

猪卵母细胞 *c-mos* 基因表达以及 RNA 干扰*

刘丽清^{1,2} 田江天¹ 格日乐其木格¹ 孙爽¹ 赵祥杰² 宋军¹
张永富¹ 李玉田³ 刘娣^{2**} 刘忠华^{1**}

1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030
2. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030
3. 黑龙江省农业科学院畜牧中心, 哈尔滨 150030

摘要 *c-mos* 基因在动物卵母细胞减数分裂调控中起作用, 但其作用机制目前仍不清楚。本实验通过 RT-PCR、免疫荧光激光共聚焦检测方法检测了猪卵母细胞在体外成熟培养过程中 *c-mos* 基因在转录水平、翻译水平上的表达以及蛋白的分布, 并应用注射小干扰 RNA (siRNA) 方法对其进行了 RNA 干扰 (RNAi) 研究。结果显示, 猪卵母细胞在体外成熟培养过程中 *c-mos* 基因 mRNA 量逐渐增高, 电激活后 6 h 接近完全降解; MOS (*c-mos* 基因蛋白产物) 在 GV 卵母细胞生发泡中有一定量的表达, 生发泡破裂 (GVBD) 前表达量增加且开始向卵母细胞胞质弥散, 成熟培养 44 h 未成熟卵母细胞中的 MOS 表达量要高于成熟卵母细胞, 激活后 6 h 核区 MOS 明显减少, 但仍然有少量 MOS 分布于胞质中; 成熟培养前干扰 *c-mos* 基因, 所用三个 siRNA 都能成功敲低 mRNA 量, 分别是同时期对照组 mRNA 量的 0.08 ± 0.03 , 0.11 ± 0.06 和 0.20 ± 0.06 倍, 干扰后虽然没有完全剔除 MOS, 但 MOS 量比同期卵母细胞有明显下降, 仍可以引发成熟卵母细胞染色体解凝集。研究结果揭示了猪卵母细胞体外成熟及发育过程中 *c-mos* 基因在转录和翻译水平上的动态表达规律, 建立了猪卵母细胞 *c-mos* 基因 RNAi 体系, 为 MOS 在猪卵母细胞发育过程中的功能研究建立了重要的基础 [动物学报 53 (4): 717-724, 2007]。

关键词 *c-mos* 基因 猪 卵母细胞 RNAi

Expression of *c-mos* gene and its RNAi in porcine oocyte*

LIU Li-Qing^{1,2}, TIAN Jiang-Tian¹, GERILE Qimuge¹, SUN Shuang¹, ZHAO Xiang-Jie², Song Jun¹, ZHANG Yong-Fu¹, LI Yu-Tian³, LIU Di^{2**}, LIU Zhong-Hua^{1**}

1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China
2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China
3. Farming Center of Academy of Agriculture Sciences of Heilongjiang Province, Haerbin 150030, China

Abstract *c-mos* involves in the regulating of oocyte meiosis process, but the mechanism is still not clear. *c-mos* transcriptional and translational expression pattern during *in vitro* maturation (IVM) and early parthenogenetic development were studied by realtime PCR and immuno-fluorescence confocal microscopy. *c-mos* RNA interference (RNAi) system was studied by micro-injection of short interference RNA (siRNA). The results showed that *c-mos* mRNA increased during IVM, and its degradation happened around 6 h after electric activation. At germinal vesicle (GV) stage, MOS (protein product of *c-mos* gene) was found inside GV. There was an surge expression of MOS before germinal vesicle breakdown (GVBD) and at the same time began to disperse towards cytoplasm. After 44 h IVM, MOS level in the immatured oocytes was higher than matured oocytes, and there was less MOS in nucleus than in the cytoplasm at 6 h after matured oocytes were activated; RNAi was performed before IVM, and all the three siRNA applied could successfully knockdown the level of *c-mos* mRNA, which were 0.08 ± 0.03 , 0.11 ± 0.06 and 0.20 ± 0.06 times of the control group respectively, and the quantity of MOS was obvious decreased compared with the control group at the same stage. Although MOS is not depleted completely, knockdowned MOS by RNAi could induce chromosomes of

2007-02-12 收稿, 2007-06-19 接受

* 黑龙江省自然科学基金资助 (This research was funded by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province)

** 通讯作者 (Corresponding author). 刘忠华: E-mail: liu086@yahoo.com; 刘娣: E-mail: liudi1963@sohu.com

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

matured oocytes to de-condensation without activation. The study illuminated a dynamic *c-mos* transcriptional and translational expression pattern during the process of IVM and early *in vitro parthenogenetic* development of porcine oocyte, and established a RNAi system on *c-mos* gene in porcine oocyte. These results provided an important base for the study of MOS function in porcine oocyte [*Acta Zoologica Sinica* 53 (4): 717–724, 2007].

