

猪 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻保存技术研究

戴建军, 芮 荣, 武彩虹, 葛立军, 卢 庆

(南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 旨在探讨提高猪 GV 期卵母细胞冷冻保存效率的可能途径。将 EDS、EFS40 和 ES 冷冻保护液用作卵母细胞冻前、冻后程序的处理,但不冷冻,比较 3 种冷冻保护剂对猪 GV 期卵母细胞的毒性作用;采用 ES 液作玻璃化液,比较常规细管法、OPS 法和电镜铜网法 3 种冷冻载体对猪 GV 期卵母细胞的冷冻效果;并以 ES 液作玻璃化液,OPS 管为冷冻载体,将猪 GV 期卵母细胞分 5 组,即对照组、CB + 离心处理组、直接冷冻组、CB + 冷冻组、CB + 离心 + 冷冻组进行对比处理,比较各处理卵母细胞的冻后存活率与发育率。结果表明,在不同冷冻保护液中,以 ES 液组合作为玻璃化冷冻液时的毒性作用最低,与对照组间无明显差异 ($P > 0.05$);在 3 种冷冻载体中,用 OPS 法冷冻猪 GV 期卵母细胞,所获冻后存活率明显高于电镜铜网法和细管法(65.4%对 45.0%和 38.6%, $P < 0.05$),并可获得最佳的冻后成熟率(43.3%);猪 GV 期卵母细胞单纯经细胞松弛素 B 和离心极化处理,不会严重影响卵母细胞的存活,但卵裂率显著低于对照组(39.0%对 52.1%, $P < 0.05$);细胞松弛素 B 处理或细胞松弛素 B + 离心极化处理后再进行玻璃化冷冻,并不能提高卵母细胞的冻后存活率与发育率。采用 OPS 法直接进行 GV 期卵母细胞的玻璃化冷冻,可获得 7.8%的冻后卵裂率,并能获得桑椹胚发育,是一种有效的猪卵母细胞冷冻保存技术。

[关键词] 猪;卵母细胞;玻璃化冷冻

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0034-05

Study on vitrification of porcine GV stage oocytes

DAI Jian-jun, RUI Rong, WU Cai-hong, GE Li-jun, LU Qing

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: In order to investigate an approach to improve the cryopreservation efficiency of porcine GV stage oocytes, three kinds of cryoprotectants (EDS, EFS40 and ES) were respectively used for the treatment of pre- and post-vitrification of oocytes. Then, with the ES chosen for vitrification solution, the routine straw method, OPS method and electron microscopy grid (EMG) method were adopted to cryopreserve porcine GV stage oocytes. Finally, ES was used as vitrification solution and OPS method as vitrification carrier, and porcine GV stage oocytes were divided into 5 groups for the treatment: the control, CB + centrifugation group, the group of vitrification only, CB + vitrification group, and CB + centrifugation + vitrification group. The toxic experiment of different cryoprotectants on porcine GV stage oocytes showed that ES solution showed the lowest toxicity and there was no significant difference compared with the control ($P > 0.05$). Among 3 types of freezing carriers, OPS method yielded significantly higher post-warming survival rate than EMG and straw method did (65.4% vs 45.0% and 38.6%, $P < 0.05$), and resulted in the optimal post-warming maturation rate (43.3%) as well. Porcine GV stage oocytes treated with cytochalasin B and centrifugation separately didn't show significant influence on decrease or increase in survival. However,

收稿日期] 2006-07-12

[基金项目] 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2003]第 14-1 号);国家自然科学基金项目(30270958)

[作者简介] 戴建军(1979-),男,江苏靖江人,在读硕士,主要从事动物生殖生物学研究。

[通讯作者] 芮 荣(1962-),男,安徽当涂人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物生殖生物学研究。E-mail: rruai@njau.edu.cn。

their cleavage rate would be significantly lower than that of the control (39.2 % vs 52.1 % , $P < 0.05$). The pre-treatment with cytochalasin B or cytochalasin B + centrifugation could not improve the post-warming survival and developmental rates of vitrified GV stage oocytes. The OPS vitrification of porcine GV stage oocytes without other treatments could result in 7.8 % of cleavage rate and subsequent morula development.

