

综 述

运用反义寡核苷酸研究非洲爪蛙 母源基因的功能

史慧娟 顾 斐 陶庆华*

(清华大学生命学院, 北京 100084)

摘要 母源基因在动物胚胎早期发育中的功能是发育生物学研究领域的难点之一。在过去二十多年里,反义寡核苷酸介导的反向遗传学技术在多种模式生物中均得到广泛应用,在非洲爪蛙母源基因功能分析中,反义寡核苷酸介导的mRNA降解和受体转移(host transfer)技术的联合使用,确立了以转录因子VegT和Wnt信号分子家族成员Wnt11为代表的母源基因在非洲爪蛙胚胎早期图式建成中的重要功能。目前,非洲爪蛙仍然是研究脊椎动物母源基因功能最为方便的模式系统,因此,该文将在简要叙述VegT和Wnt11调控胚胎三胚层的决定与分化和背方组织者中心诱导过程中的作用的基础上,较为详细地介绍反义脱氧寡核苷酸降解母源mRNA的原理和其与受体转移技术结合使用,分析非洲爪蛙母源基因功能的详细技术流程。

关键词 非洲爪蛙;母源基因;反义寡核苷酸;受体转移技术

Study the Function of Maternal Genes Using Antisense Oligonucleotide and Host Transfer Technique

Shi Huijuan, Gu Fei, Tao Qinghua*

(Tsinghua University School of Life Sciences, Beijing 100084, China)

Abstract *Xenopus laevis* has been an important model organism for the study of fundamental questions in molecular biology, cell biology, membrane physiology and developmental biology. In the past two to three decades, *Xenopus* has been demonstrated as the most amenable vertebrate model system for deciphering the function of maternal genes. By the combinatorial use of antisense oligodeoxynucleotide-mediated mRNA degradation and host transfer techniques, maternal transcriptional factor VegT has been demonstrated to play essential roles in the mesoderm induction and maternal Wnt11 as a critical component of the maternal dorsal determinants. In this review, we will introduce the principles related to the design and use of antisense oligodeoxynucleotide for the depletion of maternal mRNA of interest and the detailed procedures of host transfer technique.

Key words *Xenopus laevis*; maternal genes; antisense oligo nucleotide; host transfer technique

收稿日期: 2012-09-28 接受日期: 2012-12-09

国家自然科学基金(批准号: 30930012)和国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2011CB943802)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62788745, Fax: 010-62792749, E-mail: qhtaolab@mail.tsinghua.edu.cn

Received: September 28, 2012 Accepted: December 9, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30930012) and the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2011CB943802)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62788745, Fax: +86-10-62792749, E-mail: qhtaolab@mail.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-04 15:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1508.003.html>

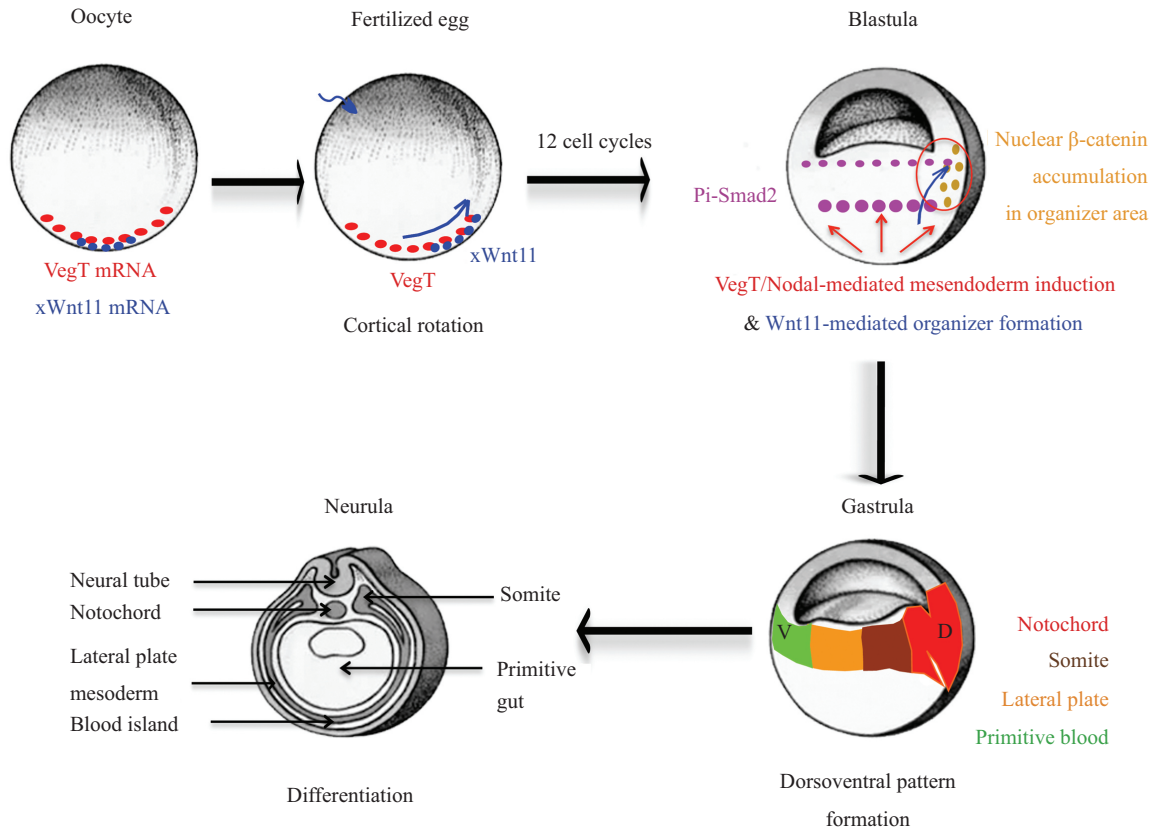
1 母源基因与非洲爪蛙早期胚胎图式建成

非洲爪蛙(*Xenopus laevis*)不仅是细胞生物学、生物化学、膜蛋白生理学等领域的优良研究模型,也是一种重要的发育生物学研究模式脊椎动物。该系统具有以下特点:(1)完全体外发育。非洲爪蛙常年可以响应外源雌激素(human chorionic gonadotropin, HCG)而排卵,每次排卵量可达1 000~3 000枚。体外授精操作简便。(2)胚胎体积较大。非洲爪蛙成熟的卵母细胞和受精卵直径约为1~1.5 mm,在解剖镜下可以进行注射、胚胎组织切割、组织/细胞移植等显微操作。(3)胚胎早期发育周期较短。在21~23 °C的条件下,受精卵一个半小时后开始第一次卵裂,随后进行11次同步化快速卵裂(25~30 min/cycle),期间合子基因组处于无转录状态;7~8 h后,进入囊胚中期,合子基因组开始转录,在2~3 h内进入原肠胚期,5~6 h内完成原肠运动,进入神经胚期,1 d后器官原基形成,并开始分化,2 d内将完成早期发育过程,并孵化为能够自由游泳的幼虫。(4)非洲爪蛙是目前最方便的母源基因功能研究脊椎动物模式系统。非洲爪蛙的成熟卵母细胞在适当的离体培养条件下能够存活7~10 d,并且保有受精潜能。在培养期间可以运用多种反向遗传学技术改变母源基因的表达剂量,对母源基因在胚胎发育中的功能进行原代研究。

