

电穿孔介导小干扰 RNA 高效转染小鼠附植前胚胎

常博峰, 彭辉, 田进海, 苏建民, 张亨德, 白学尧, 张涌

西北农林科技大学动物医学院 农业部生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

常博峰, 彭辉, 田进海, 等. 电穿孔介导小干扰 RNA 高效转染小鼠附植前胚胎. 生物工程学报, 2012, 28(5): 613-622.

Chang BH, Peng H, Tian JH, et al. Efficient delivery of siRNA into mouse preimplantation embryos by electroporation. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 613-622.

摘要: 使用 Cy3 标记的阴性对照小干扰 RNA (siRNA) 转染小鼠附植前胚胎, 建立向小鼠附植前胚胎导入 siRNA 的电穿孔方法。通过控制透明带弱化程度、电压、脉冲时间和脉冲次数等条件, 采用不同参数组合并结合使用不同介质作为电转缓冲液将 Cy3 标记的阴性对照 siRNA 转染小鼠附植前胚胎。在荧光倒置显微镜下, 观察胚胎的存活率、siRNA 转染率以及阳性转染存活胚胎的囊胚发育率。结果显示小鼠附植前胚胎在使用台氏液消化胚胎透明带 10 s 后, 以 opti-MEM 作为电转缓冲液, 电穿孔参数设置为 30 V, 1 ms, 3 次的条件下取得最佳转染效果。总之, 电穿孔方法可实现 siRNA 简便、高效地转染小鼠附植前胚胎。

关键词: 小干扰 RNA, 电穿孔, 透明带, RNA 干扰

Efficient delivery of siRNA into mouse preimplantation embryos by electroporation

Bohao Chang, Hui Peng, Jinhai Tian, Jianmin Su, Hengde Zhang, Xueyao Bai, and Yong Zhang

Key Laboratory of Animal Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: We developed a detailed electroporation method to deliver efficiently siRNA into mouse preimplantation embryos. By introducing Cy3 labeled negative control small interfering RNA (siRNA) into mouse preimplantation embryos, we optimized conditions for the electroporation, including the voltage, pulse duration, pulse number, electroporation buffer and an important step to weaken the zona pellucida. Embryonic survival rate, transfection rate and

Received: October 9, 2011; **Accepted:** February 14, 2012

Supported by: National Key Project for Production of Transgenic Livestock, China (No. 2008ZX08007-004), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100303).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel/ Fax: +86-29-87080085; E-mail: zhy1956@263.net

国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (No. 2008ZX08007-004), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100303) 资助。

blastocyst development rate were evaluated under the converted fluorescence microscope, by embryos counting and statistical analysis. The best transfection was achieved in opti-MEM under the conditions of 30 V, 1 ms, 3 pulses, and the duration of digestion in tyrode's solution was 10 s. In conclusion, the proposed electroporation approach here is a simple and efficient tool to deliver siRNA for RNA interference (RNAi) into mouse preimplantation embryos.

Keywords: siRNA, electroporation, zona pellucida, RNAi

近年来由 siRNA (Small interfering RNA) 介导的 RNA 干扰 (RNAi) 已经逐渐成为研究基因功能的有力工具^[1-2]。将制备好的 siRNA 导入细胞中的方法主要有显微注射法、脂质体转染法、电穿孔法等。相比而言,电穿孔法具有操作简便、转染效率高等优点^[3-5]。电穿孔的原理是细胞在脉冲电场作用下,细胞膜脂双层上形成瞬时微孔,导致其通透性和膜电导瞬时增大,使得在正常生理情况下细胞膜难以通透的物质能够进入细胞^[6-7]。电穿孔法已经成功应用于向体外培养的细胞^[8-9]、活体组织^[10]、附植后胚胎^[11]和雄性配子^[12]导入蛋白质、糖类和 DNA 等。但是对由透明带包裹的附植前胚胎采用电穿孔方法进行转染具有特殊的难度。本研究通过对透明带弱化、优化电压、脉冲时间和脉冲次数等不同电穿孔参数,并结合使用不同介质作为电转缓冲液,采用统计学方法和形态学观察比较了各实验组别转染效果,建立了 siRNA 转染小鼠附植前胚胎的电穿孔方法,为采用由 siRNA 介导的 RNAi 技术研究基因在小鼠附植前胚胎中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

孕马血清促性腺激素 (Pregnant mare serumgonadotrophin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotropin, hCG) 购自