Key Words : pig ;oocytes ;vitrification

猪卵母细胞体积大、脂质含量高,冷冻保存的难度较大。自 Rall 和 Fahy^[1]首次报道小鼠胚胎的玻璃化冷冻保存以来,玻璃化冷冻技术受到广泛的关注。该技术因冷冻时间短,操作简便,并且不需要特殊的设备而愈来愈受到人们的青睐。猪卵母细胞内的脂质含量约为绵羊的 1.8 倍、牛的 2.4 倍、小鼠的 6.8 倍^[2]。长期以来,由于猪卵母细胞的这一结构特点,使其对低温极其敏感^[3],致使相关研究一直未获得突破性进展。有关猪卵母细胞冷冻保存的大多数报道多局限在冻后形态与发育方面,冷冻效率依然偏低。因此,研究和改进猪卵母细胞的冷冻方法,仍是一项重要的任务。本试验从冷冻保护剂、冷冻载体和冷冻处理方法等方面,探讨了提高猪卵母细胞冷冻保存效率的可能途径,以期完善猪卵母细胞的冷冻保存技术,提高其冻后的发育能力,从而为建立有效的猪卵母细胞冷冻保存技术平台奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

TCM199 为 GIBCO BRL 产品;聚蔗糖(Ficoll-70)、二乙酸荧光素(FDA)、透明质酸酶和 17-雌二醇均为 SIGMA 产品。新生牛血清(NCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司,乙二醇(EG)为上海试剂一厂产品,二甲亚砜(DMSO)为启东中鹤化学有限公司产品,蔗糖为上海化学有限公司产品,台盼蓝(TB)为中国医药(集团)上海化学试剂公司产品,L-半胱氨酸为上海伯奥生物科技有限公司产品。孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津实验动物中心,人绒毛膜血清促性腺激素(hCG)为宁波市激素制品厂产品。

1.2 猪 GV 期卵母细胞的采集

从南京市哈慈天环食品有限公司下属屠宰场采集猪卵巢,置于 37℃、含青霉素和链霉素各 500 IU/mL 的生理盐水中,2 h 内送回实验室。以抽吸法采集卵巢表面直径 2~5 mm 的卵泡卵母细胞,在实体显微镜下选择胞质均匀、包被 3 层及 3 层以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs)作为供试 GV 期卵母细胞,用 TCM199 液洗 2~3 次后备用。

1.3 玻璃化冷冻液的配制及其毒性试验

1.3.1 ED/EDS 液和 EG/ES 液的配制 EG、DMSO 和含体积分数 10 % NCS 的 TCM199 三者按体积比 1 : 1 : 8 充分混匀,即为 ED 液;将 0.6 mol/L 蔗糖溶于体积比 1 : 1 : 3 充分混匀的 EG、DMSO 和 TCM199(含 10 % NCS)混合液中,即为 EDS 液;将 EG 和 TCM-199 液按体积比 1 : 4 充分混合即得 20 % EG 溶液;将 0.5 mol/L 蔗糖溶于按体积比 2 : 3 混合的 EG 和 TCM-199 混合溶液中,即为 ES 液。以上液体经过滤、分装后,于 4℃ 保存备用。

1.3.2 EFS20 和 EFS40 溶液的配制 300 g/L 聚蔗糖和 0.5 mol/L 蔗糖溶于含体积分数 10 % NCS 的 TCM199 溶液中,充分混匀即为 FS 液;再将 EG 和 FS 液分别按体积比 2 : 8 和 4 : 6 混匀,即为 EFS20 和 EFS40 液。过滤、分装后,于 4℃ 保存备用。

1.3.3 玻璃化冷冻液的毒性试验 为了检验不同冷冻保护剂对猪卵母细胞的毒性作用,将 EDS、EFS40 和 ES 冷冻保护剂组合用作猪 GV 期卵母细胞冻前、冻后程序的处理,但不冷冻;比较不同冷冻保护剂处理对猪卵母细胞存活与发育能力的影响。

1.4 OPS 管的制作

用自制加热板将 0.25 mL 塑料细管加热变软,离开加热板后,两手轻拉细管使其中部拉细、拉长至 22 cm 左右,用刀片切除细管棉塞段,再从拉细的中间部位切断,即制成 OPS 管。其管壁内径约为 0.8~1.0 mm,管壁厚 0.08 mm。

