

· 技术研究 ·

用全染色体涂抹探针进行卵母细胞第一极体荧光原位杂交

任秀莲, 庄广伦, 徐艳文, 周灿权, 方 丛, 张敏芳
(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立用全染色体涂抹探针(WCP)对卵子第一极体进行荧光原位杂交(FISH)检测染色体的方法。【方法】收集单精子卵胞浆内注射(ICS)中不成熟卵母细胞经体外培养成熟和常规试管婴儿(IVF)中未能成功受精的成熟卵母细胞, 活检第一极体, 固定后行 13、14 号染色体的全染色体涂抹探针荧光原位杂交。活检后, 一部分卵母细胞固定行 FISH 以分析卵子自身的 13、14 号染色体, 其余行 ICSI 受精, 观察受精和卵裂情况。【结果】共获得成熟母细胞 93 个, 成功活检 85 个, 成功固定 78 个, 共 29 个第一极体处于分裂中期, 均有 FISH 结果。卵母细胞体外培养成熟后立即取极体进行固定, 90.5%(19/21) 的极体处于分裂中期, 而取卵后 30~48 h 和 72 h 后活检的第一极体处于分裂中期的比例分别为 27.3%(6/22) 和 11.4%(4/35), 3 组相比有统计学差异 ($P < 0.01$)。11 个卵母细胞同时获得了极体和相对应卵细胞的 FISH 结果, 其中 10 个极体和相对应的卵细胞分别有 1 条 13、14 号染色体, 剩余 1 个卵母细胞的极体有 2 条 14 号染色体和 1 条 13 号染色体, 相对应的卵细胞仅有 1 条 13 号染色体, 二者互补。活检后行 ICSI 受精的卵母细胞受精率为 78.6%(11/14), 优质胚胎率 45.5%(5/11)。【结论】全染色体涂抹探针对于卵子第一极体进行遗传分析可以有效、准确地推测相对应卵母细胞的染色体构成, 从而应用于女性染色体易位患者的植入前遗传诊断。

关键词: 全染色体涂抹探针; 第一极体; 荧光原位杂交; 卵母细胞

中图分类号: R

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0109-04

Application of Whole Chromosome Painting Probes in Fluorescence In-situ Hybridization of First Polar Bodies

REN Xiu-lian, ZHUANG Guang-lun, XU Yan-wen, ZHOU Can-quan, FANG Cong, ZHANG Min-fang
(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To establish the method of chromosome analysis of first polar bodies (1PBs) by using whole chromosome painting probes in fluorescence in-situ hybridization (FISH).【Methods】Oocytes that failed to fertilize after in vitro fertilization (IVF) or oocytes matured in vitro from immature oocytes in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were used for this study. The first polar bodies were biopsied and fixed. Whole chromosome painting probes 13, 14 were analyzed in FISH. After biopsy, parts of the oocytes were fixed for FISH, while the rest were fertilized by ICSI. Fertilization rate and cleavage rate were observed.【Results】Of the 93 matured oocytes collected, 85 were successfully biopsied and 78 were fixed. Altogether 29 1PBs were at metaphase stage and got FISH results. First polar body chromosomes fixed immediately after maturation in vitro were found to be at metaphase stage in 90.5% (19/21) cases. However, the metaphase degenerated soon after oocyte retrieval. For the 1PBs biopsied 30~48 h and > 72 h after oocyte retrieval, only 27.3%(6/22) and 11.4%(4/35) were at metaphase stage respectively ($P < 0.01$). FISH analyses of the 1PBs and the corresponding MII oocytes (MII) showed concordance in the pair. Of the 11 oocytes with FISH results available for both the polar bodies and the complementary MII oocytes, numerically normal chromosome 13 and 14 were obtained in 10 1PB-MII doublets, the other one was chromosomally abnormal with two chromosome 14, one chromosome 13 in the polar body and only one chromosome 13 in the oocyte. The fertilization rate and good embryo rate of the oocytes fertilized by ICSI after biopsy were 78.6%(11/14) and 45.5%

收稿日期: 2005-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200301)

作者简介: 任秀莲(1977-), 女, 辽宁朝阳人, 博士生; 徐艳文, 副研究员, 通讯作者, E-mail: xuyanwen@pub.guangzhou.gd.cn

(5/11) respectively. 【Conclusions】 The analysis of 1PBs by using whole chromosome painting probes is an accurate and effective way to diagnose the chromosome constitutes of the MII oocytes and can be applied to PGD for female carriers of translocation.