Key words *c-mos* gene, Porcine, Oocyte, RNAi

c-mos 是莫洛尼氏鼠类肉瘤病毒癌基因的同源基因, 其蛋白产物 (MOS) 是在此病毒转化的细胞中被首次发现的, 分子量 39 kD, 是生殖细胞特异性表达的丝氨酸/苏氨酸激酶。经典的 MOS 激酶途径为 MOS/EKR/MAPK/p90^{RSK}, 在卵母细胞两次减数分裂过程中执行功能, 而 MOS 又被称为 MAPKKK, 是目前所知这一途径激活的原发因子。

c-mos mRNA 是在生长的 GV 期卵母细胞中积聚的母源转录物。孕酮 (PG) 刺激下, *c-mos* mRNA 3'-UTR 区发生多聚腺苷酸化, 并在短时间内开始大量合成。动物卵母细胞中 MOS 的代谢受到复杂的调控, 目前普遍认为是由 APC/C E3 连接酶识别 MOS 的 34 位赖氨酸, 使其发生多聚泛素化, 最终被 26S 蛋白水解酶识别并水解。泛素-蛋白水解酶途径 (UPP) 在两次减数分裂的中期至后期的转换过程中分别有两个活化并执行降解功能的窗口: 在爪蟾卵母细胞 GVBD 后, MOS 的 Ser-3 被磷酸化, UPP 途径不能识别 MOS 而使其免于降解 (Sheng et al., 2002); MPF (减数分裂成熟促进因子) 可以磷酸化 MOS 的 Ser-3, M II 卵母细胞被激活后, UPP 途径又被活化, 而 cyclinB 蛋白以及 MPF 活性在激活后 10 min 完全消失, 其后在 20 min 之内 MOS 的 Ser-3 去磷酸化, MOS 被降解 (Tunquist and Maller, 2003)。在 MOS 降解之后其母源 mRNA 的翻译也受到抑制, 研究者认为主要是由于 3'-UTR 序列下游去多聚腺苷酸化 (Propst et al., 1994), 导致 MOS 不能翻译。

Sagata et al. (1989) 首次在 MOS 与 CSF (细胞静止因子) 活性之间建立联系, 是第一个被发现的 CSF 因子, 并证明 MOS 作用有剂量效应, 高于剂量最低域值后能诱发卵母细胞 M II 期阻滞。1994 年有两个研究组同时成功敲除小鼠 *c-mos* 基因, 并证明敲除此基因的小鼠卵母细胞会发生自发激活 (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al., 1994)。最近几年在 Emi1-APC/C 以及其类似功能途径 CaMK II/PLK1/Erp1/APC/C 认识上的突破给 CSF 活性和作用机理提供了到目前为止最为直接有力的论证 (Rauh et al., 2005; Kishimoto, 2005)。有报道说 MOS 途径是通过在受精之前稳定 Emi1 与 cdc20 的

APC 抑制复合体建立 CSF 活性的 (Paronetto et al., 2004)。最近对 p90^{RSK} 的三个异构体完全敲除小鼠进行分析, 发现这些小鼠卵母细胞能正常停滞在 M II 期 (Schmidt et al., 2006), 哺乳动物中 MOS 途径在 CSF 因子中的主导性地位遭到质疑。

研究者们需要用新的思路和方法来进一步阐明 MOS 在不同时间不同物种中参与功能的复杂性。本研究试图用 RT-PCR、免疫荧光激光共聚焦检测方法评价猪卵母细胞中 *c-mos* 基因转录及蛋白表达状况, 并首次用 siRNA 干扰的方法对猪卵母细胞的 *c-mos* 基因进行研究, 为 MOS 功能的明晰补充数据, 同时, 建立有效的猪卵母细胞母源基因产物 RNAi 研究体系。

1 材料与方法

本实验所用试剂除特别说明外均购自于 Sigma 公司。

1.1 卵母细胞收集和培养

屠宰场取猪卵巢, 放入加双抗的 35℃ 生理盐水中, 2 h 内运回实验室。负压法抽取 2 mm–8 mm 表面直径卵泡内的卵母细胞。PVA-TL-HEPEs 洗涤, 在实体镜下挑取卵丘颗粒细胞多于 2 层的卵丘卵母细胞复合体 (COCs), 经洗涤和相应实验处理后置于成熟培养液中培养。成熟培养液的成分为: TCM 199 (Gibco BRL), 添加 0.1% PVA (w/v), 3.05 mmol/L D-葡萄糖, 0.91 mmol/L 丙酮酸钠和 75 μg/ml 青霉素 G; 以下试剂需用前添加: 0.57 mmol/L 半胱氨酸, 0.5 μg/ml 促黄体生成素, 0.5 μg/ml 促卵泡素, 10 ng/ml 表皮生长因子。成熟培养 44 h 的卵母细胞去除颗粒细胞后, 经电激活或者不经激活直接转至猪胚胎培养液 PZM-3 (Yoshioka et al., 2002) 中继续培养。收集直径 1 mm–2 mm 卵泡中的卵母细胞时, 需在 PVA-TL-HEPEs 中用眼科镊子自卵巢表层剥离卵泡, 实体镜下挑破卵泡, 收集卵母细胞待用。