1.5 猪 GV 期卵母细胞的玻璃化冷冻和解冻

采用以下 3 种冷冻载体进行玻璃化冷冻。电镜铜网法是将猪 GV 期卵母细胞先置于预处理液(EG)中,平衡 5 min,再转入玻璃化液(ES)中,迅速装管或加载到电镜铜网上^[4]。常规细管法的装管方法为:依次吸入 5 cm 0.5 mol/L 的蔗糖溶液,1 cm 空气,1.5 cm 含猪 GV 期卵母细胞的玻璃化液,1 cm 空气,最后吸满 0.5 mol/L 蔗糖溶液。OPS 法则是利用虹吸作用,将含猪 GV 期卵母细胞的约 2 mL 玻璃化冷冻液直接吸入管中。装管结束后直接投入 -196℃ 液氮内保存,卵母细胞投入液氮前在 ES 液中的停留时间约为 30 s。

细管法解冻时,从液氮中取出细管直接投入 37 ℃ 水浴中,约解冻 10 s 后,将卵母细胞回收至 0.5 mol/L 蔗糖溶液中,平衡 5 min;然后转入 0.25 mol/L 蔗糖溶液,再平衡 5 min;用 PBS 洗 1~2 次,再用 TCM199 液洗 2~3 次,备用。OPS 法和电镜铜网法解冻时直接将其浸入 37 ℃ 解冻液中解冻。

1.6 细胞松弛素 B 和离心极化处理的应用

为了寻求改善猪卵母细胞冻后发育的途径,本试验以 ES 冷冻液组合作玻璃化液,OPS 管为冷冻载体,对猪 GV 期卵母细胞分 5 组进行对比处理:(1)对照组:不用细胞松弛素 B(CB)和离心极化处理,且不作冷冻的新鲜卵母细胞;(2)CB+离心处理组:卵母细胞经细胞松弛素 B 和离心极化处理,但不作冷冻;(3)直接冷冻组:卵母细胞不用细胞松弛素 B 和离心极化处理,直接进行玻璃化冷冻;(4)CB+冷冻组:卵母细胞先用细胞松弛素 B 处理 15 min,再行玻璃化冷冻;(5)CB+离心+冷冻组:卵母细胞经细胞松弛素 B 和离心极化处理后,再进行玻璃化冷冻。

1.7 猪 GV 期卵母细胞冷冻-解冻后的评价

解冻的冷冻卵母细胞经 1~3 次洗涤后,置于倒置显微镜下进行形态学鉴定,胞质饱满、均一,透明带完整,COC 卵丘细胞未发生脱落或仅有少量脱落者,视为形态正常。

1.7.1 台盼蓝(TB)和二乙酸荧光素(FDA)染色存活鉴定 TB 染色时,将卵母细胞放入 3 g/L 台盼蓝溶液中,于 37 ℃ 染色 3 min,洗 2~3 次后于显微镜下观察。存活卵母细胞不着色,死亡卵母细胞则染成蓝色。FDA 染色时,将卵母细胞置于 5 mg/mL 的 FDA 染色液中,37 ℃ 染色 3 min,用 PBS 洗 2~3 次后,立即置于荧光显微镜下观察,发出强荧光的卵母细胞判为存活,发出弱荧光或不发荧光者视为死亡^[5]。

1.7.2 体外成熟与体外受精 猪 GV 期卵母细胞在含 69 mg/mL L-半胱氨酸、体积分数 10% 猪卵泡液(pFF,实验室自制)、10 IU/mL PMSG、10

IU/mL hCG 和 1 mg/mL 17-雌二醇的成熟培养液中培养 44 h。培养条件为 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂(气相)和饱和湿度。成熟培养后,卵丘细胞扩散直径为卵母细胞直径 5 倍以上或出现第一极体(pbI)者判为成熟,即为 M 期卵母细胞。

