

# 乙二醇降低超低温冷冻黄姑鱼精子的 DNA 损伤

王鑫伟<sup>①</sup> 史应学<sup>①</sup> 魏平<sup>①</sup> 竺俊全<sup>①\*</sup> 吴雄飞<sup>②</sup>

① 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211; ② 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012

**摘要:** 为了解乙二醇 (EG) 为抗冻剂超低温冻存黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 精子的活力及 DNA 损伤情况, 本研究以 Hank's 盐溶液 (HBSS) 为稀释液, 5% ~ 30% 乙二醇 (EG) 为抗冻剂, 0.5 ml 麦细管为冻存管, 两步降温法超低温冷冻保存黄姑鱼精子, 用显微观察法测定精子活力, 用单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 检测精子的 DNA 损伤, 用 SPSS 11.5 处理实验数据。黄姑鱼鲜精的激活率为  $85.67\% \pm 2.09\%$ 、运动时间为  $(318.67 \pm 6.11)$  s、寿命为  $(405.67 \pm 7.77)$  s。5%、10%、15% 乙二醇 (EG) 组冻精的运动时间及寿命与鲜精相比差异不显著, 其中 10% 乙二醇 (EG) 组冻精的激活率为  $84.67\% \pm 1.15\%$ 、运动时间为  $(319.00 \pm 12.12)$  s、寿命为  $(400.67 \pm 4.73)$  s; 20%、25%、30% 乙二醇 (EG) 组冻精的运动时间及寿命与鲜精相比差异显著。5%、10%、15%、20% 乙二醇 (EG) 组冻精核 DNA 损伤状况与鲜精无显著差异, 25%、30% 乙二醇 (EG) 组冻精核 DNA 损伤状况与鲜精差异显著, 且冻精核 DNA 的损伤程度与乙二醇 (EG) 浓度成正相关。分析认为, 5% ~ 15% 乙二醇 (EG) 适宜作为黄姑鱼精子超低温冷冻保存用抗冻剂。

**关键词:** 黄姑鱼; 精子; 超低温冷冻保存; 活力; DNA 损伤

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 02-261-07

## The DNA Damage of Cryopreserved Sperm Is Declined by Using Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in Spotted Maigre (*Nibea albiflora*)

WANG Xin-Wei<sup>①</sup> SHI Ying-Xue<sup>①</sup> WEI Ping<sup>①</sup> ZHU Jun-Quan<sup>①\*</sup> WU Xiong-Fei<sup>②</sup>

① Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211;

② Ningbo Academy of Oceanology and Fisheries, Ningbo 315012, China

**Abstract:** The semen cryopreservation is an important technology to keep healthy and vibrant sperm for a long time and it has an high value in medicine, biology, agriculture, forestry, fishing and other fields.

**基金项目** 浙江省水产新品种选育专项 (No. 2012C12907-8), 宁波市科技计划重大项目 (No. 2015C110005), 国家海洋局海洋药源生物种质资源库建设项目 (No. 12PYY001SF08-NBDX-1), 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心项目;

\* 通讯作者, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn;

