

综述

哺乳动物卵母细胞及早期胚胎蛋白质组学研究进展

陈凌声¹, 徐平^{2,3}, 石德顺¹, 李湘萍¹

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室 广西大学, 广西 南宁 530005

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3 国家蛋白质科学中心 (北京), 北京 102206

陈凌声, 徐平, 石德顺, 等. 哺乳动物卵母细胞及早期胚胎蛋白质组学研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1018-1025.

Chen LS, Xu P, Shi DS, et al. Progress in proteomics of mammalian oocyte and early embryo. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1018-1025.

摘要: 雌性生殖细胞发育是动物繁殖的基石, 哺乳动物卵母细胞和早期胚胎在其生长发育过程中有许多独特的现象和规律, 涉及一系列蛋白质合成/降解和磷酸化等状态的动态改变。对卵母细胞分裂、成熟调控机理以及植入前胚胎发育规律的研究是发育生物学领域的一项重要课题。蛋白质组学是以细胞或组织内全部的蛋白质为研究对象, 系统鉴定、定量蛋白质并研究这些蛋白质功能的科学。随着蛋白质分离、鉴定技术的快速发展, 蛋白质组学为卵母细胞发生、分化、成熟以及质量控制等相关研究提供了新的方法和内容, 如在蛋白质定量、修饰、定位和相互作用等方面提供其他组学技术不可获得的重要信息。这些信息将有助于揭示哺乳动物卵母细胞成熟和早期胚胎发育的分子机制, 对于进一步完善卵母细胞的体外成熟培养体系, 提高胚胎体外生产、体细胞克隆和转基因动物生产效率具有重要意义。

关键词: 蛋白质组学, 哺乳动物卵母细胞, 植入前胚胎发育, 生发泡期, 减数分裂

Received: December 27, 2013; **Accepted:** June 10, 2014

Supported by: National Transgenic New Species Breeding Major Project (No. 2010ZX08007-003), Natural Science Foundation Major Project of Guangxi (No. 2012GXNSFCB053002), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20126401110001).

Corresponding author: Xiangping Li. Tel: +86-771-3239202; E-mail: xiangpingli@163.com

Deshun Shi. Tel: +86-771-3239202; E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn

转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2010ZX08007-003), 广西自然科学基金重点项目 (No. 2012GXNSFCB053002), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20126401110001) 资助。

Progress in proteomics of mammalian oocyte and early embryo

Lingsheng Chen¹, Ping Xu^{2,3}, Deshun Shi¹, and Xiangping Li¹

¹ Guangxi University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530005, Guangxi, China

² State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China

³ National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing 102206, China

Abstract: The development of female germ cell is the cornerstone for animal reproduction. Mammalian oocyte and early embryo have many distinct phenomena and mechanisms during their growth and development, involving series dynamic changes of protein synthesis/degradation and phosphorylation. Research on the regulatory mechanism of oocyte division, maturation, and developmental principle of pre-implantation embryo is an important topic in the field of animal developmental biology. Proteomics using all of proteins expressed by a cell or tissue as research object, systematically identify, quantify and study the function of all these proteins. With the rapid development of protein separation and identification technology, proteomics provide some new methods and the research contents on fields of oogenesis, differentiation, maturation and quality control, such as protein quantification, modification, location and interaction important information which other omics technology can not provide. These information will contribute to uncover the molecular mechanisms of mammalian oocyte maturation and embryonic development. And it is great significant for improving the culture system of oocyte *in vitro* maturation, the efficiency of embryo production *in vitro*, somatic cell clone and transgenic animal production.

