

猪胚胎玻璃化冷冻保存技术的优化

张德福^{1,2}, 戴建军^{1,2}, 吴彩凤^{1,2}, 吴华莉^{1,2}, 刘东^{1,2}, 杨宇³, 张廷宇³, 刘伟⁴, 殷方芝⁴,
王少兵⁴, 王昭凯⁴

1 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

2 上海市农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室, 上海 201106

3 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

4 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

摘要: 在以往工作的基础上本研究对现有猪胚胎玻璃化冷冻保存技术进行了优化。以巴马小型猪为供体, 采用超数排卵技术, 采集 5~6 日龄的胚胎(囊胚/桑椹胚), 比较冷冻方法、胚胎承载工具胚胎、透明带处理和冷冻胚胎移植受体对猪胚胎冷冻效果的影响。结果表明, 冷冻方法 I[胚胎首先在冷冻液 1 (TCM199+20% FBS+10% EG+10% DMSO)中平衡 3 min, 然后立即转入冷冻液 2 (TCM199+20%FBS+20%EG+20%DMSO+0.4 mol/L SUC)中并在 1 min 内装管(每管含 2~6 枚胚胎), 直接投入液氮保存]与冷冻方法 II[透明带完整的胚胎在 NCSU23(含 7.5 μ g/mL CB)培养液中平衡 25 min, 13 000 \times g 离心 12~13 min, 然后在含 2 mol/L EG 的 NCSU23 中平衡 5 min, 再在含 8 mol/L EG+7% PVP 的 NCSU23 中快速漂洗, 装进 OPS/GMP 管, 放入液氮保存]冷冻效果没有显著差异; GMP 法能显著提高冷冻胚胎存活率(83.8% vs 77.6%, $P < 0.05$)和囊胚细胞数(47.5 vs 53.1, $P < 0.05$); 以 0.5% 链蛋白酶(Pronase)处理透明带 10 s, 虽然对猪胚胎存活率没有显著影响, 但能显著提高囊胚细胞数(60.1 vs 46.6, $P < 0.01$); 以地方猪种(枫泾母猪)为冷冻胚胎移植受体能显著提高妊娠率和胚胎效率($P < 0.01$)。

关键词: 猪, 胚胎, 玻璃化冷冻

Optimization of porcine embryo vitrification

Defu Zhang^{1,2}, Jianjun Dai^{1,2}, Caifeng Wu^{1,2}, Huali Wu^{1,2}, Dong Liu^{1,2}, Yu Yang³, Tingyu Zhang³,
Wei Liu⁴, Fangzhi Yin⁴, Shaobing Wang⁴, and Shaokai Wang⁴

1 Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetic and Breeding, Shanghai 201106, China

3 Animal Sciences & Technology College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

4 Animal Sciences & Technology College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The purpose was to optimize the vitrification for porcine embryos cryopreservation. Blastocyst/Morula(5-6th day-embryos) were collected from superovulated Bama mini-pigs(sows/gilts). We compared different cryopreservation methods, cryopreservation tools, thinning of zona pellucida(ZP) and recipient breeds on the efficiency of porcine embryo cryopreservation. The

Received: November 17, 2008; **Accepted:** April 28, 2009

Supported by: Shanghai Agriculture Committee (Nos. 2005-3-5, 2003-14-1, 2007-3-7), Science and Technology Commission of Shanghai (No. 04DZ05611), Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetic and Breeding of China (No. Shagb2008-03), Youth Foundation from Shanghai Academy of Agricultural Sciences (No. 2008-07).

