

## 斑马鱼的体外受精

### *In vitro* Fertilization Technology of Zebrafish

李玲璐, 谢训卫, 潘鲁媛\*, 孙永华\*

国家斑马鱼资源中心, 国家水生生物种质资源库, 中国科学院水生生物研究所, 武汉, 湖北

\*通讯作者邮箱: [yhsun@ihb.ac.cn](mailto:yhsun@ihb.ac.cn), [luyuanpan@ihb.ac.cn](mailto:luyuanpan@ihb.ac.cn)

引用格式: 李玲璐, 谢训卫, 潘鲁媛, 孙永华. (2022). 斑马鱼的体外受精. *Bio-101* e1010938. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010938.

How to cite: Li, L. L., Xie, X. W., Pan, L. Y. and Sun, Y. H. (2022). *In vitro* Fertilization Technology of Zebrafish. *Bio-101* e1010938. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010938. (in Chinese)

**摘要:** 斑马鱼体外受精是在体外通过人工干预的方式实现精准受精的技术方法。斑马鱼体外受精可使用新鲜收集或超低温冻存保藏的精子样品, 与新鲜收集的卵子混合后受精。体外受精技术可用于实现精确的受精时间控制, 严格同龄受精卵的获得, 自然交配产卵有困难的品系传代, 以及一次性获得大批量受精卵等实验目的, 是开展斑马鱼实验的一种基础而重要的繁育手段。

**关键词:** 斑马鱼, 体外受精, 精子, 卵子

### 材料与试剂

1. 1.5 mL 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
2. 10  $\mu$ L 一次性吸头 (Axygen, catalog number: T300)
3. 200  $\mu$ L 一次性吸头 (Axygen, catalog number: T200)
4. 35 mm 一次性塑料平皿 (海门, 货号: HC027)
5. 90 mm 一次性塑料平皿 (海门, 货号: HC030)
6. 3 mL 塑料吸管 (海泰, 货号: HC001)
7. 0.5 mL 冻存管储存盒, 内含开盖器 (Thermo, catalog number: 3744WHI)
8. 鱼捞 (上海海圣, 货号: HS018)
9. 海绵鱼托 (自制, 用于固定雄鱼位置)
10. 细轴吸水棉签 (超市采购)

11. 吸水纸或厨房用纸（超市采购）
12. 泡沫盒
13. 长柄刮勺
14. 塑料勺子（边缘光滑）
15. 性成熟雌、雄斑马鱼
16. 75%医用消毒酒精（惠昌，货号：BI10009259-2）
17. 8%次氯酸钠溶液（3A, catalog number: A04633）
18. Tricaine（Sigma, catalog number: E10521），4 °C 短期储存，-20 °C 长期储存
19. NaCl（Sigma-Aldrich, catalog number: 746398）
20. KCl（Sigma-Aldrich, catalog number: 746436）
21. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（Sigma-Aldrich, catalog number: RES20908）
22. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（Sigma-Aldrich, catalog number: PHR1330）
23. CaCl<sub>2</sub>（Sigma-Aldrich, catalog number: 793639）
24. MgSO<sub>4</sub>（Sigma-Aldrich, catalog number: 63138）
25. NaHCO<sub>3</sub>（Sigma-Aldrich, catalog number: 792519）
26. 胚胎养殖水（高温灭菌）
27. 去离子水（高温灭菌）
28. 液氮
29. 麻醉剂 Tricaine 储液（见溶液配方）
30. Hanks 储存液（见溶液配方）
31. Hanks Premix 溶液（见溶液配方）
32. Hanks 溶液 6（见溶液配方）
33. Hanks Buffer 溶液（见溶液配方）
34. 胚胎消毒储存液（6%次氯酸钠）（见溶液配方）
35. 亚甲基蓝储存液（5 g/L）（见溶液配方）