宁波第二激素厂; Cy3 标记的阴性对照 siRNA (#AM4621) 和 siPORT (#AM4502) 购自美国 Ambion 公司; 台氏液 (#T1788) 购自美国 Sigma 公司。电穿孔仪器 (ECM 2001 Electro Cell Manipulator) 购自美国 BTX 公司; 电转槽为电穿孔仪器所配套提供, 电极间距为 1 mm; opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司; 其他试剂如未经特殊说明均购自美国 Sigma 公司。

1.2 试验动物与胚胎采集

健康成年雄鼠及 5~7 周龄, 体重 20~25 g 昆明小白鼠购自第四军医大学实验动物中心。人工控制饲养温度 20 °C~24 °C, 相对湿度 50%~60%, 人工照明 12 h 光照, 12 h 黑暗。取雌性小鼠, 腹腔注射 PMSG 10 IU/只, 46 h 后注射 hCG 10 IU/只, 与公鼠 1:1 合笼过夜。16 h 后检查阴道栓, 查见阴道栓的雌鼠为受精鼠。对受精鼠逐一颈椎脱臼法处死后, 无菌条件下取出双侧输卵管, 戳破膨大壶腹部, 游离出由颗粒细胞包裹的受精卵细胞团。将细胞团置于盛有 PBS (Phosphate buffered saline) 的 35 mm 皿中清洗 1 次, 随后将细胞团转移至 0.2% 透明质酸酶中消化, 显微镜下观察消化到适当程度, 用吸卵针将受精卵吸入 Hepes-KSOM (H-KSOM) 中终止消化, 轻轻吹打至胚胎完全脱去颗粒细胞, 得到所需裸卵, H-KSOM 中清洗 3 次, 移入至少提前 0.5 h 平衡的 KSOM^[13] 培养液中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培

养箱内体外培养得到各时期附植前胚胎。

1.3 电穿孔转染小鼠附植前胚胎

使用 Cy3 标记的阴性对照 siRNA (10 μmol/L) 电穿孔转染小鼠受精卵, 此 siRNA 序列为 19 bp 随机序列, 与已知的小鼠、大鼠和人的基因无同源性, 因此导入胚胎后对胚胎基因表达不会产生影响。通过荧光倒置显微镜观察分析转染效果, 确定最佳实验条件和电穿孔参数。采用最佳实验条件和电穿孔参数转染 2-cell 胚胎、4-cell 胚胎、8-cell 胚胎、桑椹胚和囊胚, 观察转染效果。将采集的受精卵在 PBS 中清洗 2 次后移入台氏液中静置不同时间, 用以不同程度地消化透明带, 计时结束后立即加入 1 mL H-KSOM 终止消化, 然后吸出胚胎在 PBS 中清洗 3 次, 最后用吸卵针将受精卵转移至盛有 opti-MEM 的 35 mm 皿中清洗 2 遍后备用。按照 siPORT 试剂说明书配置电穿孔溶液。50 μL opti-MEM 加 3 μL siPORT, 室温避光静置 10 min, siPORT 的作用是可以与 siRNA 形成复合物, 促进 siRNA 在电转染过程中更高效地进入细胞。50 μL opti-MEM 加 10 μL Cy3 标记的阴性对照 siRNA。将稀释的 siPORT 和稀释的 Cy3 标记的阴性对照 siRNA 按 1:1 混合, 轻轻抽吸混匀, 室温避光静置 10 min。将胚胎转移至配置好的电穿孔溶液中, 注意转移胚胎时要求尽可能少吸液体, 以避免稀释电穿孔溶液。用吸卵针将含有胚胎的电穿孔溶液滴加至电转槽正负电极缝隙间, 均匀分散胚胎。选择不同电压, 脉冲时间和脉冲次数进行电穿孔转染。完成转染后吸出胚胎置于 H-KSOM 中清洗, 荧光倒置显微镜下观察, 统计分析转染效果。

1.4 实验分组

使用台氏液对胚胎透明带进行消化, 消化时间设计为未进行电转的胚胎对照组, 未经消化对照组, 消化 10、20、30 s, 电穿孔参数设定为 10 V, 1 ms, 3 次; 电压设计为 10、20、30、40、50 V, 台氏液消化 10 s, 脉冲时间 1 ms, 3 次; 脉冲时间设计为 600 μs、800 μs、1 ms、2 ms、3 ms, 台氏液消化 10 s, 电压 30 V, 3 次; 脉冲次数设计为 1、2、3、4 次, 脉冲间隔为仪器默认间隔 1 s。台氏液消化 10 s, 电压 30 V, 1 ms; 以 KSOM、PBS 和 opti-MEM 分别作为电转缓冲液, 电穿孔参数设定为 30 V, 1 ms, 3 次。

