

综述

哺乳动物雌性生殖细胞及早期胚胎基因敲除或敲减的方法

张美玲, 郝鑫, 周成杰, 王璐, 宋春儒, 韩哲, 张晓洁, 张瑞丰, 梁成光*

内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 实验动物研究中心, 生命科学学院, 呼和浩特 010070

摘要: 哺乳动物雌性生殖细胞为胚胎的形成和发育提供了大量母源性遗传物质。受精一旦实现, 所形成的早期胚胎通过细胞分裂与分化逐渐形成具有复杂结构的全新个体。针对雌性生殖细胞(主要是卵母细胞)的相关研究既能解析其独有的生理学特性, 又能为其他类型细胞的相关研究提供借鉴作用。然而, 哺乳动物卵母细胞数量稀少, 且不能在体外进行扩增培养, 导致针对卵母细胞的相关研究难度极大。哺乳动物早期胚胎的研究也同样面临材料短缺的问题。在以卵母细胞和早期胚胎为材料的研究中, 针对特定基因功能的失活或干扰是最常用的方法之一。本文将结合他人和本研究组在哺乳动物雌性生殖细胞及早期胚胎中进行的基因功能敲除或敲减实验, 对条件性基因敲除、RNA干扰、Morpholino、Trim-Away和抗体介导的蛋白功能干扰这几类技术的主要方法原理、案例、优缺点和使用注意事项进行总结分析, 并提出未来相关技术可能的改进方向, 以期从事卵母细胞及早期胚胎发育研究的科技工作者提供参考。

关键词: 哺乳动物; 卵母细胞; 早期胚胎; 敲除; 敲减

中图分类号: Q954.43+2; Q786

Methods used for gene manipulation in mammal female germ cells and early embryos

ZHANG Mei-Ling, HAO Xin, ZHOU Cheng-Jie, WANG Lu, SONG Chun-Ru, HAN Zhe, ZHANG Xiao-Jie, ZHANG Rui-Feng, LIANG Cheng-Guang*

State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, The Research Center for Laboratory Animal Science, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China

Abstract: For sexual reproduction, oocytes are mammalian female germ cells that provide the majority of maternal genetic material for early stage embryo production and development. Early stage embryos begin the process of multicellular organism formation through cell differentiation. Studies on mammalian female germ cells (oocytes) not only reveal its unique physiological characteristics, but also help understand the mechanism involved in cell differentiation of other cell types. However, because it is difficult to culture *in vitro*, our understanding of the function of oocytes and early stage embryos remains very limited. Gene editing or manipulation is one of the most commonly used method, which is also useful in the field of gametes study. In this review, we summarized the principles, advantages and disadvantages of techniques, which include conditional knockout, RNA interference, Morpholino, Trim-Away and antibody-mediated inhibition of protein function, currently used for gene manipulation in oocytes and early stage embryos. We also discuss the issues the investigators need to consider. Finally, we highlight the future directions for gene manipulation or editing in female germ cells and early stage embryos.

Key words: mammal; oocytes; early stage embryos; knockout; knockdown

Received 2019-06-30 Accepted 2019-09-12

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31871508, 31960158, 31671560), Major Projects of Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2019ZD008), Open Project of the State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, the Funding of Top Disciplines Development, Graduates Student Innovation Projects in Inner Mongolia Autonomous Region and Graduates Student Innovation Projects in Inner Mongolia University.

*Corresponding author. Tel: +86-471-3679862; E-mail: liangcg@imu.edu.cn

哺乳动物雌性配子为个体的诞生提供了原初的物质基础。作为哺乳动物体内最特殊的细胞类型之一，卵母细胞的成熟不仅是胚胎正常发育的前提，其本身也是各类细胞生物学研究中常用的细胞类型。但至今，人们尚未开发出有效的卵母细胞体外制备或扩增技术，这导致受限于材料的稀缺，很多在体细胞中进行的基因功能研究策略不能在卵母细胞上有效实施。同时，研究早期胚胎发育过程中特定基因的表达规律也受到材料稀缺的限制。基因功能研究最常用的策略是干扰基因的正常表达，包括在 DNA 水平上进行基因敲除，在 mRNA 水平上的翻译阻止和在蛋白水平上的拮抗或降解。对于可以在体外传代的体细胞而言，这些方法相对成熟，操作易行，结果相对稳定。但对于不能在体外进行传代培养的卵母细胞而言，这些方法在实际应用中有特殊的使用原则和技术路线。因此，我们有必要专门阐述基因功能的敲除或敲减策略在哺乳动物卵母细胞和早期胚胎中应用的特殊之处。本文结合作者在本领域开展的工作以及其他部分相关研究文献，从原理、案例、优缺点和使用注意事项四个方面，对哺乳动物卵母细胞和早期胚胎基因敲除或敲减方法进行概述，并针对相关技术在未来需要改进的方向提出建议。

1 条件性基因敲除

1.1 原理介绍

基因敲除方法可以定向改变细胞或个体的遗传信息，也为理解特定基因在哺乳动物雌性生殖细胞中的功能提供了有力研究手段^[1]。然而，很多基因的全身性敲除会导致动物在胚胎阶段停育死亡，这导致常规基因敲除技术在卵母细胞功能研究中具有一定的局限性。通过 *Cre-LoxP* 系统实现的条件性敲除 (conditional knockout, cKO) 可用于敲除特定器官 (组织) 或特定发育阶段的特定基因^[2]。因此，近些年来 cKO 技术被广泛应用在卵母细胞基因功能的研究中^[3]。

应用 *Cre-LoxP* 系统构建 cKO 动物的技术路线主要分为两个部分：构建带有 *Cre* 基因的转基因动物和构建具有 *LoxP* 序列的目的基因突变动物。该方法得益于 P1 噬菌体中 *Cre* 重组酶的发现。*Cre* 重组酶能够特异性介导细胞内 *LoxP* 序列之间的位点发生重组反应^[4]。*LoxP* 序列由两个 13 bp 反向重复序列和中间 8 bp 的间隔序列组成^[5, 6]。当两个 *LoxP*

序列方向相同时，*Cre* 重组酶将切除两个 *LoxP* 序列间的 DNA 片段并仅保留一个 *LoxP* 位点^[7]。细胞类型特异性启动子可以特异性调控 *Cre* 重组酶的表达，从而使 *Cre-LoxP* 系统用于研究基因在特定组织或细胞类型中的功能^[8]。

在卵母细胞特异性的基因敲除研究中，常用的启动子有透明带 3 (*Zona pellucida 3*, *Zp3*) 或生长分化因子 9 (*growth differentiation factor 9*, *Gdf9*)。*ZP3* 和 *GDF9* 在初级卵母细胞中特异性表达。*Zp3-Cre* 转基因动物中 *Cre* 酶在初级卵泡的卵母细胞中开始表达，在生长卵泡的卵母细胞中表达达到峰值，在完全生长的卵母细胞中表达减少^[9]，这使得 *Zp3-Cre* 仅适用于在初级卵泡发育阶段中对卵母细胞进行基因特异性敲除^[10]。*Gdf9-Cre* 转基因动物中 *Cre* 表达要早于 *Zp3-Cre* 转基因动物，在原始卵泡的卵母细胞中就开始表达^[11]。

1.2 部分应用介绍

条件性基因敲除的方法经常被用于卵母细胞染色体分离机制或染色体异倍性的研究。人们应用条件性敲除方法研究了在体细胞染色体分离过程中发挥关键作用的几类蛋白，包括 *Cohesin* 复合物、纺锤体组装检验点、动粒相关蛋白等，在卵母细胞中对染色体分离调控的功能。例如，Kudo 等人利用 *Zp3-Cre* 构建了卵母细胞中特异性敲除 *Separase* 的小鼠^[12]，发现 *Separase* 对 REC8 从染色体臂移除是必不可少的。还有研究人员通过构建条件性敲除 *Smc5/6* 的小鼠，发现了 *Smc5/6* 对卵母细胞同源染色体分离和雌性生育能力的必要性^[13]。Wang 等人利用 *Gdf9-Cre* 构建了卵母细胞中特异性敲除 *N-WASP* 的小鼠，发现缺失 *N-WASP* 虽不影响卵母细胞第一次减数分裂的极性和不对称分裂，但阻碍了第二次减数分裂纺锤体的形成，并影响胞质分裂^[14]。与此同时，人们也发现卵母细胞特异性敲除 *Ppp2r1a* 导致第二次减数分裂中期 (metaphase II, MII) 纺锤体长度增加和姐妹染色单体的过早分离，并导致染色体非整倍性和胚胎发育缺陷及生育能力下降^[15]。

除此之外，应用条件性敲除手段，人们也研究了卵母细胞中基因功能对胚胎形成和发育的影响。例如条件性敲除卵母细胞中的 *Mylk1* 基因导致雌性小鼠生育能力严重下降；*MLCK* 的缺失导致桑椹胚后期发育的延迟^[16]。应用条件性敲除方法，人们也发现一些基因对生育能力不是至关重要的，例如，小鼠卵母细胞中 *Stat3* 基因的缺失对雌性小鼠的生

育力没有影响，表明成熟卵母细胞和受精卵中 STAT3 蛋白的表达对这些发育阶段不是必需的^[17]。

目前，研究者利用 cKO 技术研究了其他许多基因在卵母细胞发育中的功能，例如 *APC2*、*Bub1*、*Dnmt3a*、*Gja1*、*Hsp90b1*、*Mgat1* 等，这些基因在染色体分离、极体排出、印记基因 DNA 甲基化、透明带形成、排卵等过程中发挥重要作用^[18-22] (表 1)。

