

荧光显微成像用于研究卵母细胞减数分裂过程

邓月月¹, 叶贤其¹, 曹博¹, 周洁¹, 刘付童玲², 王晓梅², 屈军乐¹, 许改霞¹

¹深圳大学光电工程学院, 教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060;

²深圳大学医学院深圳市生物医学工程重点实验室, 广东 深圳 518060

摘要 动力蛋白、微管蛋白以及染色体在卵母细胞减数分裂过程中起着重要作用,但目前传统荧光成像方法受到衍射极限的限制,分辨率较低,无法达到卵母细胞减数分裂对成像的要求。首先构建了卵母细胞体外正常成熟体系和原钒酸钠(SOV)作用下的异常成熟体系,然后基于共聚焦显微技术和随机光学重建显微技术(STORM)两种荧光成像方法,研究卵母细胞减数分裂过程中动力蛋白和微管蛋白的定位以及染色体的形态与结构。荧光显微成像结果表明:在正常成熟体系中,动力蛋白分布、微管蛋白形成的纺锤体以及染色体的形态与结构能反映卵母细胞发育的不同阶段;在 SOV 作用下,纺锤体结构异常率增加,出现桶状、细长、团缩、杂乱、梨状、多极等典型异常纺锤体结构,染色体结构异常率也相应增加。STORM 结果更清晰地展现了纺锤体结构信息,三维 STORM 结果揭示了异常纺锤体的紊乱情况,该方法为卵母细胞减数分裂过程研究提供了精度更高的成像手段。

关键词 生物光学; 共聚焦显微; 随机光重建显微; 卵母细胞; 动力蛋白; 微管蛋白; 染色体

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0507002

Application of Fluorescence Microscopy in Research of Oocyte Meiosis

Deng Yueyue¹, Ye Xianqi¹, Cao Bo¹, Zhou Jie¹, Liufu Tongling², Wang Xiaomei²,
Qu Junle¹, Xu Gaixia¹

¹School of Optoelectronic Engineering, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

²Key Laboratory of Biomedical Engineering of Shenzhen, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract Dynein, tubulin, and chromosome play important roles in oocyte meiosis. However, the traditional fluorescence microscopy is limited by the diffraction limit and has low resolution, which cannot meet the imaging requirements of oocyte meiosis. Firstly, the normal maturation system of oocyte *in vitro* and abnormal maturation system under the action of sodium orthovanadate (SOV) are established. Then the confocal fluorescence microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) are applied to study the localization of the two important proteins of dynein and tubulin and the morphology and structure of chromosome during the oocyte meiosis. The fluorescence imaging results show that the co-localization of dynein, spindle assembled by tubulin, and the morphology and structure of chromosome can correctly reflect the different stages of oocyte meiosis in the normal system. In the SOV treated groups, the abnormality rate of spindle structure increases, and there are typical spindle structures such as barrel, slender, regiment, disorderly, piriform, and multipolar. The abnormality rate of chromosome structure also increases. The STORM results clearly present the structural information of the spindle, and the 3D STORM results reveal the disorder level of abnormal spindle. This method provides an imaging approach with higher resolution for the research of the oocyte meiosis.

Key words biotechnology; confocal microscopy; stochastic optical reconstruction microscopy; oocyte; dynein; tubulin; chromosome

收稿日期: 2017-11-01; 收到修改稿日期: 2017-12-11

基金项目: 国家 973 计划(2015CB352005)、国家自然科学基金(31671491)、广东省自然科学基金(2014A030312008)