Corresponding author: Defu Zhang. Tel: +86-21-52235475; E-mail: zhangdefu10@yahoo.com.cn

上海市农委项目(Nos. 2005-3-5, 2003-14-1, 2007-3-7), 上海市科学技术委员会科技攻关项目(No. 04DZ05611), 上海市农业遗传育种重点实验室课题(No. Shagb2008-03), 上海农业科学院青年基金(No. 2008-07)资助。

results showed that: in embryo survival rate and blastocyst cell number, there were no significant differences between cryopreservation method I [embryos were vitrified by two step method with open pulled straw (OPS) and glass micropipette (GMP) in solution 1(TCM199 + 20% FBS + 10% EG + 10% DMSO) for 3 min, and solution 2(TCM199 + 20% FBS + 20% EG + 20% DMSO + 0.4 mol/L SUC)for 1 min, stored in liquid nitrogen] and method II[Blastocysts were cultured for 25 min in NCSU23 + 7.5 µg/mL cytochalasin B, centrifuged at approximately 13 000 ×g for 12–13 min, and recovered back into pNCSU23. They were then equilibrated for 5 min in 2 mol/L ethylene glycol in pNCSU23, washed quickly in the vitrification medium, 8 mol/L ethylene glycol, 7% polyvinylpyrrolidone (PVP) in pNCSU23, loaded into OPS/GMP, and plunged into liquid nitrogen]. GMP vitrification method was more suitable and efficient than OPS method ($P<0.05$) in embryo survival rate (83.8% vs 77.6%) and blastocyst cell number (53.1 vs 47.5) after thawing. Thinning of ZP did not increase the survival rate, but significantly improved blastocyst cell number in the survival blastocysts (60.1 and 46, $P<0.01$). Local pig breeds (Fengjing sows) were more suitable as recipients for embryo transfer of vitrified/warmed blastocysts, which can improve pregnant rate and embryo efficiency.

Keywords: pig, embryos, vitrification

Whittingham 等^[1]1972 年首先发明了慢速冷冻法(常规冷冻法),并在小鼠上取得胚胎冷冻成功^[1];1977 年 Willadson 等^[2]对上述方法进行了改良,发明了快速冷冻法,相继在大鼠、牛、兔、山羊、绵羊等 16 种动物上获得成功。但这些方法冷冻程序较繁琐、费时,而且冷冻过程中需要昂贵的程序降温仪。1985 年 Rall 等^[3]发明了玻璃化冷冻方法,冷冻保存小鼠 8-细胞胚胎取得成功。该法不需昂贵的冷冻设备、操作简便、冷冻过程短,因而受到广泛地重视,此后研究者不断改进,使这项技术日趋成熟,有逐渐替代传统方法的趋势。

由于胚胎脂质含量较高等原因,猪的胚胎冷冻保存技术难度大,相对其他家畜(牛、羊等)一直进展较为缓慢,直至 1989 年才获得成功(-35°C)^[4];1990 年常规液氮冷冻保存(-196°C)也有所突破^[5];国内有关猪胚胎冷冻保存的报道相对较少,冯书堂等^[6]首先报道了 -20°C 下短期冷冻保存猪胚胎移植产仔,王祖昆等^[7]、徐晓波等^[8]也进行了胚胎冷冻方法的研究,张德福等^[9]应用 OPS 玻璃化冷冻技术,在我国首次获得猪胚胎超低温(-196°C)冷冻后代。

自 1997 年 Vajta 发明 OPS 法并用于猪胚胎玻璃化冷冻后,猪玻璃化冷冻技术有了较快的发展^[10]。近年来又相继出现了多种胚胎承载工具,如玻璃微细管法(Glass micropipette, GMP)、微滴法(Microdroplet)、电镜铜网格(Electron microscopic grids, EMG)、冷冻环(Cryoloop vitrification, CLV)法、固体表面法(Solid-surface vitrification, SSV)等,这些冷冻方法的出现,大大提高了冷冻速率和冻后胚胎存活率^[11];冻前对猪胚胎进行一些辅助处理,如细胞松弛素的

添加、离心或离心去脂处理等^[12–14],也有效提高了冷冻效率。

但总的说来猪胚胎冷冻保存距推广应用尚有一定距离,冷冻胚胎的体内外存活率相对较低^[12,15]。本研究试图在前期研究的基础上,对猪胚胎玻璃化冷冻技术进行优化,提高冷冻成功率,为地方猪种的长期保存提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