20世纪70~80年代在黑腹果蝇中的大规模遗传学筛选分析,揭示了母源基因在无脊椎动物早期胚胎发育中的重要功能。非洲爪蛙是传统的实验胚胎学研究模式系统,为理解早期发育过程中的核-质相互作用、细胞与细胞、组织与组织间的相互作用,以及它们在胚胎图式建成中的功能提供丰富的知识^[1-2];但是,其发育遗传分析受制于过长的性成熟周期(1~2年),从自然生态环境及实验室中发现的突变体多与成年动物的生理功能相关。因此,在相当长一段时间里,非洲爪蛙早期发育中的基因功能分子生物学研究成果,主要来源于过量表达功能筛选,功能缺失分析则主要运用显性负突变干扰技术^[3]。自20世纪80年代以来,由两栖类动物卵母细胞生理研究实践发展而来的受体转移技术(host transfer technique)已经得到充分的优化^[4],而反义寡核苷酸对mRNA的降解生化、分子生物学机制也得到了充分的认识^[5-7]。受体转移以及反义寡核苷酸技术的结合,在非洲爪蛙早期发育研究中得到率先应用,使得我们对非洲爪蛙胚胎早期发育的关键问题如胚层诱导和背腹体轴的形成

的分子调控机制有了较为充分的理解^[8-10]。比如,母源TGFβ信号(Vg1)、T-box家族母源转录因子VegT在中/内胚层诱导中的功能都是通过此项技术得到深入的分析^[11],发现VegT在囊胚中期首先启动内胚层的决定程序,同时激活一批合子型TGFβ(*Xenopus nodal related genes*)的表达^[11-13],后者具有形态发生素(morphogen)功能,诱导紧邻内胚层的赤道边缘带细胞发育成中胚层,这些结果修正了早期关于三个胚层分别由卵母细胞中的不同位置信息诱导而成的观念^[8]。而Wnt信号通路在*Xenopus*中胚层的背腹分化和胚胎背腹体轴形成中的功能^[3],也是通过反义脱氧寡核苷酸介导的敲降实验得到最为充分的验证,发现母源储备的*Wnt11* mRNA^[14],通过依赖β-catenin的信号转导途径而发挥功能的基因^[15],是非洲爪蛙早期胚胎背腹体轴的母源决定因子主要成分,Wnt11与Wnt5a协同通过所谓的经典信号转导机制,调控β-catenin在胚胎一侧的细胞中的表达量,从而在囊胚期诱导Spemann组织者的形成;在组织者诱导过程中,Wnt11和Wnt5a的活性受到多重调控^[16-22]。反义脱氧寡核苷酸和host transfer技术的运用,还在其他一些早期发育相关的重大问题研究中获得重要进展,如:cadherin介导细胞黏连与微丝骨架合成的动态控制^[23-27]、卵母细胞极性的建立^[28]、种质mRNAs的功能^[29-33]、Tcf3/LEF1家族转录因子的功能^[34-35]、母源Wnt信号通路与染色质组蛋白甲基化修饰等表观遗传控制系统之间的相互作用^[36-37]等。这些和其他相关研究成果为我们理解非洲爪蛙母源基因在早期胚胎图式建成的功能提供了较为清晰的框架性认识(图1)。

最近的组学相关技术分析结果表明,多种模式动物的卵母细胞中均储备了大量的母源mRNA,占总转录组的20%~60%^[38]。无脊椎动物和较低等的脊椎动物中的研究结果已经揭示了母源基因在胚胎早期图式建成和基本细胞功能控制中的重要性,其他大量的母源基因的功能有待探索。人类、小鼠等哺乳类胚胎合子基因组在早期卵裂中就开始转录(小鼠胚胎8-细胞期、人类胚胎2-细胞期)^[38],在这些卵母细胞中进行大量的母源基因储备的意义,以及它们对这些胚胎早期发育的调控还不十分明了。利用非洲爪蛙模式系统,可以对一些重要生物学问题作进一步深入的分析,比如:(1)在卵母细胞发育过程中重要位置信息是如何逐步建立的,它们的活



定位在成熟卵母细胞植物极半球的转录因子VegT在卵裂过程中被植物极细胞所遗传。囊胚中期后, VegT激活多种内胚层发育相关基因, 包括Nodal家族生长因子编码基因, Nodal相关蛋白一方面进一步诱导内胚层的分化, 另一方面诱导赤道边缘带细胞发育成中胚层; 位于成熟卵母细胞植物极皮层的Wnt11 mRNA在受精后精子进入点对侧区域, 在囊胚期将通过依赖 β -catenin的经典Wnt信号途径诱导Spemann组织者的形成, 从而决定胚层的背腹极性。组织者的诱导依赖于Nodal信号与Wnt11/ β -catenin信号之间的协同作用, 而中胚层的背腹分化组织者分泌信号如Noggin、Chordin与腹方BMP信号之间相互作用的结果。

Maternal VegT and Wnt11 mRNA are localized in the cortex of vegetal pole of matured oocytes. After fertilization, VegT mRNA is inherited by the blastomeres in the vegetal pole. During the first cell cycle, maternal Wnt11 mRNA is relocalized from the vegetal cortex to the future dorsal side of embryo opposite to the sperm entrance point. By the mid- to late-blastula stage, VegT induced the vegetal cells to formation endoderm and express Nodal family growth factors, which in turn induce the equatorial cells to forma mesoderm. In the mean time, maternal Wnt11 induces the formation of Spemann organizer as a dorsaling center through a β -catenin dependent mechanism. During gastrula stages, the BMP antagonists Chordin, Noggin, Follistatin secreted from the organizer and BMP4/7 signals from the ventral side further pattern the embryo along the D/V axis. After gastrulation, the basal body plan is formed.

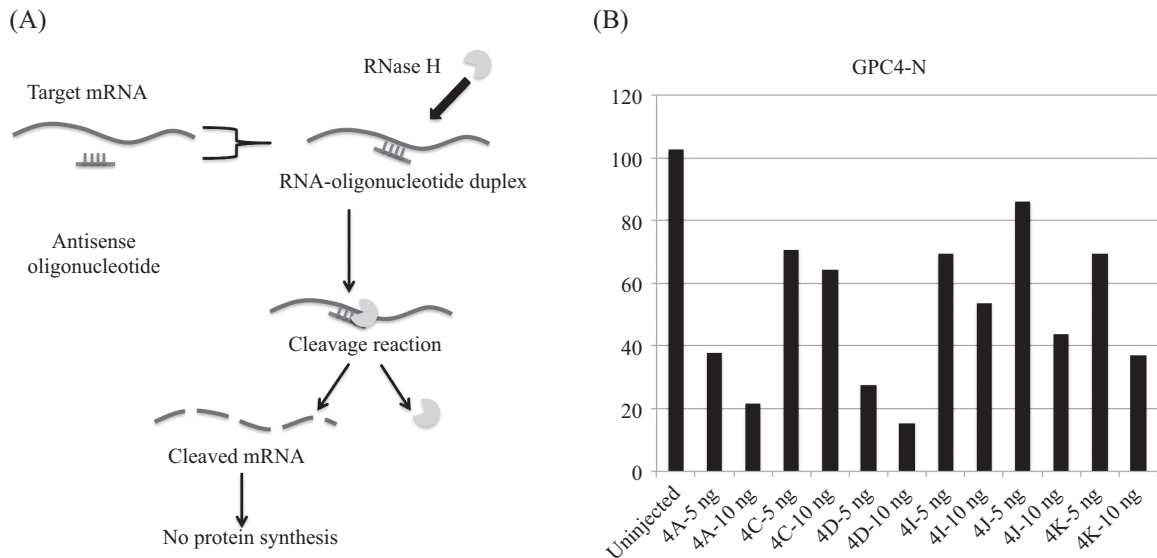
图1 母源基因VegT和Wnt11决定非洲爪蛙早期胚胎图式建成
Fig.1 Maternal genes VegT and Wnt11 prepattern the early *Xenopus* embryo

