

# WOW 培养法的研究

马夜肥 王勇胜 万敏 尹宝英 华松 张涌\*

(西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100)

**摘要** WOW 培养法是目前培养胚胎的重要方法之一, 在去透明带胚胎的培养上尤为重要。将拣卵针烧制成圆球状, 在四孔板底烫制 WOW, 将不同时间去除透明带的牛孤雌激活胚培养于 WOW 中。结果显示: 各组的卵裂率(78.9%、81.1% 和 78.9%)与对照组无显著差异( $P>0.05$ ); 移入 6-DMAP 中之前去除组的囊胚率(31.5%)与移入培养液中之前去除组(32.4%)无显著差异( $P>0.05$ ), 而且分别与对照组无差异显著( $P>0.05$ ); 移入离子霉素中之前去除组未得到囊胚。移入 6-DMAP 中之前去除组囊胚细胞数( $113.8\pm 10.1$ )与移入培养液中之前去除组囊胚细胞数( $112.5\pm 8.1$ )和对照组均无显著差异( $P>0.05$ )。分别 5 枚、15 枚和 30 枚为一组进行培养, 对胚胎的后续发育无显著影响。

**关键词** 牛; 无透明带; 孤雌激活; WOW 培养法

随着克隆羊 Dolly 的问世, 体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术已广泛用于克隆动物和转基因动物的生产, 多种不同物种的克隆动物, 如山羊、牛、猪、鼠、猫等已陆续出生<sup>[1]</sup>。但是, 目前体细胞核移植的总体效率仍很低, 大部分显微操作程序仍沿用 Willadsen 最初创立的胚胎细胞克隆的方式, 技术要求高, 克隆效率低, 离生产应用尚有一段距离<sup>[2]</sup>。经研究证明, 透明带对体外培养胚胎的发育不是必须的<sup>[3]</sup>, 利用这一点, Oback 等<sup>[4]</sup>创建了一种核移植方法, 将两无核半卵融合使之达到去核前水平, 再将供体细胞融合到卵母细胞中, 从而达到核移植的目的, 后来将此法称之为手工核移植法。在随后的 5 年里, 通过这种方法, 牛、马、鼠、猪都相继诞生<sup>[4-11]</sup>。手工核移植法比传统核移植法有很多优点: (1)在整个过程中, 所需要的时间少, 技术要求低; (2)手工克隆法有较高的融合率(96.9%)<sup>[12]</sup>, (3)使克隆从实验室走向生产实践成为可能。由于在手工核移植过程中卵母细胞去除了透明带, 所以胚胎培养过程中不能相互接触以防止黏连。2000 年, Vajta 等<sup>[13]</sup>发明了新的培养方法, 即 WOW 培养法(the well of the well system)。此方法是目前国内外培养无透明带胚胎重要方法之一。为了探讨本 WOW 培养法对胚胎发育的影响, 本实验将牛无透明带孤雌激活胚用此方法培养, 验证此培养法是否适合培养牛无透明带胚胎。在利用离子霉素(ionomycin)+6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)激活牛有透明带胚胎时, 两者的浓度分别是 5  $\mu\text{mol/L}$  和 2  $\mu\text{mol/L}$ , 作用时间分别为 5 min 和 4 h。为了验证 5  $\mu\text{mol/L}$  离子霉素和 2 mmol/L 6-DMAP 分别作用 5 min

和 4 h 是否适合去除透明带胚胎的激活, 本实验将去透明带分 3 种情况: (1)移入离子霉素中之前去除; (2)移入 6-DMAP 中之前去除; (3)移入培养液中之前去除。根据这 3 种情况, 就可以验证上述浓度和作用时间的离子霉素和 6-DMAP 对胚胎的毒性。在微滴培养法中, 胚胎数不同对其发育有重要的影响。本实验分别以 5 枚、15 枚、30 枚为一组, 用 WOW 培养无透明带孤雌胚证明胚胎数不同是否对其发育有影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 WOW 的制备