1.3 技术的优缺点

目前 *Cre-LoxP* 系统是构建卵母细胞 cKO 动物最常用的方法，技术原理明确，特异性强^[24]。cKO 是在 DNA 水平上对基因进行敲除，因此 cKO 的结果相对更加真实可信。与全身性基因敲除动物相比，

cKO 技术能够在时间和空间上特异性敲除特定基因，并且可以用于胚胎致死性基因在卵母细胞中的功能研究。虽然 *Cre-LoxP* 系统被大量用于卵母细胞中一些特定基因的研究，但也不可避免存在一些缺点，如构建卵母细胞 cKO 动物成本高、耗时长。另外由于动物本身体内环境的复杂性，敲除基因后可能会引起代偿效应，从而掩盖出现的表型，使之不易观察到，或者观察到的表型难以解释^[25]。另外，Cre 酶对于哺乳动物卵母细胞来说是一种外源性重组酶，具有潜在毒性^[26]。

1.4 应用注意事项

构建靶基因时需注意两个 *LoxP* 序列的位置和方向，若位于同一条 DNA 链上，且方向相同时，

表1. 条件性基因敲除部分应用案例
Table 1. Cases of gene conditional knockout

Gene	Species	Cre driver	Phenotype	References
<i>APC2</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Premature chiasmata resolution does not occur; SAC controls the timing of APC/C and separase activation in oocytes	[22]
<i>Bub1</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Accelerates resolution of chiasmata and extrusion of polar bodies, chromosome missegregation at meiosis I, loss of cohesion precociously between sister centromeres	[22]
<i>Dnmt3a</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Death in utero of offspring from mutant females, hypomethylation of imprinted genes	[18]
<i>Gja1</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	No histological abnormalities were detected in the ovaries, reduced rate of parturition and a substantial decrease in litter size	[19]
<i>Hsp90b1</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Reduction of the zona pellucida thickness but no obvious anomalies in follicular growth, meiotic maturation or fertilization, mutant zygotes were unable to reach the 2-cell stage	[21]
<i>Mgat1</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	The ovulation rate was decreased due to aberrant development of preovulatory follicles, mutant ovaries weighed less and more atretic or abnormal follicles	[20]
<i>Mps1</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Severely impairs chromosome segregation in oocyte meiosis I and fertility in mice	[23]
<i>Mylk1</i>	Mouse	<i>Gdf9-Cre</i>	Severe subfertility; delayed morula-to-blastocyst transition	[16]
<i>N-WASP</i>	Mouse	<i>Gdf9-Cre</i>	No effect on the process of oocyte maturation, caused failure of cytokinesis completion during second meiosis	[14]
<i>Ppp2r1a</i>	Mouse	<i>Gdf9-Cre</i>	Facilitated germinal vesicle breakdown, causing elongation of the MII spindle and precocious separation of sister chromatids; high risk of aneuploidy; defective embryonic development and thus subfertility	[15]
<i>Separase</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Led to the arrest of oocyte development in the NSN configuration, follicular atresia, premature ovarian failure, and female sterility	[12]
<i>SMC5/6</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	Females infertility, increased incidence of oocyte aneuploidy and spontaneous abortion in aging females	[13]
<i>Stat3</i>	Mouse	<i>Zp3-Cre</i>	No effect on fertility	[17]

SAC: spindle assembly checkpoint; NSN: non-surrounded nucleolus.

中间部分的核苷酸序列将被 Cre 重组酶切除, 仅在 3' 端留下一个 *LoxP* 位点; 若位于同一条 DNA 链上, 但方向相反, 则会颠倒两个 *LoxP* 位点间的核苷酸序列; 若位于两条不同的 DNA 链或染色体上, Cre 重组酶会介导 DNA 链的交换或染色体易位^[6, 27]。实验设计中可以根据不同研究目的, 选择相应的序列构建方式。另外, 打靶载体同源臂长度对打靶效率影响很大, 同源重组效率与同源臂的长度成正比^[28]。一般认为基因敲除载体的同源臂总长度应为 4 kb 以上, 以 5~8 kb 之间为宜, 以便顺利进行 Cre 介导的两个同向 *LoxP* 位点发生重组^[29, 30]。

1.5 未来该技术可以改进的方向

目前, 构建卵母细胞 cKO 动物大部分都采用传统的胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 打靶技术^[31], 在筛选上百个 ESC 细胞克隆后, 将具有正确靶向基因的克隆显微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠^[32]。构建带有 *Cre* 基因的转基因动物, 是构建卵母细胞 cKO 动物的前提条件。但通过传统方法构建带有 *Cre* 基因的转基因动物, 相对费时费力。近些年新兴的 CRISPR/Cas9 技术可以大大加快构建转基因动物的过程。CRISPR/Cas9 系统源于细菌依赖的免疫系统^[33], 由 Cas9 内切酶、CRISPR RNA (crRNA) 和 transactivating crRNA (tracrRNA) 三部分组成, 该技术已经成为常用的高效基因敲除或敲入技术手段, 可对实验动物进行精确的遗传修饰^[33, 34]。目前, 联合应用 *Cre-LoxP* 和 CRISPR/Cas9 技术, 已经构建了肝脏等组织器官的条件性敲除小鼠^[34, 35]。研究人员通过 CRISPR/Cas9 系统获得了不同靶基因座中携带 *Cre* 基因的大鼠品系^[36]。为了更好地在雌性生殖细胞中应用 cKO 技术, 将 *Cre-LoxP* 技术和 CRISPR/Cas9 等高效基因编辑技术结合使用, 能够更高效地制备雌性生殖细胞和早期胚胎 cKO 动物^[26]。另外引入如 *Dre-rox* 和 *Flp-frt* 等其他位点特异性重组系统来提高 Cre 重组酶表达特异性, 也是降低 *Cre-LoxP* 系统负面影响的有效手段^[37, 38]。

2 RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术

RNAi 是一种生物界中普遍存在的用来抵御外来基因和病毒感染的进化保守机制^[39]。RNAi 是由双链 RNA 触发的转录后基因沉默机制, 因具有简洁、快速、序列特异性强等优点, 在分子生物学、生物化学等相关研究领域被广泛应用^[40–42]。RNAi 技术在卵母细胞中进行基因功能敲减应用, 最为广

泛的当属小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰。

2.1 原理介绍

siRNA 也称为短干扰 RNA (short interfering RNA) 或沉默 RNA (silencing RNA), 是一条由 20~25 个核苷酸组成的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)。shRNA 包括两个短的反向重复序列, 中间由一茎环序列分隔并组成发夹结构。shRNA 从细胞核转运到细胞质中, 经 Dicer 酶剪切形成 siRNA, 从而发挥对基因的干扰作用^[43]。一个简单的 shRNA 表达系统包括 RNA 聚合酶 III 的启动子序列、靶基因序列、4~10 个碱基组成的 Loop 环结构及与靶基因序列互补的序列和 4~6 个 T 作为转录终止子。

RNAi 的作用机制如下: 首先, dsRNA 核酸内切酶 (Dicer) 激活。Dicer 是 RNA 酶 III 家族成员, 能够特异识别双链 RNA^[44]。在 Dicer 的作用下, dsRNA 降解成 21~23 nt 的 siRNA。然后, 反义 siRNA 作为另一个核糖核酸酶复合体 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的引导链, 由 RISC 介导切割靶 mRNA 分子中与 siRNA 反义链互补的区域, 并起到干扰基因表达的作用^[45]。RISC 在 siRNA 的引导下, 一方面使 mRNA 在 RNA 酶的作用下裂解, 另一方面以 siRNA 为引物, 以 mRNA 为模板, 在 RNA 聚合酶作用下合成 mRNA 的互补链。mRNA 成为 dsRNA 后, 在 Dicer 酶的作用下也被裂解成 siRNA。新生成的 siRNA 也具有诱发 RNAi 的功能。通过此聚合酶链式反应, 使细胞内 siRNA 增加, 显著增强了对基因表达的抑制。长度从 21~23 nt 的 siRNA 到几百个核苷酸的 dsRNA 均可诱发 RNAi 效应, 并且较长的 dsRNA 对基因阻断的效果显著强于短的 dsRNA^[46]。

RNAi 是转录后水平的基因沉默机制, 具有较高的特异性, 且对基因表达的抑制效率较高, 少量的 dsRNA 就可达到改变表型的作用。

2.2 部分应用介绍

近年来使用 RNAi 对哺乳动物卵母细胞进行内源性基因干扰的例子有很多, 并显示出较好的效果。很多研究集中在了对卵母细胞纺锤体-染色体复合体功能的研究方面。例如, 本课题组利用特异性 siRNA 对小鼠卵母细胞中 *Cltc* 进行功能敲减^[47], 结果表明 CLTC 蛋白表达下降了 50%, 并造成第一极体排放率下降及染色体中期板集合失败等一系列

影响小鼠卵母细胞成熟的缺陷。还有研究人员利用特异性 siRNA 对小鼠卵母细胞中 *Rbbp7* 进行功能敲减, 结果表明该基因功能的干扰造成染色体错误排列, 动粒微管附着失败及纺锤体组装检测点 (spindle assembly checkpoint, SAC) 功能损伤^[48]。也有研究表明, 应用 siRNA 技术对小鼠卵母细胞中 *MAD2* 功能进行干扰, 造成其蛋白表达量下降了 81%~92.9%, 同时造成减数分裂纺锤体异常, 生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 率下降, 细胞凋亡增加^[49]。

在猪植入前的孤雌胚胎中利用 siRNA 特异性干扰 *EZH2* 基因功能, 结果显示其干扰效率为 73.79%, 严重影响了囊胚细胞抵御早期凋亡的能力^[50]。在牛卵母细胞中, 利用特异性 siRNA 对 *SGO1* 进行基因功能干扰后, 卵母细胞减数分裂阻滞、胚胎质量下降、胚胎发育率降低^[51]。