1.5 转染胚胎观察

电穿孔后将胚胎用 H-KSOM 清洗后荧光显微镜下检测存活率、转染率和阳性存活胚胎囊胚率。先在明场下统计胚胎数目, 固定视野转换荧光光源, 统计发出红色荧光的胚胎数, 在曝光时间为 1 s 时明显观察到红色荧光的存活胚胎计为阳性转染胚胎。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{电转后存活胚胎数}}{\text{处理前总胚胎数}} \times 100\%$$

$$\text{转染率}(\%) = \frac{\text{阳性转染胚胎数}}{\text{电转后存活胚胎数}} \times 100\%$$

$$\text{阳性存活胚胎囊胚率} = \frac{\text{阳性转染胚胎发育至囊胚数}}{\text{阳性转染胚胎数}} \times 100\%$$

1.6 统计学方法

每组试验设置 3 组重复, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析, 组间比较采用 ANOVA 法和 LSD 法检验。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 原核胚透明带消化时间对电穿孔效率的影响

未进行消化处理的原核胚电穿孔后胚胎存活率较高,与消化 20 s 实验组相比差异显著 ($P < 0.05$),暗示对透明带的消化处理在一定程度上可能会对胚胎的发育带来不利影响。但与消化 10 s 实验组差异不显著,这说明只要在适度的消化时间内,透明带弱化处理的过程对胚胎的影响是微弱的,不显著的;使用台氏液消化 30 s 后,透明带变得很薄甚至完全被消化,电穿孔后荧光显微镜观察显示存活胚胎 Cy3 荧光阳性率,即转染率 (85%) 显著高于未消化组和消化 10 s 组,与消化 20 s 实验组差异不显著;胚胎消化 30 s 后胚胎存活率 (31%) 显著低于其他 3 组 ($P < 0.05$);消化 10 s 和 20 s 实验组转染率无显著差异,但两组均显著高于未处理组 ($P < 0.05$);消化 10 s 实验组阳性存活胚胎囊胚发育率显著高

于消化 20 s 和 30 s 实验组。另外未经消化处理和电穿孔过程的胚胎在体外培养的囊胚率达到 92%,显著高于其他各组,包括未经消化处理而只进行电穿孔的实验组,这说明电穿孔过程中可能由于胚胎所处位置导致其所受场强不均等原因而不可避免地对少部分胚胎带来不可恢复的损伤 (表 1)。

图 1 为不同实验组胚胎电穿孔后的显微照片。A、D、G、J 分别为明场下胚胎显微照片, B、E、H、K 分别为同一胚胎的红色荧光照片, C、F、I、L 为明场与荧光的合成照片。

2.2 电压对电穿孔效率的影响

转染率在 30 V 时达到最高 (95%),与电压 10 V 和 20 V 实验组差异显著 ($P < 0.05$),继续增加电压转染率变化不大,但胚胎存活率和存活胚胎囊胚发育率急剧下降。电压为 10、20、30 V 实验组间存活胚胎囊胚发育率差异不显著 (表 2)。

表 1 透明带消化时间对电穿孔效率的影响

Table 1 Electroporation efficiency after different duration of digestion

Duration of digestion	Number of embryos for treatment	Number of surviving embryos	Number of Cy3 positive embryos	Number of surviving positive embryos to blastocyst
No electroporation	64	—	—	57 (92.17 ± 0.73) ^a
Untreated	76	73 (96.25 ± 2.01) ^a	35 (47.87 ± 1.32) ^a	30 (85.98 ± 2.04) ^b
10 s	83	72 (87.17 ± 3.39) ^{ab}	48 (66.63 ± 0.80) ^b	39 (81.20 ± 0.68) ^b
20 s	59	45 (76.15 ± 2.02) ^b	34 (75.58 ± 1.13) ^{bc}	22 (64.29 ± 2.68) ^c
30 s	61	19 (30.99 ± 2.34) ^c	16 (85.00 ± 7.64) ^c	9 (55.56 ± 5.56) ^c

Three replicate experiments were performed per treatment. Numbers in parentheses represent respective rates ($\bar{x} \pm s$), while other numbers represent total embryo numbers of three replicates. Within a column, the rates with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$).