供体猪系巴马小型猪(BM),体重在 40~50 kg、年龄在 8~10 个月,受体母猪系成年枫泾母猪、长上母猪(长白猪 × 上海白猪),上述实验猪均饲养于上海市农业科学院畜牧兽医研究所实验猪场。

所用试剂如未特别注明,均为 Sigma 公司生产。TCM199 培养液和胎牛血清均购自 Gibco 公司;氯前列烯醇(PG)购自上海市计划生育科学研究所;孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津实验动物中心;人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波市激素制品厂。

1.2 超排处理

PG+PMSG+hCG 法:于小型猪发情周期的 16~17 d 肌注 0.2 mg PG 和 1000 IU PMSG,小型猪发情后与公猪自由交配,并在首次配种后肌注 hCG 500 IU。

1.3 胚胎的手术回收

首次配种日计为第 0 天,于第 5~6 天回收胚胎。

1.3.1 小型猪的麻醉与保定

采用耳静脉注射 2.5%戊巴比妥钠 30~50 mL、8%水和三氯乙醛(含 5%硫酸镁)50~100 mL 进行全身麻醉,仰卧保定。

1.3.2 手术冲胚

采用常规外科手术方法在猪倒数第 1、2 对乳头之间沿腹中线切开 7~8 cm, 暴露一侧子宫角, 并沿子宫角、输卵管取出该侧卵巢, 观察排卵点情况。从子宫角距尖端 1/2~2/3 部位朝子宫角方向插入牛用冲卵管或胚胎回收针(自制)并固定; 用注射器吸取 60 mL 冲卵液(添加 2% 新生牛血清的杜氏磷酸盐缓冲液), 从宫管结合部子宫角尖进针, 缓缓注入冲卵液及少许空气, 将含胚冲卵液收集于 50 mL 带盖离心管内, 以相同方法冲洗另一侧子宫角。

1.3.3 胚胎运送

将上述带盖离心管盖严后置于 37°C 保温瓶内, 10 min 内送回实验室。

1.3.4 检胚

含胚液在离心管中静置 10 min 后, 吸取下层液体至培养皿内, 在实体显微镜下检取。

1.4 猪胚胎冷冻承载工具的制备

1.4.1 开放式拉长麦管(*Open pulled straw*; OPS)的制备

在温控板上将 0.25 mL 的麦管(France)拉成外径约为 0.7 mm 的开放式小管。

1.4.2 玻璃微细管(*Glass micropipette*, GMP)的拉制

将直径为 0.25~0.40 cm 的玻璃管在酒精灯火焰上加热煅烧, 当煅烧部分变得很柔软后, 脱离火焰用双手捏住玻璃管两端迅速向相对的方向牵拉, 拉制成外径 200~300 μm 的微管, 用作胚胎冷冻载体。

1.5 胚胎冷冻

冷冻方法 I: 胚胎冷冻及解冻参照 Berthelot 等^[16]的方法进行。胚胎冷冻的操作均在室温下进行, 胚胎先在冷冻液 1(TCM199+20% FBS+10% EG+10% DMSO)中平衡 3 min, 然后胚胎立即转入冷冻液 2(TCM199+20% FBS+20% EG+20% DMSO+0.4 mol/L Suc)中 1 min, 在这 1 min 里, 要尽快将胚胎吸入 OPS/GMP 管(每管 2~6 枚), 投入液氮, 保存 3 个月。解冻液的温度均为 37°C, 解冻液的基础液均为 TCM199+20% FBS。解冻时, 将 OPS 胚胎放入 0.13 mol/L Suc 溶液, 1 min 后将胚胎转移到相同浓度 Suc 溶液中平衡 5 min, 再将胚胎转入 0.075 mol/L Suc 溶液中平衡 5 min, 最后将胚胎保存在 37°C、5% CO₂、饱和湿度下的基础液中。