Keywords: proteomics, mammalian oocyte, pre-implantation embryo development, germinal vesicle stage, meiosis

哺乳动物卵母细胞是一种高度特化的生殖细胞,具有重构精子 DNA 并启动早期胚胎发育的能力。大多数哺乳动物的卵母细胞在发育过程中会自然停滞在第一次减数分裂前期的核网期。这个时期的卵母细胞细胞核明显,又被称为生发泡 (Germinal vesicle, GV)。当受到特殊信号的调控,如激素或从卵泡环境中被释放出来,卵母细胞可恢复减数分裂,生发泡破裂 (Germinal vesicle breakdown, GVBD),染色体凝集,第一次减数分裂中期 (Metaphase I, M I) 纺锤体形成,第一极体排出并完成第一次减数分裂。随后,卵母细胞停滞在第二次减数分裂中期 (Metaphase II, M II),受精后完成第二次

减数分裂,完全成熟并排出第二极体,形成受精卵^[1-2]。

哺乳动物卵母细胞在 GVBD 后,转录活性快速下降,直至胚胎基因组激活,转录才重新恢复。因此,卵母细胞完成减数分裂成熟以及维持早期胚胎发育依赖于卵子在生长过程中合成并储存的大量母源性 mRNA 和蛋白质等^[3]。尽管对小鼠等哺乳动物卵母细胞成熟过程已有一些认识,但对其中具体的分子调控机理尚不完全清楚。以往人们对哺乳动物卵母细胞成熟及早期胚胎发育机制的研究大多是从基因组、转录组水平或以单个蛋白质功能来进行的。实验证明,卵母细胞中 mRNA 丰度与蛋白质表达

量的线性相关性并不一致,尤其对于低丰度蛋白质,相关性更差^[4]。此外,蛋白质作为生命功能的执行者,存在多种不同亚型、复杂的翻译后修饰、蛋白质间相互作用等特点。因此,从蛋白质整体表达水平对卵子发生和早期胚胎发育进行研究,有助于进一步理解哺乳动物生殖细胞的发育成熟机理及生殖疾病发生机制。

1995年,澳大利亚学者 Wilkins 等将一个细胞、组织或生物体基因组表达的全部蛋白质总称为蛋白质组 (Proteome)^[5]。蛋白质组学 (Proteomics) 旨在大规模研究蛋白质的特征、结构、功能、翻译后修饰的状态、蛋白质与蛋白质之间的相互作用等,由此在蛋白质水平上阐述细胞独有的特点、动态的变化以及关于疾病发生等过程^[6]。

目前,蛋白质组学研究主要采用双向凝胶电泳 (2-DE) 技术结合质谱鉴定和基于液相色谱和质谱联用 (LC-MS/MS) 的鸟枪法等两种方式进行。二维凝胶电泳根据蛋白质等电点和相对分子量大小将样品中的蛋白质混合物分开。双向凝胶电泳操作过程相对繁琐,对样品需要量相对较大。大量研究表明,2-DE/MS 并不能覆盖全部蛋白质,2-DE 上的一个点可能含有许多种蛋白质,而同一个蛋白质又可能分布在多个点,因此难以用于定性和定量研究。基于多维液相色谱-串联质谱分析复合肽段混合物的技术方法 (Multidimensional protein identification technology, MudPIT) 对样品中高丰度和低丰度蛋白、极疏水的、极大分子量的蛋白的鉴定均无偏向性^[7],已发展成为鸟枪法蛋白质组学研究常用方法之一^[8-9]。此外,基于一维凝胶电泳和 LC-MS 的 GeLC-MS 也得到了发展和广泛地应用,该方法操作简便,对不同特