## 仪器设备

1. 配种缸（上海海圣，型号：HS022）
2. 20 cm 带齿镊子（Vetus, catalog number: MT-200）

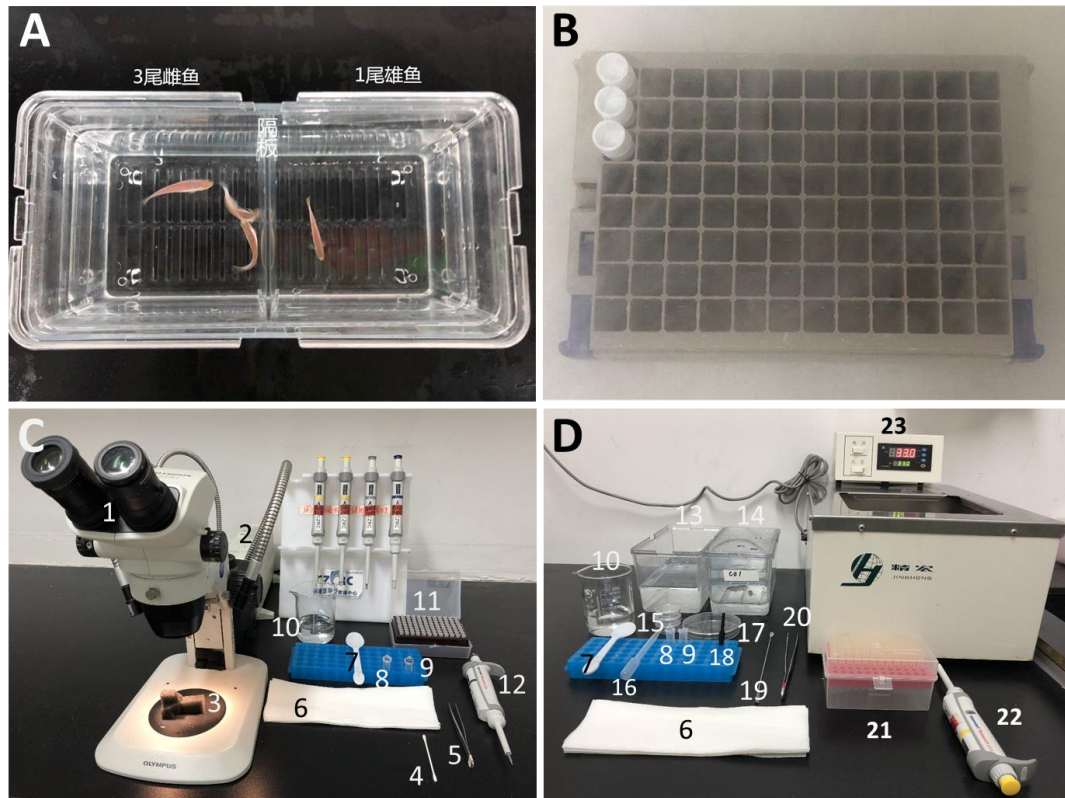
3. 250 mL 烧杯 (Bomex, catalog number: 20201-250)
4. 宽头镊子 (Vetus, catalog number: 33A-SA)
5. 0.1-2.5  $\mu$ L 移液器 (Eppendorf, catalog number: 3120000216)
6. 20-200  $\mu$ L 移液器 (Eppendorf, catalog number: 3120000054)
7. 无菌过滤器接收瓶 (Thermo, catalog number: 455-0150)
8. 解剖显微镜 (Olympus, catalog number: SZ2-LGB)
9. 鹅颈灯 (Olympus, catalog number: LG-PS2)
10. 恒温水浴锅 (精宏, 型号: DKB-501S)
11. 恒温培养箱 (精宏, 型号: HWS-080)

## 实验步骤

### 1. 准备工作

- a. 为提高斑马鱼雌鱼的产卵量和雄鱼的产精量, 必须在实验前 1 至 2 周将雌雄鱼分开饲养, 并增添活体饵料投喂。
- b. 雌鱼的准备: 实验前一天的下午, 准备装有养殖水的配种缸, 水量约占配种缸体积的三分之二, 将准备用于收集卵子的雌鱼, 按照雌、雄鱼 3:1 的比例放置在配种缸隔板两侧 (图 1A)。将配种缸放置在平时养殖的鱼房台面上, 让斑马鱼保持正常作息。
- c. 雄鱼的准备: 实验前一天的下午, 将准备用于收集新鲜精子样品的雄鱼, 从养殖系统转移到配种缸中过夜。
- d. 体外受精实验必须在早晨进行, 尽量在鱼房光周期开始后 3 小时内完成。
- e. 如果需要复苏超低温冻存保藏的精子样品, 需要在实验前将冻存精子样品从液氮储藏罐中取出, 在泡沫盒中注入液氮, 将冻存精子样品浸入其中备用 (图 1B)。
- f. 实验前将海绵鱼托、宽头镊子、长柄刮勺、塑料勺子、烧杯用 75 % 酒精消毒后风干备用 (图 1C)。
- g. 实验当天早上需要新鲜配置 Hanks Buffer 溶液。
- h. 将鱼房中前一天放置的装有雌雄鱼的配种缸拿到实验场所, 与自然交配产卵不同, 第二天早晨不要抽开隔板, 不要让雌鱼接触雄鱼。
- i. 打开解剖显微镜和鹅颈灯。如需复苏超低温冻存保藏的精子样品, 则打开恒温