Key words: whole chromosome painting probe; first polar body; fluorescence in situ hybridization; oocyte

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006,27(1):109-112]

染色体易位是最常见的染色体结构异常。据 Stern 等^[1]报道,平衡易位在一般人群中的发病率为 0.1%,在不孕夫妇中占 0.6%,在有 10 次以上 IVF 周期失败的夫妇中达 3.2%,在习惯性流产的夫妇中更是高达 9.2%^[1]。尽管染色体易位患者自身表型正常,但可产生不平衡的配子,因而常常发生反复自然流产、死胎或生育染色体异常后代。植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术对染色体易位患者的胚胎进行染色体检测,选择正常或平衡的胚胎移植入子宫腔,使易位患者的自然流产率由自然周期的 95%降至 PGD 周期的 13%^[2]。目前 PGD 多数采用活检处于分裂间期的卵裂球进行荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH),其缺点是不能区分正常和平衡易位的胚胎^[3]。而对于女性易位携带者,还可以通过卵子第一极体的检测推断卵子正常与否。第一极体的染色体在排卵后的短时间内处于分裂中期,可用全染色体涂抹探针 (whole chromosome painting probe, WCP) 通过 FISH 方法检测其染色体的构成,从而区分正常和平衡的卵子^[4]。目前,通过第一极体对女性易位患者进行 PGD 的报道较少,本研究拟建立应用 WCP 进行第一极体染色体分析的方法,旨在将其应用于临床,降低染色体易位患者的自然流产率,使其能够生育表型和基因型均正常的健康后代。

1 材料与方法

1.1 材料

所有卵母细胞均来源于 2005 年 1 月-6 月在中山大学附属第一医院生殖中心行体外受精-胚胎移植中废弃的卵子,所有患者均签署知情同意书。卵母细胞根据卵龄和来源不同分为以下 3 组:A 组收集单精子卵胞浆内注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 的不成熟卵母细胞,进行体外培养成熟 (in vitro maturation, IVM),每 4~6 h 观察一次卵母细胞成熟情况,一旦成熟,立即活检取出第一极体,共获得 25 个“新鲜”成熟卵母细胞;B 组为 26 个常规试管婴儿 (in vitro fertilization - embryo transfer, IVF-ET) 中未能成功受精的成熟卵母细胞,在取卵后 30~48 h (D1 或 D2) 活检第一极体;C 组 42 个 IVF-ET 中未能成功受精的成熟卵母细胞,培养至取卵 72 h 后 (D3) 活检第一极体。ICSI 中不成熟卵母细胞的判断标准为:取卵后 3~5 h 去除卵丘颗粒细胞后观察,生殖泡期 (GV) 或第一次减数分裂中期 (MI) 的卵母细胞,卵周间隙未见第一极体。IVF 中未受精的成熟卵母细胞的判断标准为:IVF 受精 16~20 h 后卵细胞胞浆内未见原核,卵周隙内仅见第一极体,于 4 h 后再观

察一次,如仍未见原核形成,则作为未受精卵母细胞。优质胚胎的标准为细胞数大于 5 个,细胞大小均匀,碎片少于 20%,且为局部分布。

1.2 方法

1.2.1 对照淋巴细胞培养 用染色体核型正常男性外周血淋巴细胞作探针 FISH 杂交率的对照。淋巴细胞培养、低渗处理、固定及玻片制备方法参阅文献^[5]。

1.2.2 不成熟卵母细胞体外培养 将 MI、GV 期卵母细胞置成熟培养液 (MediCult IVM[®] Denmark, +0.075 IU/mL FSH + 0.1 IU/mL LH + 体积分数 10%血清),在 37 体积分数 6%CO₂ 培养箱中进行培养。

1.2.3 极体活检 活检过程在配备有 Narishige 显微操作系统的 Nikon (TE300) 倒置显微镜上进行。切割针及活检针均自备,平口活检针内径 20 μm。采用机械法进行极体活检,将极体置于 5 点钟部位,调整切割针,使其从 4 点钟至 7 点钟方向进行切割,然后调整极体在 3 点钟部位,用平口活检针吸出极体。

1.2.4 卵母细胞的处理 活检后,成功固定 A 组中 21 个卵细胞 (“新鲜”成熟卵母细胞) 的第一极体,随机挑取其中 14 个卵细胞进行 ICSI 受精,受精后 16~18 h、60 h 分别观察胚胎形态,剩余卵母细胞则和极体分别进行固定。而 B 组和 C 组卵母细胞 (IVF 中未受精的成熟卵母细胞),在活检后全部进行固定。