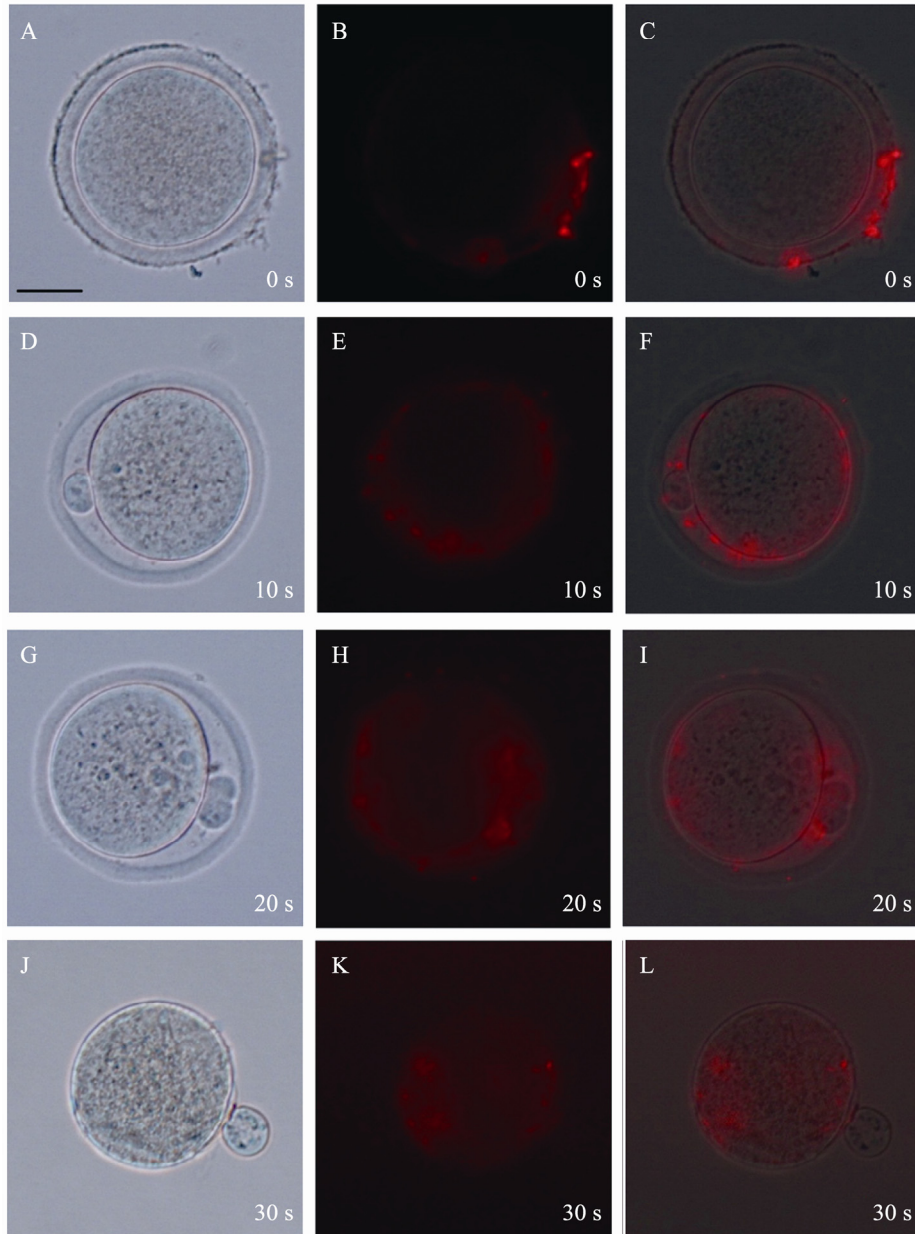


图 1 不同消化时间的胚胎电穿孔后的红色荧光水平

Fig.1 Cy3 Fluorescence level in embryos when they were electroperated after different duration of digestion. Bar=40 μ m. (A-C) Zona intact embryo. Fluorescence is present in the zona pellucida but not in the cytoplasm of the cell. (D-F) Duration of digestion was 10 s. (G-I) Duration of digestion was 20 s. (J-L) Duration of digestion was 30 s.

