

重组肉毒神经毒素 A 轻链 (BoNT/A LC) 突变体的构建、表达与活性分析

宋孚洋¹, 马臣杰¹, 高 珊², 康 琳², 王玉炯¹, 王景林^{2*}

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 中国宁夏回族自治区 银川 750021;

2. 军事医学科学院 微生物流行病学研究所 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 中国北京 100071)

摘 要: A 型肉毒神经毒素的轻链(BoNT/A LC)是一种锌依赖性的金属内肽酶. 通过 X 射线分析其结构并结合一些文献报道表明, 轻链上的 Arg362 和 Tyr365 直接参与了酶的催化作用, 而 Glu350 则处于其活性位点的中心位置. 采用定点突变技术, 对编码这 3 个关键性的氨基酸位点的碱基进行突变(Arg362Ala、Tyr365Phe、Glu350Ala), 获得了 BoNT/A LC 突变体. 突变体蛋白与 BoNT/A 的底物蛋白 SNAP-25 进行切割反应, 结果表明, 未经突变的 BoNT/A 轻链蛋白能够特异性地识别 SNAP-25 蛋白上的 Q197-R198 位点, 而突变体蛋白则完全无法识别该位点, 不具有金属内肽酶活性, 成功地去除了肉毒神经毒素的毒力, 为下一步的全长肉毒神经毒素重组疫苗的研究打下了基础.

关键词: 肉毒神经毒素; 轻链; 突变

中图分类号: R996.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)03-0263-05

Construction, Expression and Analysis of the Activity of Mutation of Recombinant Light Chain of Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A LC)

SONG Fu-yang¹, MA Chen-jie¹, GAO Shan², KANG Lin², WANG Yu-jiong¹, WANG Jing-lin^{2*}

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia Hui Autonomous Region, China;

2. The State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract: The light chain of botulinum neurotoxin is the catalytic domain as zinc dependent metalloprotease. By X ray analyze its structure and some literature reports suggested that, Arg362 and Tyr365 of BoNT/A light chain may be directly involved in catalysis, Glu350 apparently occupies a central position in the active site. Site directed mutagenesis have been used to change these amino acids (Arg362Ala, Tyr365Phe, Glu350Ala), then the mutation of the BoNT/A light chain was gotten. When the SNAP-25 was mixed with BoNT/A Lc, the reaction result between the enzyme and substrate showed that BoNT/A Lc can cleave its substrate at Q197-R198, but the BoNT/A LC mutant has no enzymatic activity. It certificates that the toxicity of BoNT/A was removed successfully, and can be considered as foundation of studying recombinant holotoxoid vaccine against Botulism serotype A.

Key words: botulinum neurotoxin(BoNT); light chain; mutation

(Life Science Research, 2011, 15(3): 263~267)

收稿日期: 2011-04-07; 修回日期: 2011-05-13

基金项目: 病原微生物生物安全国家重点实验室资助课题(PBS2009B-05)

作者简介: 宋孚洋(1985-), 男, 宁夏银川人, 硕士研究生, 主要从事微生物与基因工程研究; *通讯作者: 王景林(1964-), 男, 吉林白城人, 北京军事医学科学院研究员, 博士生导师, 主要从事病原微生物的检测与免疫防治研究, Tel: 010-66948531, E-mail: wangjl6481@hotmail.com.

肉毒神经毒素(Botulinum neurotoxin, BoNT)是世界上已知毒性最强的物质之一,由肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)在厌氧条件下产生,共有7种血清型(A~G).其中,A型BoNT毒性最强,人的半数致死量LD₅₀仅为0.1~1 ng/kg^[1].尽管肉毒中毒并非一个常见的疾病,但肉毒中毒的致死率高、中毒后需要进行长时间综合的医学治疗等.特别是BoNT一直以来都被国际社会认为是最具危险性的生物恐怖剂之一,也是重要的生物毒素战剂^[2].近年来,我国的新疆、西藏和甘肃等西部地区时有肉毒中毒发生,因此,对BoNT疫苗的研究具有十分重要的意义.