性又是如何被精确调控的? (2)母源因子如何影响囊胚期不同细胞对位置信息作出精确的解读? (3)母源核蛋白如何调控合子基因组染色质的包装, 从而决定合子基因组在囊胚中期转换前后的转录活性差异? (4)母源因子如何调控囊胚期胚胎细胞的命运可塑性等。受体转移以及反义寡核苷酸介导的反向遗传学技术的结合使用将有助于回答这些问题。

2 运用受体转移技术研究母源基因的功能

两栖类动物的腹腔卵没有受精能力。非洲爪蛙

卵母细胞在通过输卵管的过程中形成明显可见的胶囊(jelly coat)包被; 胶囊包被在吸引、激活精子以及帮助精子穿透卵细胞膜中具有重要作用。另外也有证据表明, 输卵管直段区(pars recta)对卵黄膜上的一类糖蛋白的翻译后处理是卵母细胞受精能力获得的必要条件^[39-41]。卵母细胞在通过输卵管的过程中如何获得受精性的详细机制还不得而知。但是, 经人工分离的成熟去滤泡卵母细胞(第六期), 在体外可进行较长时间的培养, 然后使用孕酮激素刺激培养卵母细胞恢复第一次减速分裂, 并停滞在第一次分裂中期, 此时的卵母细胞类似于正常的腹腔卵。经过



A: 反义脱氧寡核苷酸与靶mRNA形成特异的RNA/DNA杂交体, 激活内源RNase H, 导致靶mRNA的断裂与降解; B: qRT-PCR结果示例反义脱氧寡核苷酸的有效性筛选, 编号为4A和4D的寡核苷酸能够有效降解目标基因mRNA, 具有较好的剂量效应。实验中使用未注射的卵母细胞中目标mRNA的稳态水平作为100%标准, 并使用ODC mRNA表达水平作为正规化参考标准。

A: schematic depiction of the RNase H-dependent mechanism of antisense DNA oligo mediated degradation of mRNA; B: an exemplary quantitative RT-PCR result shows two antisense oligos 4A and 4D can efficiently depleted maternal GPC4 mRNA in a dose dependent manner. The cDNA from uninjected oocytes serves as 100% reference.

图2 反义寡核苷酸降解mRNA技术原理

Fig.2 The principle of antisense oligonucleotide-mediated degradation of mRNA

受体转移技术, 可以将这些培养卵母细胞转移到正在产卵的受体雌蛙的腹腔中, 在腹腔上皮纤毛运动的作用下, 这些外源卵母细胞会随同受体的卵母细胞一道被收集到输卵管中, 在1~3 h内这些外源卵母细胞被排到体外, 可以进行常规的人工授精^[7,42-43]。

卵母细胞在体外培养期间, 通过显微注射合成的反义寡核苷酸, 可以有效地降解储备在卵母细胞中的目标mRNA。因为, 如同其他大多数模式动物, 非洲爪蛙成熟卵母细胞中母源基因组的转录活动终止; 受精后的快速卵裂期间, 合子基因组也同样处于转录静止状态, 直至囊胚中期合子基因组才开始大规模的转录活动^[44-45]。因此, 一旦卵母细胞中储备的某种mRNA被敲降, 就可以实现对该母源基因的功能干预, 结合上面提到的受体转移技术, 使得分析母源基因在早期发育中的功能成为可能。

下面分别叙述反义寡核苷酸技术原理、反义寡核苷酸筛选、注射, 以及受体转移技术流程。

2.1 反义脱氧寡核苷酸技术原理

目前, 用来分析非洲爪蛙母源基因功能的反义寡核苷酸主要有两种。一种是反义脱氧寡核苷酸, 其作用机制是, 脱氧寡核苷酸与目标mRNA形成

RNA: DNA异源杂交体, 激活内源RNase H^[46], 后者在互补区段切割RNA序列, 导致目标mRNA的断裂和降解, 从而达到敲降目标mRNA的目的(图2A); 另一种是吗啉环代寡核苷酸, 这类寡核苷酸可以通过在目标mRNA的翻译起始密码附近阻止翻译的起始(因此可供选择靶序列较少)、或者在pre-mRNA的内含子-外显子接头区阻止mRNA的拼接和成熟, 从而达到敲低目标蛋白的目的^[47]。反义脱氧寡核苷酸的敲降效率可以通过定量RT-PCR检测; 抑制mRNA拼接的MO(morpholino oligo)的效果也可以通过定量RT-PCR检测, 而抑制翻译起始的MO的效果检测则需要有好的特异性抗体, 或者至少需要通过报告基因或者体外翻译实验来验证。研究表明, 反义脱氧寡核苷酸能够在数小时内导致目标mRNA降解到足够低的程度, 而反义脱氧寡核苷酸本身也会在12 h内被内源DNA酶充分降解^[43]。因此, 此类脱氧寡核苷酸可以被用来特异地研究母源基因的功能。相反, 吗啉环修饰的MO对DNA酶具有很强的抗性, 在体内稳定性则强得多。因此, 对于那些既有母源储备, 也有早期合子转录的基因, 运用MO则无法严格地区分这类目标基因的母源与合子功能。另外, MO的工

作剂量往往比脱氧寡核苷酸高得多(10~100 ng), 而高剂量MO也会产生细胞毒性^[48]。

2.2 反义脱氧寡核苷酸的设计

设计反义脱氧寡核苷酸所遵循的一般规则与设计PCR引物的规则类似, 比如, GC比例在40%~60%, 退火温度在50~60 °C, 尽可能高的复杂度, 无单核苷酸尤其是G和C的3~4次以上重复, 无GC二聚体三次以上的重复、无回文结构等^[49-50]。靶标序列一般选在编码区, 而且尽量靠近起始密码端, 因为3'端缺失的部分mRNA仍有可能被翻译成部分多肽, 产生不必要的副作用。在充分确定目标基因cDNA、甚至足够长的EST序列的可靠性后, 我们通常使用MIT primer 3(version 0.4.0, 使用缺省参数值)在线引物设计程序。大部分DNA合成公司的网站也有相应的寡核苷酸设计和挑选程序; 挑选出5-10条与目标基因cDNA编码区序列互补的、长度为18 nt的候选反义寡核苷酸, 小规模(1 OD)合成后需经PAGE纯化和脱盐处理。关于脱氧寡核苷酸的长度, 主要的考虑因素是要兼顾敲降效率和特异性。理论上讲, 12-15 nt长的寡核苷酸就可以产生足够多样的特异性, 敲降脊椎动物基因组中的任何一个基因^[51], 但是实践中多用16-20 nt长的寡核苷酸来兼顾效率和特异性。链长过长也会导致特异性的下降, 或者寡核苷酸本身更容易形成二级结构, 甚至其部分降解可以形成新的非特异识别^[51-52]。因此, 大多实验室选用18 nt长脱氧寡核苷酸。