1.2 siRNA 的设计

依据猪 *c-mos* 基因 (X78318) 序列, 使用 <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/> 经典的 siRNA 设计原则设计干扰序列, 并用 NA + N19 的设

计方法, 选择编码区 (CDS) 区域, 热动力学参数 (Thermodynamics) 比较低、GC 含量在 35% - 60% 之间的序列, 在 NCBI 进行猪基因组信息的 Blast 比对, 选择有两到三个碱基错配的三个序列做备选靶点, 分别为: siMOS803 (nt803-825): sense/5'-GCC-UGGGCAGCAUCAUCAUdTdT-3', antisense/5'-AUG-AUGAUGCUGCCCAGGCdTdT-3'; siMOS1171 (nt1171-1193): sense/5'-GGCUGGAAGAUCUGCGCUUdTdT-3', antisense/5'-AAGCGCAGAUCUCCAGCCdTdT-3'; siMOS1311 (nt1311-1333): sense/5'-GCGGAC-AUCUACUCCUUUGdTdT-3', antisense/5'-CAAAGG-AGUAGAUGUCCGCdTdT-3'。干扰实验的阴性对照序列 (Negative control sequence, NC) 为: sense/5'-UUCUCCGAACGUGUCACG-3', antisense/5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'。所有干扰序列均由上海吉

玛制药技术有限公司 (Gene Pharma) 合成。

1.3 干扰序列的显微注射

刚收集的 GV 期卵母细胞, 透明质酸酶 (2 mg/ml) 部分消化卵丘后置于成熟培养液中孵育 1 h。挑取质膜完整、颗粒细胞去除较彻底的卵母细胞在含 CB (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的操作滴中进行 siRNA 干扰序列的注射。显微操作系统为尼康倒置显微镜 (TS-100)、尼康显微注射系统 (IM-9A)。用原核注射用水 (Sigma, W1503) 将 siRNA 稀释至 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 在操作滴右侧做 2 μl 小滴, 注射针吸取稀释液后移回操作滴, 控制注射量为 5 pI/卵上下。进行 siRNA 干扰试验前, 用 FAM 荧光标记的 NC 序列 (Gene Pharma) 注射卵母细胞, 荧光显微镜即时检测注射效果 (图 1), 注射效率达到 0.792 ± 0.0166 ($n = 3$) 时, 开始正式 RNAi 试验。

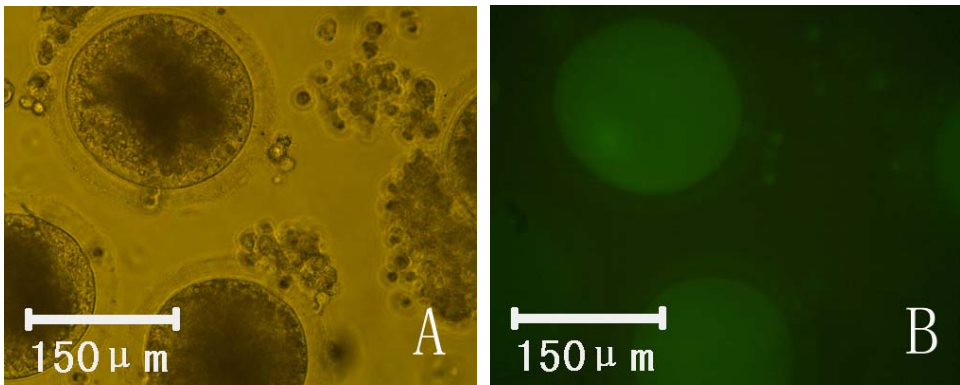


图 1 FAM 荧光标记的 NC siRNA 序列注射猪卵母细胞效果 (400 \times)

白色箭头表示序列注射失败。

Fig.1 The effect of injecting NC siRNA sequence marked by FAM fluorescence into porcine oocyte (400 \times)

White arrowhead represents the failure of sequence injection.