将拣卵针的针尖在火焰上烧成圆球状, 经消毒后在火焰上微热后迅速将针尖压在四孔板(Nunc, 丹麦)底, 待针尖未完全冷却将针拔出, 然后重复上述过程。每个孔中烫制 30~50 个深约 250  $\mu\text{m}$  直径约 200  $\mu\text{m}$  的 WOW, 将四孔板中加入 400  $\mu\text{l}$  SOFaa 液[合成输卵管液(synthetic oviduct fluid, SOF)+2% (V/V)必需氨基酸+1% (V/V)非必需氨基酸+1  $\mu\text{mol/L}$  谷氨酰胺+8 mg/mL BSA (不含脂肪酸)], 用小号球状针尖挤压 WOW, 使气体排出, 然后用 SOFaa 液洗 3 次后备用(图 1)。

### 1.2 牛卵巢的采集、运输以及卵母细胞的采集

牛卵巢采集于西安附近的屠宰场, 卵巢均为黄牛卵巢。采集的卵巢放入装有 23~28  $^{\circ}\text{C}$  无菌生理盐水(内含 100 IU/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/ml}$  硫酸链霉素)

收稿日期: 2007-11-15 接受日期: 2007-12-25

国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No. 2001AA213081)

\* 通讯作者。Tel: 029-87080092, E-mail: zhy1956@263.net

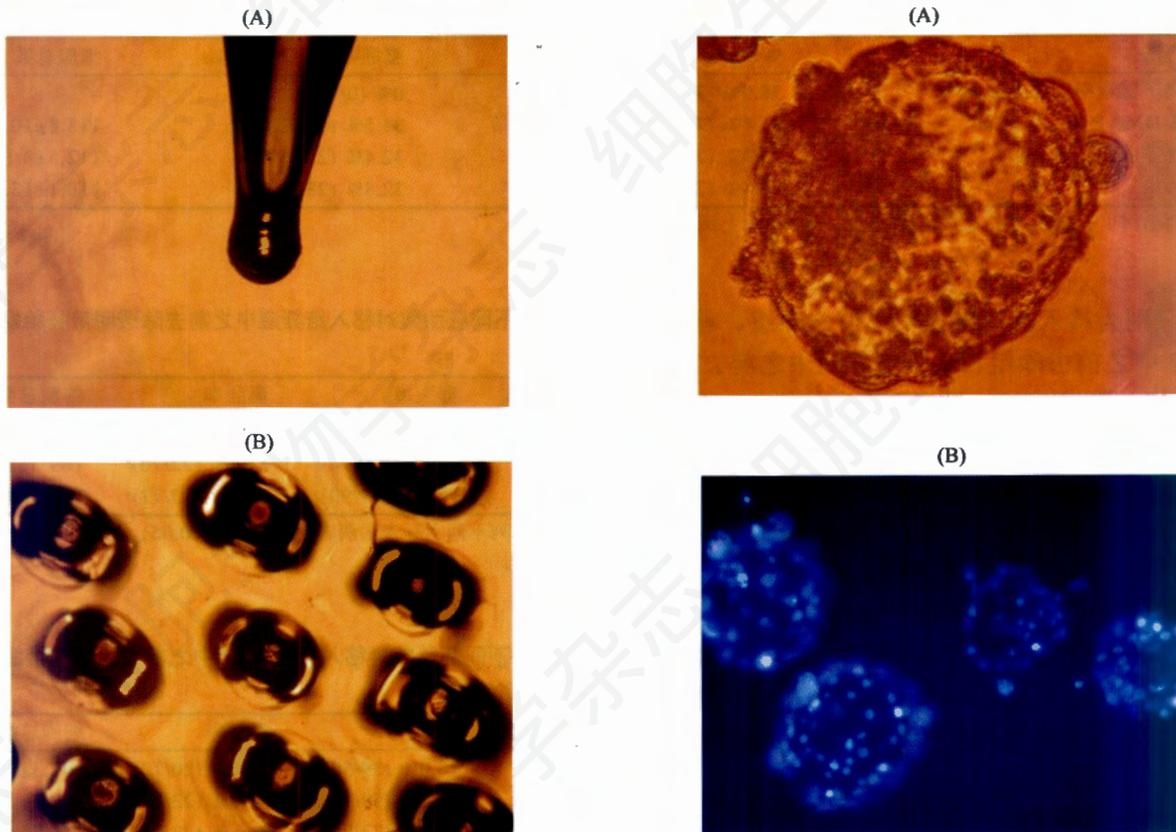


图1 打孔针(A)及 WOWs(B)