BoNT/A在结构上分为两部分:轻链(LC,50 kD)为活性结构域,具有锌依赖性金属内肽酶活性,是毒素的毒性部分,BoNT/A的底物是SNAP-25,LC可以识别SNAP-25上的Q197-R198位点,从而对其进行特异性的切割,最终引起中毒反应.重链(HC,100 kD)的主要作用是神经细胞膜上相应受体结合、在内体膜上形成离子通道并辅助LC转位,包含两个结构域——转位结构域(H_N)和结合结构域(H_C),H_C又可分为H_{C1}和H_{C2}两部分^[3].要制备出性能优越的BoNT疫苗,首先要保证其安全性,即如何去除BoNT的毒力.其次要保证其具有良好的抗原性.国内外的许多学者都对BoNT疫苗进行了研究,但往往是安全性很好,但疫苗的抗原性不好,或者是疫苗抗原性较好,但制备过程中存在很大的危险因素^[4-8].针对此问题,我们决定采取对BoNT/A轻链酶活性中心关键的氨基酸位点定点突变的方法,以去除其金属蛋白酶的活性,有效地保证了疫苗的安全性,从而为后期全长、无毒的重组BoNT/A疫苗的制备打下基础.

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

A型肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)62A为本室保存的国际标准株(GenBank登录号:M30196.1);*E.coli*宿主菌,BL21(DE3)购自Takara公司;原核表达载体pET32a和用于表达A型肉毒毒素作用底物SNAP-25的质粒pET22b-SNAP质粒为本室保存.

1.2 工具酶和主要试剂

T₄DNA连接酶,限制性内切酶*Bam*H I、*Xho* I购自美国NEB公司;质粒提取试剂盒、凝胶回收

试剂盒及IPTG购自Promega公司;PMD-18T载体、rTaqDNA聚合酶购自Takara公司;抗BoNT/A马血清购自卫生部兰州生物制品所;HRP标记的羊抗马IgG购自Santa公司.QuikChange Lighting定点突变试剂盒购自STRATAGENE公司.

1.3 BoNT/A LC基因的PCR扩增

根据GenBank中的BoNT/A轻链基因序列,设计一对上下游引物:5'-CGggtaccCAATTTGTTAATAACAATT和5'-GTAAActcgagTGCCTTATTGTATCCTTT,分别引入*Bam*H I、*Xho* I酶切位点,引物由Invitrogen公司合成.以A型肉毒梭菌基因组为模板进行PCR扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳,以TaKaRa公司的DL2000Marker确定其大小.

1.4 原核表达载体pET32a-LC及其突变体的构建与鉴定

将纯化的PCR产物连接T载体,转化*E.coli* DH5a,PCR鉴定的阳性重组质粒用*Bam*H I和*Xho* I双酶切,回收BoNT/A-LC片段,使用T₄DNA连接酶与经同样用双酶切处理的pET32a载体进行连接,构建出原核表达载体pET32a-LC.以pET32a-LC为模板,使用STRATAGENE公司的定点突变试剂盒对轻链上编码影响酶活力的关键性氨基酸位点的碱基进行突变(Glu350Ala、Arg362Ala、Tyr365Phe),以去除其与底物作用的能力,新获得质粒命名为pET32a-mLC.将该质粒转化DH5a感受态,挑选阳性菌落送交Invitrogen公司进行测序鉴定.

1.5 重组BoNT/A轻链蛋白及其轻链突变体蛋白的诱导表达

将鉴定正确的重组质粒转化表达菌株*E.coli* BL21,挑选阳性菌落接种于含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB培养基中,37℃过夜培养,1:100接种于LB培养基中,37℃振荡培养至OD₆₀₀为0.6左右,加入IPTG至终浓度1 mmol/L,25℃继续培养过夜,4℃、6 000 r/min离心20 min收集菌体.重悬菌体后,放置冰上超声破碎30 min,4℃、10 000 r/min离心20 min,分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳,分析目的蛋白.

1.6 蛋白纯化

菌体沉淀重悬于镍柱上样缓冲液(0.02 mol/L Na₃PO₄、0.5 mol/L NaCl、0.04 mol/L C₃H₄N₂,pH 7.4),超声后取上清使用镍柱上样,用洗脱缓冲液(0.02 mol/L Na₃PO₄、0.5 mol/L NaCl、0.4 mol/L

C₃H₄N₂, pH 7.4) 洗脱. SDS-PAGE 电泳分析经镍柱纯化的重组 BoNT/A 轻链和其轻链突变体蛋白.