水浴锅并将水温调至 33 °C (图 1D)。

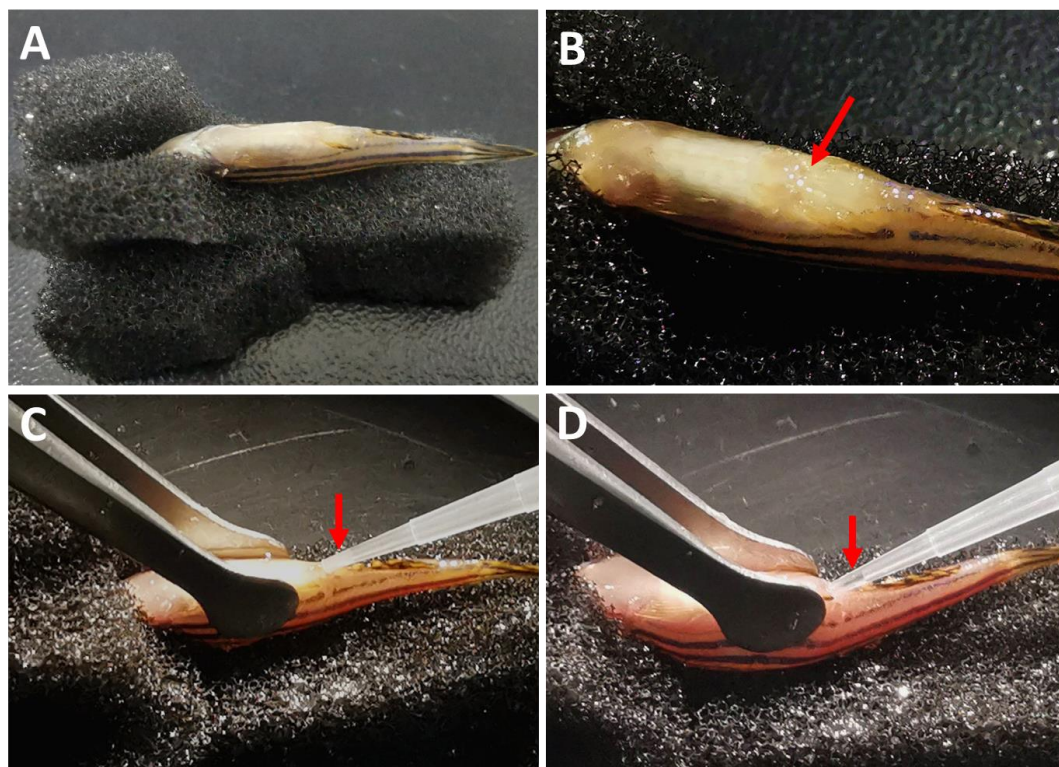


**图 1. 斑马鱼体外受精准备示意图.** A. 配种缸中雌雄鱼的放置; B. 液氮中的冻存精子样品; C. 收集精子样品工作台, D. 收集卵子工作台。(C/D) 中编号: 1. 解剖显微镜; 2. 鹅颈灯; 3. 海绵鱼托; 4. 细轴吸水棉签; 5. 宽头镊子; 6. 吸水纸; 7. 塑料勺子; 8. 1.5 mL 离心管分装 50  $\mu$ L Hanks Buffer 溶液; 9. Hanks Buffer 溶液; 10. 250 mL 烧杯装麻醉剂; 11. 10  $\mu$ L 一次性吸头; 12. 2.5  $\mu$ L 移液器; 13. 胚胎养殖水; 14. 待体外受精的鱼系; 15. 35 mm 一次性塑料平皿; 16. 3 mL 塑料吸管; 17. 90 mm 一次性塑料平皿; 18. 0.5 mL 冻存管开盖器; 19. 长柄刮勺; 20. 20 cm 带齿镊子; 21. 200  $\mu$ L 一次性吸头; 22. 200  $\mu$ L 移液器; 23. 恒温水浴锅。