**第一作者介绍** 王鑫伟, 男, 本硕连读生; 研究方向: 海洋生物技术; E-mail: 1448118147@qq.com.

收稿日期: 2015-08-08, 修回日期: 2015-12-17 DOI: 10.13859/j.cjz.201602012

Advanced researches on cryopreservation of sperm have shown that there are still some key issues to be solved, such as the benefit cryoprotectant, the best cooling rate and recovery conditions. This study aimed to evaluate the effects of EG (ethylene glycol) as a cryoprotectant for protecting freezing sperm motility and DNA damage in spotted maigre (*Nibea albiflora*). We used hanks balanced salt solutions (HBSS), 5% - 30% ethylene glycol (EG), two-step cooling, 0.5 ml straws for cryopreservation of *N. albiflora* sperm. Subsequently, we investigated the DNA damage and motility of the freezing sperm by single cell gel electrophoresis (SCGE) and microscopic observation. All statistical data were given as Mean  $\pm$  SD, and One-Way ANOVA was performed to determine the significant differences between groups using SPSS 11.5. Significant differences were considered as  $P < 0.05$ . The results showed that the fresh sperm activation rate was  $85.67\% \pm 2.09\%$ , movement duration was  $318.67 \pm 6.11$  s, and life-span was  $405.67 \pm 7.77$  s (Table 1). There were no significant differences in moving and life-span time between fresh sperm and frozen-thawed sperm diluted with 5%, 10% or 15% EG. When 10% EG was used as cryoprotectant, the activation rate was  $84.67\% \pm 1.15\%$ , movement duration was  $319.00 \pm 12.12$  s and life-span was  $400.67 \pm 4.73$  s. However, moving time and life-span time of frozen-thawed sperm were significantly decreased compared to fresh sperm when 20%, 25% or 30% EG was used as cryoprotectant (Table 1). The SCGE results demonstrated that there were no significant differences in DNA fragmentation between fresh sperm and frozen-thawed sperm which diluted with 5%, 10%, 15% or 20% EG as cryoprotectant. However, when EG concentration was 25% or 30%, DNA fragmentation was significantly increased. In addition, DNA damage extent of frozen-thawed sperm was positively correlated with concentrations of EG (Fig. 2, Table 2). The majority of sperm showed slightly or mildly damaged DNA, while the remaining was heavily damaged or completely damaged (Table 2). These results suggest that 5% - 15% EG can be used as cryoprotectant for sperm cryopreservation in *N. albiflora*. This study provides valuable data for optimal choice of cryoprotectant and the optimal sperm cryopreservation conditions in economic aquaculture fish.

**Key words:** Spotted maigre, *Nibea albiflora*; Spermatozoa; Cryopreservation; Motility; DNA damage

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 是我国石首鱼科主要经济鱼类及传统渔业对象之一。自然海区资源因捕捞过度及污染等原因而衰退, 其资源保护与恢复备受关注。近年来, 黄姑鱼的人工育苗 (孙忠等 2005)、养殖推广 (蔡厚才等 2000, 刘巧灵 2009)、种质保存 (金春华等 2011)、良种选育 (杨育凯等 2013) 等工作已在持续开展之中。精子冷冻保存是种质保存途径之一, 对优良种质黄姑鱼精液进行超低温冷冻保存, 建立精子库, 可为育种及苗种繁育提供优质精子保障。目前, 黄姑鱼精子超低温冷冻保存研究已见以 Hank's 盐溶液 (hanks balanced salt solutions, HBSS) 为稀释液、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 为抗冻剂、

两步降温法取得较好冻存效果的报道 (金春华等 2011)。乙二醇 (ethylene glycol, EG) 是渗透性抗冻剂之一, 在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (姜建湖等 2011)、鲑鱼 (*Miichthys miiuy*) (王伟等 2010)、褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) (章龙珍等 2009) 等种类精子的超低温冷冻保存实验中, 取得了较高的冻精活力。精子在冷冻或解冻过程中会造成一定程度的细胞结构损伤 (包括 DNA 损伤), 影响其质量。研究发现, 精子 DNA 损伤会降低其受精能力和胚胎发育潜能, 因此, 精子 DNA 损伤被认为是精子质量评价的检测指标之一 (Evenson et al. 2002, 2006)。精子 DNA 损伤检测一般用单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel

electrophoresis, SCGE) (叶霆等 2009, 程顺等 2013, Xu et al. 2013), 或用精子 DNA 吖啶橙荧光检测技术 (Evenson et al. 2002)。在鱼类鲜精及冻精 DNA 损伤检测中较多使用单细胞凝胶电泳技术 (SCGE)。