1.7 Western 印迹鉴定

纯化的重组 BoNT/A 轻链蛋白及其轻链突变体蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 使用转移缓冲液转移 1.5 h, 将胶中蛋白通过微型半干电泳转移仪(美国 EC 公司)转移至硝酸纤维素膜上, 以 WB-B 液封闭 1 h, WB-D 液洗膜 3 次后, 以抗 BoNT/A 全毒素的马血清(1:500)为一抗, HRP 标记的羊抗马 IgG(1:2 000)为二抗, 加 DAB 显色液进行 Western 印迹检测. 待出现特异性显色区带后, 用 2 mol/L 硫酸终止反应, 以去离子水洗膜并干燥, 避光保存.

1.8 蛋白活力的检测

用梯度剂量的重组 BoNT/A LC 蛋白、BoNT/A mLC 蛋白加入等量的重组 SNAP-25 蛋白, 对轻链及其轻链突变体蛋白的活性进行 SDS-PAGE 检测(表 1).

表 1 切割反应的体系
Table 1 The system of cleave reaction

Protein	System of reaction/ μ L					
SNAP-25	30	30	30	30	30	0
LC	0	5	10	15	20	25
mLC	0	25	30	35	40	45

2 结果

2.1 PCR 扩增 BoNT/A 轻链基因及其突变体基因的序列分析

利用 PCR 从 A 型肉毒梭菌菌体中扩增到一条目的基因片段, 与预期 1 364 bp 的 BoNT/A 轻链基因大小一致, 并以其为模板获得一条新的突变体基因(图 1).

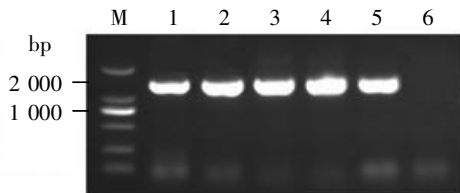


图 1 BoNT/A 轻链及其突变体基因 PCR 扩增结果
M: 分子标准带; 1: 阳性对照 BoNT/A LC 基因; 2, 3: BoNT/A 轻链基因; 4, 5: BoNT/A 轻链突变体基因; 6: 阴性对照.

Fig.1 The amplification of BoNT/A LC and BoNT/A mLC

M: Marker; 1: Positive contrast; 2, 3: BoNT/A LC amplification; 4, 5: BoNT/A mLC amplification; 6: Negative contrast.

2.2 BoNT/A 轻链及其轻链突变体表达载体的构建与鉴定

PCR 产物在 T₄ DNA 连接酶作用下克隆到 pMD-18T 载体中, 转化 E.coli DH5a 后挑选阳性克隆, 测序正确的 DNA 片段经 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定, 获得大小为 1 364 bp 的目的条带, 表明目的基因已经插入到载体中(图 2).

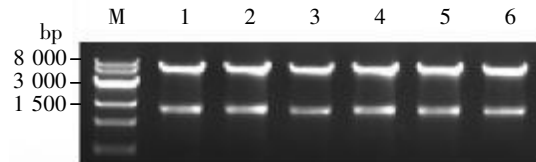


图 2 质粒的双酶切验证

M: 分子标准带; 1~3: pET32a-LC 质粒; 4~6: pET32a-mLC 质粒.

Fig.2 The digested vector pET32a-LC and pET32a-mLC

M: Marker; 1~3: The vector pET32a-LC; 4~6: The vector pET32a-mLC.

2.3 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将鉴定正确的 pET32a-LC 和 pET32a-mLC 质粒转化表达菌株 E.coli BL21(DE3)中, 经 1mmol/L IPTG 于 25 °C, 120 r/min 培养过夜后, 通过超声破碎和 SDS-PAGE 电泳分析, 发现目的蛋白在上清和沉淀中均有分布, 相对分子质量大小约为 60×10³ kD, 与推测的重组蛋白大小相符(图 3).

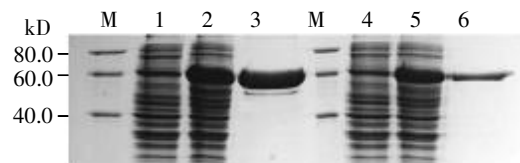


图 3 蛋白质表达纯化结果

M: 蛋白标准带; 1: 诱导前的 LC 蛋白; 2: 诱导后的 LC 蛋白; 3: 纯化后的 LC 蛋白; 4: 诱导前的 mLC 蛋白; 5: 诱导后的 mLC 蛋白; 6: 纯化后的 mLC 蛋白.