表 2 电压对电穿孔效率的影响

Table 2 Electroporation efficiency at different voltages

Voltages (V)	Number of electroporated embryos	Number of surviving embryos	Number of Cy3 positive embryos	Number of surviving positive embryos to blastocyst
10	69	61 (88.50 ± 0.76) ^a	39 (63.96 ± 1.15) ^a	32 (82.45 ± 1.56) ^a
20	87	69 (79.29 ± 5.42) ^{ab}	56 (81.04 ± 1.12) ^b	47 (84.00 ± 1.15) ^a
30	73	51 (68.41 ± 5.99) ^b	48 (94.77 ± 2.83) ^c	39 (80.63 ± 1.00) ^a
40	81	35 (43.05 ± 1.56) ^c	33 (95.00 ± 2.89) ^c	25 (72.31 ± 1.48) ^b
50	89	20 (22.16 ± 2.16) ^d	19 (94.00 ± 1.15) ^c	9 (43.68 ± 3.70) ^c

Three replicate experiments were performed per treatment. Numbers in parentheses represent respective rates ($\bar{x} \pm s$), while other numbers represent total embryo numbers of three replicates. Within a column, the rates with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$).

2.3 脉冲时间对电穿孔效率的影响

胚胎存活率随脉冲时间的延长而降低, 脉冲时间为 600 μ s、800 μ s 和 1 ms 时差异不显著, 继续延长脉冲时间, 存活率显著下降 ($P < 0.05$); 转染率随脉冲时间的延长而提高, 600 μ s、800 μ s 和 1 ms 三个实验组转染率提高程度差异显著, 1 ms 时转染率最高达到 93%, 继续增加脉冲时间转染率无显著提高, 但存活胚胎囊胚发育率在 2 ms 和 3 ms 实验组中显著降低 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.4 脉冲次数对电穿孔效率的影响

胚胎存活率随着脉冲次数的增加而降低, 但脉冲次数为 1、2、3 次时差异不显著, 脉冲次数为 4 次时, 相比前 3 组胚胎存活率降低显著 ($P < 0.05$); 转染率随着脉冲次数的增加而显著提高 ($P < 0.05$), 脉冲次数增加到 4 次以后, 转染率提高不显著; 阳性转染胚胎囊胚发育率随脉冲次数的增加而降低, 但相邻两实验组间囊胚率降

低不显著 (表 4)。

2.5 电转缓冲液对电穿孔效率的影响

使用 KSOM、PBS 和 opti-MEM 分别作为电转缓冲液时, 电穿孔后的胚胎存活率 3 组间无显著差异; 使用 opti-MEM 作为电穿孔缓冲液时 Cy3 阳性转染率最高, 达到 92%, 使用 KSOM 实验组转染率最低, 3 组间差异显著 ($P < 0.05$); 使用 PBS 作为电转缓冲液时的阳性转染存活胚胎的囊胚发育率显著低于其他两组。

2.6 电穿孔转染其他时期胚胎

通过上述实验确定电穿孔转染小鼠受精卵条件为: 台氏液消化 10 s, 电穿孔参数为电压 30 V, 脉冲时间 1 ms, 脉冲次数 3 次。使用此方法转染小鼠其他时期胚胎, 包括 2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚和囊胚。图 2 为转染后培养 4 h 荧光显微镜下观察拍照照片。

表 3 脉冲时间对电穿孔效率的影响

Table 3 Electroporation efficiency of different pulse duration

Pulse duration	Number of electroporated embryos	Number of surviving embryos	Number of Cy3 positive embryos	Number of surviving positive embryos to blastocyst
600 μ s	61	50 (81.67 \pm 1.76) ^a	32 (64.79 \pm 1.60) ^a	26 (83.35 \pm 0.87) ^a
800 μ s	94	69 (73.33 \pm 3.18) ^a	56 (82.34 \pm 1.50) ^b	47 (84.82 \pm 0.95) ^a
1 ms	71	51 (72.33 \pm 1.76) ^a	48 (92.98 \pm 1.42) ^c	40 (83.57 \pm 1.92) ^a
2 ms	81	35 (42.86 \pm 2.41) ^b	33 (94.74 \pm 3.18) ^c	23 (67.83 \pm 4.12) ^b
3 ms	74	20 (26.65 \pm 5.13) ^c	19 (93.61 \pm 1.69) ^c	9 (44.99 \pm 3.85) ^c

Three replicate experiments were performed per treatment. Numbers in parentheses represent respective rates ($\bar{x} \pm s$), while other numbers represent total embryo numbers of three replicates. Within a column, the rates with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$).