1.4 RT-PCR 检测

40 枚左右卵母细胞用 0.1 mg/ml 蛋白酶 K 的操作液 (含 BSA) 作用 5 min, 经操作液洗涤后置于液氮中快速冻存。取出后立即用裂解液裂解, 并依照说明书进行总 RNA 提取 (Absolutely RNA microprep kit, STRATEGENE, CANADA)。过程为: 裂解, 乙醇沉淀, 加低盐缓冲液, 上硅胶柱, Dnase I 消化, 高盐缓冲液洗柱, 低盐缓冲液洗柱, 30 μl 洗脱液洗脱 RNA 并收集到收集管中。反转录反应按说明书 (RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0, TAKARA) 试剂配比和建议反应条件进行, 20 μl 反应体系中加 9.5 μl 总 RNA。RT-PCR (ABI7500, U.S.A) 按照说明书 (SYBR premix Ex TaqTM, TAKARA) 进行 20 μl 体系 PCR 反应 (2 μl cDNA,

0.4 μl ROX Dye-II)。检测的目的基因 *c-mos* 基因 (X78318) 引物序列为: 上游引物, 5'-CCAGGGAA-TACTTGAGACAC-3'; 下游引物, 5'-ACATCCAGGG-AATACTTGAGAC-3'。选取的内参为 H2a 基因 (BF703857): 上游引物, 5'-CCCTGGGCGATGGTGACTT-3'; 下游引物, 5'-TACATGGCGGCGTGCTG-3'。反应条件均为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 5 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸, 34 s, 40 个循环。每个试验组有两次以上有效重复, 目的基因和内参基因分别做 PCR 反应, 每个反应做三个完全一致的 PCR 仪器孔重复。

1.5 免疫荧光激光共聚焦显微镜检测

卵母细胞去除卵丘颗粒细胞, 去透明带 (方法同上); 操作液中恢复 10 min; 4% 多聚甲醛溶液中

(PBS + 0.1% PVA + 4% 多聚甲醛) 固定 1 h; 置于 T-X-100 (0.2%) 溶液中 30 min 增加膜通透性; 封闭液 (PBS + PVA 0.1% + 1% BSA + 10% 山羊血清) 38℃ 封闭 30 min; 1/50 配比稀释 MOS 一抗 (兔抗人, SC-28789), 38℃ 孵育 1 h; PBS 洗涤三次, 每次 5 min; 1/120 稀释二抗 (FITC 标记的山羊抗兔 IgG, ZYMED, 81-6111), 38℃ 孵育 1 h; 碘化丙啶 (PI, 10 μ g/ml, p4170) 作用 10 min; PBS 洗涤两次, 每次 10 min。把卵母细胞置于抗荧光猝灭封片剂小滴中, 载波片四角用凡士林和甘油混合物支撑, 封片。激光共聚焦显微镜 (Leica, sp2) 油镜下观察全卵蛋白信号分布状况以及局部放大倍数后核区蛋白信号分布状况。为便于描述 MOS 表达与成熟过程中核进程的关系, 参考 Sun et al. (2004) 的实验结果, 将 GV 期至 GVBD 前的卵母细胞分为如下 5 类: GV0 型, 有核仁, 整个核区有分散的染色质; GV1 型, 有核仁, 被凝集的染色质围绕; GV2 型, 凝集的染色质不仅包围核仁, 还在核膜附近形成几个团簇; GV3 型, 染色质凝集成许多团簇或者线, 在整个核质内分布; GV4 型, 凝集的染色体团簇或者链没变但是核膜不再分明, 核仁完全消失。44 h 成熟卵母细胞、未成熟卵母细胞以及 50 h 激活卵母细胞同样用核形态来表征 MOS 表达量和分布状况同核进程之间的关系。

1.6 数据分析

Realtime PCR 检测结果采用经典的 $2^{-\Delta\Delta T}$ 方法分析 (Livak and Schmittgen, 2001), 所有数据采用 SPSS11.0 方差比较中的均值分析以及配对样本 t 检验模块分析, $P < 0.05$ 判定为差异显著。

2 结 果

2.1 猪卵母细胞体外成熟前后 *c-mos* 基因 mRNA 量的测定

分别在成熟培养 0 h、24 h 卵母细胞, 44 h 成熟卵母细胞, 成熟后转至 PZM-3 中继续培养到 50 h 的激活的卵母细胞, 以及 68 h 二细胞期胚胎中检测 *c-mos* mRNA 随时间表达变化状况。

成熟培养 0 h *c-mos* mRNA 已有表达, 成熟培养过程中, 24 h mRNA 量是 0 h 的 3.561 ± 0.526 倍, 44 h 量是 0 h 量的 4.948 ± 0.809 倍; 卵母细胞孤雌激活后继续培养至 50 h, 在这 6 h 内 *c-mos* mRNA 量急速降低 20 多倍, 濒于完全降解 (是 0 h mRNA 量的 0.203 ± 0.15 倍), 这一趋势持续到 2-细胞胚胎 (是 0 h mRNA 量的 0.048 ± 0.031 倍) (图 2)。

