

文章编号: 1000-0615(2007)04-0431-06

## 中华鲟胚胎细胞的冷冻保存及其核移植

余来宁<sup>1</sup>, 危起伟<sup>2</sup>, 张繁荣<sup>1</sup>, 杨东<sup>1</sup>, 姚雁鸿<sup>2</sup>, 刘红艳<sup>1</sup>

(1. 江汉大学医学与生命科学学院, 湖北 武汉 430056;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

**摘要:** 为了保存濒危鱼类中华鲟种质资源, 对其囊胚细胞和原肠细胞进行了冷冻保存和核移植试验。用二甲亚砜(DMSO)、1,2-丙二醇(PG)、羟乙基淀粉(HES) 3种抗冻剂, 配制4种冷冻保护液: CP1(12% D)、CP2(10% P)、CP3(8% D + 6% E)、CP4(7% P + 6% E), 冷冻细胞存活率分别为  $47.4\% \pm 4.7\%$ 、 $64.4\% \pm 3.6\%$ 、 $54.7\% \pm 4.7\%$ 、 $76.7\% \pm 5.7\%$ , CP4保存效果最好, 说明添加非渗透型抗冻剂羟乙基淀粉能提高冷冻保存细胞的存活率。比较了两种冷冻方法, 发现细胞在  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  平衡 30 min 之后直接投入液氮的一步冷冻降温法是可行的。对不同发育时期的胚胎细胞冷冻存活率进行了比较, 结果表明原肠细胞冷冻存活率( $64.4\% \pm 11.8\%$ )明显比囊胚细胞的( $57.1\% \pm 11.2\%$ )高( $P < 0.05$ )。用冷冻复苏后的囊胚细胞和原肠细胞作供体, 以中华鲟未受精卵作受体进行核移植, 各移植了 469 和 392 枚卵, 分别获得了 5 尾和 2 尾克隆鱼, 核移植成功率分别为 1.1% 和 0.5%。表明可通过冷冻保存胚胎细胞结合核移植技术保存鱼类种质资源。

**关键词:** 中华鲟; 胚胎细胞; 冷冻保存; 核移植

**中图分类号:** S 917      **文献标识码:** A

## Cryopreservation and nuclear transplantation of Chinese sturgeon's embryonic cells

YU Lai-ning<sup>1</sup>, WEI Qi-wei<sup>2</sup>, ZHANG Fan-rong<sup>1</sup>, YANG Dong<sup>1</sup>, YAO Yan-hong<sup>2</sup>, LIU Hong-yan<sup>1</sup>

(1. Medical and Life Science School, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;

2. Changjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

**Abstract:** To preserve the genetic resources of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), a kind of fish on the verge of extinction, its blastula cells and gastrulae cells have been cryopreserved in  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  liquid nitrogen and gone through nuclear transplant experiment. 4 cryoprotectant solution, i. e., CP1 (12% D), CP2 (10% P), CP3 (8% D + 6% E) and CP4 (7% + 6% E) compounded with 3 cryoprotectants, i. e., dimethylsulfoxide (DMSO), 1,2-propylene glycol (PG) and hydroxyethyl starch (HES), and survival rates of cryopreserved cells are  $47.4\% \pm 4.7\%$ ,  $64.4\% \pm 3.6\%$ ,  $54.7\% \pm 4.7\%$  and  $76.7\% \pm 5.7\%$  respectively. CP4 has the best effect in preservation. It illustrates that non-penetrant cryoprotectant, hydroxyethyl starch can improve the survival rate of

收稿日期: 2006-03-06

资助项目: 国家自然科学基金(30370701)

作者简介: 余来宁(1948-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 博士生导师, 主要从事鱼类遗传育种及生物技术研究。Tel: 027-84230509,