作者简介: 邓月月(1991—),女,硕士研究生,主要从事生物光子方面的研究。E-mail: dengyueyue@email.szu.edu.cn

导师简介: 许改霞(1977—),女,博士,教授,主要从事生物光子学和纳米医学方面的研究。

E-mail: xugaixia@szu.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

纺锤体是卵母细胞成熟过程中的一个重要结构,是由极间微管、染色体牵丝及区间牵丝排列组成的中部大两极小的形如纺锤的结构,该结构在细胞分裂中期最为典型。在细胞分裂过程中,纺锤体对卵母细胞染色体的平衡、运动、分配和极体的排出具有非常重要的作用^[1-2]。纺锤体结构异常会导致异常的减数分裂,进而可能产生异常的胚胎。动力蛋白作为微管负极方向的马达蛋白,在细胞减数分裂过程中发挥着重要作用。动力蛋白帮助纺锤体组装检验点蛋白,使染色体向两极移动^[3-6]。如果动力蛋白表达异常或分布异常,就可能引起检验点蛋白在两极延迟出现或不表达,导致染色体滞后分离,造成细胞死亡或子细胞以非整倍体形成^[7]。目前,在卵母细胞成像研究中通常使用传统荧光成像方法或激光共聚焦显微成像方法,它们的成像分辨率都受到衍射极限的限制,无法达到理想的精度^[3-6]。近年来,随着光学成像技术及荧光标记技术的迅速发展,超分辨显微成像技术被广泛应用于生物医学研究中。有文献报道了利用随机光学重建显微技术(STORM)观察到了非洲绿猴肾细胞的微管蛋白精细结构^[8],该技术还可以分辨果蝇染色质三维结构的细微变化^[9-10]。由于卵母细胞在成熟过程中会涉及到众多的蛋白分布和空间构象的变化,因此STORM可为卵母细胞的研究提供更精细和更丰富的信息。本课题组首次将STORM运用于小鼠卵母细胞减数分裂过程的研究中,尝试利用共聚焦显微方法和STORM观察卵母细胞在减数分裂过程中动力蛋白、微管蛋白以及染色体的形态结构,为卵母细胞的研究提供更精细的信息。

2 材料与方 法

2.1 主要试剂

孕马血清促性腺激素(PMSG)购自宁波第二激素厂;原钒酸钠、M2、M16、矿物油均购自Sigma公司;多聚甲醛、牛血清白蛋白(BSA)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)购自北京诺特莱斯生物科技有限公司;Alpha Tubulin antibody和DYNC1L1 antibody购自GeneTex公司;Donkey anti-Mouse IgG(H+L)Secondary Antibody Alexa Fluor ©

647 conjugate 购自 ThermoFisher 公司; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor © 488)购自 Abcam 公司; DAPI Fluoromount-G © 购自 SouthernBiotech 公司;中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯。

2.2 实验动物

本实验所用实验动物为4~6周龄无特定病原体(SPF)级雌性昆明(KM)小白鼠,购自广东省医学实验动物中心,动物许可证号为SCXK(粤)2013-0002。动物饲养于通风良好、光照充足、温暖(23℃)、干燥的环境中,12h明亮,12h黑暗,给予充足的水和饲料,自由进食、饮水,动物适应新环境一周后用于实验。

2.3 构建卵母细胞体外培养成熟体系

在实验室前期方法的基础上对培养条件进行改进^[11-14],步骤简述如下:4~6周龄昆明雌鼠腹腔注射10IU孕马血清促性腺激素,48h后颈部脱臼致死,用体积分数为70%的乙醇消毒后剪开背部皮肤和肌肉层,剥离卵巢,将卵巢置于预热至37℃的M2操作型培养液中,用5号注射器针头在体视显微镜下刺破卵泡,选择颗粒细胞包裹紧密的初级卵母细胞,在M2培养液中洗涤3次后分别放入含有不同浓度(0,5,50,500 μmol/L)原钒酸钠(SOV)的M16培养液滴中,在37℃、含5%(体积分数)CO₂的孵箱中培养12h,然后进行荧光染色实验。

2.4 荧光染色

参考Zhang等^[3]的方法对样品进行处理,主要步骤为:将经过特定处理的卵子置于体积分数为4%的多聚甲醛中室温固定30min;用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次5min;在体积分数为0.5%的Triton X-100溶液中室温通透30min;用PBS洗3次,每次5min;用体积分数为5%的BSA在37℃下封闭1h;将卵母细胞转移到5%BSA稀释的一抗溶液中,在37℃下孵育1h或4℃孵育过夜处理;用PBS清洗3次,每次10min;将卵母细胞转移到5%BSA稀释的二抗溶液中,在37℃下孵育1h;用PBS清洗3次,每次10min;双标实验再将卵母细胞转移到5%BSA稀释的一抗溶液中,在37℃下孵育1h;用PBS清洗3次,每次10min;将卵母细胞转移到5%BSA稀释的二抗溶液中,在37℃下孵育1h;用PBS清洗3次,每次10min;对用于共聚焦显微成像的样品进行封片处理,即加适量含4',6-二

脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的封片剂于干净的载玻片上,移入卵母细胞,然后用干净的盖玻片压片,用中性树脂密封盖玻片和载玻片的边缘,室温下晾干,存于4℃环境下待检测;对于超分辨显微成像的样品进行封片,即加入适量成像缓冲液(在PBS中配含有50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、体积分数为1%的β-巯基乙醇(βME)、体积分数为10%的葡萄糖溶液、0.5 g/L 葡萄糖氧化酶、40 mg/L 过氧化氢酶的溶液,用盐酸和氢氧化钠调节溶液的pH为8)于干净的载玻片上,移入卵母细胞,然后用干净的盖玻片压片,用中性树脂密封盖玻片和载玻片的边缘,室温下晾干后立即检测。