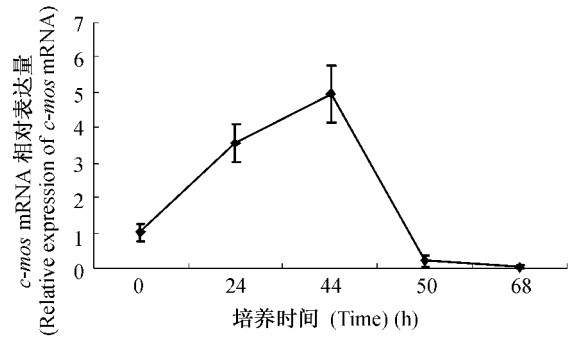


图 2 猪卵母细胞成熟前后 *c-mos* 基因 mRNA 量的变化

Fig.2 Changes of *c-mos* gene mRNA around maturation resumption of porcine oocyte

2.2 免疫荧光检测猪卵母细胞体外成熟前后 MOS 状况

选取以下几个时期猪卵母细胞做 MOS 免疫荧光信号, 以及核状态检测。分别为小卵泡 (1 mm - 2 mm) 中卵母细胞, 正常成熟培养的 0 h、24 h 卵母细胞, 44 h 成熟卵母细胞 (M II) 和未成熟卵母细胞 (IM), 成熟后转至 PZM-3 中继续培养到 50 h 的激活的卵母细胞。

小卵泡中剥离的卵母细胞多数处于 GV0 期, 这时核区就有少量 MOS 表达; 2 mm - 8 mm 卵泡中, 多为 GV1 或 GV2 期卵母细胞, 核中已有大量 MOS 表达分布; 成熟培养 24 h 多为 GVBD 或 M I 阶段卵母细胞, 少量 GV1、GV2、GV3、GV4 卵母细胞, GV2、GV3 类型中 MOS 开始向胞质弥散, 发育到 GV4、GVBD、M I 阶段的卵母细胞 MOS 均匀分布于卵的核区和胞质区。成熟培养 44 h 后 M II 以及 IM 卵母细胞中 MOS 仍然均匀分布于整个卵母细胞中, 胞质均匀且质膜完好的 IM 型多数处于第一次减数分裂后期, 卵母细胞 MOS 信号普遍强于同时期 M II 卵母细胞。50 h 卵母细胞 MOS 信号减弱, 核区附近信号尤其少 (图版 I: A - J')。

2.3 RT-PCR 检测干扰序列的有效性

显微注射后, 体外培养 44 h 挑取成熟卵母细胞进行 *c-mos* 基因 mRNA 检测。三个干扰序列注射组 (分别注射 si803, si1171, si1311 序列) *c-mos* 基因 mRNA 水平同未做注射对照组 (CON, 1.064229 ± 0.148758) mRNA 水平相比分别为 0.141 ± 0.008 , 0.171 ± 0.019 和 0.079 ± 0.005 , mRNA 量显著降低, 是有效干扰序列; 阴性对照序列 (NC) 注射组 *c-mos* 基因 mRNA 水平同未做注射对照组 (CON) 相

比为 0.778 ± 0.131 , 没有显著差异, 而且三个干扰序列注射组 *c-mos* 基因 mRNA 水平显著低于 NC 序

列注射组 (图 3)。

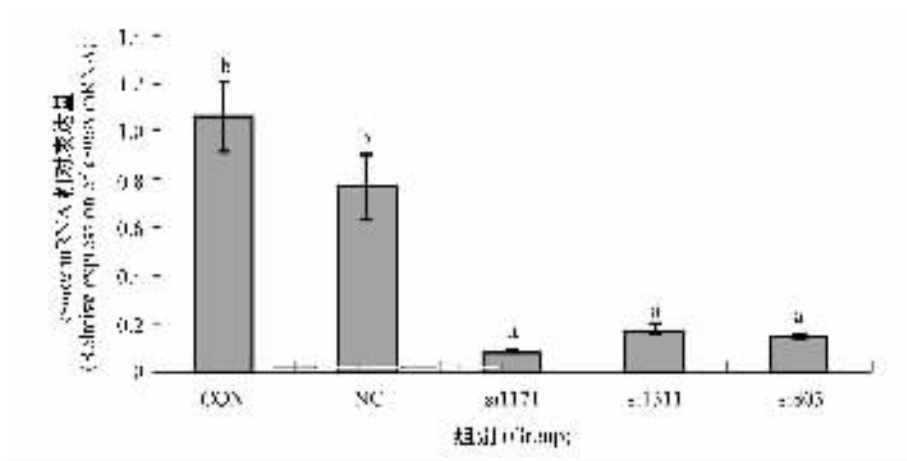


图 3 三个 siRNA 干扰序列的干扰效果

NC 为注射阴性对照序列的对照组; CON 为未做注射, 在 GV 期部分去除卵丘的对照组。数据柱上字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.3 Interference effect of three siRNA sequence

NC is the group injecting of negative control siRNA; CON is the group without injecting. Different letters on top of the data bar differ significantly ($P < 0.05$).

