时所用时间(s , $n=6$)

Table 1 The thawing time of vitrification straw at different temperatures ($n=6$)

解冻温度 Thawing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	平均解冻时间 Average thawing time (s)
35	7.94 ± 0.73
36	7.84 ± 0.97
37	7.93 ± 0.38
38	7.24 ± 0.36
39	7.11 ± 0.46
40	6.75 ± 0.68
41	7.02 ± 0.17
42	6.67 ± 0.49
43	6.17 ± 0.51
44	6.21 ± 0.38
45	6.56 ± 0.28

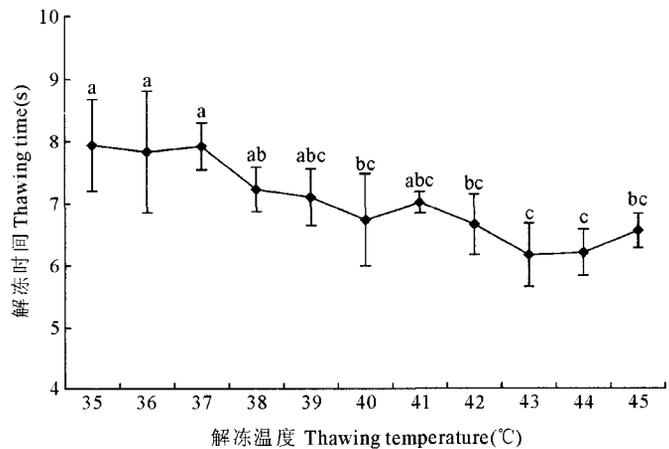


图2 玻璃化麦管在不同水浴温度下解冻时间变化曲线($n=6$)
Fig. 2 Thawing time at different water bath temperature ($n=6$)

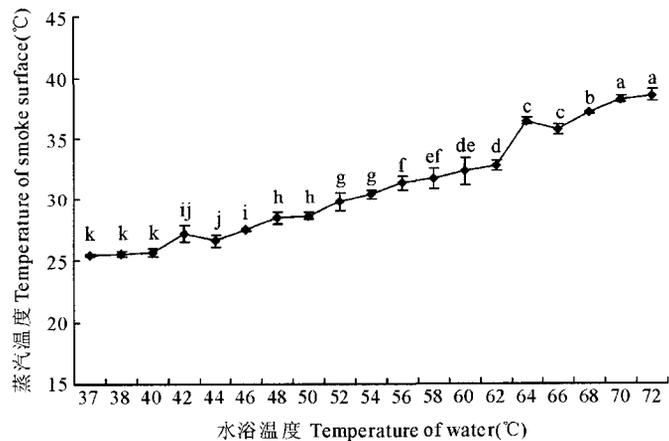


图3 不同水浴温度下表面蒸气温度变化($n=3$)
Fig. 3 Temperature change of vapour at different water bath temperature ($n=3$)

差异($P>0.05$),但各个区间之间具有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 无卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率比较

图 4 为玻璃化液 FVS1、FVS2、FVS3 和 FVS4 分别在 37℃ 水浴中和 28.6℃ 的水浴蒸气中解冻时玻璃化的保持率;FVS1~FVS4 四种玻璃化液在麦管中进行玻璃化冷冻后,在 37℃ 水浴中解冻时的玻璃化率分别为:45.8±1.39%、48.27±1.50%、20.38±5.98%和 30.08±5.43%,玻璃化率的变动没有规律性,其变化主要与实验时室温较高有关。32%和 35%的玻璃化液解冻时玻璃化率无显著性差异($P>0.05$),与 40%和 45%玻璃化液比较都有显著性差异($P<0.05$)。4 种玻璃化液在蒸气中解冻时的玻璃化率分别为:77.77±6.93%、85.78±2.12%、89.68±3.72%和 89.38±4.19%,32%玻璃化液与其他 3 种玻璃化液相比有显著性差异($P<0.05$),35%、40%和 45%的玻璃化液在解冻时的玻璃化保持率无显著性差异($P>0.05$),但玻璃化率随着玻璃化液浓度的升高有逐渐升高的趋势,与水浴中解冻相比玻璃化率较高而且稳定性较好。

2.5 有卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率比较

图 5 显示了含有牙鲆尾芽胚的麦管经过玻璃化冷冻后,分别在 37℃ 水浴中和 28.6℃ 的水浴蒸气中解冻时玻璃化的保持率;利用 FVS3 (40%)平衡后玻璃化冷冻保存的牙鲆胚胎,在水浴中解冻时的玻璃化保持率为 29.15±19.98%,在蒸气中解冻时的玻璃化保持率为 73.04±17.95%,具有显著性差异($P<0.05$)。利用 FVS4 (45%)五步法平衡的牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存后在水浴中解冻时的玻璃化保持率为 30.77±21.15%,在蒸气中解冻时的玻璃化保持率为 69.99±17.49%,二者具有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