2.5 共聚焦显微和超分辨显微成像

共聚焦显微成像:共聚焦显微图片采用德国Leica 仪器有限公司的激光共聚焦显微镜(TCS SP5 II)采集,图像收集软件为LAS AF Lite。所有样品荧光信号的捕获来自40倍物镜或100倍物镜。DAPI用波长为405 nm的激光激发,在450~480 nm波段采集荧光信号;Alexa Fluor 488用波长为488 nm的激光激发,在505~535 nm波段采集荧光信号;Alexa Fluor 647用波长为633 nm的激光激发,在650~680 nm波段采集荧光信号。图片尺寸统一为1024 pixel×1024 pixel,采用线性扫描模式,每张图信号平均4次获得。展示图片来自至少三次以上重复实验的代表性图片。

三维随机光重建显微成像:参考Bates等^[8]的STORM成像方法,自行设计并搭建了超分辨成像系统(X-Y方向分辨率为9 nm,Z方向分辨率为22 nm^[15]),该系统主要是基于奥林巴斯IX71倒置

荧光显微镜(FM)搭建的,图像收集软件为Andor SOLIS。所有的样品捕获来自100倍油镜。Alexa Fluor 647用波长为641 nm的激光激发,用FF01-676/37-25滤片采集、发出信号。将处理过的样品封片后置于显微镜上,在641 nm激光激发下找到视场内纺锤体结构区域,用电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)采集感兴趣区域的荧光闪烁序列图,曝光时间为10 ms,拍摄的序列长为10000 frame,然后通过Image J软件对其序列进行重构。

2.6 数据分析

本研究所有数据均采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,结果用均数加减标准差表示。各组的平均数比较采用t-test分析,各组比率的比较采用χ²-test进行统计分析,检验水准α=0.05。

3 结果与讨论

3.1 卵母细胞体外培养成熟体系的建立

卵母细胞体外培养12 h,在不同浓度SOV作用下获得的卵母细胞主要有4种形态,如图1(a)~(d)所示,其中图1(a)为处于生发泡期(GV)和减数分裂过程仍未启动的卵母细胞;图1(b)是发生了核膜破裂(GVBD)正在恢复减数分裂的卵母细胞;图1(c)为排出第一极体(fPB)的卵母细胞,是发育正常的核成熟卵母细胞;图1(d)为孤雌活化的卵母细胞。第一极体的排出标志着卵母细胞体外培养模型的初步建立。随着SOV浓度升高,停留在GV期卵子的比例均增加,PB期卵子的比例逐渐减少,在500 μmol/L SOV作用下卵子的成熟率为3.73%,远低于无SOV作用的空白对照组卵子的成熟率

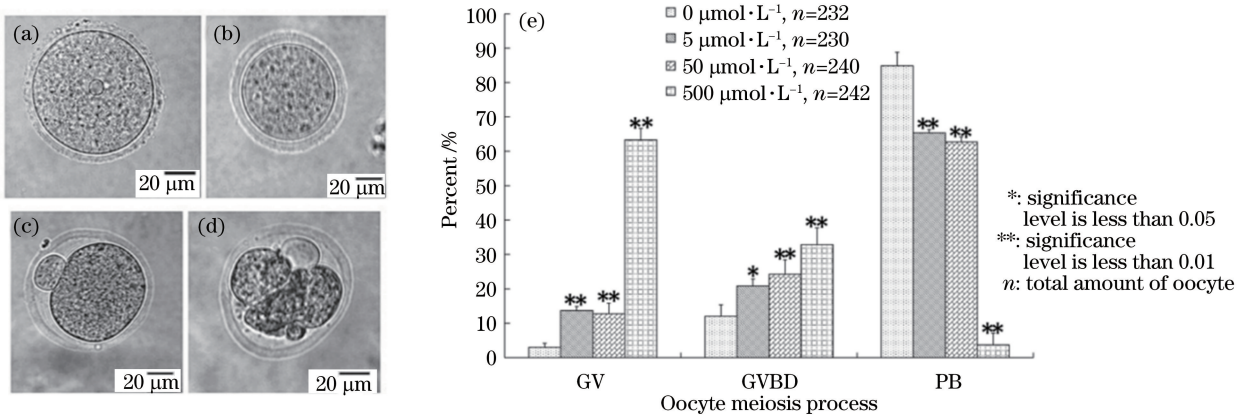


图1 不同浓度SOV作用下体外培养12 h的卵母细胞在(a) GV时期、(b) GVBD时期、(c) PB时期、(d)孤雌活化时期的形态;(e)减数分裂不同时期的统计