由于非洲爪蛙是拟四倍体, 大部分基因都存在拟等位基因, 在EST文库中和实验室cDNA克隆实践中也通常能够检索/检测到它们分别编码的mRNA, 因此, 应尽可能在完全保守的区域挑选脱氧寡核苷酸。另外, 挑选出5-10条候选寡核苷酸后, 可以通过针对*Xenopus laevis*的cDNA序列库进行BLASTN分析, 排除那些可能跟不相关基因高度互补的寡核苷酸。目前, 还没有任何mRNA结构或者RNA:DNA稳定性、杂交特异性预测算法可以真正替代寡核苷酸特异性及效率的试错实验筛选方案。

2.3 反义寡核苷酸链的筛选、修饰及特异性

因为无法就脱氧寡核苷酸的效率和特异性进行理论预测, 而且实践中发现并不是每一个理论上完全互补的脱氧寡核苷酸都能真正有效地降解其靶标mRNA, 因此, 脱氧寡核苷酸的实验筛选步骤必不可少。

将人工合成的未经修饰的反义寡核苷酸用超纯水充分溶解, 经紫外分光光度计按标准程序定量, 将浓度调整到1 ng/nL。每条候选寡核苷酸注射至少两个剂量如5 ng和10 ng, 每剂量注射10-15枚卵母细胞, 18 °C培养至少4 h直至过夜。然后, 通过标准荧光定量RT-PCR实验程序分析目标基因的敲降效率。图2B中示例的分析结果是选用持家基因*ODC*(ornithine decarboxylase)的表达水平作为正规化标准, 其他可选用的持家基因包括*GAPDH* *Plakoglobin*等。也可以选用其他传统的mRNA表达定量分析方法如Northern杂交、RNase保护等。对于反义脱氧寡核苷酸的敲降效率的一般追求目标是能够将目标mRNA降解到正常水平的20%以下, 而且显示良好的剂量效应。不同的母源蛋白质储备浓度和稳定性差异较大, 通过比较实验组与对照组中目标mRNA的稳态表达水平并不总能够真实反映目标基因蛋白的敲降效果, 理想状况是, 使用特异的抗体进行敲降效果检测。

一般从10条候选寡核苷酸中筛选出1-3条高效的寡核苷酸, 或者重复上述挑选、合成、筛选过程直至筛选到有效的寡核苷酸。因为末端磷酸二酯键的硫代修饰合成成本较低, 大多DNA合成公司都提供此项服务, 因此也可以在初步筛选实验中就使用4-6条候选末端硫代修饰的寡核苷酸(如下所述), 以缩短筛选周期。如果经多轮筛选实验后仍然无法得到有效的寡核苷酸, 需要考虑使用其他类别修饰的寡核苷酸。

选择能够高效降解目标mRNA的反义脱氧寡核苷酸, 合成时对其末端的各3-4个磷酸二酯键进行硫代修饰, 形成嵌合体DNA寡核苷酸^[53-54], 并采用HPLC方法进行纯化和TEAA脱毒处理(IDT可提供此项服务), 合成规模达5~10 OD。末端磷酸二酯键的硫代修饰可提高其对内源核酸酶的抗性, 从而延长oligo在体内的半衰期(在哺乳类细胞株中的估计是从约40 min延长到约3~4 h)^[55], 获得更好的敲降效果。脱氧寡核苷酸作为RNase H的底物, 磷酸二酯键的修饰也会影响RNase H对其识别, 因此, 位于中央区域的至少6个二酯键不作任何修饰^[54,56]。此外, 硫代修饰也会增加脱氧寡核苷酸的细胞毒性, 过多的磷酸二酯键被硫代修饰会导致寡核苷酸过于稳定, 将会残留至受精以后, 影响受精卵的正常分裂和发育。还有多种将脱氧寡核苷酸中的磷酸二酯键进行其他类别的修饰, 改变磷酸二酯键的带电性质, 产生

对核酸酶的抗性, 在这里不再一一叙述。

多数末端硫代修饰脱氧寡核苷酸在5~10 ng的剂量下仍然具有一定细胞毒性, 可能的原因包括: 寡核苷酸降解后极大地改变了细胞内单核苷酸的浓度; 寡核苷酸本身或者其降解中间物非特异地干扰某些蛋白质的功能。但是, 这种毒性往往只有在受精以后才可被观察到, 包括导致受精卵不能正常分裂、不能正常起始或者完成原肠运动、甚至胚胎解聚。因此, 在实际操作过程中, 仍然需要验证由反义寡核苷酸敲除所产生的胚胎表型的特异性, 最重要的验证方法是进行拯救实验。依据实际情况, 可以在寡核苷酸完全降解之后(24 h, 或者8倍oligo半衰期), 在需要进行孕酮刺激恢复减数分裂之前就将拯救mRNA注射到卵母细胞中; 也可以在受精之后, 8细胞期之前进行拯救注射。拯救实验中所使用的mRNA可以是经克隆改造后不能被寡核苷酸识别的同义突变体, 还可使用*Xenopus laevis*姊妹种热带爪蛙(*Xenopus tropicalis*)甚至其他物种的同源mRNA。而拯救mRNA的剂量则需要通过预实验来确定, 一般是单独在正常胚胎中过量表达时不会产生明显表型的剂量(20~300 pg/胚胎)。拯救效果的判断标准, 既可以是表型的弱化, 也可以是发育相关基因的表达朝正常稳态水平的恢复。另外, 如果针对同一基因的多个反义寡核苷酸寡核苷酸链均导致相同表型和靶基因表达水平的改变趋势, 也可以作为特异性的信心指标^[57]。

2.4 受体转移技术对培养卵母细胞进行授精的技术流程

Host transfer技术是通过外科手术的方法将完成注射的卵母细胞送入代孕雌蛙腹腔内, 使卵母细胞在经过生殖期雌蛙输卵管排出时, 完成一系列成熟后修饰的过程, 从而可以成功地完成精子进入和受精过程(图3)。同细胞培养实验一样, host transfer实验全过程需防止微生物污染; 对非一次性的一切手术器械在使用前进行除垢、灭菌处理十分关键。

2.4.1 卵巢组织、卵母细胞的分离与培养

挑选状态良好的成年雌蛙, 放入合适浓度的麻醉剂(0.1% MS222, 用1 mol/L碳酸钠溶液调至pH7.6)中, 待其处于深度麻醉状态(触碰时无吞咽反应, 根据青蛙体重不同, 一般需要10~15 min)时, 取出置于手术台上, 使其腹部朝上。用无菌手术剪刀在雌蛙腹部下方约1/3处剪开表皮层, 用无菌刀片切开腹壁肌肉层(1 cm