体外成熟的 M 期卵母细胞,经 1 g/L 透明质酸酶部分脱除卵丘细胞后,以 15 枚为 1 组,移入预先过夜平衡的 50 mL mTBM 液中等待受精。精子处理时,取 1 mL 鲜精用 2 mL 杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)离心洗涤 2 次,再用 3 mL mTBM 液离心洗涤 1 次,最后加入含 200 mg/mL 肝素的 mTBM 液,悬浮并调整精子浓度为 1 × 10⁶/mL,取 50 mL 精子加入含卵母细胞的 mTBM 液中;精卵共同孵育 6~8 h 后,移入过夜平衡的 100 mL NCSU-23 培养液中进行体外培养。培养条件为 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂(气相)和饱和湿度。培养 48 h 后检查卵裂情况,6 d 后检查桑椹胚发育情况。

1.8 数据分析

每组试验做 3 次以上重复,所获数据采用 SPSS 软件进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同冷冻保护剂对猪 GV 期卵母细胞存活和发育的影响

由表 1 可见,GV 期卵母细胞各处理组的台盼蓝染色和 FDA 染色存活率均与对照组无显著差异($P > 0.05$);但各处理组的卵母细胞体外成熟率均低于对照组,其中 EDS 组(63.8%)与对照组(76.7%)差异显著($P < 0.05$);从体外受精后卵裂和桑椹胚发育情况来看,各冷冻保护剂处理组的卵裂率均较对照组有不同程度的降低,其中 EDS 组最低,且与对照组差异显著($P > 0.05$),EFS 组次之,ES 组最高。表明 ES 作为玻璃化冷冻保护剂对猪 GV 期卵母细胞的毒性作用最低。

表 1 不同冷冻保护剂处理对猪 GV 期卵母细胞存活与发育的影响

Table 1 Effect of treatment with various cryoprotectants on the survival and development of porcine GV stage oocytes

组别 Group	卵母细胞存活率/ % Survival rate of oocytes		体外成熟率/ % IVM rate	体外受精后发育率/ % Fertilization & development <i>in vitro</i>	
	台盼蓝染色 TB staining	FDA 染色 FDA staining		卵裂率 Cleavage rate	桑椹胚发育率 Morula rate
CK	95.1(77/81)	95.5(84/88)	76.7 a(69/90)	55.4 a(36/65)	32.3 a(21/65)
EDS	91.5(65/71)	92.4(61/66)	63.8 b(51/80)	40.0 b(24/60)	16.6 b(10/60)
EFS	89.3(67/75)	93.4(71/76)	68.8 ab(53/77)	42.9 ab(27/63)	19.0 b(12/63)
ES	91.4(64/70)	93.0(66/71)	74.7 ab(56/75)	51.6 a(31/60)	25.0 ab(15/60)

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Note: Different small letters within columns show significant difference, $P < 0.05$. The following table is the same.

2.2 不同冷冻载体对猪 GV 期卵母细胞冷冻效果的影响

采用 ES 液作玻璃化液,不同冷冻载体对猪 GV

期卵母细胞的冷冻效果如表 2 所示。由表 2 可知, OPS 法冷冻效果明显优于电镜铜网法和细管法 ($P < 0.05$)。

表 2 不同冷冻载体对猪 GV 期卵母细胞冷冻效果的影响

Table 2 Effect of different vitrification carriers on the viability of porcine GV oocytes

组别 Group	形态正常率/ % Normal rate	GV 期卵母细胞存活率/ % Survival rate of GV-oocytes		体外成熟率/ % IVM rate
		台盼蓝染色 TB staining	FDA 染色 FDA staining	
细管法 Straw	80.4 (262/326)	38.6 a(34/88)	30.0 a(18/60)	29.8 a(34/114)
OPS 法 OPS	85.3 (296/347)	65.4 b(68/104)	59.7 b(43/72)	43.3 b(52/120)
电镜铜网法 TEM grid	79.7(230/288)	45.0 a(36/80)	41.7 ab(25/60)	31.1 a (28/90)

2.3 细胞松弛素 B 和离心极化处理对猪 GV 期卵母细胞冻后存活与发育的影响

GV 期卵母细胞冷冻后的卵母细胞形态、存活与发育情况如表 3 所示。由表 3 可知,CB + 离心处理组的猪 GV 期卵母细胞未作冷冻处理,其受精率虽较对照组有明显降低(39.0%对 55.8%, $P < 0.05$),但卵母细胞存活率仍均显著高于各冷冻组 ($P < 0.05$),表明单纯的 CB、离心处理不至于严重影响卵母细胞的存活。在 3 个冷冻组中,卵母细胞