Fig. 1 Morphology of the oocyte cultured *in vitro* for 12 h under the action of different concentrations of SOV at the periods of (a) GV, (b) GVBD, (c) PB and (d) parthenogenetic activation; (e) statistical data in different meiosis processes

(84.91%)，如图 1(e) 所示。结果表明：在 SOV 作用下，卵母细胞体外培养 12 h，部分卵子停滞在 GV 期；对于减数分裂启动的卵子来说，部分卵子减数分裂过程停滞在 GVBD 期，未能排出第一极体，会影响卵子减数分裂进程。

3.2 减数分裂过程中两种重要蛋白和染色体的荧光标记

3.2.1 体外培养 12 h 的卵母细胞动力蛋白的正常定位与异常定位

采用荧光染色方法观察体外培养 12 h 的卵母细胞的动力蛋白定位情况。实验发现，动力蛋白在卵母细胞减数分裂过程中均有表达，如图 2(a) 所示。荧光结果表明：在 GV 期，生发泡完整，动力蛋白散乱分布在细胞质中；在中期 (MI)，卵母细胞染色体呈一直线排列在中期板上，微管蛋白呈纺锤状，动力蛋白也呈纺锤状；在后期 (AI)，同源染色体逐渐分离，并沿着纺锤丝分别移向细胞两极，动力蛋白与纺锤体定位一致；在末期 (TI)，纺锤体以中体形式存在，胞质出现环状缢缩，动力蛋白与纺锤体定位一致；第二次减数分裂中期 (MII)，纺锤体存在于皮质区，排出第一极体，动力蛋白与纺锤体定位一致。如图 2 (b) 所示，对于异常卵子来说，其动力蛋白与微管蛋白定位一致，但未呈纺锤状。可见：动力蛋白正常表达时，与微管蛋白定位一致，呈纺锤状，减数分裂正常进行；动力蛋白异常表达时，与微管蛋白定位一致，未呈纺锤状，减数分裂进程受到影响。Horgan 等^[16]的研究表明动力蛋白在分裂过程中会散乱分布在人皮肤鳞癌细胞 (A431) 的细胞质中，且不与纺锤体共定位，主要是因为采用的细胞体系不同。本研究使用的卵母细胞具有特殊的分裂机制，卵母细胞在减数分裂后期及 MII 中期，动力蛋白仍与纺锤体共定位，不是散乱分布在细胞质中，这可能是在为第二次减数分裂过程中姐妹染色体的分离做准备^[17]。

3.2.2 体外培养 12 h 的卵母细胞微管蛋白的正常定位与异常定位

通过免疫荧光获取处于减数分裂不同时期的体外培养 12 h 的卵母细胞的微管蛋白和染色体的共定位，结果如图 2 所示。处于 GV 期的卵子，其生发泡完整，核仁可见，且位于细胞中央；细胞发生 GVBD，核仁消失，染色质浓缩为棒状染色体；没有标记出完整的纺锤体，只可见排列不规则的微管蛋白丝，可知纺锤体正在装配之中；处于 MI 期的卵子，其染色质呈一直线排列于中期板，微管蛋白呈纺锤状；处于 AI 期的卵子，同源染色体逐渐分离并沿