表 4 脉冲次数对电穿孔效率的影响

Table 4 Electroporation efficiency of different number of pulse

Number of pulse	Number of electroporated embryos	Number of surviving embryos	Number of Cy3 positive embryos	Number of surviving positive embryos to blastocyst
1	83	65 (79.08 \pm 1.11) ^a	40 (61.41 \pm 1.10) ^a	34 (85.97 \pm 1.01) ^a
2	79	60 (76.89 \pm 1.12) ^a	46 (75.90 \pm 1.35) ^b	22 (83.65 \pm 1.15) ^{ab}
3	81	60 (74.93 \pm 0.72) ^a	55 (91.07 \pm 1.56) ^c	43 (79.07 \pm 2.57) ^{bc}
4	77	41 (53.46 \pm 2.39) ^b	39 (93.01 \pm 3.55) ^c	30 (76.97 \pm 1.19) ^c

Three replicate experiments were performed per treatment. Numbers in parentheses represent respective rates ($\bar{x} \pm s$), while other numbers represent total embryo numbers of three replicates. Within a column, the rates with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$).

表 5 电转缓冲液对电穿孔效率的影响

Table 5 Electroporation efficiency of different electroporation buffers

Electroporation buffer	Number of electroporated embryos	Number of surviving embryos	Number of Cy3 positive embryos	Number of surviving positive embryos to blastocyst
KSOM	61	45 (75.16 \pm 2.95)	20 (45.74 \pm 3.24) ^a	17 (89.67 \pm 1.82) ^a
PBS	74	50 (68.34 \pm 1.53)	36 (72.08 \pm 3.53) ^b	7 (22.41 \pm 2.48) ^b
opti-MEM	71	51 (73.80 \pm 3.09)	46 (91.71 \pm 1.84) ^c	37 (82.87 \pm 2.00) ^a

Three replicate experiments were performed per treatment. Numbers in parentheses represent respective rates ($\bar{x} \pm s$), while other numbers represent total embryo numbers of three replicates. Within a column, the rates with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$).