Fig.3 Expression and purification of the protein

M: Marker; 1: LC before induced; 2: LC after induced; 3: LC expression product after purification; 4: mLC before induced; 5: mLC after induced; 6: mLC expression product after purification.

2.4 蛋白的纯化

以镍柱纯化重组 BoNT/A 轻链和轻链突变体的上清样品, 经 SDS-PAGE 电泳和 BCA 蛋白定量法分析, 重组的 BoNT/A 轻链蛋白浓度较高, 能达到 1.89 g/L, 经 TotalLab 图像软件分析, 结果表明, 其纯度约为 89%, 而轻链突变体蛋白的浓度较低, 为 0.97 g/L, 但纯度达到了 98%.

2.5 Western 印迹分析

Western 印迹分析结果显示, 重组的 BoNT/A 轻链及轻链突变体蛋白可以很好的被抗 BoNT 马血清识别, 在相对分子质量 66×10^3 kD 处有特异的印迹条带, 具有良好的抗原性(图 4).

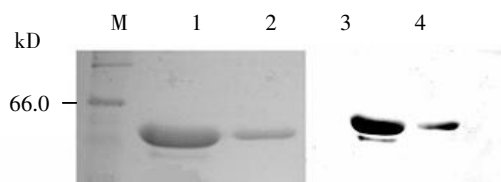


图 4 Western Blotting 检测轻链及轻链突变体蛋白
M: 蛋白标准带; 1: 转膜前的 LC 蛋白; 2: 转膜前的 mLC 蛋白; 3: LC 蛋白; 4: mLC 蛋白.

Fig. 4 Western blotting of the protein of LC and mLC
M: Marker; 1: The protein of LC after SDS-PAGE; 2: The protein of mLC after SDS-PAGE; 3: Western blotting of the protein of LC; 4: Western blotting of the protein of mLC.

2.6 活性检测

将重组的轻链及轻链突变体蛋白与毒素切割反应缓冲液 (50 mmol/L HEPES, 2 mmol/L DTT, 10 μ mol/L $ZnCl_2$, pH 7.5) 按 2:1 的比例于 37 $^{\circ}C$ 孵育 15 min, 然后按表 1 的配比与 SNAP-25 蛋白在 37 $^{\circ}C$ 下共孵育 1 h, 经 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白与 SNAP-25 的反应结果. 结果显示, 随着重组 BoNT/A 轻链蛋白量的增加, SNAP-25 的量逐渐减少, 出现浓度梯度效应, 而突变体蛋白则无此现象, 说明经过关键性氨基酸位点的突变后, 已经成功地去除了轻链蛋白的酶活性(图 5).

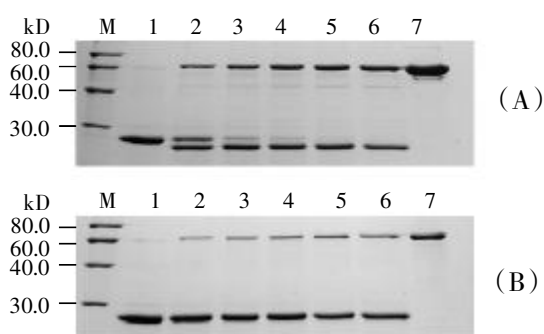


图 5 切割反应的结果

Fig.5 The result of cleave reaction

(A) LC 蛋白和 SNAP 蛋白作用 (LC cleaves SNAP)
M: Marker; 1: 30 μ L SNAP; 2: 30 μ L SNAP+5 μ L LC;
3: 30 μ L SNAP+10 μ L LC; 4: 30 μ L SNAP+15 μ L LC;
5: 30 μ L SNAP+20 μ L LC; 6: 30 μ L SNAP+25 μ L LC;
7: 25 μ L LC.

(B) mLC 蛋白和 SNAP 蛋白作用 (mLC cleaves SNAP)
M: Marker; 1: 30 μ L SNAP; 2: 30 μ L SNAP+25 μ L mLC;
3: 30 μ L SNAP+30 μ L mLC; 4: 30 μ L SNAP+35 μ L mLC;
5: 30 μ L SNAP+40 μ L mLC; 6: 30 μ L SNAP+45 μ L mLC;
7: 45 μ L mLC.

