

• 临床检验研究论著 •

多重 PCR 技术在 Y 染色体微缺失快速筛查中的应用

桂俊豪,王 瑞,刘鸿春,曹金军,宋云宏,杨 柳,黄国香,苏晓津,邹红云,何 江,余伍忠
(兰州军区乌鲁木齐总医院,乌鲁木齐 830000)

摘 要:**目的** 探讨多重聚合酶链反应(PCR)技术在 Y 染色体微缺失快速筛查中的应用价值。**方法** 以 38 例健康男性和 46 例无(少)精症男性外周血淋巴细胞基因组 DNA 为模板,采用针对 Y 染色体无精子因子(AZF)4 个亚区(AZF_a~d)15 个序列标签位点(STS)的多重引物进行 PCR 检测,并以琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。**结果** 84 例受试者多重 PCR 检测成功率为 100%,且特异性好,扩增效率高。健康男性标本可检出 15 个 STS。患者中检出 AZF_c+d 微缺失 1 例。**结论** 多重 PCR 是快速筛查 Y 染色体微缺失的有效工具。

关键词:聚合酶链反应; Y 染色体; 无精子因子; 微缺失; 快速筛查
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.018 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)06-0681-02

Application of multiplex PCR for rapid screening of the Y chromosomal microdeletion

Gui Junhao, Wang Rui, Liu Hongchun, Cao Jinjun, Song Yunhong, Yang Liu,
Huang Guoxiang, Su Xiaojin, Zou Hongyun, He Jiang, Yu Wuzhong
(Urumqi General Hospital of PLA, Lanzhou Military Command, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract:**Objective** To investigate the application value of multiplex polymerase chain reaction(PCR) for rapid screening of Y chromosomal microdeletion. **Methods** Multiplex PCR, using multiplex primers specific for 15 sequence-tagged sites(STS) in 4 sub-regions of azoospermia factor(AZF) on Y chromosome including AZF_a-b, was performed for the detection of genomic DNA of peripheral lymphocytes from 38 cases of healthy males and 46 cases of patients with oligozoospermia. The PCR products were analyzed by agar gel electrophoresis. **Results** The achievement ratio of multiplex PCR was 100% in all 84 cases of subjects, with fine specificity and high efficiency. All 15 STS could be detected in specimens of healthy males. One case with microdeletion in AZF_c+d sub-region was demonstrated in patients. **Conclusion** Multiplex PCR could serve as significant clinical tool for rapid screening of Y chromosomal microdeletion.

Key words:polymerase chain reaction; Y chromosome; azoospermia factor; microdeletion; rapid screening

全球范围内,约 15%的夫妻受不育症困扰,其中 Y 染色体无精子因子(azoospermia factor, AZF)区 DNA 片段微缺失是导致男性无精症与严重少精症的最常见分子遗传学机制^[1]。本文应用多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)对 Y 染色体上的 15 个序列标记位点(sequence-tagged site, STS)进行扩增,建立 Y 染色体微缺失快速筛查技术,为研究 AZF 区域微缺失与男性异常生精表型的关系奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康男性 38 例(对照组),年龄 26~39 岁,精子密度大于 20×10⁶/mL。于本院优生优育门诊就诊男性不育患者 46 例(患者组),年龄 27~41 岁,不育病史 1~6 年;排除隐睾、泌尿生殖道感染、睾丸损伤、睾丸炎、输精管缺如、精索静脉曲张、阻塞性无精症及促性腺激素异常;计算机辅助精液分析显示,37 例精子密度小于 5×10⁶/mL、5 例小于 2×10⁶/mL、4 例为特发性无精症。

1.2 方法

1.2.1 染色体 G-显带分析 常规方法培养受试者外周血淋巴细胞,制备中期染色体进行 G-显带分析。

1.2.2 多重 PCR 检测 采集受试者外周血标本 2 mL, EDTA 抗凝,以 DNA 提取试剂盒[亚能(深圳)生物技术有限公司]提取外周血淋巴细胞基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,对 15 个 STS 分为 4 组(G1~G4 组)进行多重 PCR 检测,试剂盒购自亚能(深圳)生物技术有限公司。15 个 STS 所在功能区的分布及名称见表 1。每组 PCR 均以 Y 染色体性别决定因子(sex-determination factor, SRY)作为内参。严格参照试剂盒说明书配制 PCR 反应体系,多重 PCR 扩增条件为:50 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 60 s(35 个循环), 72 ℃