的保温瓶中,在6 h内运回实验室。去除卵巢表面的结缔组织、脂肪组织和附着的输卵管,用无菌的生理盐水清洗3次。用带12#针头的10 ml一次性塑料注射器抽取卵巢表面上直径2~8 mm卵泡的卵泡液,抽取的卵泡液用PBS+5%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)稀释后静置片刻,在体视显微镜下收集卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。

### 1.3 卵母细胞的体外成熟培养

选择具有完整卵丘细胞层及均匀细胞质的卵母细胞(A级和B级),用PBS洗3次,再用卵母细胞成熟液[(9.5 g/L M199+10 mmol/L Heps+1 mmol/L 丙酮+25 mmol/L 谷氨酰胺+0.075 U/ml 尿促性素(HMG)(丽珠制药)+1 μg/ml 17-β雌二醇(17-E2)+10% FBS(Gibico)]洗3次,然后移入含成熟液的30 mm培养皿中进行成熟培养。每皿加成熟培养液3 ml,培养卵母细胞200枚以下,且成熟液必须预先在38.5℃、含5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下平衡2 h以上。

### 1.4 卵母细胞的激活和体外培养

成熟培养后的COCs置于0.1%的透明质酸酶中消化,用吸管反复吹打,去掉卵母细胞周围的卵丘细胞后,选择排出第一极体的卵母细胞,将其随机分成

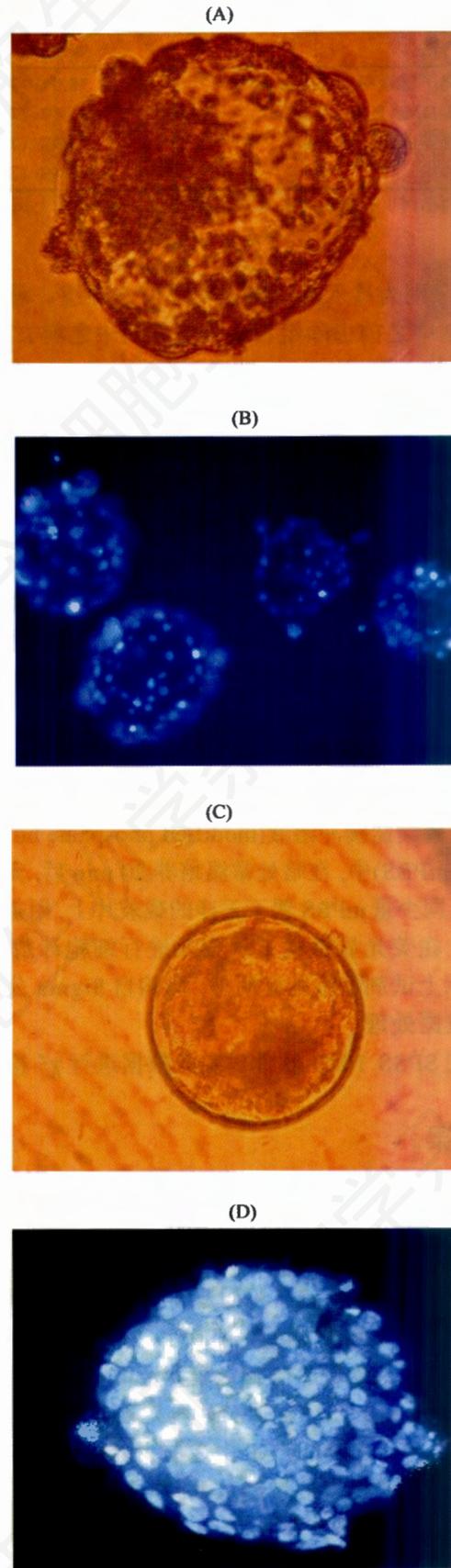


图2 无透明带孤雌囊胚(A)及染色照片(B)和有透明带孤雌囊胚(C)及染色压片(D)