除此之外, 研究者利用 siRNA 干扰技术研究了特定基因对卵母细胞发育成熟的作用, 包括

HMAD2、*HIFOO*、*TET3* 等^[52-54]。这些基因在极体排出、染色体分离等过程中发挥着重要作用, 而利用特异性 siRNA 对这些基因的表达进行干扰, 会对卵母细胞减数分裂成熟及早期胚胎发育造成不同程度的影响 (表 2)。

使用 shRNA 对哺乳动物卵母细胞基因功能进行干扰, 是继 siRNA 以来又一种较为常用的方式^[43]。在研究猪卵母细胞 *WT1* 的作用机制时, 将特异性 shRNA 注射到卵胞质中, 目的基因表达水平显著下降, 植入前胚胎发育率显著降低, 囊胚细胞早期凋亡率上升^[55]。小鼠卵母细胞中利用 *Herp* 特异性 shRNA 干扰 *WT1* 功能后, 表达量下降了 60%, 雌激素分泌量增加, 揭示了其在类固醇合成及细胞周期中的作用^[56]。另外, 在对哺乳动物卵母细胞中 *XIST*、*Myostatin* 及 *VP2/3/4* 等基因功能研究中, 同样也采用了 shRNA 进行基因功能干扰的方法^[57-59], 充分证明了 shRNA 在哺乳动物卵母细胞基因功能敲减中的有效性 (表 3)。

表2. siRNA介导的基因功能干扰部分应用案例

Table 2. Cases of siRNA-mediated gene function interference

Gene	Species	Import method	Knockdown effectiveness	Phenotype	References
<i>Cltc</i>	Mouse	Micro-injection	Downregulated by 50%	Decreased first polar body extrusion rate, extensive spindle formation and chromosome congression defects	[47]
<i>DNMT1</i>	Bovine	Micro-injection	Downregulated by 63%	Downregulation of DNMT1 protein and global DNA methylation levels	[48]
<i>EZH2</i>	Porcine	Micro-injection	Downregulated by 73.79%	Reduced the capacity of cells in the blastocysts to resist apoptosis	[50]
<i>HIFOO</i>	Bovine	Micro-injection	Downregulated by 70%	Bovine oocyte maturation impaired	[53]
<i>HMAD2</i>	Human	Micro-injection	Downregulated by 85%~92%	Failure of meiosis I arrest	[52]
<i>MAD2</i>	Mouse	Micro-injection	Downregulated by 81%~92.9%	Meiotic spindle abnormality, decreased GVBD rate, increased apoptosis	[49]
<i>Rbbp7</i>	Mouse	Micro-injection	Lower mRNA expression level	Severe chromosome misalignment, improper kinetochore-microtubule attachments, impaired SAC function, cytokinesis defects, and increased incidence of aneuploidy at metaphase II	[48]
<i>SGO1</i>	Bovine	Micro-injection	Lower mRNA expression level	Decreased the embryonic development rate and quality, arrest of cell division in meiosis and mitosis	[51]
<i>TET3</i>	Bovine	Micro-injection	Lower mRNA expression level	Inhibited oocyte development, maturation, fertilization, decreased cleavage and blastocyst rates	[54]

GVBD: germinal vesicle breakdown; SAC: spindle assembly checkpoint.

表3. shRNA介导的基因功能干扰部分应用案例
Table 3. Cases of shRNA-mediated gene function interference

Gene	Species	Import method	Knockdown effectiveness	Phenotype	References
<i>Herp</i>	Mouse	Micro-injection	Downregulated by 60%	Arrested granulosa cells at the S phase of the cell cycle; significantly upregulated the concentration of estradiol in the culture supernatants	[56]
<i>Myostatin</i>	Bovine	Micro-injection	Lower mRNA expression level	A less amount of myostatin mRNA, less myotube formation	[58]
<i>VP2/3/4</i>	Bovine	Micro-injection	Downregulated by 91% to 98%	Prevent primary epithelium cells of transgenic bovine fetus from FMDV infection	[59]
<i>WT1</i>	Porcine	Micro-injection	Lower mRNA expression level	Decreased preimplantation embryonic development and increased apoptosis in blastocysts	[55]
<i>XIST</i>	Porcine	Micro-injection	Lower mRNA expression level	Increased total blastocyst cell number	[57]

FMDV: foot-and-mouth disease virus.

2.3 技术的优缺点

RNAi 技术对基因功能的干扰具有快速、高效、易操作等优点^[60],是研究特定基因功能的有效方法。另外可针对不同的基因构建不同的表达载体,具有序列特异性强的优点^[61]。体外转录成本相对较低,某种程度上可替代昂贵的基因敲除技术。目前,对于可以体外扩增的体细胞而言,将制备后的 siRNA 利用质粒和病毒载体的方法将其运送到细胞内^[62]。病毒载体作为基因导入细胞的工具被广泛应用,但病毒载体可诱导机体产生某种程度的免疫反应,亦或引起插入、突变、致癌、致毒风险。此外病毒载体的制备和生产条件也相对严格^[63]。针对不同的细胞类型,选择优良的转染试剂,是决定实验能否成功的关键要素。对于卵母细胞或早期胚胎而言,常用显微注射技术的导入方法。在导入过程中,不当操作会引起 RNA 降解,从而导致干扰效率下降。

2.4 应用注意事项

由于 siRNA 或 shRNA 进入细胞后才能对 mRNA 的翻译过程进行抑制,因此高效地将其导入细胞是关键步骤。在实验操作中一定注意避免 RNA 酶的污染^[64];在实验设计时,要通过阴性对照来排除非特异性的影响。此外, RNAi 发挥作用需要数小时才能降解内源性 mRNA。因此,针对卵母细胞的 RNAi 需要将卵母细胞抑制在特定的细胞时期[例如生发泡 (germinal vesicle, GV) 阶段或减数分裂中期],长时间的细胞周期抑制也会降低卵母细胞后续的发育潜能。最后,为了验证其干扰效率还应该

利用 RT-PCR 来验证对特异性基因的干扰效率或利用 Western blot 来检验蛋白的表达情况,确保其干扰效率的稳定性后再进行后续实验。

2.5 未来该技术可以改进的方向

首先在设计 siRNA 或 shRNA 时,应注意进行有效的序列分析并保证其与 DNA 序列配对的正确性,保证其干扰效率。其次由于 siRNA 或 shRNA 是在进入卵母细胞后才能发挥功能,所以如何高效地将 siRNA 或 shRNA 导入卵母细胞,是其发挥敲减作用的关键。在转染卵母细胞或对其进行显微注射等操作中,导入到每个卵母细胞中的 siRNA 或 shRNA 的摩尔数尽可能一致,以保证结果的稳定性。

3 Morpholino (MO)

3.1 原理介绍

MO 是一种反义寡核苷酸。与 DNA 及 RNA 寡核苷酸相比,MO 不具有核糖环,取而代之的是 MO 环。这种改变使得 MO 可与 DNA 或 RNA 进行碱基配对,同时它有优于常规寡核苷酸的特征^[65]。MO 的作用机制与 RNAi 类似,都是通过结合靶序列,进而抑制蛋白的翻译过程。MO 一般用于转录后 mRNA 沉默,目前使用的 MO 主要有两种:一种 MO 序列跨越内含子和外显子,这样的 MO 与未成熟 mRNA 结合,阻碍 mRNA 正确剪切成熟,从而达到敲减蛋白表达的目的^[66]。另外一种 MO 与成熟 mRNA 结合,阻碍翻译的进行,也能够起到

良好的敲减效果^[67]。

3.2 部分应用介绍

MO 首次于 2000 年被发现，并被有效应用于发育生物学研究中^[68-70]。最早的研究表明，MO 可以成功地阻碍非洲爪蟾胚胎和斑马鱼中特定基因的表达。将 β -CATENIN 特异性 MO 注射到非洲爪蟾早期胚胎中，发现 β -CATENIN 敲低后引起了不同的表型：2- 细胞和 4- 细胞阶段注射 MO 会导致非洲爪蟾的背轴形成失败，在 8- 细胞阶段注射 MO 后会抑制头部形成，而 32- 细胞阶段注射 MO 则导致粘液腺的形成异常^[69]。通过 MO 敲减来探究基因功能的方法很快得到了认可，并应用于其他物种的多种基因，包括小鼠 *Ckl1a*、*Ckap5*、*Mos*、*Oct4*、*Zfp207*、*Daam1* 等^[71-76]，猪的 *KDM5B*、*CD47* 等^[77, 78]，牛的 *CDC20*、*GFR1*、*CCL24* 等^[79-81]（表 4）。

在哺乳动物卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中，关键蛋白对减数分裂及有丝分裂的适当调控是至关重要的。DNA 复制后发生的染色体分离由纺锤体精确控制，从而确保卵母细胞和早期胚胎的正常发育。本课题组分别采用特异性 MO 对小鼠卵母

细胞中 *Ckl1a* 及 *Ckap5* 进行敲减，都获得了很好的敲减效果^[75, 76]。本课题组利用特异性 MO 对小鼠卵母细胞中的 *KIF1B* 进行敲减，由于极体异常排出、纺锤体形态紊乱、染色体异常聚集、非整倍性增加，导致早期胚胎发育受阻，同时还影响线粒体的正常分布，并使 ATP 水平下降。之后对原核期合子 *KIF1B* 进行敲减，结果表明 *KIF1B* 蛋白表达下降了 74.1%，并造成胚胎发育率降低、纺锤体组装和染色体排列异常等一系列影响早期胚胎发育成熟的缺陷^[82]。其他研究人员利用 MO 敲减 *Zfp207*，由于纺锤体组装失败，染色体不能正确排列到赤道板上，造成有缺陷的动粒不能与微管结合，导致 MII 的卵母细胞异倍性增加^[71]。因此，这些实验结果印证了以上蛋白在减数分裂及有丝分裂关键调控过程中发挥重要作用。