## 2. 收集新鲜精子样品

- a. 在 1.5 mL 离心管中加入 50  $\mu$ L Hanks Buffer 溶液备用。将自制海绵鱼托放入养殖水中浸湿，以湿润但不出水为原则。

- b. 在烧杯中将麻醉剂稀释至工作浓度（即 **0.168 g/L**），将斑马鱼雄鱼放入其中进行麻醉，直至腮动停止，鱼身失去平衡，侧面躺倒在水中则已进入深度麻醉状态。
- c. 将已经充分麻醉的雄鱼用勺子捞出，放在吸水纸上，用勺子将鱼身翻一次，每一面 **1 至 2 秒钟**，吸掉鱼身上的多余水分，不要过分干燥以免损伤鱼鳞给鱼造成不可逆转的伤害。
- d. 将吸干水分的雄鱼放置在自制海绵鱼托上，腹部朝上，固定住鱼头（图 **2A**），用细轴吸水棉签分开腹鳍，露出泄殖孔，并将泄殖孔附近的水分进一步吸干（图 **2B**）。
- e. 将夹有雄鱼的海绵鱼托放在解剖显微镜下，并且将鹅颈灯光源集中在雄鱼腹部泄殖孔的位置。在显微镜下用宽头镊子轻轻挤压雄鱼的腹部，用 **2.5  $\mu$ L** 移液器吸头收集精子样品，之后将雄鱼放回水中。精子样品以白色乳状液体为佳（图 **2C**），如呈透明水状则为质量差的样品（图 **2D**），受精率会受到影响。
- f. 将收集到的白色乳状液体加入准备好的 **50  $\mu$ L Hanks Buffer** 溶液中，与溶液混合均匀，做好样品标记。样品短时间（**1 小时内**）可室温放置，在 **4  $^{\circ}$ C** 环境下，受精活力可以保存一周（**Alavi and Cosson, 2006**）。如需长期保存，则需要通过斑马鱼精子冻存实验后（见本手册斑马鱼精子冻存章节），在液氮中保藏，如操作和保藏得当，超低温环境下精子样品的受精活力可维持 **10 年以上**。



**图 2. 斑马鱼精子样品收集操作示意图.** A. 将麻醉好的雄鱼吸干水分后，腹部朝上固定在海绵鱼托上； B. 光源集中在腹部泄殖孔处，红色箭头处为泄殖孔； C. 使用宽头镊子轻轻挤压鱼腹收集精子样品，红色箭头标示收集到优质精子样品呈乳白状； D. 使用宽头镊子轻轻挤压鱼腹收集精子样品，红色箭头标示收集到劣质精子样品呈透明状。