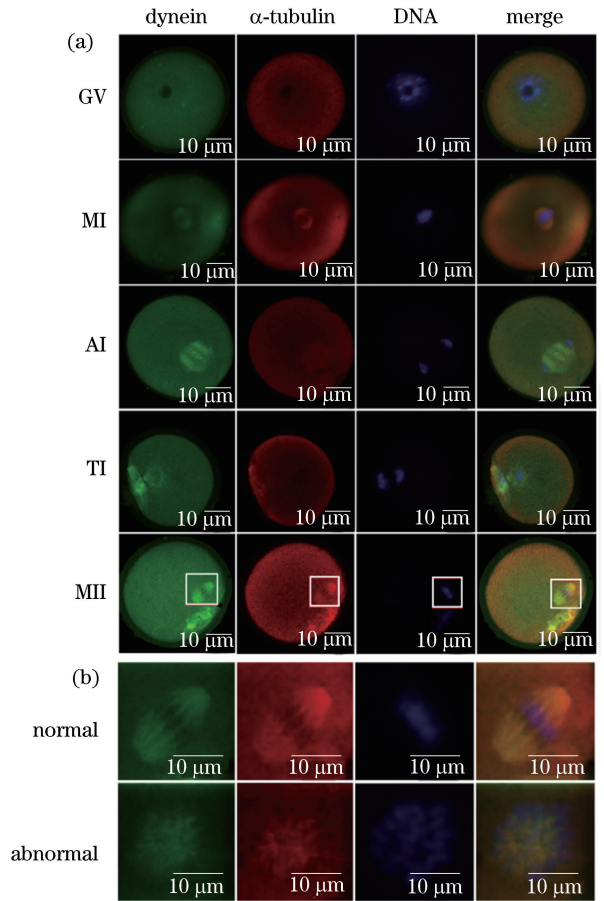


图 2 不同减数分裂时期体外培养 12 h 的卵母细胞动力蛋白、微管蛋白以及染色体的荧光共定位。(a) 正常卵子；(b) MII 期卵子白色方框部分的局部放大以及异常定位卵子
Fig. 2 Fluorescence co-localization of dynein, α -tubulin and chromosome of the oocyte cultured *in vitro* for 12 h at different meiosis stages.
(a) Normal oocyte; (b) partial enlargement of the white square part of MII oocyte and the abnormal oocyte

着纺锤丝分别向两极移动，同时纺锤体在长轴方向上延伸拉长；处于 TI 期的卵子，染色质在纺锤体两极分别聚集成团，纺锤体以中体形式存在；处于 MII 期的卵子，细胞排出第一极体到达 MII 期，纺锤体存在于皮质区，长轴与质膜平行，到此第一次减数分裂结束。此标记结果与文献 [18-19] 的结果一致。通过免疫荧光观察体外培养 12 h 的卵母细胞，其典型的纺锤体结构如图 3(a)~(h) 所示，正常纺锤体呈纺锤状 [图 3(a)]，异常纺锤体呈桶状结构 [图 3(b)]、细长结构 [图 3(c)]、团缩结构 [图 3(d)]、杂乱结构 [图 3(e)]、梨状结构 [图 3(f)] 和多极异常纺锤体结构 [图 3(g)、(h)]。

经不同浓度 SOV 作用后，5 μ mol/L 和

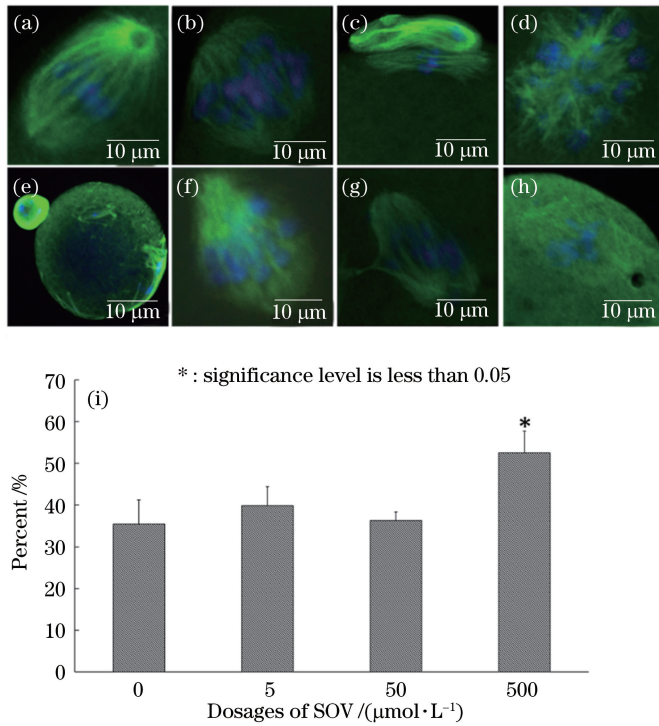


图3 体外培养12 h的卵母细胞微管蛋白的荧光共定位。(a)正常纺锤体卵母细胞；(b)~(h)不同纺锤体的异常卵母细胞；(i)不正常MI~MII纺锤体结构的统计数据

Fig. 3 Fluorescence co-localization of α -tubulin of the oocyte cultured *in vitro* for 12 h at different meiosis stages. (a) Normal oocyte with normal spindle; (b)-(h) abnormal oocytes with various spindles; (i) statistic data of abnormal MI-MII spindle structures

50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组异常纺锤体结构增加比例不明显,500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组异常显著,如图3(i)所示。