3.3 技术的优缺点

MO 的化学结构具备了稳定、长期活性、低毒性以及较高序列特异性等特性。由于 MO 不携带任何电荷，无法被 DNase 或 RNase 酶识别，因此非常稳定。有研究表明，GFP 特异性 MO 能够有效地

表4. Morpholino介导的基因功能干扰部分应用案例
Table 4. Cases of Morpholino-mediated gene function interference

Gene	Species	Import method	Knockdown effectiveness	Phenotype	References
<i>CCL24</i>	Bovine	Micro-injection	Reduced	Decreased the percent of GATA6 ⁺ cells in the outside of the ICM	[79]
<i>CD47</i>	Porcine	By Endo-Porter cultured <i>in vitro</i>	Reduced	Enhanced survival of random tissue flaps	[78]
<i>CDC20</i>	Bovine	Micro-injection	Downregulated by 80%	MI arrested with abnormal spindles	[81]
<i>Ckl1a</i>	Mouse	Micro-injection	Distinctly reduced	Failure of PB1 extrusion, chromosome misalignment and MII plate incassation	[76]
<i>Ckap5</i>	Mouse	Micro-injection	Significantly reduced	Failure of PB1 extrusion, serious defects in spindle assembly, and failure of chromosome alignment	[75]
<i>Daam1</i>	Mouse	Micro-injection	Significantly reduced	Failure of PB1 extrusion	[74]
<i>GFR1</i>	Bovine	Micro-injection	Downregulated by 50%	Failure of bovine oocyte maturation and early embryo development	[80]
<i>KDM5B</i>	Porcine	Micro-injection	Notably reduced	Upregulated the histone demethylase KDM6A	[77]
<i>Mos</i>	Mouse	Micro-injection	Reduced	Formation of abnormally large polar body	[72]
<i>Oct4</i>	Mouse	By Endo-Porter cultured <i>in vitro</i>	Downregulated by 50%	Disappearance of the inner cell mass in the outgrowths of blastocysts	[73]
<i>Zfp207</i>	Mouse	Micro-injection	Reduced	Impaired spindle organization and misaligned chromosomes	[71]

ICM: inner cell mass; PB1: first polar body.

抑制非洲爪蟾的转基因品系中 GFP 的翻译, 并且这种抑制作用能够从早期胚胎持续到蝌蚪阶段^[83]。MO 对 *Oct4* 的特异性敲减导致早期胚胎发育异常, 内细胞团消失, 而对照 MO 组的早期胚胎发育状态良好, 表明了适当的浓度下 MO 细胞毒性较低^[73]。带荧光标签的 MO 还可用于监测胚胎内 MO 以及 microRNAs 的分布^[84]。MO 具有精确的序列特异性, 可能是因为 MO 在阻断基因转录物时, 必须结合至少 14~15 个连续碱基, 所以靶向目的基因转录物的序列信息时, 具有较高准确性^[85, 86]。MO 通常不受其他反义结构类型 (包括 S-DNA、siRNA 和 shRNA) 的非靶标影响^[87]。可光活化的 MO 也已被用于提供基因敲减的时空控制, 实现了在特定发育阶段, 将胚胎特定区域基因进行敲减的目的^[85]。

但与 RNAi 类似, 对卵母细胞来说, MO 发挥作用所需时间太长, 且不能在卵母细胞发育的各个时期进行实时敲减, 限制了它的应用效果。

3.4 应用注意事项

MO 在实际应用中应该注意脱靶效应和敲减效率对实验结果的影响。脱靶效应的产生可能影响目的基因敲减效率, 或导致完全不相关的基因产物的生成, 并且观察到的表型可能只是由于目的基因的部分敲减而非全部敲减所导致。为避免上述情况的发生, 在设计和使用 MO 时需要注意以下几点。

首先, 针对每种靶基因, 最好同时设计翻译阻断和剪接抑制的 MO。在确保注射量一致的情况下独立测试两种 MO 的效果, 如果由两种 MO 引起的表型相似, 则证明 MO 确实影响了目的基因的功能^[88]。

其次, 在实验中应使用对照 MO。如果公司提供的标准对照 MO 不合适, 建议使用 5 碱基错配 MO 作为注射过程本身的对照, 因为这与实验性设计的 MO 最相似, 且该基因是不会有在目的细胞中错配或反转的。实际操作中, 多种对照 MO 会使实验结果更准确。

此外, 在实验中还需要使用特异性强的抗体, 以精确检测蛋白质表达水平, 即使在单细胞水平, 所用抗体也应该能够定量检测注射 MO 的胚胎细胞中蛋白质的下调情况^[89]。该方法可与现有突变体比较, 如果目的基因有突变, 比较突变体的表型和 MO 注射后的胚胎表型, 也可验证 MO 效应。

最后, 还可通过挽救实验来验证 MO 的特异性, 验证对照组与挽救组表型是否一致, 进一步验证被敲减基因的功能和 MO 的有效性。

3.5 未来该技术可以改进的方向

通常利用显微注射的方法将 MO 导入卵母细胞, 但显微注射费时费力, 因此, 通过在体外培养的胚胎或者细胞中使用电转、添加有效转染 MO 的特殊转染试剂 (Endo-Porter) 等方法, 可以节省大量时间和人力成本。在小鼠卵母细胞中利用 Endo-Porter 转染 MO 的研究中发现, 体外培养 72 h 后, MO 才能发挥作用, 并且 *Oct4* 特异性的 MO 在囊胚期对靶蛋白的敲减效率大于 50%, 但在桑椹胚期无显著效果^[73]。这是由于未修饰的 MO 不易穿过大多数细胞类型的质膜所致。如果在没有转染试剂的情况下, 将未修饰的 MO 添加到细胞培养物中, 则必须使用高浓度 MO 和长时间暴露, 但是其转染效率仍旧较低^[90]。这也说明通过体外转染 MO 的方法不能对各时期卵母细胞中的目的基因进行实时敲减, 所以未能广泛应用于卵母细胞及早期胚胎发育的研究中。同时, 未来需要以缩短 MO 的作用时间和提高 MO 敲减效率为目的进行改进, 或者开发一种简易、高效、快速将 MO 导入卵母细胞的方法, 将会使得 MO 的应用更为广泛。

4 Trim-Away

4.1 原理介绍

前面介绍的特定基因功能干扰的方法, 要么是针对特定 DNA 序列的删除或突变, 要么针对特定 mRNA 的合成或降解, 进而干扰蛋白表达的技术。虽然这些方法已经广泛应用于卵母细胞基因功能的研究, 但它们的一个普遍缺陷是不能够清除已经合成的蛋白, 尤其是细胞内一些相对稳定的蛋白。

另外, 前述方法中, 基因功能敲减的起效时间与目的蛋白功能实际被干扰之间的时间间隔相对较长。所以这些方法不适用于研究发生时程较短的生物学过程。例如, 在小鼠卵母细胞减数分裂过程中, 从 GVBD 开始到 MII, 持续 12~14 h。如果蛋白降解延迟, 功能不能被及时抑制, 就很难确定出现的表型是否是蛋白功能干扰的直接结果^[91]。蛋白质功能抑制的延迟也可能激活细胞的补偿机制, 从而改变甚至掩盖对应的表型^[92]。

为了克服这些问题, 研究者们从蛋白质的稳定性入手, 将目的蛋白与不稳定的结构域融合^[93]; 或者将目的蛋白与线粒体相连, 使目的蛋白锁定在远离其发挥功能的部位^[94]。然而, 所有这些方法都必须使用修饰过的变体, 取代内源性蛋白功能。因此,

这些方法不适合研究所有细胞类型的蛋白功能。

2017年, Clift 等人发现了一种能在短时间内降解内源性蛋白的方法, 称之为“Trim-Away”^[95]。该方法利用了 TRIM21 在细胞免疫反应中发挥功能的原理。TRIM21 是一种 E3 泛素连接酶、胞浆抗体受体, 与抗体的 Fc 结构域有很高的亲和力^[96], 可以识别抗体结合的病原体, 在多种细胞类型和组织中广泛表达^[97]。在细胞感染过程中, TRIM21 将泛素蛋白酶体系统招募到抗体结合的病原体中, 导致其破坏。TRIM21 可引起多种病原体的降解, 包括 RNA 和 DNA 病毒、细菌以及蛋白质致病因子^[98]。因此, 利用抗体受体和泛素连接酶系统, TRIM21 可以作为一个工具来驱动内源性蛋白的降解。

Trim-Away 技术的操作过程为: 第一步, 引入外源蛋白 TRIM21; 第二步, 引入针对目的蛋白的抗体; 第三步, TRIM21 介导的泛素化降解与抗体结合的目的蛋白。一个成功的 Trim-Away 实验必须满足如下要求: 细胞内必须大量表达 TRIM21, 如果内源性 TRIM21 的表达水平不足以降解蛋白, 需要将外源 TRIM21 和针对目的蛋白的抗体同时转入到细胞内。在小鼠卵母细胞的减数分裂成熟过程中, 与对照组相比, 过表达 TRIM21 不会影响减数分裂速率、核膜破裂比率、第一极体排放率以及纺锤体形态^[95], 证明外源 TRIM21 的导入对卵母细胞成熟是安全的。