表1 离子霉素和6-DMAP对胚胎发育的影响

处理方法	卵裂率	囊胚率	细胞总数
移入离子霉素中之前去除	78.9% (71/90) <sup>a</sup>	0% (0/71) <sup>a</sup>	-
移入6-DMAP中之前去除	81.1% (73/90) <sup>a</sup>	31.5% (23/73) <sup>b</sup>	113.8±10.1 <sup>a</sup>
移入培养液中之前去除	78.9% (71/90) <sup>a</sup>	32.4% (23/71) <sup>b</sup>	112.5±8.1 <sup>a</sup>
对照	77.8% (70/90) <sup>a</sup>	32.8% (23/70) <sup>b</sup>	110.1±15.3 <sup>a</sup>

同列不同上标表示两者差异显著( $P<0.05$ ), 相同上标表示差异不显著。

3组, 分别为移入离子霉素中之前去除组、移入6-DMAP中之前去除组和移入培养液中之前去除组。根据上述3组, 用0.5%链霉蛋白酶(pronase)处理约1 min, 透明带在不同时间被去除。然后将卵母细胞移入含5  $\mu\text{mol/L}$ 的离子霉素SOFaa液中温育5 min后, 用SOFaa培养液洗3遍, 然后在含2 mmol/L 6-DMAP的SOFaa液中培养4 h, 之后用SOFaa液洗3遍后培养于WOW中。为防止卵母细胞之间相互黏连, 用6-DMAP处理时在WOW中进行。各组均加400  $\mu\text{l}$  SOFaa液并覆盖400  $\mu\text{l}$  石蜡油, 第3天半量换液一次即可。将有透明带孤雌胚用此方法培养作为对照组。

### 1.5 囊胚细胞计数

将发育7天的囊胚移入含10  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst33342的改良磷酸盐缓冲溶液(modified phosphate buffered saline, mPBS)中, 在暗处常温培养20 min后, 充分清洗并连同少量mPBS置于干净的载玻片上, 用盖玻片覆盖。在荧光显微镜下观察并进行细胞计数。

以上试剂除特殊标明外, 均购自Sigma公司。

### 1.6 数据处理

用SPSS 1010软件对实验数据进行 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 离子霉素和6-DMAP对胚胎发育的影响

由表1可看出, 移入6-DMAP中之前去除组和移入培养液中之前去除组发育到囊胚(图2A、图2B), 移入离子霉素中之前去除组未得到囊胚, 3组卵裂率均与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。移入6-DMAP中之前去除组的囊胚率与移入培养液中之前去除组差异不显著( $P>0.05$ ), 而且分别与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。移入6-DMAP中之前去除组与移入培养液中之前去除组囊胚细胞总数和对照组分别无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 不同胚胎数对其发育的影响

2.2.1 不同胚胎数对移入培养液中之前去除透明带胚胎发育的影响 分别以5枚、15枚、30枚为

表2 不同胚胎数对移入培养液中之前去除透明带胚胎发育的影响

胚胎数	卵裂率	囊胚率	细胞总数
5	80.0% (72/90) <sup>a</sup>	33.3% (24/72) <sup>a</sup>	107.9±7.9 <sup>a</sup>
15	77.8% (70/90) <sup>a</sup>	31.4% (22/70) <sup>a</sup>	109.3±12.6 <sup>a</sup>
30	78.9% (71/90) <sup>a</sup>	32.4% (23/71) <sup>a</sup>	112.5±8.1 <sup>a</sup>

同列不同上标表示两者差异显著( $P<0.05$ ), 相同上标表示差异不显著。

表3 不同胚胎数对移入6-DMAP中之前去除透明带胚胎发育的影响

胚胎数	卵裂率	囊胚率	细胞总数
5	78.0% (39/50) <sup>a</sup>	29.6% (20/70) <sup>a</sup>	107.3±7.2 <sup>a</sup>
15	78.7% (59/75) <sup>a</sup>	31.0% (22/71) <sup>a</sup>	108.0±5.2 <sup>a</sup>
30	81.1% (73/90) <sup>a</sup>	31.5% (23/73) <sup>a</sup>	113.8±10.1 <sup>a</sup>

同列不同上标表示两者差异显著( $P<0.05$ ), 相同上标表示差异不显著。

表4 不同胚胎数对移入离子霉素中之前去除透明带胚胎发育的影响

胚胎数	卵裂率	囊胚率
5	76.7% (23/30) <sup>a</sup>	-
15	78.4% (47/60) <sup>a</sup>	-
30	78.9% (71/90) <sup>a</sup>	-