性的蛋白质的偏性较小,特别是难鉴定的膜蛋白和碱性蛋白^[10]。

1 哺乳动物卵母细胞发育过程中的蛋白质组学研究

早在 1977 年, Schultz 等应用放射性同位素 ³⁵S 标记结合 1-DE 和 2-DE 方法研究小鼠卵母细胞发育过程中的蛋白质表达变化^[11],发现在卵子生发泡破裂 (GVBD) 后蛋白质发生明显表达变化,且和卵母细胞发育的其他形态学,如纺锤体形成或极体排出无必然联系。不同的蛋白质具有不同的合成效率,卵子胞质和核质的融合触发许多蛋白质合成的变化,并促使小鼠卵母细胞在体外培养条件下完成减数分裂成熟。Coenen 等运用放射性同位素 ³⁵S 标记结合 2-DE 技术研究了体外成熟条件下牛卵母细胞蛋白质的合成模式^[12]。研究发现,体外成熟过程中,牛卵母细胞蛋白质的合成分为 3 个阶段:成熟初期 (0-4 h)、GVBD 向 M I 期转变期 (4-16 h) 以及 M I 期结束后 (16-28 h)。其中,成熟初期合成的蛋白质有 15% 贯穿整个卵子成熟过程。卵子在减数分裂成熟过程中的第 4-8 h 期间具有较高的蛋白质合成数量,并一直维持到 M I 期 (8-12 h),随后蛋白质合成逐步下降直至保持稳定。该结果与 Kastrop^[13]、Gandolfi 等^[14]的报道基本一致。

质谱与生物技术的有机结合开创了质谱应用的新领域,生物质谱现已广泛地被应用于蛋白质鉴定或共价结构的分析,成为蛋白质组学研究中的重要工具。自 2004 年以来,陆续开始有应用基于质谱鉴定的蛋白质组学技术对哺乳动物卵母细胞蛋白质组学的深入研究,相关工作主要集中在不同发育阶段卵子蛋白质表达

谱、蛋白质磷酸化修饰的鉴定以及母源性蛋白质的鉴定等方面。

2004年, Ellederova 等应用 2-DE 结合基质辅助激光解吸电离质谱技术对不同发育阶段的猪卵母细胞蛋白质组进行研究^[2]。发现抗氧化蛋白、泛素硫酯酶 L1 以及精胺合成酶等蛋白质在猪卵子成熟过程中始终保持较高的蛋白质丰度。其中抗氧化蛋白在维持细胞内氧化还原反应平衡、抗氧化方面发挥重要作用。此外, 他们还鉴定到一批与能量代谢相关的蛋白质, 表明卵母细胞在为后续的受精过程所需的能量代谢做充分的准备。值得注意的是, 属于醛脱氢酶家族的蛋白 D7A1 在 M I 期和 M 期卵子中的表达水平显著高于 GV 期卵子。研究表明该酶具有抗毒性作用, 在人的卵巢中也呈现较高的丰度。

2007年, Vitale 等运用 2-DE 结合质谱鉴定的蛋白质组学方法研究不同时期小鼠卵母细胞的差异蛋白质^[15], 发现在 GV 期和 M 期卵母细胞中, 共有 12 种蛋白质存在表达差异。同年, Susor 等应用蛋白质组学手段比较体外培养条件下猪卵母细胞蛋白质合成的变化^[16], 发现 16 个蛋白质点在成熟过程中表达存在显著差异, 其中 4 个蛋白质表达上调, 大部分蛋白质的表达均呈现下调趋势。质谱鉴定还发现泛素羧基端水解酶 L1 (UCH-L1) 在 M 期卵母细胞中表达显著上调。作者认为, 该酶可能通过调控泛素依赖的蛋白酶体机制在减数分裂 向后期转变过程中发挥重要作用。2011年, Kim 等通过比较蛋白质组学方法研究不同发育时期 (GV 期和 M 期) 猪卵母细胞差异表达蛋白质, 共发现 16 种蛋白质表达上调, 12 种蛋白质表达下调。其中 PRDX2、GST 和 SPSY 等在内的 7 种可能