E-mail: yulainig@vip.sina.com

cryopreserved cells. The method of cooling by chilling that cells are put in liquid nitrogen directly after being balanced for 30 minutes at the temperature of  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  is feasible after two freezing ways are compared. The survival rates of cryopreserved embryonic cells are compared in different development stages, the survival rates of cryopreserved blastula cells and gastrulae cells are  $57.1\% \pm 11.2\%$  and  $64.4\% \pm 11.8\%$  respectively. Results indicated that the survival rates of cryopreserved gastrulae cells are higher than blastula cells ( $P < 0.05$ ). With revival blastula cells and gastrulae cells as donors and unfertilized ova of the Chinese sturgeon as donees, nuclear transplantation experiment has been made, during which, 469 and 392 ova were transplanted respectively with a result of 5 and 2 cloned fish, the success rate of nuclear transplantation was 1.1% and 0.5%. It proves that genetic resources can be preserved by cryopreserved embryonic cells combined with nuclear transplanting technology.

**Key words:** *Acipenser sinensis*; embryonic cell; cryopreservation; nuclear transplantation

低温冷冻技术是保存生物细胞、组织、器官和胚胎的重要手段,现已广泛应用于生物实验材料和种质资源的保存。在农业上,世界各国建立了作物种质资源冷库,保存谷类、豆类、油类、蔬菜、花卉等种子<sup>[1]</sup>;在畜牧业上,已成功地冻存了牛、马、山羊、绵羊、狍、兔、小鼠等 16 种哺乳动物的卵子或胚胎,并通过胚胎移植和克隆等生物技术得到了大量的良种牛崽;在濒危动物保护方面,我国已建立低温种质库成功地保存了大熊猫精子<sup>[2]</sup>,并开展了异种核移植的研究<sup>[3]</sup>,这对挽救珍稀濒危物种具有重要意义。

在鱼类方面,虽然精子的冷冻保存已经成功<sup>[4]</sup>,但鱼类胚胎的冷冻保存难度却大得多。鱼类的卵子一般都很大(大于 0.5 mm),而且含有很多卵黄,这是影响鱼类胚胎的冷冻成功保存的主要原因。中华鲟(*Acipenser sinensis*)是我国特有的珍稀濒危大型洄游性鱼类,素有“水中大熊猫”之称,已列为国家一级保护动物,如能冷冻保存其卵子或胚胎,无疑对濒危中华鲟的保护是非常有意义的。但由于中华鲟卵子特别大(大于 4 mm),且卵黄多,直接保存完整的卵子或胚胎难以成功,必须另辟蹊径。因此,作者着手探索新的途径,即:冷冻保存由胚胎上分离下来的囊胚细胞或原肠细胞,之后将复苏的细胞通过细胞核移植技术获得成活的胚胎或幼鱼,目前尚未见此类报导。本实验对胚胎细胞的不同分离方式、冷冻保护液、冷冻方法以及复苏后细胞核移植效果进行了初步的比较研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 中华鲟胚胎细胞的来源和分离

中华鲟卵和胚胎由中国水产科学研究院长江水产研究所中华鲟试验基地提供。待中华鲟受精卵发育至囊胚期、原肠期时,采取以下 2 种方式分离细胞:

(1)将已去膜的卵(30 枚左右)放于盛有 5 mL 生理盐水(0.9%)的离心管中,用吸管吹打,使细胞分散,低速离心收集细胞。

(2)将已去膜的卵放入盛有分离液的小皿中,用镊子和发圈把胚盘切下来并分散成单个细胞。

### 1.2 主要试剂

稀释液 1000 mL 蒸馏水中含 NaCl 8.00 g, KCl 0.40 g, CaCl<sub>2</sub> 0.14 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.20 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.06 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, 葡萄糖 1.00 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.35 g。

分离液 100 mL 蒸馏水中含 NaCl 0.35 g, KCl 0.005 g, EDTA 55.80 mg, NaHCO<sub>3</sub> 0.02 g。