同列不同上标表示两者差异显著( $P<0.05$ ), 相同上标表示差异不显著。

一组, 用WOW培养移入培养液中之前去除透明带孤雌胚, 由表2可以看出, 每组之间的卵裂率和囊胚率都无显著差异( $P>0.05$ )。

2.2.2 不同胚胎数对移入6-DMAP中之前去除透明带胚胎发育的影响 分别以5枚、15枚、30枚为一组, 用WOW培养移入6-DMAP中之前去除透明带孤雌激活胚, 由表3可以看出, 每组之间的卵裂率和囊胚率都无显著差异( $P>0.05$ )。

2.2.3 不同胚胎数对移入离子霉素中之前去除透明带胚胎发育的影响 分别以5枚、15枚、30枚为一组, 用WOW培养移入离子霉素中之前去除透明带孤雌激活胚, 由表4可以看出, 每组之间的卵裂

率无显著差异( $P>0.05$ ), 但均未发育到囊胚。

### 3 讨论

在 WOW 制作方法上, 谭世俭等<sup>[14]</sup>利用大缝衣钢针, 通过手腕用力并做顺时针旋转, 制成圆锥形小凹。此方法的缺点在于在制作 WOW 过程中产生了大量的碎沫, 其对胚胎的发育会有毒性作用, 而且孔壁不是很光滑, 很容易造成卵裂球之间相互分离, 而且囊胚回收率低; Vajta 等<sup>[13]</sup>利用钢针烫制 WOW, 此方法的优点在于能够制作成倒梯形孔, 可是同样存在缺点, 就是孔的制作成功率低。本实验利用玻璃针烫制 WOW, 有效的去除了上述的缺点, 可此法本身缺点就是不能制成倒梯形孔, 不利于卵裂球之间相互黏连。

无透明带胚胎培养过程中, 由于没有透明带的包裹, 在发育至致密化前, 卵裂球之间很容易彼此分离, 所以在制作 WOW 时直径不要过大而且要有适合的深度, 否则卵裂球之间不但容易分离, 而且胚胎容易溢出 WOW, 彼此之间发生黏连。

本实验用链霉蛋白酶去除透明带, 其优点在于它可以同时去除大量胚胎的透明带(200个以内), 而且所用时间短, 对卵母细胞损伤小。但在链霉蛋白酶中作用时, 胚胎会失去原有的圆球状, 变成月牙状, 从链霉蛋白酶中取出后很快变回圆球状, 其机制还有待进一步研究。

在胚胎培养过程中, 胚胎会分泌一些因子, 如 IGF-I、IGF-II、EGF 等, 这些因子会通过自分泌或旁分泌方式作用于胚胎, 使其发育良好。在群培养过程中适量的培养液和恰当的培养方法也有助于胚胎的发育, 但是在群培养过程中, 死亡的胚胎必然裂解一些有毒物质影响正常胚胎的发育<sup>[13]</sup>。利用 WOW 培养法, 由于胚胎之间相互隔离, 且每枚都位于 WOW 中, 不但可以使胚胎分泌的一些因子不被稀释以自分泌方式作用于自身, 还可以阻止有毒物质作用于正常胚胎。

Booth 等<sup>[15]</sup>研究表明, 无透明带卵母细胞对离子霉素敏感度增加。本实验利用 5  $\mu\text{mol/L}$  离子霉素 + 2 mmol/L 6-DMAP 激活卵母细胞分别作用 5 min 和 4 h, 结果表明: 移入离子霉素之前去除组的卵裂率与其他两组及对照组均无显著差异, 但最多发育至 16 细胞, 未得到囊胚。而移入 6-DMAP 之前去除组和移入培养液之前去除组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞总数均无显著差异。说明在激活过程中, 5  $\mu\text{mol/L}$