4.2 部分应用介绍

在 Trim-Away 方法研究的初期, 由于卵母细胞转录沉默, 细胞内储存了大量的蛋白质, RNAi 效率低等原因, Clift 团队首先选取小鼠的卵母细胞进行验证。他们检测了参与纺锤体组装的微管马达蛋白 Eg5 (Kinesin-5)^[94], 当 Eg5 功能被破坏时, 无法形成正常的双极纺锤体, 出现大量的异常单极纺锤体。Trim-Away 敲减后观察到的表型与小分子抑制剂 monastro 处理后得到的表型相同^[95]。为了证实单极纺锤体的表型是由于 Eg5 的降解造成的, 通过 Eg5-mEGFP 的过表达, 成功挽救了 Eg5-Trim-Away 卵母细胞中纺锤体的异常。为了检测 Trim-Away 对不容易降解的蛋白的敲减作用, 针对参与卵母细胞姐妹染色单体结合的粘连蛋白复合物成员 Rec8 蛋白, 在过量表达 mEGFP-TRIM21 的卵母细胞中注射 Rec8 抗体, 结果引发姐妹染色单体过早分离^[96]。这表明 Rec8 降解导致了姐妹染色单体结合完全丧失。值得注意的是, 在 mEGFP-TRIM21 过量表达后,

卵母细胞中姐妹染色单体在注射 Rec8 抗体后, 平均仅 11 min 就开始分离, 这意味着 Trim-Away 能够迅速降低稳定的蛋白水平^[89]。最近, Mehlmann 等人运用 Trim-Away 技术在小鼠卵母细胞中靶向降解 SNAP23, 导致卵母细胞不能正常维持减数分裂阻滞^[99]。So 等人利用 Trim-Away 技术在小鼠卵母细胞中特异性降解 TACC3、GTSE1、CHC17, 研究这三种蛋白在相分离形成的液滴样减数分裂纺锤体结构域 (liquid-like meiotic spindle domain, LISD) 形成中的作用, 发现 TACC3 和 CHC17 对于 LISD 组装至关重要^[100]。除此以外, Chen 等人在斑马鱼胚胎中运用 Trim-Away 的方法成功敲减了 Ddx19B 蛋白, 验证了该方法的可靠性^[101] (表 5)。

4.3 技术的优缺点

与现有的敲减技术相比, Trim-Away 有几个独特的优点。首先, 直接作用于蛋白水平, 它对长寿命蛋白更有效。第二, 不需要对基因组进行修饰, 容易实现。第三, TRIM21 在大多数组织中广泛表达, 这意味着可以利用内源性蛋白, 而不依赖过表达或重组蛋白引入。第四, TRIM21 不具备管家基因功能, 不会与内源底物竞争, 对正常代谢的影响较小^[102]。第五, Trim-Away 可以使用目的蛋白的商品化抗体。第六, 卵母细胞内一旦 Trim21 开始翻译, 立即开始降解目的蛋白, 利于研究特定阶段的早期胚胎发育。最后, 在卵母细胞中, Trim-Away 方法可以将目的蛋白在 3~4 h 内完全降解, 能够在各个卵子间获得更加一致的表型。

Trim-Away 技术的缺点有如下几方面。首先, Trim-Away 依赖于内在的蛋白酶体活性, 因此敲减效率可能在某些细胞类型或相应的细胞周期阶段受到影响。由于 Trim-Away 是一种蛋白质靶向方法, 与基因或 mRNA 打靶方法相比, 评价脱靶的难度更大。为了减少脱靶现象, 用于蛋白靶向的抗体在使用前必须经过仔细选择和验证。最后, 在 Trim-Away 的过程中, TRIM21 既可以降解目的蛋白, 又可能激活天然免疫信号转导通路, 例如 NF- κ B。对于卵母细胞而言, 一般要求将 TRIM21 的 mRNA 注入抑制在 GV 期的卵母细胞中, 经过 2~3 h 的表达和恢复培养, 再注射目的蛋白的抗体。对卵母细胞的连续两次注射, 会显著降低卵母细胞的存活率。

4.4 应用注意事项

与其他基于抗体的干扰技术一样, 抗体的特异

表5. Trim-Away介导的蛋白功能干扰部分应用案例

Table 5. Cases of Trim-Away-mediated protein function interference

Protein	Species	Cell type	Phenotype	References
CHC17	Mouse	Oocyte	LISD assembly was disrupted upon depletion of CHC17, which binds to microtubules together with TACC3	[100]
Ddx19B	Zebrafish	Embryo	All TRIM21/anti-Ddx19B-injected zebrafish had small eyes, about 10% had a curved body axis, consistent with the findings in homozygous <i>ddx19b</i> -mutant zebrafish	[101]
Eg5 (kif11/ trip5)	Mouse	Oocyte	The formation of monopolar spindles; the phenotype expected if Eg5 is degraded and identical to oocytes treated with the Eg5 inhibitor monastrol	[95]
GTSE1	Mouse	Oocyte	Depletion of GTSE1 had only a minor effect on LISD assembly	[100]
Rec8	Mouse	Oocyte	Microinjection of Rec8 antibody into MII oocyte overexpressing TRIM21 caused premature separation of sister chromatids	[95]
SNAP23	Mouse	Oocyte	Degradation of SNAP23 by Trim-Away causes premature meiotic resumption in follicle-enclosed oocytes	[99]
TACC3	Mouse	Oocyte	Specific depletion of endogenous TACC3 by Trim-Away fully disassembled the domain, leading to complete dispersion of multiple LISD-associated proteins	[100]

LISD: liquid-like meiotic spindle domain.

性对于 Trim-Away 实验的成功至关重要。一个特异性强的抗体能够降解所有带有目标表位的抗原（即靶点），但不能降解无关的抗原（即靶外抗原）。当选择抗体的时候应该注意以下几点。第一，抗体来源物种。在小鼠、犬、灵长类动物中，TRIM21 与抗体的相互作用高度保守^[103]。在相同的 TRIM21 浓度下，该方法敲除小鼠、兔和山羊细胞内的抗绿色荧光蛋白的效率没有差异。但是，TRIM21 不能与鸡来源的抗体结合^[95]。因此，在实际应用前，研究人员应该对不常见宿主的抗体进行检测。第二，TRIM21 与 IgG 的亲合力最高，其次是 IgM 和 IgA，不与 IgY 结合^[104]。TRIM21 与 IgD 或 IgE 的结合能力尚不清楚。第三，抗体的结构，商品化抗体可以选择多种结构，包括全长的 Ig、Fab 和 Fab2。由于 TRIM21 与抗体的 Fc- 区域结合，所以应该避免使用 Fab 和 Fab2。考虑到纳米抗体的广泛应用，Clift 等人还成功地将纳米抗体与人 IgG1 的 Fc 区融合用于 Trim-Away 实验^[95]。第四，无论是单克隆抗体还是多克隆抗体，均能有效应用于 Trim-Away 实验。但是由于多克隆抗体之间存在差异，使用单克隆抗体可以得到更加稳定和可重复的结果。最后，研究表明，只要有特异性抗体存在，Trim-Away 还可以用于选择性地降解翻译后修饰的蛋白。然而，这些

抗体必须在使用前仔细评估。例如，在小鼠卵子中，磷酸化的动粒蛋白多克隆抗体在类微管组织中心存在非特异性结合^[105]。鉴于抗体在 Trim-Away 实验中的重要性，需要进行预实验来验证抗体的有效性，包括与荧光标签蛋白共定位实验、免疫荧光染色定位实验、蛋白印迹实验、与其他方法的交叉验证等。

4.5 未来该技术可以改进的方向

Trim-Away 是一种不需要事先修饰蛋白或 mRNA，能够在哺乳动物细胞中快速降解内源性蛋白的方法。要在实验前反复验证抗体的可靠性，运用显微注射方法一次性将抗体和外源 TRIM21 表达载体注入卵母细胞，既能保证卵母细胞的存活率，又能得到较高的敲减效率。然而在实际运用中，筛选抗体是最具有挑战且决定效率和成败的关键步骤，而商品化抗体各批次间具有差异、运输过程中抗体的有效性降低等因素会给 Trim-Away 实验带来更多的不确定性。未来为了更有效地运用该技术，需要研究更具体的筛选抗体的细则和检测方法，这将有助于研究者获得可靠的数据。此外，定位于细胞核中的靶标不能被降解，可以通过使用更小的纳米体 Fc 融合来实现^[95]。总之，Trim-Away 为研究哺乳动物雌性生殖细胞中蛋白功能提供了有力工具。

5 抗体介导的蛋白功能干扰技术

5.1 原理介绍

与 Trim-Away 技术类似，抗体导入技术也是人们在卵母细胞或早期胚胎中干扰特定蛋白功能的常用方法。抗体导入细胞的方式主要有两种：一种是显微注射，即利用显微操作方法将特异性抗体注入卵母细胞，蛋白与抗体特异性结合，从而抑制蛋白功能。另一种是肽纳米颗粒介导的抗体转染技术 (peptide nanoparticle-mediated antibody transfection)，即通过将肽纳米颗粒包被的抗体转染进入细胞，包被内的抗体释放后，与胞内功能蛋白结合，进而影响目标蛋白的功能^[106]。

5.2 部分应用介绍

在研究 KIF1B 对卵母细胞成熟及早期胚胎发育的实验中，本研究组将 KIF1B 特异性抗体分别注入小鼠 GV 期卵母细胞及 MII 期卵子中，发现抗体介导的 KIF1B 功能抑制导致卵母细胞的纺锤体组装发生异常，胚胎发育率降低^[82]。通过对卵母细胞注射特异抗体，人们还阐释了 SUMO-1、Strumpellin 等蛋白抑制小鼠卵母细胞第一极体排出，以及 TFIIB、UCHL5IP 等蛋白在卵母细胞纺锤体组装和染色体