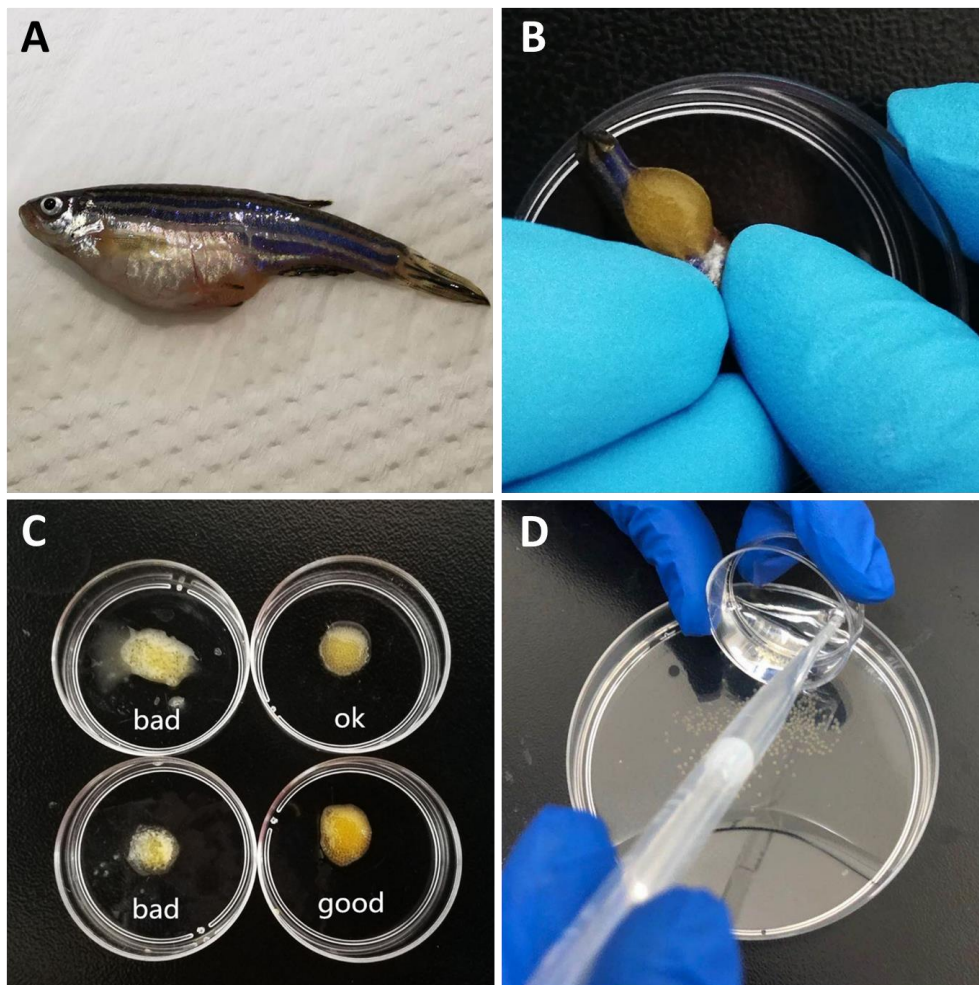
### 3. 收集新鲜卵子

- a. 在所有精子样品都准备好的前提下，开始进行卵子收集。捞取斑马鱼雌鱼放入麻醉剂中进行麻醉。
- b. 将已经充分麻醉的雌鱼用勺子捞出，放在吸水纸上，用勺子将鱼身翻一次，每一面 1 至 2 秒钟，吸掉鱼身上的水分（图 3A）。
- c. 用勺子将雌鱼侧躺放入 35 mm 平皿中，略略润湿两手食指，湿润但不要滴水，以减轻对鱼体表面的伤害。用左手食指轻轻抵住鱼背，防止鱼移动，用右手食指轻轻挤压雌鱼腹部，卵子会由泄殖孔排出（图 3B），用长柄刮勺轻轻将卵子与鱼身分离，不要刮伤鱼身（视频 1），之后将雌鱼放回水中（Carmichael *et al.*, 2009）。



视频 1. 斑马鱼体外受精

- d. 一尾雌鱼产卵量少时，可混合 2 至 3 尾雌鱼产的卵子。卵子质量是受精成功与否的决定因素之一。质量好的卵子是金黄色、饱满、粘稠、透亮的；而颜色苍白、质地不匀、含有絮状物、缺少完整卵型等情况都属于质量不好的卵子（图 3C），这样的卵子不能使用，会极大地影响受精率。
  - e. 未受精卵收集后，将装有卵子的平皿倒置在桌上以防止卵子风干。卵子离开母体后要尽快使用，放置超过 2 分钟的卵子表面干燥，不能再接受精子进行受精，这样的卵子无法使用。
4. 新鲜精子样品的体外受精
    - a. 卵子收集好后，将收集到含有新鲜精子样品的 Hanks Buffer 溶液混合液吹打均匀后加入未受精卵中，加入一小勺（约 750  $\mu$ L）养殖水，激活精子让其与卵子充分接触，在培养皿盖上做好标记。
    - b. 装有受精卵的 35 mm 培养皿室温放置 5 分钟后，用吸管吸取胚胎养殖水小心地将胚胎冲洗至 90 mm 培养皿中（图 3D），加入胚胎养殖水至平皿 2/3 处，并在培养皿盖上做好标记。放入 28.5  $^{\circ}$ C 恒温培养箱内养殖。



**图 3. 斑马鱼卵子收集操作示意图.** A. 将麻醉好的雌鱼吸干水分；B. 轻轻挤压雌鱼腹部，卵子由泄殖孔流出；C. 不同质量的卵子样品；D. 将受精后的胚胎冲洗至 90 mm 平皿中。

## 5. 冻存精子样品的体外受精

- a. 提前吸取 50  $\mu$ L Hanks Buffer 溶液在移液器吸头内，放在手边备用。
- b. 待收集到质量好的卵子后，迅速开始冻存精子样品复苏。用冻存管开盖器将精子冻存样品从液氮中取出，一只手垫着吸水纸捏住冻存管管壁，另一只手用开盖器小心拧开冻存管盖子（图 4A）。
- c. 如冻存管内有液氮，请小心倒出。之后将冻存管下半部分迅速浸入 33  $^{\circ}$ C 水浴中回温 8 至 10 秒（图 4B）（Draper and Moens, 2009）。此过程中注意，不要将水浴锅中的水浸到冻存管中，以免影响精子活性。

- d. 从水浴中拿出冻存管，迅速加入已准备好的 50  $\mu\text{L}$  Hanks Buffer 溶液，吹打数下后全部加入收集好的未受精卵中，轻轻混匀，立即加入一小勺（约 750  $\mu\text{L}$ ）胚胎养殖水激活，并在培养皿盖上做好标记。
- e. 装有受精卵的 35 mm 培养皿室温放置 5 分钟后，用吸管吸取胚胎养殖水小心地将胚胎冲洗至 90 mm 培养皿中，加入胚胎养殖水至平皿 2/3 处，并在培养皿盖上做好标记。放入 28.5  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内养殖。
- f. 在冻存保藏过程中，冻存管内部可能浸入液氮，也可能形成一定的负压。冻存管离开液氮环境后会立即开始回温，在拧开盖子空气进入的瞬间，液氮可能会喷溅出来。在整个操作的过程中都要注意安全，精力集中，手法稳定，以免液氮飞溅或泼出造成冻伤。