冷冻保护液 以上述稀释液作稀释剂,用二甲亚砜(DMSO)、1,2-丙二醇(PG)、羟乙基淀粉(HES)配制冷冻保护液,经预试验筛选出以下 4 种冷冻保护液,分别为 CP1(12% DMSO)、CP2(10% PG)、CP3(8% DMSO + 6% HES)及 CP4(7% PG + 6% HES)。

### 1.3 冷冻方法

一步法 将细胞放入盛有 0.1 mL 冷冻保护液的冷冻管中,置  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  平衡 30 min 之后直接投入液氮( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ )中保存。

二步法 将细胞放入盛有 0.1 mL 冷冻保护液的冷冻管中,置 0 °C 平衡 10 min,再置 -20 °C 平衡 30 min 之后投入液氮(-196 °C)中保存。

#### 1.4 复温方法

取出经低温保存的细胞冷冻管在 37 °C 水浴中快速解冻,用 Holtfreter 氏液稀释洗涤 2 次。

#### 1.5 细胞活率检测

解冻后的细胞用台盼蓝拒染法检测其存活率。

#### 1.6 细胞核移植及胚胎发育率

用经短期液氮保存(0.5 ~ 8 h)的细胞解冻后作供体,以中华鲟未受精卵作受体进行核移植,方

法参照文献[5]。移植后的胚胎在 Holtfreter 氏液中培养,并在不同发育阶段检测其发育率。

#### 1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 for-windows 统计软件,对实验数据进行配对样本的统计分析和 *t* 检验(Paired-Samples *T* Test)。

## 2 结果与分析

以 4 种冷冻保护液,采用两种分离方法和两种冷冻方法分别对发育至囊胚期和原肠期的中华鲟胚胎细胞进行了冷冻保存实验,实验结果复苏胚胎细胞存活率见表 1。

表 1 中华鲟胚胎细胞冷冻保存复苏后的存活率

Tab.1 Livability of cryopreserved embryonic cells of Chinese sturgeon

冷冻剂 cryoprotectant solution	分离方法 separate method	囊胚细胞冻后活率(%) survival rates of cryopreserved blastula cells				原肠细胞冻后活率(%) survival rates of cryopreserved gastrulae cells			
		一步法冷冻 one-step freezing		二步法冷冻 two-step freezing		一步法冷冻 one-step freezing		二步法冷冻 two-step freezing	
CP1	(1)	40.3	42.5	44.8	43.6	48.5	47.7	51.7	52.1
	(2)	44.8	41.4	49.9	45.0	46.6	47.3	54.6	56.8
CP2	(1)	59.5	60.1	63.7	62.2	64.6	63.8	67.7	69.4
	(2)	62.9	61.3	61.1	61.4	65.0	66.8	69.5	70.9
CP3	(1)	50.1	49.5	53.7	51.8	54.4	59.0	64.3	58.5
	(2)	48.3	50.6	50.4	51.3	56.1	59.0	59.8	58.6
CP4	(1)	65.2	70.5	70.3	73.3	76.5	80.6	80.2	82.7
	(2)	76.1	74.6	76.2	71.6	77.0	80.8	86.5	84.3

#### 2.1 两种分离方法的比较

分离方法(1)吸管吹打离心收集细胞与方法(2)发圈分散细胞比较,两种方法分离细胞冷冻保存后的存活率无显著差异( $P > 0.05$ ):方法(1)为  $60.1\% \pm 11.7\%$ ,方法(2)为  $61.5\% \pm 12.5\%$ 。但方法(1)耗时明显短于方法(2),一般分离 30 枚

卵,方法(1)仅需 10 min 左右,而方法(2)却需 35 min 左右。因此,方法(1)优于方法(2)。

#### 2.2 4 种冷冻保护液效果比较

用 SPSS13.0 for-windows 统计软件对上述结果进行统计分析,4 种冷冻保护液保存细胞的平均存活率及其比较见表 2。

表 2 4 种冷冻保护液保存中华鲟胚胎细胞存活率比较

Tab.2 Comparison of 4 cryoprotectant solutions in livability of cryopreserved embryonic cells of Chinese sturgeon