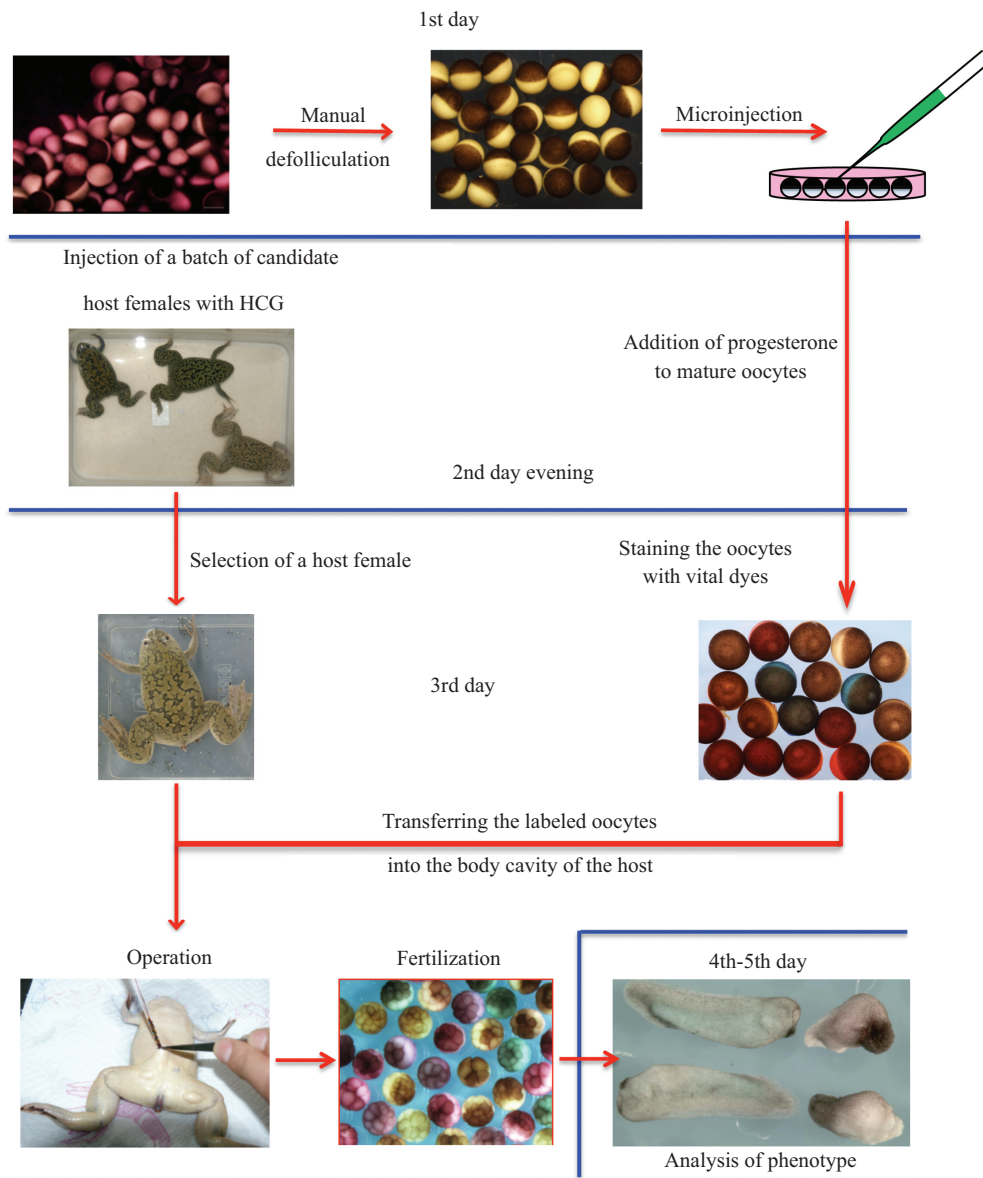
左右狭缝), 用无菌镊子和眼科手术剪刀取出卵巢, 放入事先备好的含有OCM(oocyte culture medium) (OCM: 60% L-15培养基、0.4% BSA、1 mmol/L谷氨酰胺、0.1 mg/mL庆大霉素, pH7.8~8.0; 使用前配制, 4 °C保存时间不超过4 d)培养液的平皿中, 进一步分解成1 cm见方小片, 并使用新鲜OCM清洗1-2次, 然后分散到多个9 cm培养皿中(每皿5-7小片); 卵巢组织和卵母细胞在不进行实验操作时均置于18 °C培养。每8~12 h换液一次。

部分卵巢切除手术完毕后, 迅速将仍处于麻醉状态的雌蛙的腹壁肌肉/肌膜、皮肤依次分别缝合, 将缝合好的雌蛙放入脱氨/活性氯自来水中恢复。一般一只雌蛙可以多次使用, 但两次手术间隔至少2~3个月。本实验每只爪蛙的手术次数不超过六次。

运用卵母细胞进行生理、生化或者细胞生物学的实践中, 通常使用胶原蛋白酶消化卵巢组织, 从而获得大量的单个卵母细胞, 但是经胶原蛋白酶的处理的卵母细胞通常不再具有受精性; 而一般显微注射针无法穿透结缔组织。因此, 进行母源基因功能研究所需的卵母细胞必须经手工去除滤泡和结缔组织而获得^[7,43]。使用的工具是经过手工磨制抛光的4号或者5号钟表匠镊子。用一只镊子端部轻轻夹住离目标卵母细胞约0.5 cm处的结缔组织, 另一只镊子在更靠近目标卵母细胞处轻轻撕扯结缔组织, 即可逐个分离卵母细胞(内层滤泡细胞仍然附着在卵母细胞表面, 但是不影响后续实验操作)。将分离好的卵母细胞转移至新鲜培养液(9 cm培养皿)中, 置于18 °C培养, 直到下一步实验操作。

手工去滤泡卵技术乍看具有一定的挑战性, 考验初学者的耐心, 但是经过一到两周的练习后, 多数人可以得心应手, 在2~4 h内获得300~500枚单个去滤泡卵母细胞。一次典型敲降实验包括对照组和3-5个不同的剂量实验组, 共需要400~800枚卵母细胞。

选取健康的供体卵巢十分关键。一般通行的做法是, 将卵巢供体雌蛙单独养殖, 不作它用。在进行部分卵巢切除术时, 先取出一小片在解剖镜下观察, 看卵巢中是否有足够的第六期成熟卵母细胞, 其它各期的未成熟卵母细胞也应该明显可见。如果出现如下情况, 需要另行选取卵巢: (1)卵巢老化, 死亡或者正在降解的卵母细胞随处可见; (2)成熟卵母细胞动物极色素颗粒分布不够致密; (3)尝试分离单个卵母细胞过程中极易损伤卵母细胞(如细胞膜上出现



实验的第一天, 通过部分卵巢切除术取出足量卵巢组织, 然后手工去滤泡组织分裂单个第六期卵母细胞, 使用微量控制显微注射仪将适量的反义脱氧寡核苷酸注射到卵母细胞中, 培养到第二天傍晚, 向培养液卵中加入 $2 \mu\text{mol/L}$ 孕酮, 诱导卵母细胞恢复减数分裂, 同时挑选一组候选受体雌蛙, 进行HCG注射, 诱导产卵。第三天上午进行手术灌注, 首先用不同的活体染料对处于第一次减数分裂中的培养卵母细胞进行染色标记, 同时选取一只刚刚开始产卵的雌蛙作为转移受体, 对其实施麻醉和灌注手术。手术完毕, 待受体雌蛙苏醒, 恢复正常排卵, 大约4~5 h后, 大部分染色标记的卵排到体外。收集全部的标记卵和少量受体自身卵一同进行体外授精, 然后进行其他必要的实验操作和表型观察、记录与分析。