在玻璃化冷冻过程中,利用极快的速度将麦管投入液氮中时,温度相对较高的麦管使周围液氮气化形成蒸气层,这样在麦管和液氮之间形成一个绝热层,使麦管中的玻璃化液和胚胎的温度不能立即降至液氮温度(Arav *et al.* 2002),从“玻璃化麦管在冷冻和解冻过程中温度变化”和“玻璃化麦管在不同水浴温度解冻时间变化”两个实验中可以看出,玻璃化冷冻和解冻过程中的温度变化是一个迅速降温 and 升温的过程,从室温 13℃ 冷至 -196℃ 需要 15.46 s,冷冻速率约为 800℃/min。这一降温速率麦管都可形成玻璃化。在 38℃ 水浴中解冻,使麦管内玻璃化液温度达到 13℃ 左右需要 7.24 s,解冻速率约为 1700℃/min。在 35~45℃ 水浴解冻过程中玻璃化麦管的解冻时间在 6.21

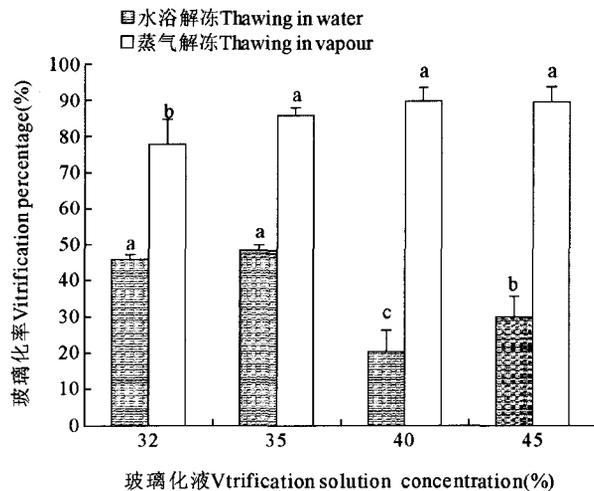


图 4 无卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率($n=3\sim5$)
Fig. 4 Vitrification percentage of the straw without eggs thawing in water bath and vapour ($n=3\sim5$)

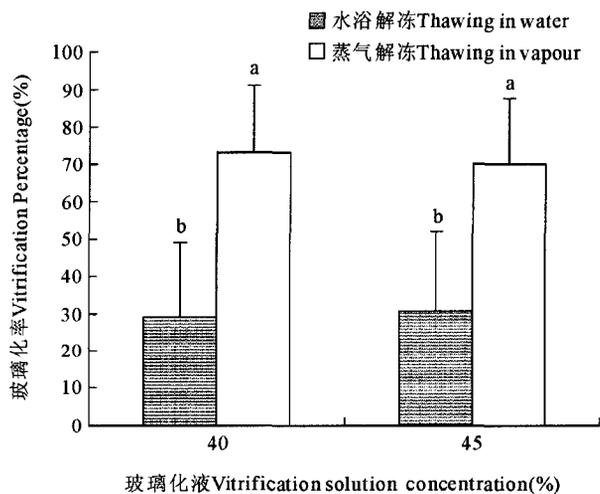


图 5 有卵玻璃化麦管在水浴和蒸气中解冻时玻璃化率($n=9$)
Fig. 5 Vitrification percentage of the straw with eggs thawing in water bath and vapour($n=9$)

~7.94 s,解冻时间快于冷冻时间,几乎是冷冻时间的1/2,解冻速率约为1 500~2 000 °C/min。Shaw等(1997)认为趋向于脱玻璃化的解冻速率在1 000 °C/min,在家畜胚胎的玻璃化冷冻中玻璃化麦管从液氮中直接进入水浴中的解冻速率约为2 000 °C/min(-196~0 °C/5s),麦管从液氮中直接进入空气中的解冻速度约为1 697 °C/min(-196~7 °C/60~80 s)(Shaw *et al.* 1997)。有人认为正确的复温过程是冷却过程的函数,应针对不同的冷却过程选择不同的复温过程,但这方面人们研究的极少。一般建议,如冷却速率快,那么相应的复温速率也要快,在绝对值上复温速率总要比冷却速率高得多(李广武等 1998)。