解冻后均获得了较高的形态正常率,但相互间差异不显著 ($P > 0.05$);各冷冻组的卵母细胞成熟率较对照组明显下降 ($P < 0.05$),其中 CB + 离心 + 冷冻组部分卵母细胞经离心处理后,卵丘细胞严重脱落,故未计算其成熟率。从卵裂率来看,在 3 个冷冻组中,仅直接冷冻组获得了 7.8%的卵裂率,12 枚卵裂胚经体外培养后,6 枚发育至 8-细胞,3 枚发育至 16-细胞,3 枚发育至桑椹胚;而另两个冷冻组均未获得卵裂。

表 3 细胞松弛素 B 和离心极化处理对 GV 期卵母细胞冻后存活与发育的影响

Table 3 Effect of treatment with CB and centrifugation on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes

组别 Group	形态正常率/ % Normal rate	GV 期卵母细胞存活率/ % Survival rate of GV oocytes		成熟率/ % Maturation rate	卵裂率/ % Cleavage rate
		台盼蓝染色 TB staining	FDA 染色 FDA staining		
对照组 Control	-	-	-	73.3 a(88/120)	55.8 a(67/120)
CB + 离心处理组 CB + centrifugation	91.1 (92/101)	78.2 a(43/55)	82.4 a(42/51)	-	39.0 b(30/77)
直接冷冻组 Vitrification only	92.4 (85/92)	60.0 b(42/70)	60.8 b (45/74)	42.2 b(65/154)	7.8 c(12/154)
CB + 冷冻组 CB + vitrification	90.5 (95/105)	51.1 c(23/45)	46.0 b(29/63)	30.3 b(47/155)	0 d(0/155)
CB + 离心 + 冷冻组 CB + centrifugation + vitrification	91.6 (87/95)	46.7 b(28/60)	44.8 c(26/58)	-	0 d(0/148)

3 讨论

玻璃化冷冻过程中,需要使用高浓度的冷冻保护剂。由于冷冻保护剂虽可保护细胞免受冷冻伤害,但其同时对细胞又有化学毒性作用,因此选择适当的冷冻保护剂及其合适的使用浓度,以充分发挥其冷冻保护效果,并最大限度地降低其毒性作用,一直是玻璃化冷冻需要解决的关键问题之一。Huang 等^[6]比较了几种玻璃化冷冻保护剂对猪卵母细胞的毒性,结果发现在猪卵母细胞冷冻时,甘油效果较差,EG 相对较好。Lim 等^[7]和 Wani 等^[8]在牛上也获得了相似的结果。本试验中,以 EDS 液处理的猪 GV 期卵母细胞的发育力最差,EDS 液中含有 DM-SO,故该结果可间接证明其毒性作用较大。作者在

试验中还发现,用 EFS 液组合处理卵母细胞时,其后发育率不及 ES 液处理组;卵母细胞在 EFS 液处理过程中脱水现象更为严重,细胞缩水形态表现得甚为剧烈,而这样的形态变化可能会导致卵母细胞内部结构的破坏,如 GV 期卵丘与卵母细胞的连接受损,M 期卵母细胞微丝、微管和纺锤体的部分破坏等^[9],以至于影响到卵母细胞的进一步发育。

玻璃化冷冻中冷冻速度是影响冷冻保存成败的关键因素之一^[10]。围绕提高冷冻速度的问题,已发展出多种冷冻载体,如 OPS 法、电镜铜网法(EMG)和冷冻环法等,这些冷冻载体的使用,均能有效减少玻璃化冷冻液的用量,提高降温速率。利用 OPS 法冷冻保存卵母细胞时,由于冷冻液量只有 1~2 μL,且管壁已被拉薄,冷冻液与液氮接触充分,可以较细

管法获得更快的冷冻降温和解冻升温速率^[11]。电镜铜网(EMG)法最早由 Martino 等^[12]应用于冷冻牛卵母细胞,也是一种有效的玻璃化冷冻方法。在本试验中作者发现,EMG 法获得的猪 GV 期卵母细胞冻后的存活率低于 OPS 法。这可能是由于在 EMG 法的冷冻-解冻过程中,冻后卵母细胞常粘附在铜网上,需要吹打方可脱落,而吹打操作可能会破坏卵母细胞的完整性,对其体外成熟与发育不利。