参与氧化还原调节和 c-AMP 信号通路的蛋白质在 M 期卵母细胞中表达上调^[17]。这和 Ellederova 的研究结果基本一致。

已有研究表明, 卵母细胞中蛋白质的活性受特异的激酶和磷酸酶调节, 进而调控细胞生长、分化、细胞周期和减数分裂等过程。为了研究体外培养条件下卵母细胞蛋白质组和磷酸化蛋白质组的变化模式, 2006年, Massicotte 等通过 2-DE 结合 MALDI-TOF-MS 蛋白质组学技术对牛卵母细胞进行研究^[18]。他们共鉴定到 550 个蛋白质点, 且发现卵子成熟过程中有 30%~50% 的蛋白质发生了磷酸化修饰。微管蛋白 β 链 (TBB)、细胞周期蛋白 E2 (CCNE2)、蛋白二硫化物异构酶 (PAID3) 和硫氧还蛋白过氧化物酶 (PDX2) 等 4 个蛋白质在体外培养过程中表达显著变化。其中, CCNE2 表达下降, 而 PDX2 磷酸化后失活。这些变化可引起细胞内过氧化物水平的改变, 其介导的信号是减数分裂成功的重要原因。作者认为 CCNE2 和 PDX2 可作为卵子减数分裂成熟的分子标志物。

GVBD 标志着卵子第一次减数分裂的恢复。卵丘颗粒细胞通过与卵母细胞之间形成的大量缝隙连接为卵母细胞发育、成熟提供所需的营养物质, 传递内分泌及其他环境信号^[19]。因此, 卵丘颗粒细胞对卵母细胞发育成熟至关重要。为了研究卵子和卵丘细胞间相互作用因子及其作用机制, Memili 等应用液相色谱-串联质谱技术 (LC-MS/MS) 研究牛 GV 期卵母细胞和卵丘颗粒细胞的蛋白质组^[20]。在卵丘颗粒细胞和 GV 期卵母细胞中分别鉴定到 4 395 和 1 092 种蛋白质, 其中 858 种为共同鉴定的蛋白质。这些蛋白质参与包括细胞间信号转导和相互作用有关的膜蛋白、核蛋白等。该研究第一

次全面剖析了牛卵母细胞和卵丘颗粒细胞蛋白质组,也首次验证了 5 360 个假设蛋白。随后作者应用差异洗涤分馏结合多维色谱-串联质谱联用 (Differential detergent fractionation-multidimensional protein identification technology, DDF-Mud PIT) 技术对牛 GV 期细胞和颗粒细胞蛋白质组进行研究,分别鉴定到 811 和 1 247 个蛋白,其中 371 个蛋白质表达差异显著。GO 分析发现,卵丘颗粒细胞中的蛋白质主要参与细胞信号传导、分子运输、代谢和能量前体生成等多个过程。该研究证实卵母细胞需要颗粒细胞传递特异的细胞内信号,以维持其生长和成熟^[21]。

2008 年, Ma 等运用 2-DE 等技术构建了小鼠 MII 期卵母细胞蛋白质表达图谱,共分离得到 869 个蛋白质点,其中 90 个蛋白质点对应于 53 个蛋白质表现为磷酸化修饰。这些蛋白质主要参与染色体重构、母源性物质储存以及卵裂球分裂等过程^[22]。这些研究不仅为阐明复杂的卵子成熟调控机理提供了新的信息,还发现了一些可能的诱导重编程及多能性因子,为提高体细胞核移植技术 (SCNT) 和诱导多能性干细胞 (iPS) 效率、促进再生医学研究创造了条件。

成熟卵母细胞中含有受精、胚胎基因组激活和早期胚胎发育所需的大量母源性蛋白质。但对这些发挥重要功能的母源性蛋白的数量、种类及其功能了解甚少。有研究发现小鼠的母源性效应基因/蛋白质约 30 种,实际有待鉴定的因子可能会更多^[23]。2009 年,张平等通过 1-DE 与反相高效液相色谱-串联质谱技术 (RP-LC-MS/MS) 从 2 700 个小鼠 MII 期卵母细胞中鉴定了 625 种蛋白质,并从中筛选到 76 个在卵子和受精卵中具有高 mRNA 表达水平的母源

性蛋白质,包括许多从未被报道过的蛋白质^[24]。与已发布的小鼠胚胎干细胞蛋白质组相比较,两者共同鉴定的蛋白质有 371 个。该研究为深入了解哺乳动物母源性蛋白质参与卵子发生、受精、早期胚胎发育等过程提供了重要的信息。