分离过程中的功能^[107-110]。Chao 等人通过 GV 期卵母细胞抗体注射技术，证明了抑制 GRIM-19 蛋白的功能可导致囊胚形成和胚胎着床能力下降^[111] (表 6)。

纳米颗粒通常被认为是直径小于 100 nm 的超微颗粒，且根据其结构组成，可分为脂质体纳米颗粒^[112]和肽纳米颗粒^[113]。近年来，肽纳米颗粒介导的转染技术，凭借其效果好、适用范围广成为优先应用的外源物质导入细胞的技术手段^[114-117]。由于卵母细胞形态结构的特殊性，其透明带结构被普遍认为是抗体等诸多大分子进入胞质的主要障碍。因此有研究者通过肽纳米颗粒介导抗体转染技术，将 Arl2 抗体以非注射的方式导入小鼠卵母细胞，进而对卵母细胞进行减数分裂表型分析。结合免疫荧光等实验，他们发现抗体介导的 Arl2 抑制可导致染色体聚集和纺锤体微管组装异常，并阻碍卵母细胞成熟^[106]。

5.3 技术的优缺点

从基因或 mRNA 水平上进行敲除或敲减，对细胞内已经合成的蛋白的抑制作用有限。通过注射抗体的方式与细胞内的蛋白直接结合，可以抑制细胞内已合成的蛋白功能。在基因或 mRNA 水平进行

表6. 抗体介导的蛋白功能抑制部分应用案例

Table 6. Cases of antibody-mediated inhibition of protein function

Protein	Species	Import method	Knockdown effectiveness	Phenotype	Reference
Arl2	Mouse	Peptide nanoparticle-mediated antibody transfection	Downregulated by over 90%	Failure of spindles organizing, significantly delayed meiosis progression	[106]
GRIM-19	Mouse	Micro-injection	Similar with siRNA micro-injection	The degeneration rate was higher, blastocyst formation rates were significantly lower	[111]
KIF1B	Mouse	Micro-injection	Similar with MO micro-injection	Spindle assembly, chromosome segregation were disturbed	[82]
Strumpellin	Mouse	Micro-injection	Similar with MO micro-injection	Failed to extrude a PB1, several oocytes underwent symmetric division	[107]
SUMO-1	Mouse	Micro-injection	Similar with siRNA micro-injection	PB1 extrusion was significantly inhibited	[109]
TFIIB	Mouse	Micro-injection	Similar with siRNA micro-injection	Irregular configuration of spindles with altered chromosome alignment	[108]
UCHL5IP	Mouse	Micro-injection	Similar with MO micro-injection	Spindle and chromosome defects	[110]

功能干扰的最大限制是,从抑制操作开始到实际的蛋白质耗尽之间有一定的时间延迟,而抗体注射起效时间相对较短。对于肽纳米颗粒介导的抗体转染技术,具有高效性、低毒性、高稳定性及强血清兼容性的优点^[114–117]。更重要的是,相比显微注射技术,肽纳米颗粒介导的抗体导入细胞的操作较为简单,且有效避免了对卵母细胞的机械损伤等负面影响。相较脂质体纳米颗粒介导的抗体转染技术而言,其优势还在于短肽载体可与抗体形成非共价键,有效保护抗体等大分子物质免遭修饰和降解,从而维持抗体等被运输物质原有的结构和特性^[49]。此外,大多数靶蛋白的抗体都可以通过商业化途径获得,增加了相关技术的应用广泛性。

抗体介导的基因功能干扰的缺点是,如果使用显微注射方法将抗体导入卵母细胞,同其他显微注射方式一样,对卵母细胞造成机械性损伤,可能会导致第一极体排放延迟^[82]。此外,商业化抗体产品中常添加叠氮钠和甘油等物质,如果不对这些物质进行预处理,也会造成细胞的非特异性应激反应。再者,如果导入细胞中抗体的特异性不高,会造成脱靶效应。与针对 DNA 或 mRNA 靶向方法相比,评估抗体的特异性更加困难,无法通过 Western blot 和免疫荧光等方法对蛋白的敲减效果进行直接验证。而且,对于卵母细胞内某些高丰度蛋白,单一使用抗体抑制技术无法有效实现对功能蛋白的沉默,从而使未被沉默的功能蛋白继续发挥作用,因此很少有研究人员仅通过注射抗体的方式得出有效结论。最后,如果抗体仅识别靶蛋白的非功能区段,而不影响靶蛋白功能区段的功能发挥,则会大大降低对靶蛋白的功能抑制效率。

5.4 应用注意事项

用于蛋白靶向的抗体,在使用前必须仔细选择和验证,可以通过 Western blot 等方法验证抗体的特异性。利用显微操作仪将特异性抗体注入卵母细胞的操作时间越短越好。注射抗体的浓度也是研究者应充分考虑的参数之一^[82],因为抗体浓度决定了最终注入细胞的液体体积和对靶蛋白的封闭效果。对于 GV 期卵母细胞,单次注射量应控制在 5~10 pL。同时注射相同剂量的 IgG 作为阴性对照,并评估注射本身对卵母细胞的损伤程度。注射后的卵母细胞应继续培养 1~3 h,使抗原与抗体识别并充分结合,达到抑制特定蛋白功能的目的。与抗体注射类似,在抗体转染过程中,如果研究对象为高丰度

蛋白,也需要将 siRNA 敲减技术和抗体抑制技术结合使用,以确保敲减的有效性。此外,在卵母细胞中,抗体转染的处理时间一般为 40~44 h,过短的转染时间会降低抗体的导入效果^[106]。

5.5 未来该技术可以改进的方向

通过抗体抑制蛋白功能的方法,无法直接验证蛋白功能的干扰效率。因此,开发可直接验证干扰效率的方法至关重要。含有叠氮钠等添加物的抗体,应对其进行相应的预处理方可使用,可开发专门用于抗体抑制的特异性抗体;同时增强抗体特异性,减少可能发生的抗体特异性不强或抗体作用于目标蛋白非功能结构域的问题。

6 结论与展望

哺乳动物雌性生殖细胞及早期胚胎中特定基因功能的失活或敲减对于研究基因功能、作用机制具有重要意义。虽然有多种方法已被应用于特定基因功能的干扰,但每种技术方法在实际操作中均有一定限制,没有一种方法完全适用于卵母细胞及早期胚胎中所有基因的功能干扰。因此,需要多种敲减方法联合应用。总之,人们通过对已有技术的不断改进,以及多种技术的联合应用,可以预期这些方法将对哺乳动物雌性生殖细胞及早期胚胎中基因功能的研究提供更加有效和多样的手段,使我们对哺乳动物的生殖与发育机理有更清晰和明确的认识,也会对人类不孕、不育等相关疾病的发生机理有更深入的了解。

参考文献

- 1 Chadwick CC, Chippari S, Matelan E, Borges-Marcucci L, Eckert AM, Keith JC Jr, Albert LM, Leathurby Y, Harris HA, Bhat RA, Ashwell M, Trybulski E, Winneker RC, Adelman SJ, Steffan RJ, Harnish DC. Identification of pathway-selective estrogen receptor ligands that inhibit NF- κ B transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(7): 2543–2548.
- 2 Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 2006; 20(13): 1744–1754.
- 3 Sun QY, Liu K, Kikuchi K. Oocyte-specific knockout: a novel *in vivo* approach for studying gene functions during folliculogenesis, oocyte maturation, fertilization, and embryogenesis. *Biol Reprod* 2008; 79(6): 1014–1020.
- 4 Kaartinen V, Nagy A. Removal of the floxed neo gene from