冷冻方法 II: 参考 Cameron 等^[13]的方法进行。

将胚胎在 NCSU23(含 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB)培养液中平衡 25 min, 13 000 $\times g$ 离心 12~13 min; 然后在含 2 mol/L EG 的 NCSU23 中平衡 5 min, 再在含 8 mol/L EG+7% PVP 的 NCSU23 中快速漂洗, 装进 OPS/GMP 管, 放入液氮保存; 解冻方法同上。

1.6 胚胎死活鉴定及囊胚细胞计数

培养 24 h 已形成囊胚腔并继续扩张的囊胚视为存活; 对囊胚采用 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst33342 染色, 荧光镜下计数囊胚细胞核数。

1.7 胚胎移植

胚胎移植在其发情周期的第 6 天。子宫角暴露前的手术操作与胚胎手术回收相同。一侧子宫角暴露后, 插入自制注胚针, 将胚胎吹入一侧子宫。

1.8 实验设计

实验 1: 以冷冻方法 I, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后进行胚胎培养试验, 比较 OPS 和 GMP 玻璃化冷冻法对猪胚胎冷冻效果的影响。

实验 2: 以 GMP 为猪胚胎承载工具, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后进行胚胎培养试验, 比较冷冻方法 I 和冷冻方法 II 对猪胚胎冷冻效果的影响。

实验 3: 以 GMP 为猪胚胎承载工具和冷冻方法 I, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后以 0.5% 链蛋白酶(Pronase, 10 s)处理, 使透明带变薄, 对照组胚胎未经 pronase 处理; 进行胚胎培养试验, 研究透明带处理对猪胚胎存活率的影响。

实验 4: 在实验 3 基础上, 分别以 10 头长上、枫泾母猪为冷冻胚胎移植受体, 比较不同受体母猪对猪冷冻胚胎移植的影响。

实验 1 至实验 3 均重复 3 次。

1.9 数据处理

实验中所获得的数据用 SPSS 统计软件统计分析, 进行显著性分析。

2 结果

2.1 实验 1: 承载工具对猪胚胎冷冻效果的影响

以冷冻方法 I, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后进行胚胎培养试验, 比较 OPS 和 GMP 玻璃化冷冻法对猪胚胎冷冻效果的影响(表 1)。表明应用 GMP 法冷冻效果优于 OPS 法。

表 1 承载工具对猪胚胎冷冻效果的影响

Table 1 Effect of two different vitrification tools (OPS and GMP) on pig embryo cryopreservation

Group	% viable after 24 h <i>in vitro</i> (n)	Cell number \pm S.E.M (n)
OPS	77.6 (23)	47.5 \pm 3.0 (20)
GMP	83.8 (21)*	53.1 \pm 3.2 (19)*

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, the same as below.

2.2 实验 2: 冷冻方法对猪胚胎冷冻效果的影响

以 GMP 为猪胚胎承载工具, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后进行胚胎培养试验, 比较冷冻方法 I 和冷冻方法 II 对猪胚胎冷冻效果的影响(表 2)。表明两方法间差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 实验 3: 透明带处理对猪胚胎存活率的影响

以 GMP 为猪胚胎承载工具和冷冻方法 I, 选用部分胚胎(囊胚)解冻后进行胚胎培养试验, 研究透明带薄化处理对猪胚胎存活率的影响(表 3)。表明透明带处理(0.5% 链蛋白酶 10 s)虽然对猪胚胎存活率没有显著影响, 但能显著提高囊胚细胞数($P < 0.01$)。

表 2 不同冷冻方法对猪胚胎冷冻效果的影响

Table 2 Effect of two different freezing methods on pig embryo cryopreservation

Group	% viable after 24 h <i>in vitro</i> (n)	Cell number \pm S.E.M (n)
Freezing method I	84.6 (22)	51.5 \pm 3.2 (18)
Freezing method II	80.8 (21)	53.1 \pm 3.0 (18)

表 3 透明带薄化处理对猪胚胎存活率的影响

Table 3 Effect of thinning of ZP on pig embryo cryopreservation

Group	% viable after 24 h <i>in vitro</i> (n)	Cell number \pm S.E.M (n)
Zp thinning	84.8 (28)	60.1 \pm 4.0 (22)**
Control	81.8 (27)	46.6 \pm 3.1 (22)