3.2.3 体外培养12 h的卵母细胞染色体的正常定位与异常定位

图4为染色体的免疫荧光观察结果。正常的染色体整齐排列[图4(a)],随着SOV浓度增加,卵母细胞出现了掉队[图4(b)],散乱染色体[图4(c)、(d)]结构有所增加,50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组较为明显,数据统计结果如图4(e)所示,说明高浓度SOV更容易造成卵母细胞染色体结构异常。

3.3 卵母细胞纺锤体的结构

普通荧光成像方法受到衍射极限的限制,分辨率较低,本研究尝试利用普通荧光显微镜(FM)和STORM研究卵母细胞减数分裂过程中两种重要蛋白以及染色体的形态结构。图5为利用普通荧光显微镜和STORM观察到的卵母细胞纺锤体的结构。结果表明,超分辨成像较普通显微成像能够捕获到更多的细节,如图5(c)所示。根据显微镜成像系统分辨率公式计算可得普通荧光显微镜成像分辨率的理论值为276 nm。在本实验中,采用FM测得一根纺锤丝的的半峰全宽(FWHM)为401 nm,用

STORM测得的FWHM为142 nm。可见,STORM的分辨率优于普通荧光显微镜的实测值与理论值,STORM可以获取更精细的结构信息。

3.4 卵母细胞纺锤体结构的三维STORM形貌

本课题组实验室自行搭建了三维纳米荧光显微超分辨成像系统,基于柱面镜像散的单分子轴向定位方法,通过拟合光斑在X、Y方向的尺寸得到其Z轴的位置,可以实现单分子轴向纳米分辨定位。三维STORM成像系统重构图像可以给出卵母细胞在焦平面上下350 nm深度空间上的纺锤丝信息,如图6所示,图中不同颜色代表不同的成像深度。二维STORM和三维STORM的重构结果表明:三维STORM展示出了纺锤体的轴向信息,如图6(b)、(d)所示;对比正常纺锤体和异常纺锤体可以看出,正常纺锤体有完整的两极结构,而异常纺锤体仅为单极结构;正常卵母细胞的纺锤丝纵深跨度为-175~0 nm,跨度较小;而异常卵母细胞的纺锤丝贯穿-300~263 nm的范围,跨度较大,纺锤体更加紊乱。

4 结 论

卵母细胞减数分裂过程是一个有序、复杂的过

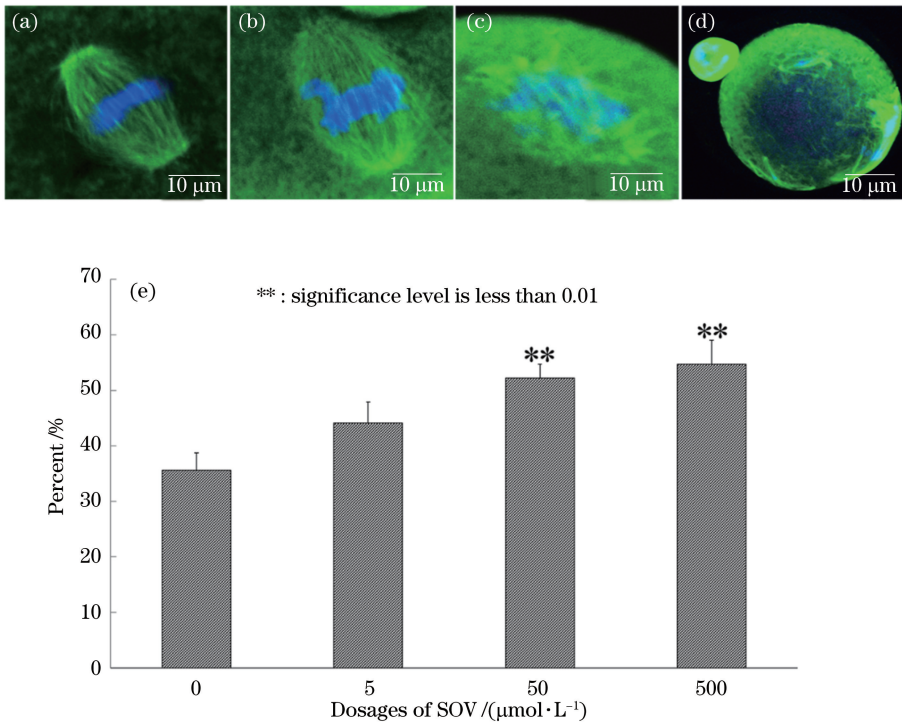


图 4 (a)正常染色体结构;(b)~(d)异常染色体结构;(e)不正常 MI~MII 染色体结构的统计数据
 Fig. 4 (a) Normal chromosome structure; (b)-(d) abnormal chromosome structures;
 (e) statistic data of abnormal MI-MII chromosome structures