- a conditional knockout allele by the adenoviral Cre recombinase *in vivo*. *Genesis* 2001; 31(3): 126–129.
- 5 Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 2018; 34(4): 147–159.
 - 6 Le Y, Sauer B. Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Mol Biotechnol* 2001; 17(3): 269–275.
 - 7 Michael SK, Brennan J, Robertson EJ. Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci. *Mech Dev* 1999; 85(1–2): 35–47.
 - 8 Magnuson MA, Osipovich AB. Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use. *Cell Metab* 2013; 18(1): 9–20.
 - 9 Dean J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immunol* 2002; 53(1–2): 171–180.
 - 10 Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22(1): 53–74.
 - 11 Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15(6): 854–866.
 - 12 Kudo NR, Wassmann K, Anger M, Schuh M, Wirth KG, Xu H, Helmhart W, Kudo H, McKay M, Maro B, Ellenberg J, de Boer P, Nasmyth K. Resolution of chiasmata in oocytes requires separate-mediated proteolysis. *Cell* 2006; 126(1): 135–146.
 - 13 Hwang G, Sun F, O'Brien M, Eppig JJ, Handel MA, Jordan PW. SMC5/6 is required for the formation of segregation-competent bivalent chromosomes during meiosis I in mouse oocytes. *Development* 2017; 144(9): 1648–1660.
 - 14 Wang ZB, Ma XS, Hu MW, Jiang ZZ, Meng TG, Dong MZ, Fan LH, Ouyang YC, Snapper SB, Schatten H, Sun QY. Oocyte-specific deletion of N-WASP does not affect oocyte polarity, but causes failure of meiosis II completion. *Mol Hum Reprod* 2016; 22(9): 613–621.
 - 15 Hu MW, Wang ZB, Jiang ZZ, Qi ST, Huang L, Liang QX, Schatten H, Sun QY. Scaffold subunit Aalpha of PP2A is essential for female meiosis and fertility in mice. *Biol Reprod* 2014; 91(1): 19.
 - 16 Liang QX, Zhang QH, Qi ST, Wang ZW, Hu MW, Ma XS, Zhu MS, Schatten H, Wang ZB, Sun QY. Deletion of *Mylk1* in oocytes causes delayed morula-to-blastocyst transition and reduced fertility without affecting folliculogenesis and oocyte maturation in mice. *Biol Reprod* 2015; 92(4): 97.
 - 17 Robker RL, Watson LN, Robertson SA, Dunning KR, McLaughlin EA, Russell DL. Identification of sites of STAT3 action in the female reproductive tract through conditional gene deletion. *PLoS One* 2014; 9(7): e101182.
 - 18 Kaneda M, Hirasawa R, Chiba H, Okano M, Li E, Sasaki H. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with Zp3-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. *Genes Cells* 2010; 15(3): 169–179.
 - 19 Gershon E, Plaks V, Aharon I, Galiani D, Reizel Y, Sela-Abramovich S, Granot I, Winterhager E, Dekel N. Oocyte-directed depletion of connexin43 using the Cre-LoxP system leads to subfertility in female mice. *Dev Biol* 2008; 313(1): 1–12.
 - 20 Williams SA, Stanley P. Oocyte-specific deletion of complex and hybrid N-glycans leads to defects in preovulatory follicle and cumulus mass development. *Reproduction* 2009; 137(2): 321–331.
 - 21 Audouard C, Le Masson F, Charry C, Li Z, Christians ES. Oocyte-targeted deletion reveals that *hsp90b1* is needed for the completion of first mitosis in mouse zygotes. *PLoS One* 2011; 6(2): e17109.
 - 22 McGuinness BE, Anger M, Kouznetsova A, Gil-Bernabe AM, Helmhart W, Kudo NR, Wuensche A, Taylor S, Hoog C, Novak B, Nasmyth K. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 2009; 19(5): 369–380.
 - 23 Hached K, Xie SZ, Buffin E, Cladiere D, Rachez C, Sacras M, Sorger PK, Wassmann K. *Mps1* at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* 2011; 138(11): 2261–2271.
 - 24 Kuhn R, Schwenk F. Advances in gene targeting methods. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(2): 183–188.
 - 25 Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, Berns A, Jonkers J. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16): 9209–9214.
 - 26 Li Y, Zhang W, Zhao J, Li S, Shan L, Zhu J, Li Y, Zhu H, Mao Q, Xia H. Establishing a dual knock-out cell line by lentivirus based combined CRISPR/Cas9 and Loxp/Cre system. *Cytotechnology* 2018; 70(6): 1595–1605.
 - 27 Matthaei KI. Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats. *J Physiol* 2007; 582(Pt 2): 481–488.
 - 28 Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11(11): 5586–5591.
 - 29 Lu ZH, Books JT, Kaufman RM, Ley TJ. Long targeting arms do not increase the efficiency of homologous recombination in the beta-globin locus of murine embryonic stem

- cells. *Blood* 2003; 102(4): 1531–1533.
- 30 Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods* 2014; 408: 89–100.
- 31 Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265(5168): 103–106.
- 32 Couasnay G, Frey C, Elefteriou F. Promoter Cre-specific genotyping assays for authentication of Cre-driver mouse lines. *JBMR Plus* 2019; 3(4): e10128.
- 33 Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadan AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010; 468(7320): 67–71.
- 34 Wang M, Huang YP, Wu H, Song K, Wan C, Chi AN, Xiao YM, Zhao XY. Mitochondrial complex I deficiency leads to the retardation of early embryonic development in *Ndufs4* knockout mice. *PeerJ* 2017; 5: e3339.
- 35 Wang L, Shao Y, Guan Y, Li L, Wu L, Chen F, Liu M, Chen H, Ma Y, Ma X, Liu M, Li D. Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos. *Sci Rep* 2015; 5: 17517.
- 36 Ma Y, Zhang L, Huang X. Building Cre knockin rat lines using CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol* 2017; 1642: 37–52.
- 37 Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 2011; 474(7351): 337–342.
- 38 McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-mediated recombination: general principles and experimental considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* 2017; 7(1): 1–12.
- 39 Stein P, Zeng F, Pan H, Schultz RM. Absence of non-specific effects of RNA interference triggered by long double-stranded RNA in mouse oocytes. *Dev Biol* 2005; 286(2): 464–471.
- 40 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418(6894): 244–251.
- 41 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296(5567): 550–553.
- 42 Zhou D, He QS, Wang C, Zhang J, Wong-Staal F. RNA interference and potential applications. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(9): 901–911.
- 43 Sarnova L, Malik R, Sedlacek R, Svoboda P. Shortcomings of short hairpin RNA-based transgenic RNA interference in mouse oocytes. *J Negat Results Biomed* 2010; 9: 8.
- 44 Flenr M, Malik R, Franke V, Nejepsinska J, Sedlacek R, Vlahovicek K, Svoboda P. A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* 2013; 155(4): 807–816.
- 45 Amanai M, Shoji S, Yoshida N, Brahmajosyula M, Perry AC. Injection of mammalian metaphase II oocytes with short interfering RNAs to dissect meiotic and early mitotic events. *Biol Reprod* 2006; 75(6): 891–898.
- 46 Velez AM, Fishilevich E. The mysteries of insect RNAi: A focus on dsRNA uptake and transport. *Pestic Biochem Physiol* 2018; 151: 25–31.
- 47 Zhao J, Wang L, Zhou HX, Liu L, Lu A, Li GP, Schatten H, Liang CG. Clathrin heavy chain 1 is required for spindle assembly and chromosome congression in mouse oocytes. *Microsc Microanal* 2013; 19(5): 1364–1373.
- 48 Balboula AZ, Stein P, Schultz RM, Schindler K. Knockdown of RBBP7 unveils a requirement of histone deacetylation for CPC function in mouse oocytes. *Cell Cycle* 2014; 13(4): 600–611.
- 49 Wang JY, Lei ZL, Nan CL, Yin S, Liu J, Hou Y, Li YL, Chen DY, Sun QY. RNA Interference as a tool to study the function of MAD2 in mouse oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(1): 116–124.
- 50 Cai Q, Niu H, Zhang B, Shi X, Liao M, Chen Z, Mo D, He Z, Chen Y, Cong P. Effect of EZH2 knockdown on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. *Theriogenology* 2019; 132: 95–105.
- 51 Yin FX, Li GP, Bai CL, Liu Y, Wei ZY, Liang CG, Bunch TD, Zan LS. SGO1 maintains bovine meiotic and mitotic centromeric cohesions of sister chromatids and directly affects embryo development. *PLoS One* 2013; 8(9): e73636.
- 52 Homer HA, McDougall A, Levasseur M, Murdoch AP, Herbert M. RNA interference in meiosis I human oocytes: towards an understanding of human aneuploidy. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(6): 397–404.
- 53 Yun Y, An P, Ning J, Zhao GM, Yang WL, Lei AM. H1foo is essential for *in vitro* meiotic maturation of bovine oocytes. *Zygote* 2015; 23(3): 416–425.
- 54 Cheng H, Zhang J, Zhang S, Zhai Y, Jiang Y, An X, Ma X, Zhang X, Li Z, Tang B. Tet3 is required for normal *in vitro* fertilization preimplantation embryos development of bovine. *Mol Reprod Dev* 2019; 86(3): 298–307.
- 55 Gao F, Guan J, Liu L, Zhang S, An P, Fan A, Song G, Zhang P, Zhao T, Tang B, Zhang X, Li Z. Effects of WT1 down-regulation on oocyte maturation and preimplantation