2.4 干扰 *c-mos* 基因后猪卵母细胞成熟以及自发激活状况

三个 siRNA 干扰卵母细胞 *c-mos* mRNA 表达后, 与两对照组相比成熟率没有显著变化。

表 1 三个 siRNA 序列干扰对猪卵母细胞成熟的影响

Table 1 Interference effect of the three siRNAs to maturation of porcine oocyte

	总卵数 Number of total oocytes	总成熟卵 Number total maturation oocytes	成熟率 (重复次数 n) Maturation rate (Number of repeats n)
Si803	138	80	0.58 ± 0.14^a (6)
Si1171	171	95	0.64 ± 0.12^a (7)
Si1311	121	70	0.63 ± 0.16^a (5)
NC	168	110	0.62 ± 0.09^a (7)
CON	202	128	0.65 ± 0.15^a (7)

同一列中含相同字母为差异不显著, $P > 0.05$ 。

Values with a common letter in the superscripts did not differ, $P > 0.05$.

激光共聚焦显微镜成像表明对 *c-mos* mRNA 进行成功干扰之后, MOS 在 44 h 成熟卵母细胞中仍然存在, 但量明显降低, 不能形成正常的 M II 核形态, 染色体不同程度的解凝集成丝状染色质, MOS 残留越少的卵母细胞解凝集成越彻底 (图版 I: K、K', L、L')。

3 讨论

Newman and Dai (1996) 通过 RNA 酶保护法分析猪卵母细胞 *c-mos* 基因转录状况, 发现 *c-mos* 基因 mRNA 在卵母细胞激活后迅速降低。本研究通过 RT-PCR 方法直接检测 *c-mos* 基因的 mRNA 量, 进一步肯定了 Newman 等人的研究结果。猪卵母细胞在成熟之前 mRNA 量持续增加, 激活后 6 h mRNA 水平下降到体外培养 0 h 卵母细胞的 0.203 ± 0.15 倍, 而且 mRNA 水平到 2 细胞胚胎期仍保持降低趋势。而 Nganvongpanit et al. (2006) 同样用 RT-PCR 方法分析牛卵母细胞中 *c-mos* mRNA 量的变化趋势, 却发现激活后短时间内 mRNA 量无显著变化, 直到 4 细胞胚胎后才开始迅速下降。Alizadeh et al. (2005) 证实, 小鼠中 *c-mos* mRNA 同其它几个只在减数分裂过程中发挥作用的基因 mRNA 会在卵母细胞激活后马上降解, 其降解过程由 3'-UTR 区域的未知元件指导, 说明除了 *c-mos* mRNA 3'-UTR 区域去多聚腺苷酸化能阻止 MOS 翻译以外, mRNA 的选择性降解也是控制卵母细胞激活后 MOS 不再重新合成的因素, 且后一影响因素在猪、小鼠中明显, 而在牛中却没有表现出来。同为哺乳动物, 卵母细胞激活以后 mRNA 降解的调控模式可能存在不同。

小鼠和大鼠中 MOS 的翻译是在 GVBD 之后才

开始的 (Paronetto et al., 2004), 与此不同, 本研究发现猪卵母细胞中 MOS 在 GVBD 前就已经合成。因此, 在猪卵母细胞中 MOS 发挥作用的时间也很可能与小鼠和大鼠卵母细胞存在差异。在猪 GVO、GV1 期卵母细胞中 MOS 主要分布于核区, GV2、GV3 类型中 MOS 开始向胞质弥散, GV4、GVBD、M I 阶段核区 MOS 相对减少, 而胞质中 MOS 相对增加并呈均匀分布状态。MOS 在胞质中伴随成熟发育进程而发生的分布变化很可能与调控卵母细胞发生 GVBD 有关。Verlhac et al. (2000) 的研究表明 MOS 可以分别通过激活 MEK1 或者抑制磷酸酶两个相对独立的途径来激活 MAPK; 而激活后的 MAPK 可与 p90^{RSK} 共同定位于核区, 进而参与调控 GVBD 的发生 (Fan et al., 2004)。由于磷酸酶对 MAPK 的激活抑制作用主要在胞质中发生的, 因此可以推断, 在 GVBD 发生之前核中 MOS 大量弥散到胞质中, 很可能通过抑制磷酸酶和激活下游通路从而促进 GVBD 的发生。猪卵母细胞 GVBD 至 M II 期间 MOS 量未见明显变化 (图版 I: E、F、G、I)。爪蟾卵母细胞 GVBD 后, MOS 被保护而不能被 APC/C 系统识别, 免遭被降解的命运 (Sheng et al., 2002), 猪卵母细胞中似乎也存在这一保护途径。