为了解乙二醇 (EG) 为抗冻剂超低温冷冻保存黄姑鱼精子的活力及 DNA 损伤情况, 本研究以 Hank's 盐溶液为稀释液、5% ~ 30% 乙二醇 (EG) 为抗冻剂, 两步降温法超低温冷冻保存黄姑鱼精子, 用显微观察法测定鲜精及冻精的活力, 用单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 检测冻精核 DNA 损伤。旨在为黄姑鱼精子超低温冻存技术的改进及质量检测提供参考, 并为黄姑鱼精子超低温冻存库的建立提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从浙江象山港湾苗种有限公司网箱养殖的黄姑鱼中挑选性成熟度高的雄鱼 10 尾 (体重 1.2 ~ 1.8 kg), 暂养于室内水池中, 供采样用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 采精** 用毛巾擦干黄姑鱼体表, 轻轻挤压鱼腹部使精液流出, 盛于 2 ml 小管中, 置于 4℃ 冰箱, 尽快进行实验。

**1.2.2 精子超低温冷冻保存** 以乙二醇 (EG) 为抗冻剂、HBSS 液 (KCl 0.4 g/L, NaCl 8.01 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.16 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.35 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.12 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06 g/L, 葡萄糖 0.35 g/L) 为稀释液, 配制抗冻液。将精液与抗冻液 (4℃) 按 1 : 3 比例混匀, 于 4℃ 下 10 ~ 15 min 后, 分装到 0.5 ml 的麦细管中, 每支盛约 0.4 ml。采用自制简易降温装置两步降温法冷冻保存, 即将盛精麦细管平放在离液氮面 3.0 cm 左右处, 3 ~ 5 min 后投入液氮中保存。解冻时从液氮中迅速取出麦细管, 于水浴中 40℃ 下融化。实验分为 E1 ~ E6 共 6 个组, 即抗冻剂乙二醇的添加量分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30%。

**1.2.3 鲜精和冻精的活力检测** 用针头沾取少许精液于载玻片上, 加一滴盐度 28 的过滤海水混匀, 迅速在显微镜下观察精子活力, 包括运动时间、寿命和激活率 (激活率指精液与 28 盐度的过滤海水混合后, 运动精子占全部精子数量的百分比) (金春华等 2011), 重复实验 3 次。

**1.2.4 鲜精与冻精 DNA 损伤的检测** 采用叶霆等 (2009) 所述单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 检测鲜精与冻精的 DNA 损伤。

### 1.3 实验数据处理

单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 彗星图片由 CometScore 1.5 软件分析处理, 计算出彗星尾矩、彗星率及损伤系数 (叶霆等 2009)。用 SPSS 11.5 处理实验数据, 用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 检验各组数据差异显著性, 以  $P = 0.05$  为检验水准, 统计结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。

## 2 结果

### 2.1 黄姑鱼鲜精及冻融精子的活力

以乙二醇 (EG) 为抗冻剂, HBSS 为稀释液, 超低温冷冻保存黄姑鱼精子 3 d 后解冻, 检测其活力。E1 ~ E6 各组 (即 5% ~ 30% 乙二醇组) 冻融精子的激活率与鲜精相比差异不显著。E1 ~ E3 组 (5% ~ 15% 乙二醇组) 冻融精子的运动时间及寿命与鲜精相比差异不显著, 但 E4 ~ E6 组 (20% ~ 30% 乙二醇组) 冻融精子的运动时间及寿命与鲜精相比差异显著 (表 1)。

### 2.2 黄姑鱼鲜精及冻精的 DNA 损伤

超低温冷冻保存黄姑鱼精子 7 d 后解冻检测其 DNA 损伤, 并与鲜精 DNA 损伤进行比较。乙二醇 (EG) 浓度在 5% ~ 20% 时, 冻精与鲜精的彗星尾距 (尾长 × 尾部 DNA 百分含量) 差异不显著; 乙二醇 (EG) 浓度为 25% 及 30% 时, 冻精与鲜精的彗星尾距差异显著。冻精的彗星尾距随乙二醇 (EG) 浓度的升高而增大 (图 1)。

根据彗星拖尾中 DNA 量占细胞总 DNA 含

表 1 鲜精与冻融精子活力比较 ( $n = 300$ , Mean  $\pm$  SD)