众所周知,成熟卵母细胞和未分化的胚胎干细胞中含有重编程因子(包括蛋白质、RNA、小分子等)。这些分子具有重编程体细胞的能力^[25-27]。虽然 SCNT 和 iPS 技术极大地促进了动物生殖生理学的研究,但对细胞重编程的分子机制目前尚不清楚。2010 年, Wang 等应用 LC-MS/MS 技术研究了不同发育阶段小鼠卵母细胞蛋白质组,分别在 GV 期、MII 期卵母细胞和受精卵中鉴定到 2 781、2 973 和 2 082 种蛋白质。研究表明,不同的蛋白质的组成成分与不同时期细胞的特点有一定关系。如 M 期卵母细胞比其他时期的细胞含更多的特异性转录因子和染色质重构因子,表明这些蛋白质可能与精子或体细胞表观遗传重编程有密切关系^[28]。2011 年, Pfeiffer 等通过 1-DE 结合 LC-MS/MS 技术研究小鼠 M 期卵母细胞和未分化 ES 细胞蛋白质组,提出重编程因子应具备核定位、核染色质修饰以及催化活性等 3 个特点。他们分别在 M 期卵母细胞和 ES 细胞中鉴定到 3 699 和 4 723 个蛋白质,其中 28 个共同鉴定的蛋白质符合作者提出的上述重编程因子的特点^[29]。

2 哺乳动物早期胚胎发育相关的蛋白质组学研究

由于胚胎细胞样品非常有限,样品收集不易,到目前为止,有关动物早期胚胎的蛋白质组研究报告还不多。早在 1989 年,就有牛早期

胚胎样品蛋白质的研究, 尽管没有蛋白质鉴定的结果, 但该研究极大地影响了人们对牛胚胎发育生物学的认识。Frei 等运用 ^{35}S -蛋白酸标记结合 1-DE 技术研究牛卵母细胞及早期胚胎的蛋白质组, 发现卵母细胞、合子、2-细胞和 4-细胞期胚胎的蛋白质表达模式稍有不同, 并与 8-16 细胞期胚胎的蛋白质表达相比有显著不同, 而 16-32 期细胞和囊胚具有相似的蛋白质表达模式。此外, 作者还运用 ^3H -尿苷标记不同发育时期的牛胚胎, 以检测 RNA 合成速率。结果显示, 8-细胞期以前胚胎的蛋白质合成受母源性 mRNA 调控, 8-16 细胞期间改变为合子基因组调控。这个现象被其他研究证实, 即牛合子基因组激活时间发生在 8-16 细胞期之间^[30]。

2006 年, Massicotte 等应用放射性同位素 ^{35}S 结合 2-DE 技术研究体外成熟 2-、4-和 8-细胞期的牛胚胎蛋白表达模式、确定了母源性蛋白质 (Maternal housekeeping proteins, MHKP)^[31] 的概念。他们从以上样品中分别鉴定到 291、373 和 252 个蛋白质, 其中 70、83 和 28 个蛋白质分别特异地存在于 3 个时期的胚胎中; 123 个蛋白质存在于所有的 3 个时期中, 被认为是候选母源性蛋白质 (MHKP)。利用 MALDI-TOF-MS 技术鉴定到 10 个蛋白质, 发现其中的大部分蛋白质在卵子或卵巢中已有报道, 但 E-FABP 蛋白为新候选 MHKP, 且该蛋白在卵母细胞中是首次被报道。该研究展示了母源-胚胎转变 (Maternal-embryonic transition, MET) 过程中蛋白质表达的变化情况, 同时筛选出一些候选的 MHKP, 有助于进一步揭示 MET 的分子机制。

2009 年, Gupta 等通过半定量质谱方法分析比较猪孤雌激活 (Parthenogenetically activated, PA) 和体外授精 (*In vitro* fertility, IVF)