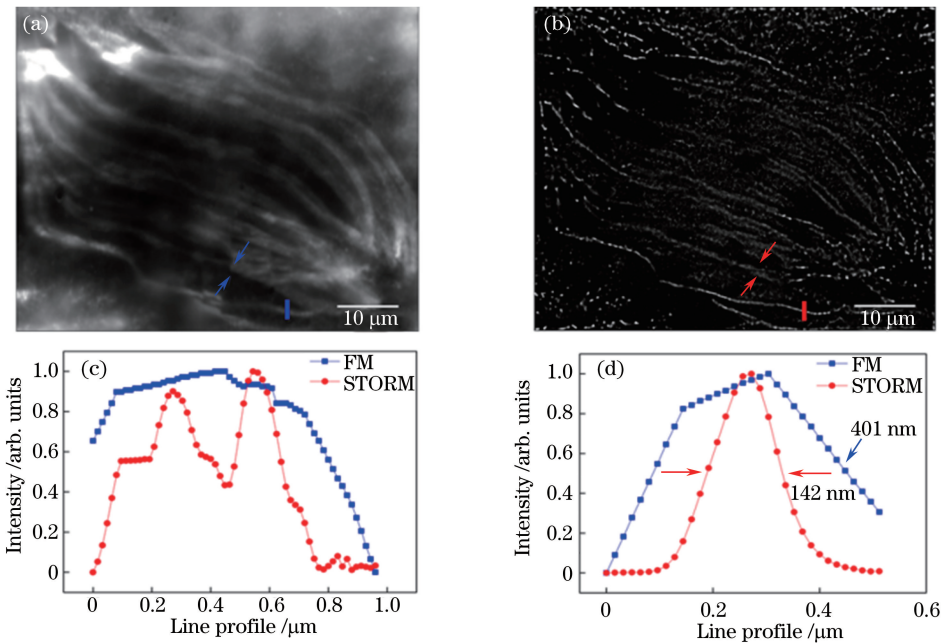


图 5 同一位置(a) FM 和(b) STORM 成像的卵母细胞纺锤体;(c)箭头处纺锤丝的信号强度;(d)直线处纺锤丝的信号强度
 Fig. 5 Images of oocyte spindle obtained by (a) fluorescence microscope and (b) STORM at the same position;
 (c) fluorescence intensity of the spindle fibers pointed by arrows; (d) fluorescence intensity of the spindle fibers pointed by straight lines

程,在此过程中,动力蛋白通过把检验点蛋白从着丝点附近的动粒转运到纺锤体的两极,从而使检验点蛋白失活,通过水解腺苷三磷酸(ATP)提供能量将

其他重要的蛋白转运到微管负极,使同源染色体正确分离,染色体正确排列并排出第一极体,这些体现了减数分裂过程动力蛋白的重要性。本研究首先建

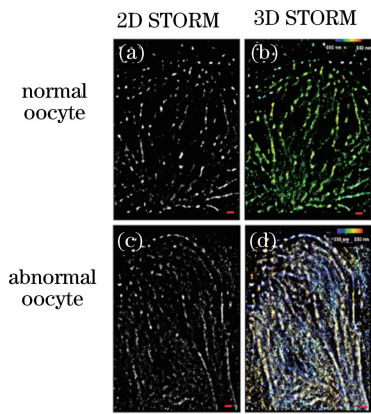


图 6 正常卵子纺锤体结构的(a)二维和(b)三维 STORM 重构图; 异常卵子纺锤体结构的(c)二维和(d)三维 STORM 重构图

Fig. 6 Reconstructed images of the normal oocyte spindle obtained by (a) 2D STORM and (b) 3D STORM; reconstructed images of the abnormal oocyte spindle obtained by (c) 2D STORM and (d) 3D STORM

立了卵母细胞体外培养成熟模型, 利用 FM 和 STORM 观察了减数分裂过程中两种重要蛋白(动力蛋白和微管蛋白)及染色体的定位和结构变化。结果表明, SOV 可以成功构建卵母细胞体外异常成熟体系, 共聚焦荧光显微成像明确了这两种重要蛋白和染色体在减数分裂过程不同时期的共定位情况, 提示异常成熟的卵母细胞中动力蛋白与微管蛋白构成的纺锤体空间位置一致, 但纺锤体的形态发生了改变。在二维 STORM 图片中可以看到更清晰的纺锤丝走向及分布, 但由于仅对焦平面进行成像, 无法真实反映纺锤体轴的走向。三维 STORM 成像可以呈现约 700 nm 厚度内纺锤丝的三维结构, 提供了更丰富的信息。该研究将荧光共定位与荧光超分辨成像方法相结合, 为进一步阐明卵母细胞减数分裂过程中分子的协同作用提供了新的技术手段。

参 考 文 献

[1] Wang W H, Keefe D L. Prediction of chromosome misalignment among *in vitro* matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope [J]. *Fertility and Sterility*, 2002, 78(5): 1077-1081.