60 s。以 2.0%琼脂糖凝胶进行 PCR 产物电泳检测,5 V/cm 恒压电泳 60 min,凝胶成像系统照相并分析结果。

表 1 15 个 STS 所在功能区分布及名称

功能区	组别			
	G1	G2	G3	G4
AZF _a	—	SY84	SY86	SY82
AZF _b	SY143	—	SY127、SY124	SY134、SY128、SY133
AZF _c	SY254、SY255、SY242	SY239	—	—
AZF _d	—	SY152	SY145	—

—:无数据。

2 结 果

2.1 染色体 G-显带分析 对照组未检出外周血染色体 G-显带异常者(图 1A)。患者组检出 Klinefelter's 综合征 1 例,核型为 47,XXY(图 1B);检出 Y 大于 18 号染色体 2 例(图 1C)。



A:对照组核型;B:Klinefelter's 综合征(47, XXY)患者核型(箭头示 X 染色体);C:Y 大于 18 号染色体患者核型(箭头示 Y 染色体)。

图 1 外周血染色体 G-显带核型图

2.2 Y 染色体微缺失筛查 多重 PCR 扩增 Y 染色体 15 个 STS,对照组 STS 带型完整,4 条泳道(G1~4)分别显示 SRY

基因和各 STS 标签扩增产物,PCR 产物特异性好,片段大小符合预期,无杂带,扩增产物量相近;PCR 产物电泳结果见图 2。1 例特发性无精症患者 AZFc 区 SY254、SY242、SY255、SY239 和 AZFd 区 SY152 位点无扩增产物,表明 AZFc 区伴部分 AZFd 亚区存在联合微缺失;PCR 产物电泳结果见图 3。

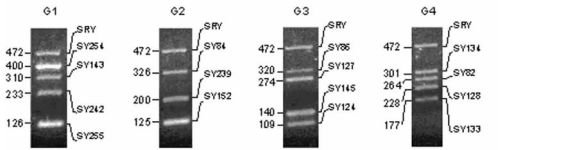


图 2 对照组 Y 染色体 SRY 基因及 AZF 区 15 个 STS 多重 PCR 产物分析

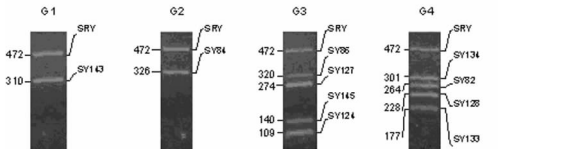


图 3 AZFc 伴部分 AZFd 亚区微缺失患者多重 PCR 产物分析

3 讨 论

Y 染色体为男性特有单倍体,其长臂上的男性特异性区域 (male-specific region of the Y, MSY) 内密集排列着大量生精相关基因,一旦 Y 染色体结构变化累及 MSY 内的相关功能基因,可能导致生精障碍^[2]。序列分析表明,Y 染色体 MSY 存在大量具有高度同源性的 DNA 重复序列,易发生染色体内非等位性重组,使 Y 染色体具备高变异率,容易引起生精相关基因的缺失或重复,与男性不育的高度异质表型密切相关^[3]。

AZF 区域微缺失与男性异常生精表型密切相关,被认为是导致男性无精症与严重少精症的最常见分子遗传学机制^[1,4-9]。AZF 定位于 Y 染色体 q11. 22 ~ q11. 23,分为 AZFa~c 共 3 个亚区^[1,10]。流行病学研究表明,无精症、寡精症患者 AZF 微缺失发生率为 10% ~ 15%,仅次于 Klinefelter's 综合征^[11]。其中,AZFc 区是 AZF 微缺失热点区,AZFa 或 AZFb 微缺失患者一般表现为唯支持细胞综合征或生精阻滞,睾丸内无精子产生,而 AZFc 区缺失可以出现不同的临床表型^[5,12]。研究发现,无精症缺失基因 (Deleted in Azoospermia gene, DAZ) 定位于 Y 染色体长臂 AZFc 内,在睾丸组织中特异表达,在大多数个体中有 4 种拷贝 (DAZ1、DAZ2、DAZ3 和 DAZ4),其产物为 RNA 结合蛋白,可能在生精过程中发挥着重要作用^[10,13-14]。