从解冻温度曲线的变化过程中看出,当玻璃化麦管在水浴中解冻温度快速达到13 °C,将麦管迅速从水浴中拿出时玻璃化液温度还会继续升高,图1中d~e所示,为了使玻璃化液在解冻中温度不会升得太高,作者采取了解冻后将麦管在13 °C水浴中平衡的办法,这样可有效地限制玻璃化液温度的过分升高,这样在胚胎解冻中不会因解冻后温度的过分升高而导致胚胎死亡。在实验中观察到,玻璃化麦管在解冻过程中会产生从透明到乳白,再到透明的变化过程,麦管中乳白色即将消失时将麦管从水浴中拿出,此时麦管内的温度在13 °C左右,这一特点在鱼类胚胎冷冻中可作为解冻温度的观察特征,以供实验者参考。

在不同水浴温度下对玻璃化麦管的解冻时间进行测定研究,未能查阅到相关资料。在这一实验中显示了随着解冻水温的升高,解冻时间有逐渐变短的趋势,虽然图2中37、41和45 °C几个点的解冻时间出现波动,但方差分析结果显示,其解冻时间与前几个温度点相比有显著性降低。这一实验为鱼类胚胎冷冻后解冻时间的掌握提供了依据,胚胎在38~42 °C水浴中解冻时间可控制在6.67~7.24 s。因为玻璃化冷冻后的解冻是相当重要的一步,解冻方法不当会使整个冷冻过程前功尽弃。从玻璃化冷冻的经验看,胚胎在冻前玻璃化液中成活率是可控制的,在冷冻中也可使麦管的玻璃化率达到57%~78%(田永胜等 2004),但解冻时脱玻璃化现象及解冻过程中麦管内温度的失控是一个难于解决的问题,这也可能是制约冻后胚胎成活的主要因素。

为此作者探索了一种“蒸气解冻法”,将水浴锅从37 °C加热至72 °C时,对水温每升高2 °C时水浴表面蒸气温度进行了测量,研究表面蒸气温度的变化规律和找寻适合于玻璃化麦管解冻的蒸气温度,从实验结果可以看出,水浴温度在37~72 °C时,水浴表面蒸气温度为25.47~38.6 °C,将装有不同浓度的玻璃液的冷冻麦管(玻璃化液中不含有卵)在28.6 °C的蒸气中解冻时,表现出较稳定的玻璃化率,很少发生因脱玻璃化而导致的麦管爆裂现象,解冻时麦管的玻璃化率在77.77%~89.68%,体现出随着玻璃化液浓度升高其玻璃化率也相应提高的趋势。而水浴中解冻麦管的玻璃化率低,且不稳定,从理论上讲,随着玻璃化液浓度的提高,冷冻和解冻时玻璃化率也相应的提高,但是在实验中由于室温的变化,解冻时水面的冲击力等因素的影响,使水浴解冻的玻璃化率并未体现出规律性的变化。将含有牙鲆尾芽期胚胎和玻璃化液(FVS3或FVS4)的麦管采用玻璃化法冷冻保存,然后分别在水浴和蒸气中解冻,同样显示出在蒸气中解冻的玻璃化率较水浴中解冻的玻璃化率高,可见玻璃化麦管在蒸气中解冻优于水浴解冻。

参 考 文 献

- 于过才,陈松林,孔晓瑜,田永胜,季相山. 2004. 鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究. 海洋水产研究, 25(1):1~4
- 田永胜,陈松林,严安生,季相山,于过才. 2003. 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存. 动物学报, 49(6):843~850
- 田永胜,陈松林,严安生. 2005. 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究. 高技术通讯, 15(3): 105~110
- 田永胜,陈松林,严安生. 2005a. 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存. 水产学报, 29(2):275~280
- 田永胜,陈松林,于过才,季相山. 2005b. 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存. 水产学报, 29(2):275~280
- 田永胜. 2004. 3种海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究. 见:华中农业大学水产学院博士论文
- 李广武,郑从义,唐兵. 1998. 低温生物学. 长沙:湖南科学出版社, 41~59
- 陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展和前景展望. 水产学报, 26(2):161~168
- 陈松林,田永胜. 鱼类胚胎玻璃化冷冻保存方法. 中国,发明专利,03112417.8. 3003-3-6
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Dekel, I., and Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 77~81
- Chen, S. L., and Tian, Y. S. 2005. Cryopreservation of flounder embryos by vitrification. *Theriogenology*, 63(4):1 207~1 219
- Shaw, J. M., Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., and Trounson, A. O. 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or Dextran. *Cryobiology*, 35: 219~229