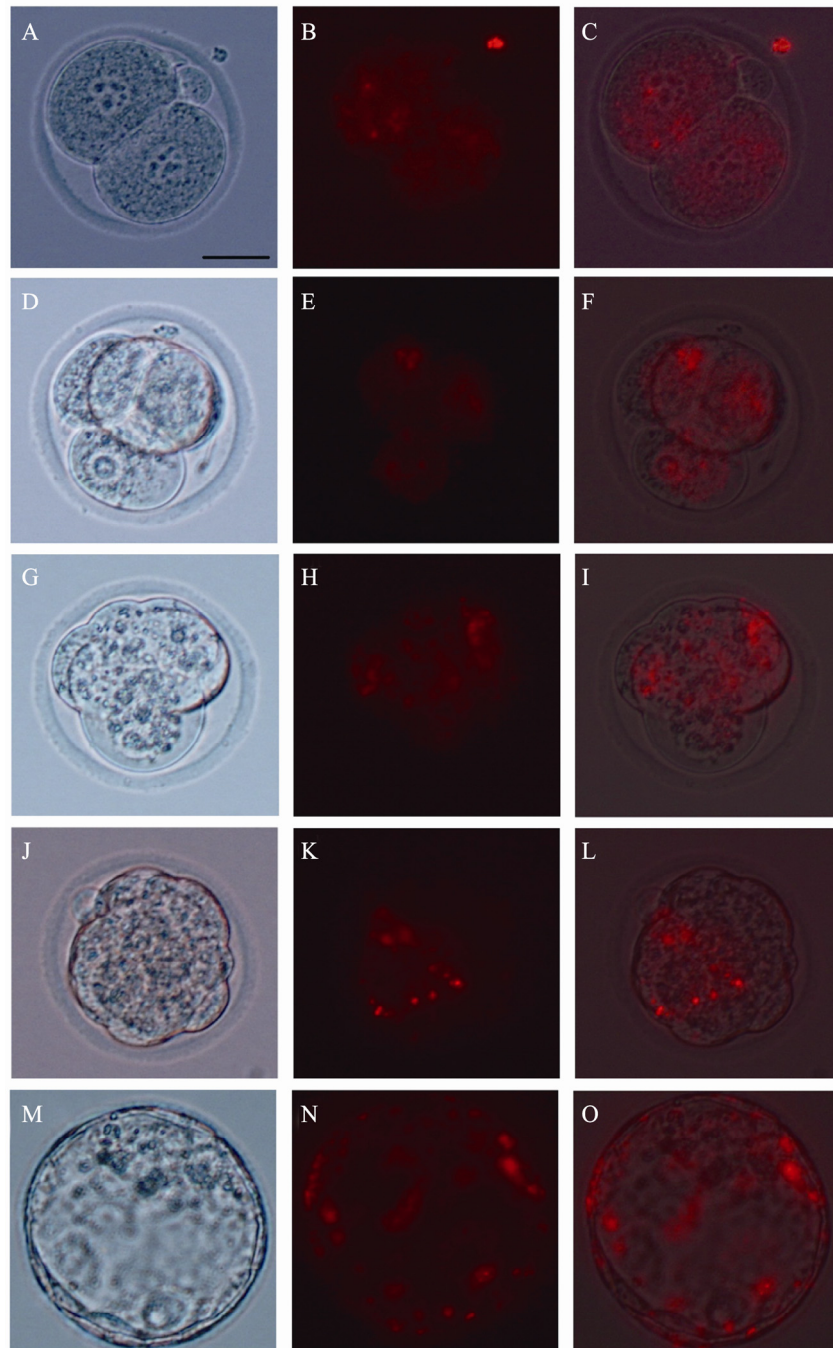


图 2 电穿孔转染小鼠附植前各时期胚胎

Fig. 2 Electroporation of mouse embryos in various stages with Cy3-labeled negative control siRNA. Bar=40 μ m. (A–C) Embryos electroporated at 2-cell stage. (D–F) Embryos electroporated at 4-cell stage. (G–I) Embryos electroporated at 8-cell stage. (J–L) Embryos electroporated at morula stage. (M–O) Embryos electroporated at blastocyst stage.

3 讨论

透明带对于胚胎在体内的正常发育是非常重要的^[14-15]，然而将透明带完整的胚胎，即实验设计中未处理的实验组胚胎直接用于电穿孔时转染效率很低，并且通过荧光显微镜观察发现电穿孔后的胚胎在透明带上具有异常荧光亮点(图 1)，荧光直接反映的是所标记的 siRNA 的位置，因此异常的荧光亮点说明 siRNA 很少能穿透透明带进入胚胎细胞内部，而是在透明带上形成聚集，造成假阳性转染。

尽管去除透明带，即消化 30 s 后的小鼠原核胚在体外培养中也能成功发育到囊胚，但是发育率显著低于透明带完整的胚胎(表 1)。并且去除透明带的胚胎容易黏附于吸卵针管壁内，在清洗和转移过程中极易受到损伤，这也在一定程度上降低了胚胎利用率，增加了实验成本，因此尽管存活胚胎的 Cy3 阳性率即转染率较高(表 1)，但我们依然放弃完全去除透明带的方案。我们采用一方面对透明带进行适度弱化，另一方面提高电穿孔时的电压，优化脉冲时间和脉冲次数。Grabarek 等^[16]在使用电穿孔方法向胚胎导入 dsRNA (double-stranded RNA) 时采用 10 V 电压，然而通过表 2 可以看出 30 V 电压的胚胎存活率相比 10 V 有所降低，但是牺牲的存活率获得的是显著提高的阳性转染率，这使得采用此方法进行 RNA 干扰的实验结果的可信度大为增强。电压再高，则转染后的胚胎存活率会显著降低^[17]，这一点从表 2 中也可以看出。

脉冲时间对转染效率也有较大影响，脉冲时间的延长可以提高阳性转染率，但是脉冲时间过长会导致胚胎局部过热从而对胚胎造成不可恢

复的损伤，同时在瞬时微孔的持续期间所引起的胚胎与电转缓冲液之间的物质交换，也可能造成胚胎内部稳态的破坏，从而导致胚胎存活率下降^[18]。脉冲时间太短则不能使足够的 siRNA 进入胚胎内部^[19]。通过实验可以看出，脉冲时间从 600 μ s 延长至 1 ms 时，阳性转染率逐渐增加。继续延长脉冲时间，转染率提高不显著，但是胚胎存活率开始显著下降(表 3)。

实验证明大多数细胞在脉冲次数为 2~4 次的条件下可以取得较为理想的转染效果。脉冲次数的增加一方面增加穿孔数量，另一方面脉冲次数的增加也提高了脉冲触发电渗透、内吞等运输方式的概率^[20]。实验数据表明(表 4)，对于弱化了透明带的胚胎，在综合考虑转染效率、胚胎存活率和囊胚发育率的情况下，3 次脉冲可以获得较好的转染效果。