冷冻保护液 cryoprotectant solution	配方 solution component	n	平均存活率(%) survival rate of cells	效果比较(差异显著性检验) test of significance of difference			
				CP1	CP2	CP3	CP4
CP1	12% D	16	47.4 ± 4.7		-17.0 * *	-7.4 *	-29.3 * *
CP2	10% P	16	64.4 ± 3.6	$P < 0.01$		9.7 * *	-12.3 * *
CP3	8% D + 6% H	16	54.7 ± 4.7	$P < 0.05$	$P < 0.01$		-21.9 * *
CP4	7% P + 6% H	16	76.7 ± 5.7	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	

\*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$

结果显示,冷冻保护液 CP4 对中华鲟胚胎细胞的保存效果最好,保存细胞的存活率平均为

76.7%,其次是 CP2(64.4%)和 CP3(54.7%),最差的是 CP1(47.4%),即  $CP4 > CP2 > CP3 > CP1$ 。

从效果比较可以看出:10%的1,2-丙二醇(CP2)比12%的二甲亚砷(CP1)对中华鲟胚胎细胞的保存效果好( $P < 0.01$ ),复合型的冷冻液,即添加6%的羟乙基淀粉可显著提高保存效果,CP3比CP1保存效果(存活率)提高7.4%( $P < 0.05$ );CP4比CP2保存效果提高12.3%( $P < 0.01$ )。

### 2.3 两种冷冻方法的比较

一步法降温冷冻保存细胞的平均存活率为 $59.1\% \pm 12.0\%$ ,二步法为 $62.4\% \pm 11.9\%$ ,二步法略高,但无显著性差异( $P > 0.05$ ),而一步法程序更为简捷和省时。

### 2.4 不同发育期胚胎细胞冷冻存活率比较

囊胚细胞冷冻存活率为 $57.1\% \pm 11.2\%$ ,原

肠细胞冷冻存活率为 $64.4\% \pm 11.8\%$ ,原肠细胞冷冻存活率明显比囊胚细胞的高( $P < 0.05$ )。分析原因,主要是由于原肠细胞体积比囊胚细胞小的缘故。

### 2.5 复苏细胞的核移植

用经液氮( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ )保存后复苏的囊胚细胞核和原肠细胞核作供体,以中华鲟未受精卵作受体进行了核移植实验,分别移植了469枚和392枚卵,各获得5尾和2尾幼鱼,核移植成功率分别为1.1%和0.5%。各发育阶段的胚胎形态见图1,说明经液氮冷冻保存的囊胚细胞和原肠细胞通过核移植技术可以获得成活的克隆鱼。核移植卵的分裂和发育情况见表3。