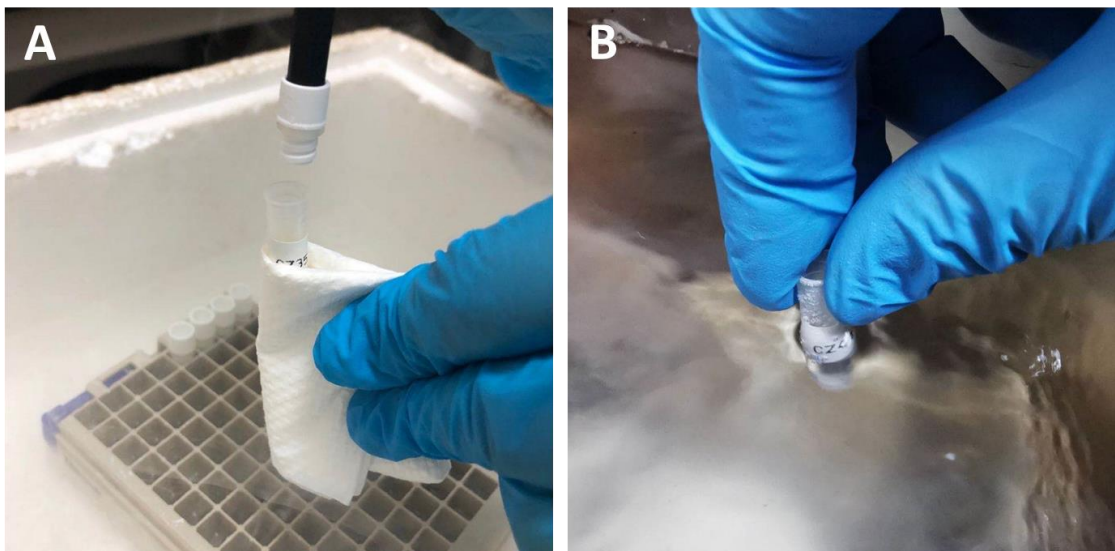


图 4. 复苏超低温冻存保藏的精子样品操作示意图. A. 开盖器拧开精子冻存管；  
B. 冻存管浸入 33  $^{\circ}\text{C}$  水浴中。

## 6. 受精卵的分拣及受精率统计

- a. 在 28.5  $^{\circ}\text{C}$  培养条件下，受精后约 3 小时进入 1000 细胞期，6 小时胚盾开始形成，其间是较容易分辨受精与未受精鱼卵的时期（Kimmel CB, 1995），以发育到 high stage 为最佳分拣时期。
- b. 将受精卵与未受精卵分别挑出并计数，统计受精率。

- c. 为保证养殖系统的健康，挑拣出来的胚胎用胚胎消毒液消毒 2 次，再用胚胎养殖水冲洗干净（Carmichael *et al.*, 2009）。
- d. 消毒后的胚胎放置于含 0.5 mg/L 亚甲基蓝的胚胎养殖水中，放入恒温培养箱中 28.5 °C 培养，以小于 50 枚/90 mm 皿的密度静水养殖，前 5 天胚胎需要每天更换养殖水，并检出败育的死胚。

## 结果与分析

精子样品与未受精卵子结合后，放置在 28.5 °C 标准培养温度下培养 3 小时后，于显微镜下观察，可以看到正常的受精卵进入 1000 细胞期，而未受精鱼卵可能在早期也会膨起动物极，并发生 1 至 2 次假性细胞分裂，但是分裂不规律，而且不会继续发育。1000 细胞期至 high stage 阶段较易分别受精胚胎和未受精卵。

新鲜收集的精子样品和超低温冻存保藏的精子样品的受精活力是有差异的。在与高质量的未受精卵子结合后，前者的受精率一般在 90% 以上，甚至接近 100%；而后者的受精率受冻存操作和样品保藏质量的影响，可能在 10% 至 90% 之间（Yang, 2007; Carmichael *et al.*, 2009; Draper and Moens, 2009）。国家斑马鱼资源中心超低温保藏的精子样品，最早冻存于 2015 年，至今已有 7 年，平均复苏后受精率在 53% 左右。相对于新鲜精子样品，超低温冻存保藏的精子样品的复苏，对卵子的质量要求更高。