3 讨论

由于 BoNT 的中毒剂量小、潜伏期短、致死率高, 而又易于制备获得, 所以对于相关疫苗的研究越来越受到研究学者们的重视. 近年来, 国内对肉毒毒素的研究也取得了很大的进步, 现已有多个研究小组利用非融合型、融合型载体在大肠杆菌、毕赤酵母中分别表达过 BoNT/A 的轻链、重链的 H_C 和 H_N 片段, 而且相当一部分以上清的形式获得, 具有一定的抗原性. 如本室的贾宏丽等利用 pET-21a 质粒成功表达出的 BoNT/A 轻链蛋白^[9]; 军事医学科学院的孙志伟教授采用 pTIG-Trx 质粒表达出的可溶性 BoNT/BHc 蛋白^[10]等等, 但是仍有许多问题需要进一步研究, 如: 1) BoNT/A 片段的表达量不高, 不利于疫苗的大量制备; 2) 用抗原免疫小鼠后, 血清效价不高; 3) 攻毒实验中发现所表达的 BoNT/A 片段蛋白的保护性不好, 不能很好的结合天然毒素等等. 为了解决这些问题, 加强疫苗的抗原性, 提高保护性, 国外的很多课题组都采取了表达大片段, 多价苗串联体等方法, 如 Simpson 等^[11]研制的 BoNT/A、B、E 三价苗; Shone 等^[12]通过表达 BoNT 的轻链及重链的转位结构区制备出的 BoNT/A、B 疫苗. 因此, 如何表达全长的重组肉毒毒素蛋白, 从而获得免疫效价高, 保护性和安全性好的肉毒毒素疫苗就成为了当前的重点研究方向.

想要成功表达出肉毒毒素的全长重组蛋白疫苗, 首先要考虑如何去除其毒力, BoNT/A 的轻链具有金属内肽酶活性, 是 BoNT 全毒素的活性功能区域, 决定了 BoNT 的毒性作用. 在 BoNT/A LC 中, 锌结合模体 HEXXH 位于第 223~227 位, 高度保守, 对 LC 生物学活性的发挥起着重要作用. 从 BoNT/A LC 的晶体结构预测的锌配位模型显示, His223、His227、Glu262 直接与 Zn^{2+} 形成配位键, 而 Glu224 借一个水分子与 Zn^{2+} 相连接. 其中, Glu224 对 LC 的催化活性非常重要, 类似于嗜热菌蛋白酶中的 Glu134, 可能参与了肽键水解的各个环节. 在 LC 活性中心, 还存在一些次层残基, 如 Arg362、Tyr365、Phe266、Glu350 等, 其主要功能在于维持和稳定 LC 活性中心严格的结构或其与被结合底物的相对位置来保证 LC 的最佳酶解能力. 特别是 Arg362 和 Tyr365, 根据 Binz 等^[13]的研究发现, 这两个位点直接参与了肉毒毒素轻链与底物的催化作用, 共同保证了嗜热

菌蛋白酶过渡态的稳定,是典型的隶属于谷氨酸锌化总科的金属蛋白酶。而对Glu350进行突变,则能显著的降低酶的水解活性,导致这一现象的原因主要是改变了活性位点的精细结构,使得酶对热变性更加敏感并降低其对锌离子的亲和力。本实验选取编码影响BoNT/A轻链活性中心的关键性氨基酸位点Glu350、Arg362和Tyr365的碱基进行突变,采用相同的表达条件,成功的获得了可溶性的LC和mLC蛋白。将这两种蛋白分别于BoNT/A的底物蛋白SNAP-25共孵育,进行切割反应后,其结果经过SDS-PAGE电泳分析,发现未突变的BoNT/A LC具有蛋白酶活性,能与其底物SNAP-25蛋白发生切割反应,并出现一个明显的梯度效应,而突变体BoNT/A mLC则不具有该现象,证明我们通过关键性氨基酸位点的改变,成功地去除了其内肽酶活性,从而消除A型肉毒毒素的毒力,为后期表达重组全长BoNT/A疫苗的研究打下一个坚实的基础。

参考文献(References):