**: $P < 0.01$.

2.4 实验 4: 不同受体母猪对猪冷冻胚胎移植的影响

在实验 3 基础上, 分别以 10 头长上(LS)、枫泾(FJ)母猪为冷冻胚胎移植受体, 比较不同受体母猪对猪冷冻胚胎移植的影响(表 4)。表明以枫泾母猪为冷冻胚胎移植受体妊娠率和胚胎效率均显著高于长上母猪($P < 0.01$)。

3 讨论

猪胚胎超低温冷冻对地方猪种的长期保存意义

重大。长期以来, 由于猪胚胎脂质含量较高等原因, 进展一直较为缓慢^[17,18]。玻璃化冷冻技术, 特别是 OPS 玻璃化冷冻技术的突破, 使猪胚胎超低温冷冻保存成功率大幅度提高^[8]。但总体上讲, 猪胚胎冷冻成功率还是相对偏低。

以往的研究表明^[19], 猪胚胎随着发育的进行, 胚胎细胞的脂肪滴颗粒逐渐减少, 发育到孵化囊胚阶段, 脂肪含量降到最低, 冷冻存活率较高。但从实际应用来看, 在此阶段胚胎不宜进行冷冻保存, 按照国际胚胎移植协会(IETS)国际间胚胎交流的规定, 必须采集冷冻保存透明带完整的胚胎^[20], 因为透明带能保护胚胎免受病原体的侵袭, 据此本研究采集处于 5~6 天桑椹胚、囊胚阶段透明带完整的胚胎。

目前国际上猪的胚胎玻璃化冷冻程序主要有 2 种: 一种是以法国国家农业科学院^[12,16]为代表, 以 TCM199+20% FBS 为基础液, EG、DMSO 和 SUC 作冷冻剂; 另一种是以澳大利亚昆士兰大学兽医学院^[13-15]为代表, 以含 CB 的 NCSU23 培养液为基础液, 离心极化处理, EG 作冷冻剂。

上述两方法均取得了较好的冷冻效果, 本研究结果也表明两者结果没有显著差异。但后者操作较为烦琐, 需经 CB、离心等处理, 不利于实际应用操作。本实验室应用冷冻方法 I, 在国内首次获得猪冷冻(-196°C)胚胎产仔^[17]。

超低温冷冻胚胎的存活取决于渗透性抗冻保护剂通透性的快慢、化学毒性的大小和非渗透性抗冻保护剂的渗透压作用及有无冰晶生成。以往传统的冷冻方法采用浓度为 1.5 mol/L DMSO 或 EG 为主体的渗透性抗冻保护剂, 因其浓度低、对细胞的化学毒性较小, 故冻前需较长的降温冷却时间, 另外还需要人工植冰过程, 由于冰晶的生成对细胞造成物理性的损伤而影响其活力。本研究采用胚胎玻璃化冷冻保存, 其中渗透性抗冻保护剂 EG、DMSO 分子量较小, 通过胚胎细胞膜的速度较快^[21], 在 1 min 内使细胞内外达到平衡程度, 即投入液氮中冷冻保存。而添加大分子物质聚蔗糖的作用是, 当溶液急速冷却后, 溶液由液态变为半固态, 最后成为玻璃化固态。在此急速冷却过程中由于玻璃化溶液首先形成半固态现象、加之此溶液不生成冰晶, 因此在冷冻过程中对胚胎的压力能够得到缓冲, 使胚胎免

表 4 不同受体母猪对猪冷冻胚胎移植的影响
Table 4 Effect of two different recipients on pig cryopreservation embryo transfer

Breeds	Number of recipients	Total number of transferred blastocyst	Pregnant rate (%)	Number of piglets born per farrowing	Total number of live-born piglets	Survival rate
LS	10	200	30	6-5-3	12	6.0%(12/200)
FJ	10	200	70**	5-5-6-2-7-4	31	15.5%(31/200)

LS: Landrace × Shanghai White pig. **: $P < 0.01$.