- embryo development in pigs. *Reproduction* 2014; 148(4): 377–387.
- 56 Chen F, Wang N, Yang D, Wen X, Mahmoud TN, Zhou D, Tang K, Lin P, Wang A, Jin Y. Herp depletion arrests the S phase of the cell cycle and increases estradiol synthesis in mouse granulosa cells. *J Reprod Dev* 2016; 62(2): 159–166.
- 57 Chen X, Zhu Z, Yu F, Huang J, Jia R, Pan J. Effect of shRNA-mediated Xist knockdown on the quality of porcine parthenogenetic embryos. *Dev Dyn* 2019; 248(1): 140–148.
- 58 Milazzotto MP, Goissis MD, Feitosa WB, Martins LF, Strauss BE, Bajgelman MC, Assumpcao ME, Visintin JA. Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for *in vitro* production of transgenic bovine embryos. *Zygote* 2010; 18(4): 339–344.
- 59 Wang H, Wu J, Liu X, He H, Ding F, Yang H, Cheng L, Liu W, Zhong J, Dai Y, Li G, He C, Yu L, Li J. Identification of short hairpin RNA targeting foot-and-mouth disease virus with transgenic bovine fetal epithelium cells. *PLoS One* 2012; 7(8): e42356.
- 60 Liao Y, Tang L. Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36(4): 630–638.
- 61 Murashov AK. RNAi and microRNA-mediated gene regulation in stem cells. *Methods Mol Biol* 2017; 1622: 15–25.
- 62 Zhang H, Wang L, Li W, Mao Q, Wang Y, Li Q, Hua S, Zhang Y. A simple and efficient method to transfect small interference RNA into bovine SCNT embryos. *Theriogenology* 2015; 84(6): 846–852.
- 63 Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(6): 421–446.
- 64 Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J Control Release* 2014; 195: 49–54.
- 65 Corey DR, Abrams JM. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol* 2001; 2(5): REVIEWS1015.
- 66 Draper BW, Morcos PA, Kimmel CB. Inhibition of zebrafish *fgf8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 2001; 30(3): 154–156.
- 67 Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489(1): 141–158.
- 68 Ekker SC. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 2000; 17(4): 302–306.
- 69 Heasman J, Kofron M, Wylie C. Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* 2000; 222(1): 124–134.
- 70 Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene ‘knock-down’ in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26(2): 216–220.
- 71 Dai XX, Xiong H, Zhang M, Sun S, Xiong B. Zfp207 is a Bub3 binding protein regulating meiotic chromosome alignment in mouse oocytes. *Oncotarget* 2016; 7(21): 30155–30165.
- 72 Coonrod SA, Bolling LC, Wright PW, Visconti PE, Herr JC. A morpholino phenocopy of the mouse *mos* mutation. *Genesis* 2001; 30(3): 198–200.
- 73 Sato Y, Sato S, Kikuchi T, Nonaka A, Kumagai Y, Sasaki A, Kobayashi M. Knockdown of gene expression by antisense morpholino oligos in preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*. *Anal Biochem* 2016; 509: 41–45.
- 74 Lu Y, Zhang Y, Pan MH, Kim NH, Sun SC, Cui XS. Daam1 regulates fascin for actin assembly in mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle* 2017; 16(14): 1350–1356.
- 75 Lu A, Zhou CJ, Wang DH, Han Z, Kong XW, Ma YZ, Yun ZZ, Liang CG. Cytoskeleton-associated protein 5 and clathrin heavy chain binding regulates spindle assembly in mouse oocytes. *Oncotarget* 2017; 8(11): 17491–17503.
- 76 Wang L, Lu A, Zhou HX, Sun R, Zhao J, Zhou CJ, Shen JP, Wu SN, Liang CG. Casein kinase 1 alpha regulates chromosome congression and separation during mouse oocyte meiotic maturation and early embryo development. *PLoS One* 2013; 8(5): e63173.
- 77 Huang J, Zhang H, Wang X, Dobbs KB, Yao J, Qin G, Whitworth K, Walters EM, Prather RS, Zhao J. Impairment of preimplantation porcine embryo development by histone demethylase KDM5B knockdown through disturbance of bivalent H3K4me3-H3K27me3 modifications. *Biol Reprod* 2015; 92(3): 72.
- 78 Isenberg JS, Romeo MJ, Maxhimer JB, Smedley J, Frazier WA, Roberts DD. Gene silencing of CD47 and antibody ligation of thrombospondin-1 enhance ischemic tissue survival in a porcine model: implications for human disease. *Ann Surg* 2008; 247(5): 860–868.
- 79 Negron-Perez VM, Vargas-Franco D, Hansen PJ. Role of chemokine (C-C motif) ligand 24 in spatial arrangement of the inner cell mass of the bovine embryo. *Biol Reprod* 2017; 96(5): 948–959.
- 80 Wang DH, Zhou HX, Liu SJ, Zhou CJ, Kong XW, Han Z, Liang CG. Glial cell line-derived neurotrophic factor supplementation promotes bovine *in vitro* oocyte maturation and early embryo development. *Theriogenology* 2018; 113: 92–101.
- 81 Yang WL, Li J, An P, Lei AM. CDC20 downregulation impairs spindle morphology and causes reduced first polar body emission during bovine oocyte maturation. *Theriogenology* 2014; 81(4): 535–544.
- 82 Kong XW, Wang DH, Zhou CJ, Zhou HX, Liang CG. Loss

- of function of KIF1B impairs oocyte meiotic maturation and early embryonic development in mice. *Mol Reprod Dev* 2016; 83(11): 1027–1040.
- 83 Nutt SL, Bronchain OJ, Hartley KO, Amaya E. Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis* 2001; 30(3): 110–113.
- 84 Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5(8): e203.
- 85 Shestopalov IA, Sinha S, Chen JK. Light-controlled gene silencing in zebrafish embryos. *Nat Chem Biol* 2007; 3(10): 650–651.
- 86 Summerton JE. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem* 2007; 7(7): 651–660.
- 87 Summerton JE. Invention and early history of morpholinos: from pipe dream to practical products. *Methods Mol Biol* 2017; 1565: 1–15.
- 88 Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 2008; 135(10): 1735–1743.
- 89 Hutchinson SA, Eisen JS. Islet1 and Islet2 have equivalent abilities to promote motoneuron formation and to specify motoneuron subtype identity. *Development* 2006; 133(11): 2137–2147.
- 90 Sazani P, Kang SH, Maier MA, Wei C, Dillman J, Summerton J, Manoharan M, Kole R. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(19): 3965–3974.
- 91 Weiss WA, Taylor SS, Shokat KM. Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors. *Nat Chem Biol* 2007; 3(12): 739–744.
- 92 El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 2017; 13(7): e1006780.
- 93 Neklesa TK, Tae HS, Schneekloth AR, Stulberg MJ, Corson TW, Sundberg TB, Raina K, Holley SA, Crews CM. Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nat Chem Biol* 2011; 7(8): 538–543.
- 94 Robinson MS, Sahlender DA, Foster SD. Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev Cell* 2010; 18(2): 324–331.
- 95 Clift D, McEwan WA, Labzin LI, Konieczny V, Mogessie B, James LC, Schuh M. A method for the acute and rapid degradation of endogenous proteins. *Cell* 2017; 171(7): 1692–1706. e18.
- 96 James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(15): 6200–6205.
- 97 Yoshimi R, Chang TH, Wang H, Atsumi T, Morse HC 3rd, Ozato K. Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts. *J Immunol* 2009; 182(12): 7527–7538.
- 98 Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(46): 19985–19990.
- 99 Mehlmann LM, Uliasz TF, Lowther KM. SNAP23 is required for constitutive and regulated exocytosis in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2019; 101(2): 338–346.
- 100 So C, Seres KB, Steyer AM, Monnich E, Clift D, Pejkovska A, Mobius W, Schuh M. A liquid-like spindle domain promotes acentrosomal spindle assembly in mammalian oocytes. *Science* 2019; 364(6447). pii: eaat9557. doi: 10.1126/science.aat9557.
- 101 Chen X, Liu M, Lou H, Lu Y, Zhou MT, Ou R, Xu Y, Tang KF. Degradation of endogenous proteins and generation of a null-like phenotype in zebrafish using Trim-Away technology. *Genome Biol* 2019; 20(1): 19.
- 102 Cromm PM, Crews CM. Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery. *Cell Chem Biol* 2017; 24(9): 1181–1190.
- 103 Keeble AH, Khan Z, Forster A, James LC. TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(16): 6045–6050.
- 104 Bottermann M, Lode HE, Watkinson RE, Foss S, Sandlie I, Andersen JT, James LC. Antibody-antigen kinetics constrain intracellular humoral immunity. *Sci Rep* 2016; 6: 37457.
- 105 Clift D, So C, McEwan WA, James LC, Schuh M. Acute and rapid degradation of endogenous proteins by Trim-Away. *Nat Protoc* 2018; 13(10): 2149–2175.
- 106 Li R, Jin Z, Gao L, Liu P, Yang Z, Zhang D. Effective protein inhibition in intact mouse oocytes through peptide nanoparticle-mediated antibody transfection. *PeerJ* 2016; 4: e1849.
- 107 Wang F, Zhang L, Zhang GL, Wang ZB, Cui XS, Kim NH, Sun SC. WASH complex regulates Arp2/3 complex for actin-based polar body extrusion in mouse oocytes. *Sci Rep* 2014; 4: 5596.
- 108 Liu H, Yin FX, Bai CL, Shen QY, Wei ZY, Li XX, Liang H,

- Bou S, Li GP. TFIIB co-localizes and interacts with alpha-tubulin during oocyte meiosis in the mouse and depletion of TFIIB causes arrest of subsequent embryo development. *PLoS One* 2013; 8(11): e80039.
- 109 Yuan YF, Zhai R, Liu XM, Khan HA, Zhen YH, Huo LJ. SUMO-1 plays crucial roles for spindle organization, chromosome congression, and chromosome segregation during mouse oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 2014; 81(8): 712–724.
- 110 Wang YP, Qi ST, Wei Y, Ge ZJ, Chen L, Hou Y, Ouyang YC, Schatten H, Zhao JG, Sun QY. Knockdown of UCH-L5IP causes abnormalities in gamma-tubulin localisation, spindle organisation and chromosome alignment in mouse oocyte meiotic maturation. *Reprod Fertil Dev* 2013; 25(3): 495–502.
- 111 Chao L, Wang X, Yang Y, Cui W, Xu J, Chen H, Hao A, Deng X. Downregulation of gene expression and activity of GRIM-19 affects mouse oocyte viability, maturation, embryo development and implantation. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32(3): 461–470.
- 112 Ewert KK, Zidovska A, Ahmad A, Bouxsein NF, Evans HM, McAllister CS, Samuel CE, Safinya CR. Cationic liposome-nucleic acid complexes for gene delivery and silencing: pathways and mechanisms for plasmid DNA and siRNA. *Top Curr Chem* 2010; 296: 191–226.
- 113 Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* 2014; 57: 78–94.
- 114 Kondo Y, Fushikida K, Fujieda T, Sakai K, Miyata K, Kato F, Kato M. Efficient delivery of antibody into living cells using a novel HVJ envelope vector system. *J Immunol Methods* 2008; 332(1–2): 10–17.
- 115 Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(5): 555–562.
- 116 Morris MC, Robert-Hebmann V, Chaloin L, Mery J, Heitz F, Devaux C, Goody RS, Divita G. A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains. *J Biol Chem* 1999; 274(35): 24941–24946.
- 117 Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotech* 2001; 19(12): 1173–1176.