Table 1 Comparison of motility between fresh sperm and frozen-thawed sperm

组别 Groups	乙二醇浓度 (%) Ethylene glycol concentration	激活率 (%) Activation rate	运动时间 (s) Moving time	寿命 (s) Survival time
对照 Contrast	鲜精 Fresh sperm	85.67 $\pm$ 2.09	318.67 $\pm$ 6.11	405.67 $\pm$ 7.77
E1	5	83.33 $\pm$ 2.31	309.67 $\pm$ 10.60	388.67 $\pm$ 11.50
E2	10	84.67 $\pm$ 1.15	319.00 $\pm$ 12.12	400.67 $\pm$ 4.73
E3	15	83.00 $\pm$ 3.00	320.00 $\pm$ 23.26	403.67 $\pm$ 18.01
E4	20	81.33 $\pm$ 4.04	203.33 $\pm$ 16.26*	296.00 $\pm$ 13.75*
E5	25	79.67 $\pm$ 6.03	168.00 $\pm$ 9.00*	220.33 $\pm$ 16.20*
E6	30	82.33 $\pm$ 6.11	132.67 $\pm$ 10.97*	185.00 $\pm$ 14.73*

\* 与鲜精相比差异显著,  $P < 0.05$ . \* Significant effect of the treatment,  $P < 0.05$ .

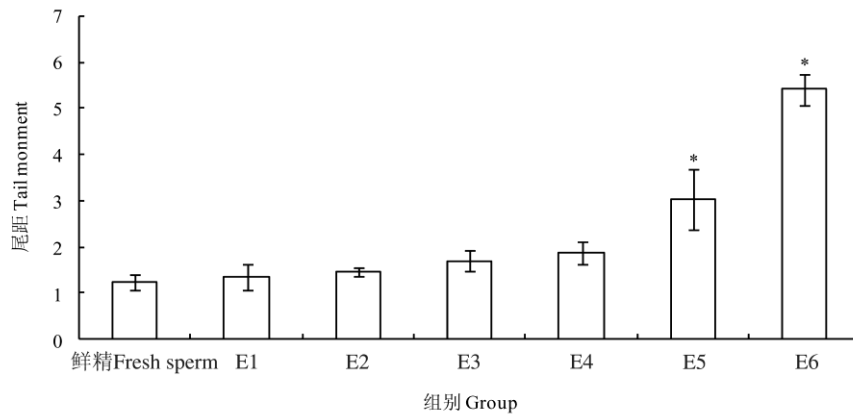


图 1 鲜精及冻精单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 检测的彗星尾距

Fig. 1 Tail comet of fresh sperm and frozen-thawed sperm by single cell gel electrophoresis (SCGE)

量的比例, 将黄姑鱼鲜精及冻精核 DNA 损伤程度分为 5 级: 0 级 (无损伤), 即彗星拖尾中 DNA 量占细胞总 DNA 含量的比例小于 5% (图 2a); I 级 (轻度损伤), DNA 比例 5% ~ 20% (图 2b); II 级 (中度损伤), DNA 比例 20% ~ 40% (图 2c); III 级 (重度损伤), DNA 比例 40% ~ 95% (图 2d); IV 级 (完全损伤), DNA 比例大于 95% (图 2e)。5%、10%、15%、20% 乙二醇 (EG) 组冻精的彗星率 (彗星细胞数占总细胞数的比例) 及 DNA 损伤情况与鲜精差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而 25% 和 30% 乙二醇

(EG) 组冻精与鲜精差异显著 ( $P < 0.05$ )。精子核 DNA 损伤以轻度 and 中度损伤为主, 重度损伤及完全损伤比率较低 (表 2)。同时, 比较了不同组别的损伤系数, 损伤系数 = 0 级损伤细胞数  $\times$  0 + I 级损伤细胞数  $\times$  1 + II 级损伤细胞数  $\times$  2 + III 级损伤细胞数  $\times$  3 + IV 级损伤细胞数  $\times$  4。