观察成熟培养 44 h 后的成熟卵母细胞以及未成熟的卵母细胞, 发现胞质均匀且质膜完好的未成熟卵母细胞大部分处于第一次减数分裂后期, MOS 量多于成熟卵母细胞。原因可能是 MOS 过量表达引发第一极体排放阻滞, 抑或是卵母细胞体外成熟时间过长使得 MOS 表达过量。如果原因为前者, 将对 MOS 功能的认识提供新的视角, 以往研究 MOS 多数是通过功能缺失来解析其作用机制, 过量表达也许可以带来新的发现。

成熟卵母细胞电激活 6 h (成熟培养后 50 h) 染色体完全解凝集, 形成核仁, MOS 量大幅降低, 核区附近尤其少。原因可能是: 卵子激活后 MPF 活性迅速降低, MOS Ser-3 因此去磷酸化后, 可以被 APC/C 系统标记泛素, 但猪卵母细胞中执行此蛋白降解功能的 26S 蛋白水解酶 20S 亚基只存在于核区附近 (Huo et al., 2004), 因而核区 MOS 减少; 大部分胞质区仍然有 MOS 分布并非蛋白的重新合成, 而很可能是 UPP 途径不能在胞质中执行降解功能所导致的结果。爪蟾中 MOS 在受精之后 20 min - 30 min 快速完全降解 (Tunquist and Maller, 2003), 而本实验发现 MOS 在猪卵母细胞以及激活

后 6 h 仍有部分残留, MAPK 活性在猪卵母细胞经历两次减数分裂并激活后 14 h 仍然能够得以维持 (Fan and Sun, 2004), MOS 仍然存在可能是部分原因。

RNAi 是动物细胞中由双链 RNA (dsRNA) 引发的序列特异性的转录后基因沉默过程。哺乳动物 RNAi 研究最早是在小鼠卵母细胞和早期胚胎中进行的 (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000), 由于卵母细胞不会像体细胞一样对长 dsRNA (> 30 bp) 产生非特异性反应而阻止蛋白合成或者引发 RNA 的全面降解; 而且卵母细胞体积大, 可以通过注射方式导入干扰序列, 可控性强。目前研究者们已经在小鼠、人、猪 (Cabot and Prather, 2003)、牛等哺乳动物中进行了多个基因的 RNAi 研究 (Nganvongpanit et al., 2006)。使用了多种形式的引发 RNAi 的效应分子: 体外合成的长 dsRNA, 化学合成的 siRNA, 质粒载体中不同启动子表达的长颈环 RNA (dsRNA 区段一般大于 300 bp) 以及短颈环 dsRNA (Svoboda, 2004)。本研究所用的三个化学合成的干扰序列干扰效率都能达到 80% 以上, 完全达到进行 RNAi 研究的标准, 与之前所做的卵子和早期胚胎中 RNAi 效率总体水平相仿 (Nganvongpanit et al., 2006)。相对于长 dsRNA 干扰序列, siRNA 能减少对同源基因的打靶失误 (off-target 效应), 准备周期短, 设计灵活性强, 费用低, 作用时效短 (3 d - 4 d), 可以实现短时干扰效果, 足以在母源 mRNA 所控制的猪卵母细胞成熟、M II 期阻滞、激活以及合子基因启动表达之前的两次卵裂等几个时间窗口内发生作用, 因此该系统很适合于研究卵母细胞或者胚胎内短期特异表达基因的功能。

本实验在转录水平有效敲低 *c-mos* 基因表达, 并降低了 MOS 表达量, 导致染色体无法维持 M II 高度凝集形态, 显示出不同程度的解凝集状态。但在干扰后的卵母细胞中仍然有少量 MOS 分布, 部分原因可能是在注射干扰片段之前 MOS 就已经有一定量的表达, 而且已表达的 MOS 在卵母细胞激活之前不发生大幅降解造成的。存在这样的趋势, 即 MOS 残留越少, M II 期卵母细胞染色质的解凝集就越彻底 (图版 I: K、K', L、L')。这说明猪卵母细胞中 MOS 在 M II 期发挥 CSF 作用时有使染色体保持凝集状态的作用, 而且此作用的发挥有剂量依赖性。三个 RNAi 实验组卵母细胞的成熟率和两个对照组没有差异, 说明同鼠、牛等物种一样,

猪中 MOS 对卵母细胞成熟之前的生理事件调控也不是必须的。

参考文献 (References)

- Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F, 2005. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 72 (3): 281–290.
- Cabot RA, Prather RS, 2003. Cleavage stage porcine embryos may have differing developmental requirements for karyopherins alpha2 and alpha3. *Mol. Reprod. Dev.* 64 (3): 292–301.
- Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ, 1994. Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370: 65–68.
- Fan HY, Sun QY, 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 70: 535–547.
- Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y, et al., 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. *Nature* 370 (6 484): 68–71.
- Huo LJ, Fan HY, Liang CG, Yu LZ, Zhong ZS, Chen DY, Sun QY, 2004. Regulation of ubiquitin-proteasome pathway on pig oocyte meiotic maturation and fertilization. *Biol. Reprod.* 71: 853–862.
- Kishimoto T, 2005. Developmental biology: cell cycle unleashed. *Nature* 437: 963–965.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T}. *Method* 25: 402–428.
- Newman B, Dai Y, 1996. Transcription of *c-mos* protooncogene in the pig involves both tissue-specific promoters and alternative polyadenylation sites. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 275–288.
- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Hoelker M, Jennen D, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, Schellander K, Tesfaye D, 2006. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts *in vitro* produced

- bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. *Reproduction* 131: 861–874.
- Paronetto MP, Giorda E, Carsetti R, Rossi P, Geremia R, Sette C, 2004. Functional interaction between p90RSK2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *EMBO. J.* 23: 4 649–4 659.
- Propst F, Rosenberg MP, Iyer A, Kaul K, Vande Woude GF, 1987. C-mos proto-oncogene RNA transcripts in mouse tissues: Structural Features. *Mol. Cell Biol.* 7: 1 629–1 637.
- Rauh NR, Schmidt A, Bormann J, Nigg EA, Mayer TU, 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437: 1 048–1 052.
- Sagata N, Daar I, Oskarsson M, Showalter SD, Vande Woude GF, 1989. The product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342: 512–518.
- Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU, 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J. Cell. Sci.* 119: 1 213–1 218.
- Sheng J, Kumagai A, Dunphy WG, Varshavsky A, 2002. Dissection of c-MOS degron. *EMBO. J.* 21: 6 061–6 071.
- Sun XS, Liu Y, Yue KZ, Ma SF, Tan JH, 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 69: 228–234.
- Svoboda P, 2004. Long dsRNA and silent genes strike back: RNAi in mouse oocytes and early embryos. *Cytogenet. Genome. Res.* 105: 422–434.
- Tunquist BJ, Maller JL, 2003. cytostatic factor (CSF) -mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17: 683–716.
- Verlhac MH, Lefebvre C, Kubiak JZ, Umbhauer M, Rassiniere P, Colledge W, Maro B, 2000. MOS activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways *EMBO J.* 19 (22): 6 065–6 074.
- Wianny F, Zernicka-Goetz M, 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell. Biol.* 2: 70–75.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S, 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66 (1): 112–119.

图版说明

图版 I 激光共聚焦显微镜油镜下观察的猪卵母细胞成熟前后 MOS 的表达变化

A–L 为全卵状态。

A' 和 L' 为分别与 A–L 全卵相对应的同一卵母细胞的细胞核以及核周局部放大后核形态和 MOS 的分布状态。

各图片卵母细胞分别为: A (A') 为 GV0 期; B (B') 为 GV1 期; C (C') 为 GV2 期; D (D') 为 GV3 期; E (E') 为 GV4 期; F (F') 为 GVBD 期; G (G') 为 MI 期; H (H') 为 44 h 未成熟卵母细胞 (IM); I (I') 为 44 h 成熟卵母细胞 (MII); J (J') 为激活后 6 h 卵母细胞 (50 h); K (K'), L (L') 分别为 0 h 对 *c-mos* 基因 RNAi 后 44 h 成熟卵母细胞。红色为 PI 着色的染色质, 绿色为 FITC 标记的 MOS 二抗染色。白色箭头所指为 GV 期末未被去除的颗粒细胞核染色, 标尺为 25 μm。

Explanation of Plate

Plate I Detection of changes of MOS expression by Confocal Microscopy under oil microscope

A–L whole oocytes.

A', L': The zoom around nucleus corresponding to whole oocytes in A–L respectively.

Oocytes in the pictures is: A (A') at GV0 stage; B (B') at GV1 stage; C (C') at GV2 stage; D (D') at GV3 stage; E (E') at GV4 stage; F (F') at GVBD stage; G (G') at MI stage; H (H') is the mmatured oocyte at 44 h (IM); I (I') is the matured oocyte at 44 h (MII); J (J') is the oocyte 6 h after activation (50 h); K (K'), L (L') are matured oocytes 44 h after RNAi of *c-mos* gene at 0 h. Red denotes chromatin dyed by PI, and green denote the second antibody of MOS dyed by FITC. White arrowheads represent dyeing of granulosa cell nuclei that are not wiped off in GV stage, and scale bar is 25 μm.