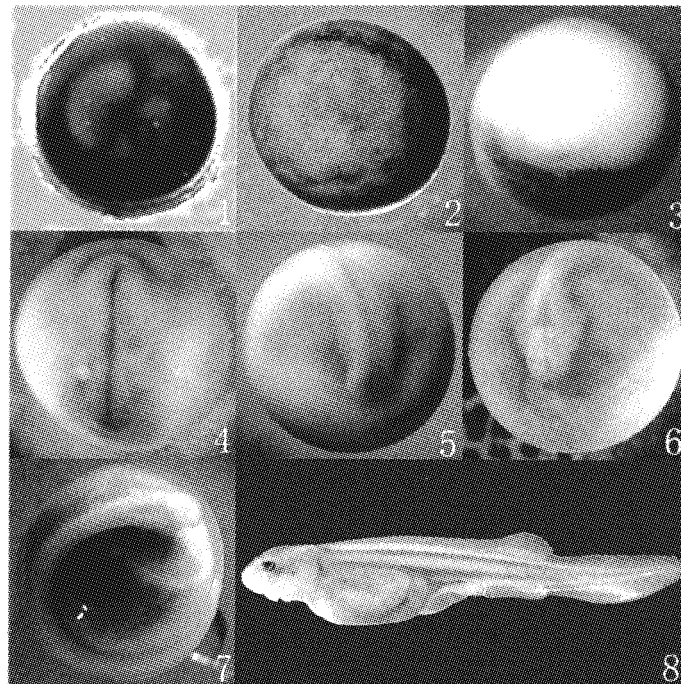


图1 冷冻保存的中华鲟胚胎细胞核移植卵的早期发育

Fig.1 Early development of the nuclear transplant egg transplanted with the cryopreserved embryonic cells of Chinese sturgeon

1: 二细胞期, 2: 囊胚期, 3: 原肠期, 4: 胚孔期, 5: 尾芽期, 6: 心动期, 7: 孵出前期, 8: 克隆幼鱼

1: 2-cell stage; 2: blastula stage; 3: gastrula stage; 4: blastopore stage;

5: tail bud; 6: heart beat stage; 7: before hatched stage; 8: cloned larvae

经统计分析可以看出,冷冻保存的囊胚细胞核移植卵各阶段的发育率比对照组(未冷冻的囊胚细胞)低,有显著差异( $P < 0.05$ ),这说明冷冻对细胞有损伤。而冷冻保存的囊胚细胞核移植卵各阶段发育率比原肠细胞明显较高( $P < 0.05$ )。其主要是由于原肠细胞核的发育全能性比囊胚细胞核差的原因。

## 3 讨论

### 3.1 中华鲟的资源状况及挽救措施

中华鲟在地球上已生存了2亿多年<sup>[6]</sup>,是世界27种鲟鱼中最珍稀的大型洄游性鱼类,为中国独有。中华鲟一生主要生长在海洋里,只有到了性成熟期(雌性14年以上,雄性8年以上),才从

表 3 中华鲟胚胎细胞冷冻复苏后核移植卵的发育存活率

Tab.3 The survival nuclear transplants eggs transplanted with the cryopreserved embryonic cells of Chinese sturgeon

供体 donor cell	受体 donees	移植卵数 transplanted eggs	卵裂数 egg division	囊胚数 blastulae	原肠胚数 gastrulae	心动胚数 heart beat	仔鱼数 larvae
冷冻囊胚细胞核 refrigerated blastulae cell nucleus	未受精卵 unfertilized eggs	469 (100%)	315 (67.2%) **	201 (42.9%)	135 (28.8%)	79 (16.8%)	5 (1.1%)
冷冻原肠细胞核 refrigerated gastrulae cell nucleus	未受精卵 unfertilized eggs	392 (100%)	227 (57.9%)	146 (37.2%)	91 (23.2%)	38 (9.7%)	2 (0.5%)
对照 * control *	未受精卵 unfertilized eggs	83 (100%)	68 (81.9%)	57 (68.7%)	31 (37.3%)	22 (26.5%)	2 (2.4%)

注: \* 对照为未冷冻的囊胚细胞核; \*\* 括弧内为发育存活率

Notes: \* control is blastulae cell nucleus; \*\* in bracket is develop livability, same as follow