离子霉素作用 5 min 对无透明带胚胎的毒性在 2 细胞前表现不明显, 而在后续的发育可以表现出来; 而 2 mmol/L 6-DMAP 作用 4 h 对无透明带胚胎发育无影响。而谭世俭<sup>[14]</sup>等将去除透明带的卵母细胞利用 10  $\mu\text{mol/L}$  钙离子载体(A23183)激活 5 min, 再移入 2 mmol/L 6-DMAP 激活培养 4 h, 得到了较高的囊胚率(36.9%)。Vajta 等<sup>[13]</sup>将离子霉素浓度工作浓度降到 2  $\mu\text{mol/L}$ , 作用 5 min, 在 2 mmol/L 6-DMAP 作用 4 h, 得到了较好的发育率。所以, 本实验小组认为利用离子霉素 + 6-DMAP 激活无透明带卵母细胞时, 要降低离子霉素作用时间和(或)浓度。移入 6-DMAP 中之前去除组和移入培养液之前去除组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞总数与对照组均无显著差异, 说明此方法制作 WOW 培养体系适合牛无透明带胚胎的培养。

经大量的实验证明, 进行胚胎体外培养时, 大量胚胎以微滴方式培养有助于其发育。胚胎来源是阻碍人类和一些濒危动物胚胎工程发展的重要因素, 因为少量的胚胎利用微滴培养法囊胚率低。但是也有个别相反地报道<sup>[16-18]</sup>。共培养法进一步模仿了体内环境, 消除了一些毒害因素, 提高了胚胎的质量和发育率<sup>[19]</sup>。但是一些技术上和一些不确定不稳定因素, 会使胚胎很容易污染。本实验分别设 5 枚、15 枚和 30 枚为一组利用 WOW 进行培养, 从表 2、表 3、表 4 可以看出, 每组之间各项参数都无显著差异, 说明利用 WOW 培养法可以进行少量胚胎的培养, 这样就更有利于体外胚胎生产。

### 参考文献(References)

- [1] 张利生等. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29: 881
- [2] Vajta G et al. Biol Reprod, 2003, 68: 571
- [3] Naito K et al. Hum Reprod, 1992, 7: 281
- [4] Oback B et al. Cloning Stem Cells, 2003, 5: 3
- [5] Vajta G et al. Theriogenology, 2004, 62: 1465
- [6] Tecirlioglu RT et al. Reprod Fertil Dev, 2004, 15: 361
- [7] Hall VJ et al. Theriogenology, 2006, 65: 424
- [8] Galli C et al. Nature, 2003, 424: 635
- [9] Lagutina I et al. Reproduction, 2005, 130: 559
- [10] Ribas R et al. Cloning Stem Cells, 2005, 7: 126
- [11] Galli C et al. Anim Reprod Sci, 2006, 98: 39
- [12] Lagutina I, et al. Theriogenology, 2007, 67: 90
- [13] Vajta G et al. Mol Reprod Dev, 2000, 55: 256
- [14] 谭世俭等. 黑龙江畜牧兽医, 2004, (2): 8
- [15] Booth PJ et al. Cloning Stem Cells, 2001, 3: 191
- [16] Hazelegar NL et al. Theriogenology, 1995, 43: 509
- [17] Lee ES et al. Theriogenology, 1995, 44: 71
- [18] Paria BC et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 4756
- [19] Holm P et al. Reprod Nutr Dev, 1998, 38: 579

## The Study of WOW Culturing Method

Ye-Fei Ma, Yong-Sheng Wang, Min Wan, Bao-Ying Yin, Song Hua, Yong Zhang\*

(Institute of Biotechnology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract** WOW is one of the important methods for embryos culture, especially for zona-free embryos in vitro. In this study, glass needle was used to make WOW at the bottom of the four-well dish, and bovine zona-free parthenogenic activated embryos were cultured in the WOW. The results showed that cleavage rate of the three groups (78.9%, 81.1% and 78.9%) had no significant difference with control ( $P>0.05$ ). The blastocyst rate of the group of zona being digested before putting in 6-DMAP (31.5%) had no significant difference with the group of zona being digested before putting in SOFaa ( $P>0.05$ ), and the two groups had no significant difference with control ( $P>0.05$ ). The group of zona being digested before putting in ionomycin didn't develop to blastocyst. The number of cells had no significant difference between the group of zona being digested before putting in 6-DMAP and the group of zona being digested before putting in SOFaa, and have no significant difference with control ( $P>0.05$ ). Culturing embryos with different numbers in each group (5, 15, 30), there is no different on the development of embryos.

**Key words** bovine; zona-free; parthenogenic activation; WOW

---

Received: November 15, 2007 Accepted: December 25, 2007

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2001 AA213081)

\*Corresponding author. Tel: 86-29-87080092, E-mail: zhy1956@263.net