1st day: an ovary is isolated from a donor female through partial oophorectomy. The ovary is cut into small pieces and cultured in low density in OCM (oocyte culture medium). Single oocytes are isolated through manual defolliculation using a pair of watch-maker's forceps. Oocytes are then injected with antisense oligo or mRNA of interest. Uninjected control and injected oocytes are then cultured in OCM at 18 degrees for 24 h. 2nd day: on the evening of day two, several candidate recipient females are injected with human gonadotropin (hCG, 800~1 000 unit per frog). In the meant time, the oocytes are treated with progesterone ($2 \mu\text{mol/L}$). 3rd day: on the morning of day three, matured oocytes (indicated by the white spot appears in the animal pole) are stained with vital dyes (neutral red, Nile blue, Bismarck brown). While the oocytes coloring, a host female that is actively laying good quality eggs is selected and anesthetized by MS222 (0.1%, pH to 8.0 with sodium bicarbonate). While the recipient female is unconscious, a small incision is made in the lower abdomen. The colored oocytes are then implanted into the body cavity of the female using a fire-polished wide bore Pasteur pipet. The incision is then rapidly sutured. Note that muscle/fascia and skin must be sutured separately. After the surgery, the female is recovered in dechlorinated water and will lay the colored eggs in 2~3 h. The eggs are then collected for fertilization.

图3 Host transfer技术流程

Fig.3 Technical flow chart of host transfer technic

划痕); (4)分离的单个卵母细胞过于柔软,不能维持较好球形。

2.4.2 卵母细胞显微注射 典型的卵母细胞显微注射实验流程是: (1)注射针制备(如使用Sutter拉针仪P-97和硼硅毛细玻璃管,内径0.58 mm,外径1 mm)和剂量校正(3~10 nL/s); (2)反义脱氧寡核苷酸溶液稀释(如1 ng/nL); (3)上样(1~3 μ L); (4)注射: 根据事先设定的注射量调节注射时间; 用镊子固定卵母细胞,使其预定注射区(一般为赤道偏植物半球区域)与针尖方向垂直; 注射深度约为细胞直径1/3~1/2左右,按需要注射一定数目(80-200枚)的卵母细胞。注射完毕后,做好标记,放入18 $^{\circ}$ C培养箱中培养36~48 h,待目标mRNA和末端硫代修饰反义脱氧寡核苷酸都有充分的降解。多数经硫代修饰的反义脱氧寡核苷酸的工作剂量在2~10 ng。但是,具体的剂量往往需要通过2-3次预实验来确定,通常在初次实验中,尝试较大的剂量范围,如2, 5, 10 ng。然后根据预实验结果调整剂量范围。

2.4.3 Host transfer手术操作流程 (1)培养卵母细胞激素促成熟和受体雌蛙准备: 经过48 h的培养后,如果需要进行拯救实验,先注射mRNA,然后向注射组和对照组卵母细胞培养基中加入孕酮(终浓度为2 μ mol/L,一般在傍晚进行),继续于18 $^{\circ}$ C培养,在10~14 h以内灌注到排卵状态良好的代孕雌蛙体内; 卵母细胞被激素促成熟的同时,挑选3-5只发育至性成熟的代孕雌蛙,每只蛙注射600~1 000 U的HCG,促进雌蛙排卵。一般情况下,激素处理过的雌蛙养在18~23 $^{\circ}$ C的水中约9~12 h便开始自主排卵,挑选状态良好、刚刚开始产卵的即可作为代孕雌蛙。候选代孕雌蛙的产卵状态和培养卵母细胞progesterone处理时间上的配合极其重要。过短(少于6 h)和过长(长于18 h)的progesterone处理都会导致受精率的显著下降,甚至根本就不能受精。而如果候选受体雌蛙已经错过排卵高峰期,也会大大降低实验胚胎的回收率和受精率。训练有素的操作者会在这一天为第二天实验中所需的试剂、溶液、手术器械、物品做好充分的准备。

(2)卵母细胞活体染色: 经过孕酮处理约8~12 h以后,便可发现卵母细胞动物极区域出现一白色斑点,标志卵母细胞恢复第一次减数,卵泡破裂(GVBD),并停滞在中期; 解剖镜下仔细观察可以看到被排出的第一极体位于白斑附近; GVBD发生率

需在90%以上。为了区分不同的实验组别,使用中性的红(neutral red)、俾斯麦棕(Bismarck brown)、尼罗蓝(Nile blue)三种活体染料对注射不同剂量的卵母细胞进行染色标记。置于摇床上染色10 min,然后将其转入新鲜的OCM培养液中,备用。根据实验需要,可以将等体积的Nile blue和neutral red混合获得紫色, Nile blue和Bismarck brown混合获得深绿色,从而使实验获得五种处理组别。因为染色在胚胎培养过程会逐渐变浅,实践中须在囊胚期将红色和紫色、蓝色和深绿色胚胎分开,以避免混淆。

在进行下一步灌注实验之前,有必要分组、分批冻存足够的卵母细胞,以备进行敲降效率检测或者其他一切必要的实验分析。

(3)外科手术灌注: 在对卵母细胞进行活体染色标记的同时,选择排卵状态良好的雌蛙(无破碎、降解卵,无串珠状卵; 可在手术前做一次预受精实验,确保有90%以上的分裂率),将其放入预先配制好的合适浓度的麻醉剂中待其深度麻醉(触碰时无吞咽反应)后,在其下腹部一侧用一次性手术刀片切一0.5 cm左右狭缝,用无菌宽口、钝缘巴斯德滴管(本生灯灼烧)将染色的卵母细胞灌注到雌蛙腹腔中,然后分别手术缝合雌蛙腹腔肌肉层和皮肤层,洗去体表麻醉剂后,放入清水中,待其苏醒后放入预先配好的温度适宜(18~21 $^{\circ}$ C)的1 \times 高盐溶液(1 \times high salt solution,相当于1.2 \times MMR)中。此时,代孕雌蛙重新开始排卵,大约2~3 h后,经活体染料标记的卵细胞就会随同雌蛙自身卵细胞一起排出体外,收集这些卵细胞于平皿中,用广口滴管将多余的盐溶液移除,运用标准程序进行体外授精,然后进行表型分析与鉴定。如果需要分析目标基因与其他基因的遗传上位关系,可将受精卵在1-2细胞期去胶囊,然后进行相关注射实验。受精后对照组的正常发育到尾芽期的比例一般为50%~90%,而注射组的受精率和存活率较对照组低一些,在30%~70%。因为实验程中存在多种不确定因素,使用不同的卵巢和受体雌蛙进行多次重复实验必不可少。经过充分的训练,多数实验者可以达到50%以上的成功率,即在单次实验中获得足够多的发育到原肠胚期、神经胚期的胚胎,表型的发生率具有统计上显著性。通过增加每次实验中卵母细胞的数目对获得足够多的分析对象也将会大有裨益。如果出现某个寡核苷酸重复性不佳的情况,潜在的原因包括寡核苷酸合成批次之间