对鲜精和冻精的 DNA 损伤系数与抗冻剂浓度的相关性进行统计分析, 损伤系数与抗冻剂浓度成正相关 (图 3)。

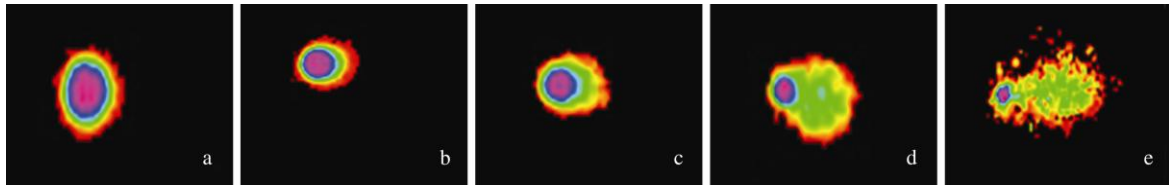


图 2 单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 彗星图

Fig. 2 Comet image by single cell gel electrophoresis

a. 0 级损伤; b. I 级损伤; c. II 级损伤; d. III 级损伤; e. IV 级损伤。放大倍数均为 ×1 000。

a. Grade 0 damage; b. Grade I damage; c. Grade II damage; d. Grade III damage; e. Grade IV damage. ×1 000 magnification.

表 2 鲜精及冻精单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 检测的 DNA 损伤分级 (n = 400, Mean ± SD)

Table 2 Classification of DNA damage detection of comet rate in fresh sperm and frozen-thawed sperm

组别 Groups	DNA 损伤级别 Classification of DNA damage					彗星率 (%) Comet Rate	损伤系数 Damage Coefficient
	0 级 (%) Grade 0	I 级 (%) Grade I	II 级 (%) Grade II	III 级 (%) Grade III	IV 级 (%) Grade IV		
鲜精 Fresh sperm	64.00 ± 3.37	19.75 ± 1.71	12.50 ± 1.91	3.75 ± 0.50	0.00 ± 0.00	36.00 ± 3.37	56.00 ± 5.48
E1	63.25 ± 4.35	20.25 ± 2.63	12.75 ± 2.22	3.75 ± 0.50	0.00 ± 0.00	36.75 ± 4.35	57.00 ± 6.68
E2	63.00 ± 2.58	21.00 ± 2.16	10.50 ± 1.91	5.50 ± 1.29	0.00 ± 0.00	37.00 ± 2.58	58.00 ± 6.53
E3	56.75 ± 3.59	22.00 ± 2.83	15.50 ± 2.89	5.50 ± 1.91	0.25 ± 0.50	43.25 ± 3.59	70.50 ± 8.54
E4	56.25 ± 2.87	22.75 ± 0.96	14.75 ± 1.71	5.25 ± 1.26	1.00 ± 1.15	43.75 ± 2.87	72.00 ± 8.98
E5	45.75 ± 4.35*	23.75 ± 3.40	20.00 ± 4.24*	7.75 ± 1.71*	2.75 ± 1.71	54.25 ± 4.35*	100.50 ± 12.12*
E6	36.75 ± 7.72*	27.75 ± 2.22*	23.25 ± 4.79*	8.25 ± 3.30*	4.00 ± 3.46*	63.25 ± 7.72*	115.00 ± 24.12*

\* 与鲜精相比差异显著, P < 0.05. \* Significant effect of the treatment, P < 0.05.

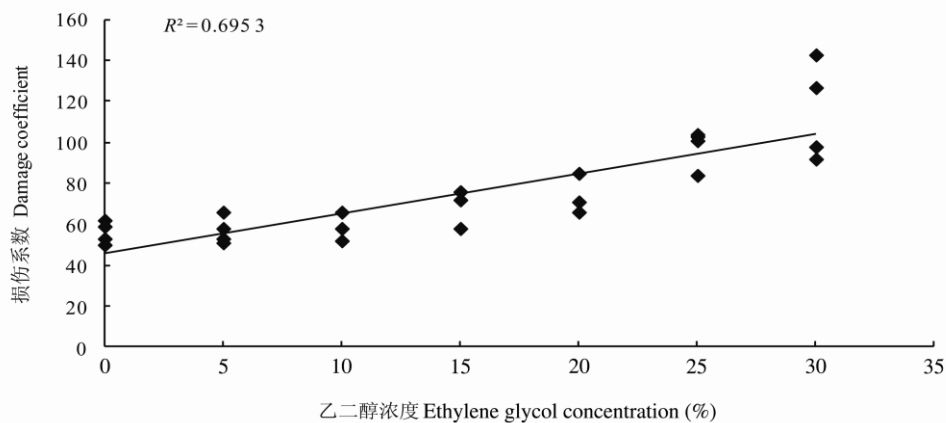


图 3 鲜精及冻精 DNA 损伤系数与乙二醇浓度的相关性

Fig. 3 Correlation of damage coefficient and ethylene glycol concentration of fresh sperm and frozen-thawed sperm