我们也测试了几种候选的电转缓冲液。使用 KSOM 培养液直接作为电转缓冲液用于电穿孔时，在两电极间产生大量絮状沉淀，这在很大程度上降低了胚胎对 siRNA 的摄入；使用 PBS 作为电转缓冲液时有少量沉淀，且存活胚胎的囊胚发育率极低，原因可能是胚胎受电击后产生的瞬时微孔使缓冲液组分能直接进入胚胎内，因此使用与细胞质组分差异较大的缓冲液会造成胚胎发育率降低；使用 opti-MEM 作为电转缓冲液时未观察到明显沉淀物生成，且电转后胚胎发育形态良好。

由此我们确定了通过电穿孔方法向小鼠受精卵导入 siRNA 的技术路线，即首先使用台氏液对胚胎透明带进行弱化处理，消化时间为 10 s。进而对透明带弱化后的胚胎进行电转染，电转缓

冲液使用 opti-MEM 并结合 siPORT 转染试剂, 电穿孔参数设定为电压 30 V, 脉冲时间 1 ms, 脉冲次数 3 次。使用此方法又转染了小鼠附植前其他时期胚胎, 包括 2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚和囊胚, 均取得良好效果, 胚胎发育形态也未观察到任何异常。总之, 本研究建立并优化了一种 siRNA 简便、高效转染小鼠附植前胚胎的方法, 为采用由 siRNA 介导的 RNAi 技术研究基因在小鼠附植前胚胎中的功能提供了技术参考。

REFERENCES

- [1] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 2001, 107 (3) : 297–307.
- [2] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001, 293 (5531) : 834–838.
- [3] Chua KY, Ramos JDA, Cheong N. Production of monoclonal antibody by DNA immunization with electroporation. *Methods Mol Biol*, 2008, 423: 509–520.
- [4] Tjelle TE, Rabussay D, Ottensmeier C, et al. Taking electroporation-based delivery of DNA vaccination into humans: a generic clinical protocol. *Methods Mol Biol*, 2008, 423: 497–507.
- [5] Zhao YG, Xu YH. Electroporation-mediated HBV DNA vaccination in primate models. *Methods Mol Biol*, 2008, 423: 487–495.
- [6] Volkov AG, Paula S, Deamer DW. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1997, 42 (2) : 153–160.
- [7] Pliquett UF, Gusbeth CA. Perturbation of human skin due to application of high voltage. *Bioelectrochemistry*, 2000, 51 (1) : 41–51.
- [8] Fei ZZ, Wang SN, Xie YB, et al. Gene transfection of mammalian cells using membrane sandwich electroporation. *Anal Chem*, 2007, 79 (15) : 5719–5722.
- [9] Yao SM, Rana S, Liu DW, et al. Electroporation optimization to deliver plasmid DNA into dental follicle cells. *Biotechnol J*, 2009, 4 (10) : 1488–1496.
- [10] Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 14 (2) : 101–114.
- [11] Osumi N, Inoue T. Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation. *Methods*, 2001, 24 (1) : 35–42.
- [12] Gagné MB, Pothier F, Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1991, 29 (1) : 6–15.
- [13] Lawitts JA, Biggers JD. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fertil*, 1991, 91 (2) : 543–556.
- [14] Bronson RA, McLaren A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J Reprod Fertil*, 1970, 22 (1) : 129–137.
- [15] Modliński JA. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs *in vivo*. *J Embryol Exp Morphol*, 1970, 23 (3) : 539–547.
- [16] Grabarek JB, Plusa B, Glover DM, et al. Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis*, 2002, 32 (4) : 269–276.
- [17] Hui SW. Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency. *Methods Mol Biol*, 1995, 48 (Pt 1) : 29–40.
- [18] Van den Hoff MJ, Christoffels VM, Labruyère WT, et al. Electrotransfection with “intracellular” buffer. *Methods Mol Biol*, 1995, 48 (Pt II) : 185–197.
- [19] Zald PB, Cotter MA, Robertson ES. Strategy for increased efficiency of transfection in human cell lines using radio frequency electroporation. *Prep Biochem Biotechnol*, 2001, 31 (1) : 1–11.
- [20] DeBruin KA, Krassowska W. Modeling electroporation in a single cell. I. effects of field strength and rest potential. *Biophys J*, 1999, 77 (3) : 1213–1224.