的质量差异、*Xenopus*群落内的个体差异(mRNA序列多态性)^[43]。

3 总结与展望

本文主要对运用末端硫代修饰的脱氧寡核苷酸进行非洲爪蛙母源基因功能分析的原理和一般操作流程以及诸多实践考虑进行了较为详尽的阐述。相关实验技术为分析、鉴定非洲爪蛙早起胚胎图式建成中的母源决定因子及其调控的细胞信号通路中作出过重要贡献,而且依然是研究脊椎动物母源基因功能的优选实验技术。如前所述,实验的成功率在很大程度上取决于供体的卵母细胞质量和受体雌蛙的生理状态。目前还没有先验的标准或者十分方便可靠的生理、生化手段鉴定卵母细胞的质量,受体雌蛙的状态也主要根据实践者的经验判断,为实验添加诸多的可变因素和不确定性。如同其他类型的基因功能缺失研究技术实践一样,进行多次的重复实验最终总能为研究人员提供足够的信息,分析发育相关基因的功能,回答一些相关的重要生物学问题。无疑,对脊椎动物母源基因功能的进一步深入研究,离不开必要的技术创新,包括探索完全在体外进行成熟培养卵母细胞的受精技术。

对脱氧或者核糖寡核苷酸进行不同的化学修饰,从而降低其使用剂量和细胞毒性,增加其特异性一直是反向遗传学、基因检测与治疗研究领域的长期追求目标。针对核糖组分的2'-O进行甲基化或者闭锁桥连而产生的2'-O Me核糖寡核苷酸和LNA寡核苷酸,具有极高的核酸酶抗性和靶序列识别特异性,通过抑制mRNA的翻译过程而实现对靶基因的功能干扰;这类核糖寡核苷酸在非洲爪蛙母源基因功能研究中的应用刚刚起步,其效果和毒性还有待进行一步评估。针对磷酸二酯键进行胺基化修饰而产生的DEED(N,N-diethyl-ethylenediamine)、DMED(N,N-dimethyl-ethylenediamine)等脱氧型寡核苷酸,通过RNase H途径降解目标mRNA。这类改变磷酸二酯键带电性质的修饰具有与基因组DNA形成三链结构的潜在特性。有充分的实验证据显示,DEED寡核苷酸降解目标mRNA的效率显著高于硫代修饰脱氧寡核苷酸,其有效剂量一般低于1 ng,对非洲爪蛙母源基因和早期合子基因均能实现功能干扰,显示了良好的应用前景。目前,2'-O甲基化修饰以及LNA寡核苷酸有商业化合成,但是价格比较昂

贵,而DEED、DMED寡核苷酸的合成还没有商业化,因而限制了其在基础生物学研究实验中的使用^[43]。

细胞命运的决定和分化的控制机制是发育生物学和干细胞生物学中的根本问题。母源因子不仅在非洲爪蛙早期发育中参与控制胚胎多潜能前体细胞的诱导和分化,而且具有改变哺乳动物细胞分化潜能的活性,为研究细胞命运决定和分化、及其可塑性的调控机制提供了独特的视角和机会。*Xenopus tropicalis*的基因组已经被测序,而*X. laevis*的全基因组测序正在进行当中。初步分析结果表明,高达70%的人类疾病相关基因在*Xenopus*中有表达^[58]。运用*Xenopus tropicalis*进行正向遗传学筛选分析的技术已经日臻成熟^[59],内切酶和转座子介导的转基因技术在*Xenopus*胚胎中简易可行^[60-61],而BAC克隆及相关的Recombineering技术更为原代转基因功能研究提供了方便快捷的途径^[62-63]。最近有报道,运用过量表达小鼠Sox2、Klf4和Oct4将尾芽期体节细胞诱导成多潜能干细胞的成功先例^[64]。所有这些技术进展都会极大促进非洲爪蛙发育生物学的研究,也为深入研究母源因子在脊椎动物胚胎细胞命运决定过程中的功能提供新的机会。

参考文献 (References)

- 1 Nieuwkoop PD. Inductive interactions in early *amphibian* development and their general nature. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 89 Suppl: 333-47.
- 2 Nieuwkoop PD. Short historical survey of pattern formation in the endo-mesoderm and the neural anlage in the vertebrates: the role of vertical and planar inductive actions. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53(4): 305-18.
- 3 Harland R, Gerhart J. Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 611-67.
- 4 Holwill S, Heasman J, Crawley C, Wylie CC. Axis and germ line deficiencies caused by u.v irradiation of *Xenopus* oocytes cultured *in vitro*. *Development* 1987; 100: 9.
- 5 Cazenave C, Chevrier M, Nguyen TT, Hélène C. Rate of degradation of [alpha]- and [beta]-oligodeoxynucleotides in *Xenopus* oocytes. Implications for anti-messenger strategies. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(24): 10507-21.
- 6 Dash P, Lotan I, Knapp M, Kandel ER, Goelet P. Selective elimination of mRNAs *in vivo*: Complementary oligodeoxynucleotides promote RNA degradation by an RNase H-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(22): 7896-900.
- 7 Mir A, Heasman J. How the mother can help: Studying maternal Wnt signaling by anti-sense-mediated depletion of maternal mRNAs and the host transfer technique. *Methods Mol Biol* 2008; 469: 417-29.
- 8 Heasman J. Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 2006; 133(7): 1205-17.