## 失败经验

1. 收集的精子样品量少、质量差可能有以下几个方面原因：
  - a. 雄鱼鱼龄太小或太老，或有鱼病。正常养殖情况下，斑马鱼 3 个月左右性成熟。如养殖密度过高、喂养不足、无活饵料喂养都会造成斑马鱼瘦小且性成熟推迟的情况，此时收集精子样品不仅少而且质量差。并且由于鱼体瘦小，很容易因麻醉或挤压过度而造成死亡。所以用于实验的雄鱼应有 6 至 18 个月鱼龄并且健康无病，体型不能太小。
  - b. 投喂不足。斑马鱼日常投喂饵料不足，或者投喂的颗粒性饲料中蛋白质含量不足，都可能导致其不产精或者产精量低。故用于收集精子样品的雄鱼每日不得投喂少于 2 顿活体饵料，或者投喂的颗粒性饲料应含有较高水平的蛋白质。
2. 收集的卵子量少、质量差可能有以下几个方面原因：

- a. 雌鱼鱼龄太小或太老，有鱼病。与雄鱼一样，养殖密度过高、喂养不足、无活饵料喂养都会造成斑马鱼瘦小且性成熟推迟的情况，此时收集卵子量少，并且由于鱼体瘦小，很容易因麻醉或挤压过度而造成死亡。所以用于实验的雌鱼应有 6 至 18 个月鱼龄并且健康无病。
  - b. 斑马鱼投喂不足，或养殖密度过高。与雄鱼一样，斑马鱼日常投喂饵料不足，或者投喂的颗粒性饲料中蛋白质含量不足，都可能导致其不产卵或者产卵量低。由于雌鱼孕育卵子需要消耗较多能量，体外受精中挤压的过程对雌鱼的伤害也比较重，因此雌鱼所需要更多营养恢复身体状况。用于体外受精的雌鱼，日常以 3 尾/L 的密度养殖在循环系统中，并且每日不得投喂少于 2 顿活体饵料。
  - c. 雌鱼在配种缸中过夜时密度过高。体外受精实验需要提前一天将雌雄鱼放置在配种缸中，配种缸中鱼的密度过高会导致水质下降，鱼的状态不佳，对雌鱼第二天排卵造成影响。因此一个配种缸中雌鱼的数量不要超过 3 尾，整个配种缸中斑马鱼的数量总和不要超过 4 尾。
  - d. 收集时间有误。光周期开始后 3 小时内，雌鱼感应光照，进入产卵状态（Nüssleinvolhard, 2002），是每天收集卵子的唯一可行时间。光周期开始 3 小时后，雌鱼会在腹中降解已产生的卵子，即便收获到卵子，也常为坏卵，不适于体外受精。
3. 受精率低可能有以下几个原因：
    - a. 收集到雄鱼的精子样品少、质量差。解决方法见 1
    - b. 收集到雌鱼的卵子量少、质量差。解决方法见 2
    - c. 对卵子质量判断有误。体外收集到的未受精卵情况千差万别，好的卵子需同时满足金黄色、饱满、粘稠、透亮等条件。对卵子判断失误，是造成受精率低甚至得不到受精卵的主要原因。
    - d. Hanks Buffer 溶液不新鲜。Hanks Buffer 溶液必须在使用当天新鲜配置，不新鲜的 Hanks Buffer 对体外受精，尤其是超低温冻存精子样品复苏的受精率有很大影响。
  4. 实验后死鱼或引起鱼病可能有以下几个原因：
    - a. 麻醉时间过长。麻醉的目的是让斑马鱼暂时失去知觉，让鱼在无痛和不挣扎的情况下完成实验。因此麻醉剂要稀释至工作浓度（即 0.168 g/L），将鱼麻醉至鱼

鳃刚好不动即捞出，迅速完成操作后，将鱼放回水中复苏，长时间处于深度麻醉状态会造成鱼的死亡。

- b. 鱼身干燥过度或鱼鳞受损。在操作过程中用吸水纸吸干水分，是避免卵子或精子携带过多水分，过早激活精子，无法实现精准受精。过度吸干水分会造成鳞片的损伤，挤压鱼腹的宽头镊子和手指、固定雄鱼的海绵鱼托如果没有事先润湿也会损伤鱼鳞，这些操作中造成的创口，容易成为细菌感染的破口。所以操作过程接触鱼身的材料都需要润湿，操作要轻柔，尽量避免让鱼身受伤。
- c. 挤压用力过度。在收集精子样品过程中，用宽头镊子挤压雄鱼腹部，或用手指积压雌鱼腹部时，用力过度可能造成内脏损伤、鱼鳔破裂、腹部出血甚至死亡。因此，挤压过程动作要轻柔。
- d. 实验用鱼使用过于频繁。挤压雌、雄鱼的过程，会对鱼身造成一定的伤害，因此人工授精操作频率不能小于半个月，最好为间隔 1 个月或更久。挤过的雌、雄鱼，一周后可以用于自然配鱼产卵。