- [1] SCHANTZ E J, JOHNSON E A. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine[J]. *Microbiol Reviews*, 1992, 56(1): 80-89.
- [2] ARNON S S, SCHECHTER R, INGLESB T V, *et al.* Botulinum toxin as a biological weapon[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2001, 285(8): 1059-1070.
- [3] SINGH B R. Intimate details of the most poisonous poison[J]. *Nature Structural Molecular Biology*, 2000, 7(8): 617-619.
- [4] KADKHODAYAN S, KNAPP M S, SCHMIDT J J, *et al.* Cloning, expression, and one-step purification of the minimal essential domain of the light chain of botulinum neurotoxin type A[J]. *Protein Expression and Purification*, 2000, 19(1): 125-130.
- [5] LI L, SINGH B R. High-level expression, purification, and characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain[J]. *Protein Expression and Purification*, 1999, 17(3): 339-344.
- [6] LAPENOTIERE H F, CLAYTON M A, MIDDLEBROOK J L. Expression of a large, nontoxic fragment of botulinum neurotoxin serotype A and its use as an immunogen[J]. *Toxicon*, 1995, 33(10): 1383-1386.
- [7] LACY D B, RAYMOND C S. Recombinant expression and purification of the Botulinum neurotoxin type A translocation domain[J]. *Protein Expression and Purification*, 1997, 11(2): 195-200.
- [8] VENUGOPAL S, BIBHUTI R D. Separation, purification, partial characterization and comparison of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin tapes A, B and E[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 19(260): 10461-10466.
- [9] 贾宏丽, 王景林. 重组肉毒神经毒素A轻链(BoNT/A Lc)蛋白的表达、纯化与鉴定[J]. *军事医学科学院院刊*(JIA Hong-Li, WANG Jing-Lin. Expression of the recombinant light chain of botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A LC) in *E. coli* and its purification and identification [J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*), 2005, 29(1): 30-33.
- [10] 于蕊, 王双, 孙志伟, 等. B型肉毒毒素保护性抗原Hc在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. *生物技术通讯*(YU Rui, WANG Shuang, SUN Zhi-Wei, *et al.* High-level and soluble expressions of botulinum neurotoxin serotype B protective antigen Hc domain in *Escherichia coli*[J]. *Letters in Biotechnology*), 2008, 19(3): 365-367.
- [11] RAVICHANDRAN E, SIMPSON L, FETWEH H, *et al.* Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B and E that can be administered by the mucosal route[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(6): 3043-3054.
- [12] SHONE C, AGOSTINI H, CLANCY J, *et al.* A bivalent recombinant vaccine for botulinum types A and B neurotoxins based on a polypeptide comprising their effector and translocation domains that is protective against the predominant A and B subtypes[J]. *Infect and Immunity*, 2009, 77(7): 2795-2801.
- [13] BINZ T, BADE S, RUMMEL A, *et al.* Arg362 and Tyr365 of the botulinum neurotoxin type A light chain are involved in transition state stabilization[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(6): 1717-1723.

(上接第253页)

参考文献(References):

- [1] DEMIROL A, GUVEN S, BENKHALIFA M, *et al.* Successful birth following transfer of frozen-thawed embryos produced from *in-vitro* matured oocytes[J]. *Reproduction Biomedicine Online*, 2010, 21(2): 215-218.
- [2] DOWLING-LACEY D, JONES E, BOCCA S, *et al.* Two singleton live births after the transfer of cryopreserved-thawed day-3 embryos following an unstimulated *in vitro* oocyte maturation cycle[J]. *Reproduction Biomedicine Online*, 2010, 20(3): 387-390.
- [3] SONG W Y, CHUNG J T, CHAN P T, *et al.* Live birth after ICSI of micro-TESE-retrieved spermatozoa into *in vitro*-matured oocytes[J]. *Journal Andrology*, 2011, 32(1): 23-25.
- [4] HOOMA S T, SWANN K. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes[J]. *Human Reproduction*, 1994, 9(12): 2356-2361.
- [5] WU H, HE C L, FISSORE R A. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs[J]. *Molecular Reproduction Development*, 1997, 46(2): 176-189.
- [6] HUNTER M G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs[J]. *Reviews of Reproduction*, 2000, 5(2): 122-130.
- [7] SAUNDERS C M, LARMAN M G, PARRINGTON J, *et al.* PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development [J]. *Development*, 2002, 129(15): 3533-3544.
- [8] HASSOLD T, HUNT P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(4): 280-291.
- [9] BATTAGLIA D E, GOODWIN P, KLEIN N A, *et al.* Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women[J]. *Human Reproduction*, 1996, 11(10): 2217-2222.
- [10] HAMATANI T, FALCO G, CARTER M G, *et al.* Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes[J]. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(19): 2263-2278.