胚胎的蛋白质组^[32]。结果显示, IVF 和 PA 胚胎共有的鉴定蛋白质 377 个。以谱图数 (Spectral count) 进行相对定量, 发现 90% 的蛋白质的差异丰度比值 >2 , 其中 410 个蛋白丰度比值 >10 , 表明孤雌激活和正常的体外授精在分子事件上存在巨大的差异。利用选择性反应监测 (Selected reaction monitoring, SRM) 实验, 他们还验证了包括 JAK2、STAT1、STAT2 和钙蛋白酶抑制蛋白等在内的 9 个蛋白丰度变化情况。该研究不仅发现了反映胚胎质量的可能标志分子, 还揭示了在猪孤雌激活 (PA) 的胚胎中基因组印迹、蛋白质表达异常可能是引起胚胎发育停止的原因。2012 年, Myriam 等应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术研究不同发育阶段牛胚胎的差异蛋白质^[10]以筛选差异表达蛋白质, 鉴定与胚胎成熟质量相关的候选蛋白质。结果发现, 2-细胞胚胎和桑椹胚有 28 个蛋白质的表达有差异。应用 SRM 技术, 他们还验证了其中的 YBX2 蛋白和 IGF2 mRNA 结合蛋白 3 等在 2-细胞胚胎和桑椹胚中存在丰度差异。定量比较桑椹胚和囊胚的蛋白质组, 发现与翻译和生物合成过程有关的一系列蛋白质在这两个时期胚胎中具有显著差异。这是 iTRAQ 定量蛋白质组学技术首次应用于牛卵母细胞和早期胚胎发育的蛋白质组研究中, 研究结果为阐明细胞命运决定以及胚胎基因组激活的分子机制提供了新的线索。

3 挑战与展望

哺乳动物卵母细胞是繁殖生物学研究的主要对象, 其在动物生殖生理学研究具有举足轻重的作用。多年来, 国内外学者从多个层面及角度对哺乳动物卵母细胞及早期胚胎发育的分子机制进行了大量的研究, 包括重要基因及

蛋白质功能组、基因组和转录组水平等方面, 有关研究也取得了一定的成果。然而, 对卵母细胞成熟及其调控的具体分子机制、特别是重要蛋白质间的网络化调控关系仍不是完全清楚, 仍需要发掘与细胞成熟相关的标志性分子。

蛋白质组学的研究策略及其新技术和方法逐步在哺乳动物卵母细胞研究中得到应用, 并取得了一定进展, 但仍面临着不少挑战。首先, 相对于其他细胞或组织样品, 卵母细胞及胚胎细胞样品来源有限, 样品收集较困难且费时较长。这个矛盾在大家畜动物胚胎样品收集时显得尤为突出, 也使得开展相关物种的蛋白质组学的研究受到限制。其次, 目前许多物种仍缺乏相应的蛋白质数据库, 这对开展这些物种的蛋白质组学研究时进行蛋白质搜库检索带来困难。第三, 哺乳动物卵母细胞蛋白质丰度动态变化范围较大, 其表达易受饲养环境、季节及成熟培养条件等因素影响; 其中大量的低丰度蛋白质易被高丰度蛋白质干扰, 给蛋白质检测鉴定带来困难。

随着蛋白质组学技术的不断发展以及科学家们对蛋白质组学的理解的加深, 可实现微量甚至单细胞的蛋白质组鉴定。将有关新技术、新方法应用于研究发现哺乳动物卵母细胞成熟及早期胚胎发育相关蛋白质, 可系统鉴定更多的新蛋白质, 为后续深入研究重要蛋白质的生物学功能奠定基础。此外, 运用差异蛋白质组学的技术比较不同发育阶段或体内、外成熟的卵母细胞蛋白质的表达变化, 筛选与卵母细胞发育成熟相关的标志性蛋白质, 将有助于进一步揭示哺乳动物卵母细胞成熟、受精和早期胚胎发育分子机制, 为提高体外卵母细胞成熟和胚胎发育效率、细胞核移植和胚胎干细胞技术、