[2] Severson A F, Von D G, Bowerman B. Oocyte meiotic spindle assembly and function [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2016, 116: 65-98.

[3] Zhang D, Yin S, Jiang M X, *et al.* Cytoplasmic dynein participates in meiotic checkpoint inactivation in mouse oocytes by transporting cytoplasmic mitotic

arrest-deficient (Mad) proteins from kinetochores to spindle poles [J]. *Reproduction*, 2007, 133(4): 685-695.

[4] Hatsumi M, Endow S A. Mutants of the microtubule motor protein, nonclaret disjunctional, affect spindle structure and chromosome movement in meiosis and mitosis [J]. *Journal of Cell Science*, 1992, 101(3): 547-559.

[5] Raaijmakers J A, Medema R H. Function and regulation of dynein in mitotic chromosome segregation [J]. *Chromosoma*, 2014, 123(5): 407-422.

[6] Li M, Li S, Yuan J, *et al.* Bub3 is a spindle assembly checkpoint protein regulating chromosome segregation during mouse oocyte meiosis [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7701.

[7] Pariente N. A balancing act: focus on aneuploidy [J]. *EMBO Reports*, 2012, 13(6): 472.

[8] Bates M, Jones S A, Zhuang X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): a method for superresolution fluorescence imaging [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, 2013(6): 498-520.

[9] Boettiger A N, Bintu B, Moffitt J R, *et al.* Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 418-422.

[10] Zhuang X. Super-resolution STORM nanoscopy of chromatin [C]. 2017 AAAS Annual Meeting, 2017.

[11] Xu G, Lin S, Law W C, *et al.* The invasion and reproductive toxicity of QDs-transferrin bioconjugates on preantral follicle *in vitro* [J]. *Theranostics*, 2012, 2(7): 734-745.

[12] Xu G, Lin G, Lin S, *et al.* The reproductive toxicity of CdSe/ZnS quantum dots on the *in vivo* ovarian function and *in vitro* fertilization [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37677.

[13] Xie X Y, Zhu X M, Teng H, *et al.* Toxicity of quantum dots on mouse ovarian granulosa cells [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2013, 40(5): 0504001. 谢向毅, 朱小妹, 滕欢, 等. 量子点对小鼠卵巢颗粒细胞的毒性 [J]. *中国激光*, 2013, 40(5): 0504001.

[14] Wang X M, Yong K T, Xu G X, *et al.* Invasion of CdSe/CdS/ZnS quantum dots for oocytes *in vitro* maturation [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2010, 37(11): 2730-2734. 王晓梅, 杨坚泰, 许改霞, 等. CdSe/CdS/ZnS 量子点对体外培养成熟卵母细胞的侵入性研究 [J]. *中国激光*, 2010, 37(11): 2730-2734.

[15] Ni Y, Cao B, Ma T, *et al.* Super-resolution imaging of a 2.5 kb non-repetitive DNA *in situ* in the nuclear genome using molecular beacon probes [J]. *Elife*,

- 2017, 6: e21660.
- [16] Horgan C P, Hanscom S R, Mccaffrey M W. Dynein LIC1 localizes to the mitotic spindle and midbody and LIC2 localizes to spindle poles during cell division[J]. Cell Biology International, 2011, 35(2): 171-178.
- [17] Huang X, Wang H L, Qi S T, *et al.* DYNLT3 is required for chromosome alignment during mouse oocyte meiotic maturation [J]. Reproductive Sciences, 2011, 18(10): 983-989.
- [18] Ma W, Viveiros M M. Depletion of pericentrin in mouse oocytes disrupts microtubule organizing center function and meiotic spindle organization [J]. Molecular Reproduction and Development, 2014, 81(11): 1019-1029.
- [19] Xu X L, Ma W, Zhu Y B, *et al.* The microtubule-associated protein ASPM regulates spindle assembly and meiotic progression in mouse oocytes[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49303.