受膨胀造成物理性的损伤^[3]。玻璃化溶液中添加蔗糖主要是提高胚胎细胞外液渗透压作用, 冷冻过程中使胚胎脱水, 同时使渗透性抗冻保护剂渗透到胚胎内部。而解冻时蔗糖的渗透压作用又能脱出细胞内部的抗冻剂, 解除其对胚胎的化学毒性作用^[22,23]。研究表明 EG 的分子量(62.07) 较小、对细胞膜的通透性较强、化学毒性较小, 但玻璃化形成的状态稍差些; 而 DMSO 的分子量为 78.14, 渗透性较乙二醇差, 化学毒性较大, 但是形成玻璃化状态要好一些, 将 2 种抗冻剂混合后, 既提高了抗冻剂的渗透性, 又缓解了 DMSO 的化学毒性, 玻璃化状态形成得比较彻底^[21], 混合后起到了互补作用。

猪胚胎冷冻后由于透明带受到一定的损伤, 影响了其进一步孵化, 因此借鉴辅助孵化技术 (Assisted hatching), 用 pronase 处理冷冻胚胎使其透明带变薄或消除透明带, 可提高冷冻胚胎的孵化率, 本研究结果显示透明带变薄处理后, 其胚胎囊胚细胞数显著增加, 这与 Beebe LFS 等^[15]的研究结果相似。

猪胚胎对低温十分敏感, 近 10 年来研究者改细管冷冻法为 OPS 法, 使冷冻速度超过细管法的 10 倍^[24]。由于提高了降温速度, 可减少冷冻损伤。又因为卵母细胞/胚胎与高浓度的玻璃化溶液接触时间小于 1 min, 从而大大减小了化学毒性和渗透性的损伤, 使猪胚胎冷冻保存有所突破。

本研究在上述承载工具的基础上, 选用与塑料麦管(Straw)类似的玻璃管拉制 GMP 管冷冻猪卵母细胞。研究表明^[25,26]GMP 的内径较小(< 0.8 mm), 且热传导性能好, 故降温速率更快, 冷冻效果好; 而 OPS 法的缺点是拉制有一定的难度, 当 OPS 管拉至 0.8 mm 时, 在狭窄处变得很脆, 易于裂口; 此外 GMP 还可以克服 OPS 管在液氮中容易上浮和炸裂, 由于玻璃密较塑料大, 在液氮中不像 OPS 管那样易于浮起, 便于储存。迄今尚未见到国内外用 GMP 管

冷冻猪胚胎的报道; 本实验在卵母细胞冷冻上也表明应用 GMP 法冷冻效果优于 OPS 法^[27], 加之取材方便, 不失为一种较好的玻璃化冷冻承载工具。

受体对冷冻胚胎移植后的成活率也有一定的影响, 研究表明胚胎移植到枫泾母猪, 受胎率、产仔数等明显优于长上母猪, 可能是枫泾母猪提供了较好的子宫内环境, 这与法国学者^[16]应用梅山猪作受体母猪取得的结果相似。

综上所述, 以 GMP 为猪胚胎承载工具和冷冻方法 I, 胚胎(囊胚)解冻后以链蛋白酶作透明带薄化处理, 以地方猪种(如枫泾猪)为冷冻胚胎移植受体, 可取得较好的冷冻效果。

REFERENCES

[1] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 1972, **178**(59): 411-414.

[2] Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In "The Freezing of Mammalian Embryos". London: Butterworths Press, 1977: 175-200.

[3] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, **313**: 573-575.

[4] Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno T, *et al.* Birth of piglets from frozen embryos. *Vet Rec*, 1989, **125**(2): 43-44.

[5] Kashiwasaki N, Ohtani S, Miyamoto K, *et al.* Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Vet Rec*, 1991, **128**: 256-257.