### 3 讨论

乙二醇(EG)是较常用的渗透性抗冻剂之一,已在某些鱼类精子超低温冷冻保存研究中应用。例如,姜建湖等(2011)对大黄鱼精子的超低温冷冻保存研究表明,乙二醇(EG)浓度在5%~20%时冻精的活力与鲜精相比无显著差异,乙二醇(EG)浓度在25%和30%时冻精的活力显著下降。王伟等(2010)研究表明,以Cortland液为稀释液,10%乙二醇(EG)为抗冻剂超低温冷冻保存鳊鱼精子,冻精活力与鲜精活力相比无显著差异,乙二醇(EG)浓度低于或高于10%时冻精活力明显下降。章龙珍等(2009)研究发现,16%乙二醇(EG)为抗冻剂超低温冷冻保存褐牙鲈精子,解冻后激活率较高,乙二醇(EG)浓度低于或高于16%时冻精活力下降。韩龙江等(2014b)以HBSS为稀释液,10%、15%乙二醇(EG)为抗冻剂超低温冷冻保存条纹锯鲷(*Centropristis striata*)精子效果较好,冻精激活率较高,乙二醇(EG)浓度为5%、20%时,冻精激活率明显下降。本研究发现,5%、10%、15%乙二醇(EG)组冻精的运动时间及寿命与鲜精相比差异不显著;20%、25%、30%乙二醇(EG)组冻精的运动时间及寿命与鲜精相比差异显著。可见,适当浓度的乙二醇(EG)为抗冻剂适于黄姑鱼等一些海水鱼类精子超低温冷冻保存。此外,乙二醇(EG)作为抗冻剂也在贝类精子冷冻保存中应用。Ieropoli等(2004)在超低温冷冻保存太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)精子的抗冻剂毒性实验中发现,10%乙二醇(EG)为抗冻剂,其效果较好。韩龙江等(2014a)以HBSS为稀释液,10%乙二醇(EG)为抗冻剂,超低温冷冻保存太平洋牡蛎精子,其运动率达27.93%。Di Matteo等(2009)对紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)精子的冷冻保存研究发现,7%乙二醇(EG)作为抗冻保护剂效果更佳。吴丽云等(2011)以15%乙二醇(EG)为抗冻剂,4°C/min冷冻速率冻存西施舌(*Coelomactra*

*antiquata*)精子,其成活率达95.53%。精子在冷冻及解冻过程中因冷休克、渗透压改变、冰晶影响及抗冻剂毒副作用等原因会引起细胞膜性结构及核DNA损伤(Zilli et al. 2003, Martínez-Páramo et al. 2009),适当浓度的抗冻剂对冻精细胞结构完整性有较好的保护作用(陈松林 2007)。姜建湖等(2011)用单细胞凝胶电泳技术(SCGE)对大黄鱼冻精核DNA损伤的检测表明,乙二醇(EG)浓度在5%~20%时,大黄鱼冻精核DNA损伤与鲜精相比差异不显著,乙二醇(EG)为25%和30%时冻精的DNA损伤与鲜精相比明显加重,冻精DNA损伤与乙二醇(EG)的使用浓度成正相关。魏平等(2010)对真鲷(*Pagrosomus major*)精子超低温冷冻保存研究表明,5%~20%乙二醇(EG)为抗冻剂的冻精DNA损伤情况与鲜精差异不显著,而25%、30%乙二醇(EG)为抗冻剂,冻精的DNA损伤情况与鲜精差异显著,而且以轻度和中度损伤为主,重度损伤比率较低。本实验表明,黄姑鱼冻精DNA损伤程度随着乙二醇(EG)使用浓度的升高而增大,乙二醇(EG)浓度在5%~20%范围内,冻精DNA损伤状况与鲜精接近,乙二醇(EG)浓度高于20%时,冻精DNA损伤比鲜精明显加重,冻精的活力明显下降。可见,抗冻剂乙二醇(EG)浓度在5%~20%范围内适于一些鱼类精子的超低温冻存。因此,为使黄姑鱼冻精核DNA少受损伤,宜将乙二醇(EG)的使用浓度控制在5%~20%范围内,同时考虑到使黄姑鱼冻精活力接近鲜精水平,建议乙二醇(EG)的实际使用浓度以5%~15%为佳。