海洋进入长江,上溯 2000 ~ 3000 km 到达长江上游至金沙江下流江段产卵繁殖。1981 年葛州坝水利枢纽截流后,中华鲟产卵群体被阻隔在葛州坝以下江段,洄游江段缩短了 26.5% ~ 40.4%,中华鲟原有的繁殖生态条件被改变,这是导致其资源量下降的主要原因。为此我国将中华鲟列为国家一级保护动物,并采取了建立保护区、禁此捕捞以及人工增殖放流等多项措施。截止 1998 年已在长江人工放流中华鲟 6300 多万尾<sup>[7]</sup>。尽管如此,但从 1981 年至 1999 年间,中华鲟的幼鲟补充群体和亲鲟群体仍分别减少了 80% 和 90%<sup>[8]</sup>。世界自然资源保护监测中心公布的调查报告称:中国“长江鱼王”中华鲟的资源量已不足 3000 尾,而且仍在以惊人的速度锐减<sup>[9]</sup>。因此,研究中华鲟胚胎细胞的冷冻保存及其克隆技术十分必要,旨在开辟在细胞水平上保存濒危物种的新途径,本研究用液氮(-196℃)保存后复苏的中华鲟囊胚细胞核和原肠细胞核作克隆实验,获得了成活的冷冻细胞克隆鱼,表明该途径是可行的。根据低温生物学的理论,低温能抑制生物体的生化活动,从而使生物体能在低温下长期保存。若生物体在 4℃ 环境下能存活 2 h,那么按理论上推算,它在 -40℃ 下能保存数日,在 -80℃ 下可保存数月,而在 -196℃ (液氮温度)下可望保存几个世纪。Rowe<sup>[2]</sup>将在液氮温度下保存了 12 年的红细胞复温后进行检查,没有发现任何生化和功能上的变异,证明了生物材料可以在低温下长期保存。至于囊胚细胞和原肠细胞在液氮中长期保存结果如何还有待进一步的验证。

### 3.2 冷冻保护液和冷冻方法的筛选

冷冻损伤的“两因素假说”认为造成冷冻损伤

有两个独立的因素:一是胞内冰晶的形成,造成细胞骨架和膜结构被破坏;另一是溶质损伤,即细胞暴露在高浓度的溶液中而遭损伤<sup>[10]</sup>。因此,针对不同的保存对象选择不同的冷冻保护液和采用不同的降温方法是冷冻保存能否成功的关键。目前鱼类精子冷冻保存一般主要采用二甲亚砜、甲醇和甘油三种抗冻剂,并已取得了较大的成功<sup>[4]</sup>。在鱼类囊胚细胞冷冻保存研究上,也曾采用二甲亚砜作为抗冻剂,对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的囊胚细胞进行了超低温(-196℃)保存,得到了 36% 的存活率。以 1,2-丙二醇为抗冻剂,对虹鳟囊胚细胞进行超低温(-196℃)保存,存活率为 88% ~ 95%<sup>[11-12]</sup>,说明 1,2-丙二醇比二甲亚砜效果要好,这与本文的研究结果是基本一致的(前者 64.4%,后者 47.4%, $P < 0.01$ )。在本研究中我们试用了非渗透性抗冻剂羟乙基淀粉(HES),结果添加羟乙基淀粉的冷冻保护液保存细胞的存活率明显提高。羟乙基淀粉的毒性小,能溶于水,但不能进入细胞,在过冷状态下能降低溶质浓度,从而起到保护作用。因此添加羟乙基淀粉可提高冷冻保存的存活率。这种复合的细胞内外冷冻保护剂正在逐步替代单一的细胞内冷冻保护剂<sup>[13]</sup>。

在冷冻过程中,不同的细胞要求不同的最佳降温速率。若降温速率过快,则在胞内形成冰晶使细胞受损;若降温速率过慢,则细胞收缩过剧。并且细胞处在高浓度溶液中的时间过长也会引起损伤,这个过程是传热和渗透两个因素相互作用的过程<sup>[10]</sup>。因此,对不同的细胞选择不同的冷冻降温方法,使两个因素呈最好的配合对降低冷冻损伤十分重要。一般体积较大的细胞要求降温速