- 9 Heasman J. Maternal determinants of embryonic cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17(1): 93-8.
- 10 White JA, Heasman J. Maternal control of pattern formation in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2008; 310(1): 73-84.
- 11 Zhang J, Houston DW, King ML, Payne C, Wylie C, Heasman J. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 1998; 94(4): 515-24.
- 12 Kofron M, Demel T, Xanthos J, Lohr J, Sun B, Sive H, et al. Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGFbeta growth factors. *Development* 1999; 126(24): 5759-70.
- 13 Xanthos JB, Kofron M, Wylie C, Heasman J. Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* 2001; 128(2): 167-80.
- 14 Ku M, Melton DA. Xwnt-11: A maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* 1993; 119(4): 1161-73.
- 15 Moon RT, Christian JL, Campbell RM, McGrew LL, DeMarais AA, Torres M, et al. Dissecting Wnt signaling pathways and Wnt-sensitive developmental processes through transient mis-expression analyses in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev Suppl* 1993: 85-94.
- 16 Cha SW, Tadjuidje E, Tao Q, Wylie C, Heasman J. Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. *Development* 2008; 135(22): 3719-29.
- 17 Glinka A, Wu W, Onichtchouk D, Blumenstock C, Niehrs C. Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 1997; 389(6650): 517-9.
- 18 Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 2004; 7(4): 525-34.
- 19 Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002; 417(6889): 664-7.
- 20 Wang Y, Fu Y, Gao L, Zhu G, Liang J, Gao C, et al. *Xenopus* skip modulates Wnt/beta-catenin signaling and functions in neural crest induction. *J Biol Chem* 285(14): 10890-901.
- 21 Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Curr Biol* 2000; 10(24): 1611-4.
- 22 Xu S, Cheng F, Liang J, Wu W, Zhang J. Maternal xNorrin, a canonical Wnt signaling agonist and TGF-beta antagonist, controls early neuroectoderm specification in *Xenopus*. *PLoS Biol* 2012; 10(3): e1001286.
- 23 Heasman J, Ginsberg D, Geiger B, Goldstone K, Pratt T, Yoshida-Noro C, et al. A functional test for maternally inherited cadherin in *Xenopus* shows its importance in cell adhesion at the blastula stage. *Development* 1994; 120(1): 49-57.
- 24 Kofron M, Heasman J, Lang SA, Wylie CC. Plakoglobin is required for maintenance of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos and for cdc42-mediated wound healing. *J Cell Biol* 2002; 158(4): 695-708.
- 25 Lloyd B, Tao Q, Lang S, Wylie C. Lysophosphatidic acid signaling controls cortical actin assembly and cytoarchitecture in *Xenopus* embryos. *Development* 2005; 132(4): 805-16.
- 26 Tao Q, Lloyd B, Lang S, Houston D, Zorn A, Wylie C. A novel G protein-coupled receptor, related to GPR4, is required for assembly of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos. *Development* 2005; 132(12): 2825-36.
- 27 Tao Q, Nandadasa S, McCrear PD, Heasman J, Wylie C. G-protein-coupled signals control cortical actin assembly by controlling cadherin expression in the early *Xenopus* embryo. *Development* 2007; 134(14): 2651-61.
- 28 Cha SW, Tadjuidje E, Wylie C, Heasman J. The roles of maternal Vangl2 and aPKC in *Xenopus* oocyte and embryo patterning. *Development* 2011; 138(18): 3989-4000.
- 29 Houston DW, King ML. A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* 2000; 127(3): 447-56.
- 30 Houston DW, Zhang J, Maines JZ, Wasserman SA, King ML. A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* boule. *Development* 1998; 125(2): 171-80.
- 31 MacArthur H, Bubunenko M, Houston DW, King ML. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev* 1999; 84(1/2): 75-88.
- 32 MacArthur H, Houston DW, Bubunenko M, Mosquera L, King ML. DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in *Xenopus* related to eIF4A. *Mech Dev* 2000; 95(1/2): 291-5.
- 33 Zhou Y, King ML. Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* 1996; 122(9): 2947-53.
- 34 Houston DW, Kofron M, Resnik E, Langland R, Destree O, Wylie C. Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf3. *Development* 2002; 129(17): 4015-25.
- 35 Standley HJ, Destrée O, Kofron M, Wylie C, Heasman J. Maternal XTcf1 and XTcf4 have distinct roles in regulating Wnt target genes. *Dev Biol* 2006; 289(2): 318-28.
- 36 Blythe SA, Reid CD, Kessler DS, Klein PS. Chromatin immunoprecipitation in early *Xenopus laevis* embryos. *Dev Dyn* 2009; 238(6): 1422-32.
- 37 Yang J, Tan C, Darken RS, Wilson PA, Klein PS. Beta-catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. *Development* 2002; 129(24): 5743-52.
- 38 Tadros W, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts. *Development* 2009; 136(18): 3033-42.
- 39 Barisone GA, Albertali IE, Sánchez M, Cabada MO. The envelopes of *amphibian* oocytes: Physiological modifications in *Bufo arenarum*. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 18.
- 40 Barisone GA, Hedrick JL, Cabada MO. Vitelline envelope of *Bufo arenarum*: Biochemical and biological characterization. *Biol Reprod* 2002; 66(4): 1203-9.
- 41 Barisone GA, Krapf D, Correa-Fiz F, Arranz SE, Cabada MO. Glycoproteins of the vitelline envelope of *Amphibian* oocyte: Biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(5): 629-40.
- 42 Heasman J, Holwill S, Wylie CC. Fertilization of cultured *Xenopus* oocytes and use in studies of maternally inherited molecules. *Methods Cell Biol* 1991; 36: 213-30.
- 43 Hulstrand AM, Schneider PN, Houston DW. The use of antisense oligonucleotides in *Xenopus* oocytes. *Methods* 2010; 51(1): 75-81.
- 44 Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in

- early *Xenopus* embryos: II. control of the onset of transcription. *Cell* 1982; 30(3): 687-96.
- 45 Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 1982; 30(3): 675-86.
- 46 Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J, Vande Woude GF. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1988; 335(6190): 519-25.
- 47 Heasman J. Morpholino oligos: Making sense of antisense? *Dev Biol* 2002; 243(2): 209-14.
- 48 Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, *et al.* p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* 2007; 3(5): e15.
- 49 Benimetskaya L, Berton M, Kolbanovsky A, Benimetsky S, Stein CA. Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF-kappaB p65) "antisense" oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(13): 2648-56.
- 50 Krieg AM, Stein CA. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Antisense or anti-protein? *Antisense Res Dev* 1995; 5(4): 241.
- 51 Woolf TM, Melton DA, Jennings CG. Specificity of antisense oligonucleotides *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(16): 7305-9.
- 52 Shuttleworth J, Matthews G, Dale L, Baker C, Colman A. Antisense oligodeoxyribonucleotide-directed cleavage of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes and embryos. *Gene* 1988; 72(1/2): 267-75.
- 53 Agrawal S, Mayrand SH, Zamecnik PC, Pederson T. Site-specific excision from RNA by RNase H and mixed-phosphate-backbone oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(4): 1401-5.
- 54 Dagle JM, Walder JA, Weeks DL. Targeted degradation of mRNA in *Xenopus* oocytes and embryos directed by modified oligonucleotides: Studies of An2 and cyclin in embryogenesis. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(16): 4751-7.
- 55 Fisher TL, Terhorst T, Cao X, Wagner RW. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(16): 3857-65.
- 56 Shuttleworth J, Colman A. Antisense oligonucleotide-directed cleavage of mRNA in *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* 1988; 7(2): 427-34.
- 57 Wylie CC, Heasman J. What my mother told me: Examining the roles of maternal gene products in a vertebrate. *Trends Cell Biol* 1997; 7(11): 459-62.
- 58 Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, Hendrix D, Jurka J, Kapitonov V. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 2010; 328(5978): 633-6.
- 59 Abu-Daya A, Khokha MK, Zimmerman LB. The hitchhiker's guide to *Xenopus* genetics. *Genesis* 2012; 50(3): 164-75.
- 60 Chesneau A, Sachs LM, Chai N, Chen Y, Du Pasquier L, Loeber J, *et al.* Transgenesis procedures in *Xenopus*. *Biol Cell* 2008; 100(9): 503-21.
- 61 Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, *et al.* *Xenopus tropicalis*: An ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim* 2010; 59(4): 395-405.
- 62 Fish MB, Nakayama T, Grainger RM. Simple, fast, tissue-specific bacterial artificial chromosome transgenesis in *Xenopus*. *Genesis* 2012; 50(3): 307-15.
- 63 Ogino H, Ochi H. Resources and transgenesis techniques for functional genomics in *Xenopus*. *Dev Growth Differ* 2009; 51(4): 387-401.
- 64 Vivien C, Scerbo P, Girardot F, Le Blay K, Demeneix BA, Coen L. Non-viral expression of mouse Oct4, Sox2, and Klf4 transcription factors efficiently reprograms tadpole muscle fibers *in vivo*. *J Biol Chem* 287(10): 7427-35.