迄今已发现超过 12 个 Y 染色体微缺失位于 AFZ 区。本研究采用多重 PCR 技术对 Y 染色体上的 15 个 STS 进行扩增,囊括了 2004 年欧洲男科学会 (European Academy of Andrology, EAA) 和欧洲分子遗传学质量控制体系 (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) 推荐的位点,理论上可检出 95% 以上的微缺失。结果显示,健康男性 STS 带型完整,PCR 产物片段大小符合预期,无杂带,扩增产物量相近,且结果易判读,试验成功率达 100%;不育患者中检出 AZFc 伴部分 AZFd 亚区微缺失患者 1 例,患者表现为无精子症,并检出 1 例 Klinefelter's 综合征。电泳分析显示患者标本内对照 ZRY 有扩增,而 sY254 和 sY255 无扩增,表明患者 DAZ 基因所有拷贝均缺失。

目前,国外 AZF 区域微缺失筛查主要用于辅助生殖中原发性无精与严重少精症患者精子质量分析及预后判断,避免遗传缺陷的垂直传递,并为生精表型异常患者的临床治疗提供重

要参考^[1-10,15]。在中国,AZF 区域微缺失研究相对滞后,存在 AZF 微缺失检测指征把握不严、检测扩大化的趋势^[10]。Y 染色体微缺失类型、缺失频率在不同民族间的差异性尚待大样本的流行病学调查。现有资料表明:(1)Y 染色体微缺失主要发生于精子密度小于 1×10^6 /mL 的不育男性中,而在精子密度大于 5×10^6 /mL 男性中,微缺失发生频率极低;(2)AZFc 区微缺失约占 60%,AZFb、AZFb + c、AZFa + b + c 微缺失约占 35%,AZFa 微缺失仅占约 5%^[10]。

本研究显示,以多重 PCR 技术进行 Y 染色体微缺失快速筛查,特异性好,操作简便,结果易判读,检测成功率达 100%。该技术的建立将为研究无精症与严重少精症患者 AZF 微缺失与异常生精表型的关系,探讨 Y 染色体微缺失类型及缺失频率的民族差异性奠定基础,也将在辅助生殖中男性生精遗传缺陷筛查、避免 Y 染色体微缺失的垂直传递中发挥重要作用。

参考文献

[1] 蔡志明. Y 染色体及其微缺失与男性不育:过去、现在与将来[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(5): 387-394.
[2] 史铁超,魏莉. 性染色体与男性不育[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(5): 460-467.
[3] Viswambharan N, Suganthi R, Simon AM, et al. Male infertility: polymerase chain reaction-based deletion mapping of genes on the human chromosome[J]. Singapore Med J, 2007, 48 (12): 1140-1142.
[4] Bor P, Hindkjaer J, Ingerslev HJ, et al. Multiplex PCR for screening of microdeletions on the Y chromosome[J]. J Assist Reprod Genet, 2001, 18(5): 291-298.
[5] Osborne EC, Lynch M, McLachlan R, et al. Microarray detection of Y chromosome deletions associated with male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(6): 673-680.
[6] 卜莹,黄欢,武海萍. 全血直接多重 PCR 法快速检测 Y 染色体微缺失[J]. 中华医学遗传学杂志, 2008, 25(4): 406-409.
[7] 张华俊,金保方. AZF 与男性不育研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(2): 166-169.
[8] Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility[J]. Singapore Med J, 2009, 50(4): 336-347.
[9] Li Z, Haines CJ, Han Y. "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility[J]. J Genet Genomics, 2008, 35(4): 193-199.
[10] 杨元,张思仲. Y 染色体变异与男性不育[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(3): 276-281.
[11] Koh E, Maeda Y, Choi J, et al. Disorder of AZF[J]. Nippon Rinsyo, 2006, 64(Suppl2): 284-287.
[12] Blagosklonova O, Fellmann F, Clavequin MC, et al. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(9): 795-799.
[13] Abdelmoula NB, Sallemi A, Chakroun N, et al. Evaluation of DAZ microdeletions in 34 infertile men[J]. Arch Androl, 2006, 52(3): 175-178.
[14] Ferlin A, Bettella A, Tessari A, et al. Analysis of the DAZ gene family in cryptorchidism and idiopathic male infertility[J]. Fertil Steril, 2004, 81(4): 1013-1018.
[15] McLachlan RI, O'Bryan MK. State of the art for genetic testing of infertile men[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95 (3): 1013-1024.