度更慢。对于体积小的鱼类精子或人类红细胞,一般采用两步降温法先在 0℃放置 10 min,再在 -20℃放置 30 min,然后直接放入液氮中保存。中华鲟的囊胚细胞比红细胞略大,采取上述二步降温法,从本研究的结果来看是同样可行的。在此基础上,我们对比试验了一步降温法,即细胞置 -7℃平衡 30 min 之后直接投入液氮中保存。从试验结果可以看出,二步法保存细胞的存活率为  $62.4\% \pm 11.9\%$ ,一步法为  $59.1\% \pm 12.0\%$ ,一步法略低,但是没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。说明采用一步法冷冻降温是可行的,而且这样能使冷冻过程简化。

### 3.3 原肠细胞与囊胚细胞发育全能性的差异

传统的鱼类细胞核移植均以囊胚细胞作为核移植供体<sup>[14-16]</sup>。研究中冷冻保存了囊胚细胞和原肠细胞并进行了核移植,结果原肠细胞的冷冻保存存活率比囊胚细胞的高 [ $(64.4\% \pm 11.8\%) > (57.1\% \pm 11.2\%)$ ],但核移植的发育率却比囊胚细胞低得多 ( $P < 0.05$ )。这主要是由于囊胚细胞核发育全能性较好的缘故<sup>[17]</sup>。随着发育阶段推移,胚胎细胞核的发育全能性越来越差,即囊胚细胞核 > 原肠细胞核 > 神经胚细胞核... > 体细胞核<sup>[18]</sup>。从本研究的结果也可以证实这一点。因此,以保存种质资源和克隆为目的的冷冻保存选择保存囊胚细胞为好。

### 参考文献:

- [1] 卢新雄,陈晓玲.我国作物种质资源保存与研究进展[J].中国农业科学,2003,36(10):1125-1132.
- [2] 李广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998.
- [3] 陈大元,孙青原,刘冀珑,等.大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J].中国科学(C辑),1999,29(3):324-330.
- [4] 柳凌,刘宪亭,章龙珍,等.鱼类、水生生物配子及胚胎低温冷冻保存研究进展[J].淡水渔业,1997,27(3):13-17.
- [5] 余来宁,杨永铨,柳凌,等.用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植[J].淡水渔业,1989,(3):3-7.
- [6] 邢湘臣.再说“中华鲟”[J].化石,1994,(4):21-22.
- [7] 常剑波,曹文宣.中华鲟物种保护的历史与前景[J].水生生物学报,1999,22(6):712-720.
- [8] 危起伟,陈细华,杨德国,等.葛洲坝截流24年来中华鲟产卵群体结构的变化[J].中国水产科学,2005,12(4):452-457.
- [9] 叶国标.中华鲟能顺利洄游产卵的已不足500尾[N].大众科技报,2005-03-03.
- [10] 华泽钊,任禾盛.低温生物医学技术[M].北京:科学出版社,1994.
- [11] Calvi S L, Maise G. Cryopreservation of rainbow trout blastomeres: Influence of embryo stage on postthaw survival rate[J]. Cryobiology, 1998,36(4):255-262.
- [12] 陈松林.鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J].水产学报,2002,26(2):161-168.
- [13] 岑东,裴仁治,石兆玲,等.简便的造血干细胞的非程控-80℃保存[J].白血病,1999,8(2):103-105.
- [14] 童第周,吴尚勤,叶毓芬,等.鱼类细胞核的移植[J].科学通报,1963,7:60-61.
- [15] 中国科学院动物研究所细胞遗传研究组,中国科学院水生生物研究所体细胞遗传研究组,水产总局长江水产研究所细胞核移植研究组.硬骨鱼类的细胞核移植-鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼[J].中国科学,1980,(4):377-380.
- [16] 严绍颐.鱼类细胞核移植的历史回顾与讨论[J].生物工程学报,2000,16(5):541-547.
- [17] Yan S Y. Cloning in fish-nucleocytoplasmic hybrids [M]. Hong Kong: Educational and Cultural Press Ltd, 1998.
- [18] 余来宁,左文功,方耀林,等.用电融合结合继代移植方法构建草鱼抗病体细胞工程鱼[J].水产学报,1996,20(04):314-318.