## 溶液配方

### 1. 麻醉剂 Tricaine 储液 (Westerfield, 2007)

称取 400 mg Tricaine 溶于 90 mL 去离子水中，加入 2.1 mL Tris (1M, pH9.0) 调节 pH 至 7.0，定容至 100 mL，4 °C 短期储存，-20 °C 长期储存。使用时，将 4.2 mL tricaine 储液稀释于 100 mL 去离子水中，工作液要求现用现配。

### 2. Hanks 储存液 (Nüssleinvolhard, 2002)

**Hanks 储液 1:** 8.0 g NaCl, 0.4 g KCl 溶于 100 mL 去离子水中，过滤除菌，4 °C 储存。

**Hanks 储液 2:** 0.358 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (无水)，0.60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶于 100 mL 去离子水，过滤除菌，4 °C 储存。

**Hanks 储液 4:** 0.72 g CaCl<sub>2</sub> 溶于 50 mL 去离子水中，过滤除菌，4 °C 储存。

**Hanks 储液 5:** 0.601 g MgSO<sub>4</sub> 溶于 50 mL 去离子水中，过滤除菌，4 °C 储存。

### 3. Hanks Premix 溶液

将 10.0 mL Hanks 储液 1，1.0 mL Hanks 储液 2，1.0 mL Hanks 储液 4 和 1.0 mL Hanks 储液 5 溶于 86.0 mL 去离子水中，过滤除菌，4 °C 储存 (使用期 6 个月)。

#### 4. Hanks 溶液 6

0.35 g NaHCO<sub>3</sub> 溶于 10.0 mL 去离子水中，Hanks 溶液 6 需要现用现配。

#### 5. Hanks Buffer 溶液

取 0.1 mL Hanks 溶液 6 与 9.9 mL Hanks Premix 混合，即为 Hanks Buffer 溶液。

#### 6. 胚胎消毒储存液（6 %次氯酸钠）

取 8%次氯酸钠溶液中加入适量的去离子水，配制成浓度 6%的储存液，常温避光保存，保质期 6 个月。使用时，取 100 μL 胚胎消毒储存液加入到 200 mL 的灭菌胚胎养殖水中，配置成胚胎消毒液（0.003% 次氯酸钠溶液），混匀使用。胚胎消毒液必须现用现配。所有含氯溶液均不可带入鱼房，请在鱼房以外环境进行操作。

#### 7. 亚甲基蓝储存液（5 g/L）

取 0.5 g 亚甲基蓝粉末溶于 100 mL 灭菌去离子水中，配制成 5 g/L 的亚甲基蓝储存液，常温长期储存。使用时，取 100 μL 亚甲基蓝储存液溶于 1000 mL 胚胎养殖水中，混匀使用，胚胎养殖水中亚甲基蓝的终浓度为 0.5 mg/L。

## 致谢

国家斑马鱼资源中心得到科技部财政部国家科技资源共享服务平台；国家重点研发计划（2018YFA08010000）；中国科学院生物资源科技服务网络计划动物实验平台项目；湖北省自然资源资源库等项目的支持。

## 参考文献

1. Alavi, S. M. and Cosson, J. (2006). [Sperm motility in fishes. \(II\) Effects of ions and osmolality: a review.](#) *Cell Biol Int* 30(1): 1-14.
2. Carmichael, C., Westerfield, M. and Varga, Z. M. (2009). [Cryopreservation and In Vitro Fertilization at the Zebrafish International Resource Center.](#) *Methods Mol Biol* 546: 45-65.
3. Draper, B. W. and Moens, C. B. (2009). [A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization.](#) *J Vis Exp*(29).
4. Kimmel CB, B. W., Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995). [Stages of embryonic development of the zebrafish.](#) *Develop Dynam* 1995 203: 253-310.

5. Nüssleinvolhard, C. (2002). Zebrafish - A Practical Approach. New York, Oxford University Press.
6. Westerfield, M. (2007). The zebrafish book : a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), M. Westerfield.
7. Yang, H. C., C. Varga, Z. M. Tiersch, T. R. (2007). [Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish \*Danio rerio\*](#). *Theriogenology* 68(2): 128-136.