[6] Feng ST, Liu DK. Piglets delivered from frozen (-20°C) embryos. *Acta Vet Zootech Sin*, 1993, **24**(1): 41-44. 冯书堂, 刘殿魁. 猪冷冻(-20°C)胚胎在我国移植成功. 畜牧兽医学报, 1993, **24**(1): 41-44.

[7] Wang ZK, Zhang SQ. Study on collection of swine hatched-embryos and freezing methods. *J Guangdong Anim Husb Vet Med*, 1998, **23**(4): 13-14. 王祖昆, 张守全. 母猪后期胚胎的获取与冷冻保存方法的研究. 广东畜牧兽医科技, 1998, **23**(4): 13-14.

[8] Xu MB, Matusmoto T. Some factors affecting efficiency

- of swine embryo freezing. *Acta Agri Jiangsu*, 1996, **1**(4): 41–46.
- 徐晓波, 小岛敏之. 影响猪胚冷冻效果的若干因素的研究. *江苏农业学报*, 1996, **12**(4): 41–46.
- [9] Zhang DF, Liu D, Wu HL, *et al.* Study on vitrification of porcine embryos by open pulled straw method. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(5): 845–849.
- 张德福, 刘东, 吴华丽, 等. 猪胚胎开放式拉长细管玻璃化冷冻保存研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(5): 845–849.
- [10] Vajta G, Holm P, Greve T, *et al.* Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet Scand*, 1997, **38**: 349–352.
- [11] Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, *et al.* Embryo development and structural analysis of *in vitro* matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. *Theriogenology*, 2008, **70**: 1536–1543.
- [12] Berthelot F, Martinat-Botte F, Gabor Vajta, *et al.* Cryopreservation of porcine embryos: State of the art. *Livest Prod Sci*, 2003, **83**(1): 73–83.
- [13] Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, *et al.* Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology*, 2004, **61**: 1533–1543.
- [14] Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, *et al.* Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology*, 2002, **57**: 2155–2165.
- [15] Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, *et al.* Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology*, 2005, **64**: 879–890.
- [16] Berthelot F, Martinat-Botte F, Perreau C, *et al.* Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod Nutr Dev*, 2001, **41**: 267–272.
- [17] Zhang DF, Liu D, Tang LL, *et al.* Research on techniques of long-term conservation of local pig breeds. *Acta Agri Shanghai*, 2005, **21**(2): 104–107.
- 张德福, 刘东, 汤琳琳, 等. 地方猪种种质资源长期保存技术研究进展. *上海农业学报*, 2005, **21**(2): 104–107.
- [18] Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 2002, **57**: 285–302.
- [19] Nagashima H, Yamakawa H, Nieman H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, 1992, **37**: 839–850.
- [20] Tringfellow DA, Seidel GE. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS): A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Precautions. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- [21] Zhu SE. Permeability measurement of expanded mouse blastocyst to various cryoprotectants. *J China Agri Univ*, 1998, **3**(5): 110–113.
- 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. *中国农业大学学报*, 1998, **3**(5): 110–113.
- [22] Kasai M, Nishimoli M, Zhu SE, *et al.* Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biol Reprod*, 1992, **47**: 1134–1139.
- [23] Zhu SE, Kasai M, Ootoge H, *et al.* Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol based solutions. *J Reprod Fertility*, 1993, **98**: 139–145.
- [24] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, 1998, **51**: 53–58.
- [25] Cho SK, Cho SG, Bae IH. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette(GMP). *Anim Reprod Sci*, 2002, **73**: 151–158.
- [26] Kong IK, Lee SI, Cho SG, *et al.* Comparison of open pulled straw(OPS) vs glass micropipette(GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, 2000, **53**: 1817–1826.
- [27] Zhang DF, Zhu LC, Liu D, *et al.* Study on cryopreservation of porcine oocyte. *Sci Agri Sin*, 2006, **39**(6): 1233–1240.
- 张德福, 朱良成, 刘东, 等. 猪卵母细胞冷冻保存研究. *中国农业科学*, 2006, **39**(6): 1233–1240.