人类辅助生殖技术等研究提供有力的理论依据。

REFERENCES

- [1] Motlík J, Pavlok A, Lapathitis G, et al. Impact of two-step *in vitro* culture systems on developmental potency of oocytes. *Reprod Dom Anim*, 2000, 35(6): 267–271.
- [2] Ellederova Z, Halada P, Man P, et al. Protein patterns of pig oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1533–1539.
- [3] Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development*, 2010, 137(6): 859–870.
- [4] Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cellular Biol*, 1999, 19(3): 1720–1730.
- [5] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(1): 61–65.
- [6] Tyers MMann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422(6928): 193–197.
- [7] Delahunty CM, Yates JR 3rd. MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 563, 565, 567 passim.
- [8] Link AJ, Carmack E, Yates Iii JR. A strategy for the identification of proteins localized to subcellular spaces: application to *E. coli* periplasmic proteins. *Int J Mass Spectrometry Ion Proc*, 1997, 160(1/3): 303–316.
- [9] Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 242–247.
- [10] Myriam D. Qualitative and Quantitative Proteome Analyses of Bovine Oocytes and Early Embryos. Germany: LMU München, 2012.
- [11] Schultz RM, Wassarman PM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci*, 1977, 24: 167–194.

- [12] Coenen K, Massicotte L, Sirard MA. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation *in vitro* using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reproduction Dev*, 2004, 67(3): 313–322.
- [13] Kastrop PMM, Bevers MM, Destrée OHJ, et al. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1990, 26(3): 222–226.
- [14] Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, et al. Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49(2): 168–175.
- [15] Vitale AM, Calvert ME, Mallavarapu M, et al. Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(5): 608–616.
- [16] Susor A, Ellederova Z, Jelinkova L, et al. Proteomic analysis of porcine oocytes during *in vitro* maturation reveals essential role for the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1. *Reproduction*, 2007, 134(4): 559–568.
- [17] Kim J, Kim JS, Jeon YJ, et al. Identification of maturation and protein synthesis related proteins from porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Proteome Sci*, 2011, 9: 28.
- [18] Massicotte L, Coenen K, Mourot M, et al. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics*, 2006, 6(13): 3811–3820.
- [19] Zhao XM, Ren JJ, Du WH, et al. Effect of mouse cumulus cells on the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine denuded germinal vesicle oocytes. *Zygote*, 2013: 1–8.
- [20] Memili E, Peddinti D, Shack LA, et al. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*, 2007, 133(6): 1107–1120.
- [21] Peddinti D, Memili E, Burgess SC. Proteomics-based systems biology modeling of bovine germinal vesicle stage oocyte and cumulus cell interaction. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11240.
- [22] Ma M, Guo X, Wang F, et al. Protein expression profile of the mouse metaphase-II oocyte. *J Proteome Res*, 2008, 7(11): 4821–4830.
- [23] Zhang P. Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2010 (in Chinese).
张平. 小鼠 MII 期卵母细胞蛋白质组学研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2010.
- [24] Zhang P, Ni X, Guo Y, et al. Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics*, 2009, 10: 348.
- [25] Han DW, Do JT, Gentile L, et al. Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 445–454.
- [26] Hanna J, Saha K, Pando B, et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 2009, 462(7273): 595–601.
- [27] Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, et al. Impeding xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*, 2010, 330(6003): 496–499.
- [28] Wang S, Kou Z, Jing Z, et al. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2010, 107(41): 17639–17644.
- [29] Pfeiffer MJ, Siatkowski M, Paudel Y, et al. Proteomic analysis of mouse oocytes reveals 28 candidate factors of the "reprogrammome". *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2140–2153.
- [30] Frei RE, Schultz GA, Church RB. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fert*, 1989, 86(2): 637–641.
- [31] Massicotte L, Coenen K, Mourot M, et al. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics*, 2006, 6(13): 3811–3820.
- [32] Gupta MK, Jang JM, Jung JW, et al. Proteomic analysis of parthenogenetic and *in vitro* fertilized porcine embryos. *Proteomics*, 2009, 9(10): 2846–2860.

(本文责编 郝丽芳)