1.2.5 固定 极体固定:取单个极体放入 10 g/L 柠檬酸钠+6 g/L 胎牛血清的低渗溶液中,室温下低渗处理 8~10 min 后,将其转移至载玻片上,用约 10 μL 固定液 (3:1 甲醇/冰醋酸) 从极体上方轻滴在玻片上。将玻片放入 -20 保存,备用。卵母细胞固定:将卵母细胞放入 6.6 g/L 柠檬酸钠+6 g/L 胎牛血清的低渗液中,室温下低渗处理 10 min,将其转移至载玻片上,用约 10 μL 固定液 (3:1 甲醇/冰醋酸) 从卵母细胞上方约 3 cm 处轻滴在玻片上^[6]。将玻片放入 -20 保存,备用。

1.2.6 FISH 选用美国 Vysis 公司的 13 号、14 染色体的全染色体涂抹探针:WCP13 (绿色标记) 和 WCP14 (橙色标记)。FISH 按厂家提供方法进行:玻片在 73 的体积分数 70% 的甲酰胺/2×SSC 中变性 5 min; 探针在 73 变性 5 min; 将变性好的探针混合液加入玻片标记好的杂交区内,覆盖干净盖玻片,边缘用封片胶封片; 置于 37 湿盒杂交 12 h; 小心揭去盖玻片后,将玻片置于 73 0.4×SSC/体积分数 0.3% Nonidet P40 中 2 min,室温下 2×SSC/体积分数 0.1% NP 40 中 1 min 洗脱非特异性杂交; 二脒苯基吲哚 (diamidino-phenyl-indole, DAPI) 复染; 荧光显微镜 (Olympus, BX60) 下观察结果,分别用相应滤光片观察结

果, CCD 照相机摄取图片, 信号分析采用 LUCIA Cytogenetics 染色体软件分析系统 (Laboratory Imaging Ltd, Prague, Czech)。

1.3 统计学处理 组间率的差异性采用 χ^2 检验进行分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 对照淋巴细胞 FISH

在对照的男性淋巴细胞中, 共计数 200 个处于分裂中期的淋巴细胞, 有杂交信号 198 个, 杂交率 99.0%, 其中显示正常 13,13/14,14 的 187 个, 占 94.4%, 剩余 11 个异常。

2.2 极体活检和固定

共获得成熟卵母细胞 93 个, 8 个活检失败, 其中有 5 个由于极体碎片状, 吸出后完全碎裂, 3 个由于活检时将卵胞浆吸出, 卵细胞死亡。成功活检 85 个, 活检成功率 91.4%。对成功活检的 85 个第一极体进行固定, 7 个极体在固定过程中丢失, 其中 4 个由于极体碎片在转移过程中破裂, 3 个在滴固定液至玻片时流失, 成功固定 78 个, 固定成功率 91.8%。A 组、B 组、C 组成功固定的极体数分别为 21 个、22 个、35 个, 3 组之间的活检成功率、固定成功率无显著差异 ($P>0.05$), 详见表 1。成功固定的 78 个极体, 共 29 个处于分裂中期, 可进行 FISH, 其中 A 组 19 个, B 组 6 个, C 组 4 个。A 组卵母细胞成熟后立即取第一极体进行固定, 90.5% 的染色体处于分裂中期, B 组和 C 组随着取卵后时间的延长, 第一极体染色体处于分裂中期的比例降低, 3 组相比差异有显著性 ($\chi^2=36.4, P<0.01$), 详见表 1。

表 1 第一极体固定时间和染色体时相的关系

Table 1 Metaphase degeneration of first polar bodies in relation to time after oocyte retrieval

Group	Oocytes Biopsied	Fixed polar oocytes	Fixed polar bodies	Polar bodies at metaphase
A	25	23	21	19
B	26	24	22	6 ¹⁾
C	42	38	35	4 ¹⁾
total	93	85	78	29

1) Compare with group A, $\chi^2=36.4, P<0.01$

2.3 极体和卵母细胞 FISH

29 个处于分裂中期的极体均有 FISH 结果, 其中 28 个的 13、14 号染色体是正常的 (图 1), 仅 A 组中的 1 个极体染色体异常, 有 2 条 14 号染色体和 1 条 13 号染色体信号 (图 2)。将相对应的 15 个卵母细胞固定后 (A 组 5 个, B 组 6 个, C 组 4 个) 进行全染色体涂抹探针 FISH 分析, 获得 11 个可分析的结果 (73.3%), 其中 10 个卵母细胞的 FISH 结果正常, 和相对应的极体相符, 仅 A 组中有 1 个卵细胞显示 1 条 13 号染色体信号, 而相对应的极体有 2 条 14 号染色体和 1 条 13 号染色体信号, 二者是互补的 (图 2)。剩余