猪卵母细胞和胚胎对低温敏感的主要原因,一般都归咎于其内含有的大量脂质^[13]。为了减少脂质含量高对猪卵母细胞或胚胎冷冻造成的消极影响,Nagashima 等^[14]冷冻前先对猪胚胎进行了离心和去脂处理,结果改善了胚胎冷冻效果。细胞松弛素 B 是细胞骨架稳定剂,可增加细胞骨架的韧性,增强细胞的抗冻能力。事实上,目前关于细胞松弛素 B 对卵母细胞冷冻保存的确切作用尚有争议。Dobrinsky 等^[15]报道,超低温冷冻保存扰乱了胚胎细胞膜和微丝的有序结构,使这些微丝系统得到重构,形成新的骨架系统以支撑整个细胞。通常认为细胞松弛素 B 的加入,能改善这些内部结构,从而提高猪胚胎的冷冻效率。Isachenko 等^[16]报道,成熟卵母细胞经细胞松弛素 B 处理后,能改善冷冻后的发育。但也有报道认为,细胞松弛素 B 处理并不能提高牛 GV 期和 M 期卵母细胞的冻后存活率^[17]。卵母细胞中的脂肪颗粒也是重要的能量代谢物质,在生物膜的功能上发挥着重要作用,因而去除脂质可能会有不良的影响。本试验采用细胞松弛素 B 和离心极化处理并未获得更好的冷冻效果。未经细胞松弛素 B 和离心极化处理的 GV 期卵母细胞,在经玻璃化冷冻后进行体外受精,反而获得了 7.8% 的卵裂率。本试验发现,GV 期卵母细胞在离心极化处理过程中,往往发生卵丘细胞的严重脱落,可能影响到其后的发育。这与 Park 等^[18]的研究结果基本一致。

[参考文献]

- [1] Rall W, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification[J]. *Nature*, 1985, 313: 573-575.
- [2] Genicot G, Leroy J L, Soom A V. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1181-1194.
- [3] Dobrinsky J R. Cryopreservation of pig embryos[J]. *J Reprod Fert*, 1997, 52(Suppl): 301-312.
- [4] Martino A, Songsasen N, Leibo S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54: 1059-1069.
- [5] 武彩红, 戴建军, 芮荣, 等. 猪 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻后的体外成熟[J]. *江苏农业学报*, 2006, 22(2): 131-136.
- [6] Huang W T, Holtz W. Effects of meiotic stages, cryoprotectants, cooling and vitrification on the cryopreservation of porcine oocytes[J]. *Animal science*, 2002, 15(4): 485-493.
- [7] Lim J M, Ko J J, Hwang W S, et al. Development of in vitro matured bovine oocytes cryopreserved with different cryoprotectants[J]. *Theriogenology*, 1999, 51(7): 1303-1310.
- [8] Wani N A, Misra A K, Maurya S N. Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants[J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 84: 327-335.
- [9] George M A, Pickering S J, Brade P R. The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryopreservation[J]. *Mol Human Reprod*, 1996, 2: 445-456.
- [10] Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 50-51: 357-364.
- [11] 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.
- [12] Martino A, Songsasen N, Leibo S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54: 1059-1069.
- [13] Nagashima H, Cameron R D A, Kuwayama M, et al. Survival of porcine delipidated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification[J]. *J Reprod Dev*, 1999, 45: 167-176.
- [14] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R J, et al. Cryopreservation of porcine embryos[J]. *Nature*, 1995, 374: 416.
- [15] Dobrinsky J R, Pursel V G, Long C R. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62: 564-570.
- [16] Isachenko V, Soler C, Isachenko E, et al. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant[J]. *Cryobiology*, 1998, 36: 250-253.
- [17] Mezzalana A, Vieira A D, Barbieri D P, et al. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B[J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 472.
- [18] Park K E, Kwon I K, Han M S. Effects of partial removal of cytoplasmic lipid on survival of vitrified germinal vesicle stage pig oocytes[J]. *J Reprod Dev*, 2005, 51: 151-160.