### 参 考 文 献

- Di Matteo O, Langellotti A L, Masullo P, et al. 2009. Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology*, 58(2): 145-150.
- Evenson D P, Larson K L, Jost L K. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal*

- of Andrology, 23(1): 25–43.
- Evenson D P, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5): 979–991.
- Ieropoli S, Masullo P, Do Espirito S M, et al. 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology*, 49(3): 250–257.
- Mart ínez-P áramo S, P érez-Cerezales S, G ómez-Romano F, et al. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, 71(4): 594–604.
- Xu X R, Zhu J Q, Ye T, et al. 2013. Improvement of single-cell gel electrophoresis (SCGE) alkaline comet assay. *Aquatic Biology*, 18(3): 293–295.
- Zilli L, Schiavone R, Zonno V, et al. 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47(3): 227–235.
- 蔡厚才, 林岩璇, 陈传再. 2000. 南鹿海区黄姑鱼网箱养殖技术研究. *浙江海洋学院学报*, 20(1): 66–69.
- 陈松林. 2007. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术. 北京: 中国农业出版社.
- 程顺, 闫家强, 竺俊全, 等. 2013. 甘油为抗冻剂超低温冷冻保存大黄鱼精子的DNA损伤. *中国畜牧杂志*, 49(11): 34–36.
- 韩龙江, 黄雯, 刘清华, 等. 2014a. 太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 精液的超低温保存研究. *海洋与湖沼*, 45(5): 1085–1091.
- 韩龙江, 刘清华, 官曙光, 等. 2014b. 条纹锯鲷精液超低温冷冻保存研究. *水产学报*, 38(10): 1714–1721.
- 姜建湖, 闫家强, 竺俊全, 等. 2011. 大黄鱼精子的超低温冻存及细胞结构损伤的检测. *农业生物技术学报*, 19(4): 725–733.
- 金春华, 闫家强, 竺俊全. 2011. 黄姑鱼精子的超低温冻存及细胞结构损伤的检测. *水产学报*, 35(6): 846–853.
- 刘巧灵. 2009. 黄姑鱼 *Nibea albiflora* (Richardson) 苗种网箱暂养技术研究. *现代渔业信息*, 24(1): 20–22.
- 孙忠, 余方平, 程国宝. 2005. 舟山近海黄姑鱼室内全人工育苗技术研究. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 24(1): 27–47.
- 王伟, 叶霆, 闫家强, 等. 2010. 鲉鱼精子的生理特性及超低温冻存. *生物学杂志*, 27(6): 13–20.
- 魏平, 竺俊全, 闫家强, 等. 2010. 真鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的检测. *水生生物学报*, 34(5): 1049–1055.
- 吴丽云. 2011. 西施舌精子冷冻保存及其冷冻损伤机理研究. 福州: 福建师范大学硕士学位论文.
- 杨育凯, 谢仰杰, 蔡明夷, 等. 2013. 黄姑鱼雌核发育诱导及鉴定. *水产学报*, 37(9): 1297–1303.
- 叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 等. 2009. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测. *动物学研究*, 30(2): 151–157.
- 章龙珍, 闫文罡, 庄平, 等. 2009. 褐牙鲆精子生理特性及超低温冷冻保存. *上海海洋大学学报*, 18(1): 21–27.