4 个卵母细胞固定后由于胞浆过度残留无信号。

2.4 活检后卵母细胞体外培养情况

体外培养成熟的卵母细胞有 14 个在活检后进行 ICSI 受精, 受精后 16~18 h 观察原核形态, 正常双原核受精 11 个, 单原核 1 个, 未受精 2 个, 受精率 78.6% (11/14)。受精后 60 h 观察, 除未受精的 2 个, 其余 12 个全部发生卵裂, 优质胚胎率 45.5% (5/11), 但无囊胚形成。

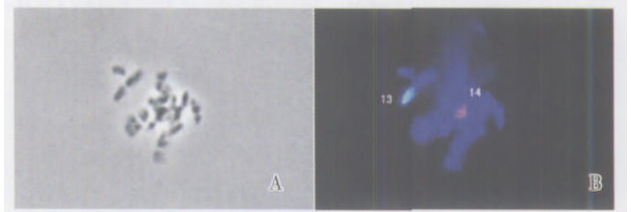


图 1 处于分裂中期的第一极体染色体

Fig. 1 Metaphase chromosome of first polar body (400 \times)

A: Human first polar body (1PB) chromosome by phase contrast microscopy; B: The same 1PB complement showing painting of chromosome 13 with the WCP 13 Spectrum Green and painting of chromosome 14 with WCP 14 Spectrum Orange



图 2 异常第一极体及相应卵母细胞 FISH 结果

Fig. 2 FISH results of an abnormal first polar body (1PB) and the corresponding oocytes (400 \times)

A: Abnormal 1PB chromosome complement showing two chromosomes 14 and one chromosome 13 hybridized with WCP 14 Spectrum orange and WCP 13 Spectrum green. B: The corresponding metaphase II oocytes showing no chromosome 14 and one chromosome 13 with the same probes

3 讨 论

自 1990 年世界上首例采用 PGD 技术的婴儿诞生以来^[7], 对第一极体进行分析已应用在单基因疾病^[8]和非整倍体筛查^[9,10]的植入前遗传学诊断中。1998 年 Munne 等^[4]首次应用第一极体对女性染色体易位携带者进行 PGD, 获得了成功妊娠^[4], 但由于极体活检和固定的难度高, 以及极体本身一些生物学特性的限制, 应用全染色体涂抹探针对第一极体进行 FISH 的研究不多, 我国尚未见相关报道。

3.1 第一极体 FISH 效率分析

全染色体涂抹探针和整条靶染色体特异性进行杂交, 可用于诊断染色体的结构, 区分正常和易位染色体。应用 WCP 进行极体 FISH 分析的机理是在排卵后的短时间内, 大多数的第一极体的染色体处于分裂中期, 可以应用全染

染色体涂抹探针分析,而随着第一极体排出时间的延长,极体退化,该比例也逐渐下降。能否获得分散较好的分裂期染色体是影响 FISH 有效性的一个关键因素。本研究中将不成熟卵母细胞培养成熟后立即活检,有 90.5%的染色体处在分裂中期,获得了清晰的 FISH 结果,和文献报道的在取卵后 6 h 内超过 90%的第一极体染色体处在分裂中期的观察结果相符^[4]。因此,为获得更多的可供 FISH 分析的第一极体染色体,应在取卵后立即取出第一极体进行固定。影响极体 FISH 有效性的另一因素是极体相对于卵裂球明显小,活检和固定有一定的难度,本研究的活检成功率和固定成功率分别为 91.4%和 91.8%,活检成功率和卵裂球相当,但固定成功率略低于卵裂球的固定率^[11]。极体呈碎片状是影响活检和固定的一个重要因素,本研究中 8 个活检失败的卵母细胞有 5 个是由于极体碎片化,吸出后完全碎裂,而 7 个固定失败的极体有 4 个是由于极体的碎片化,在转移极体过程中碎裂丢失。因此,对于已呈现部分碎片的极体,在活检和固定过程中一定要谨慎。但是只要获得处于 MII 期的极体并成功固定,其 WCP 的 FISH 杂交率可满足 PGD 的要求。本研究中 29 个处于 MII 期的极体均有 FISH 结果。

3.2 极体活检的安全性

活检的安全性也是进行 PGD 必须认真考虑的问题,本研究中对于体外培养成熟的卵母细胞,在极体活检后行 ICSI 受精的受精率可以达到 78.6%,优质胚胎率 45.5%,表明取极体不影响卵子的正常发育与受精。但本研究中无囊胚形成,可能和样本量小,卵母细胞体外成熟过程影响卵子质量有关。文献报道亦表明进行极体活检后的卵母细胞的受精率、卵裂率、囊胚形成率与未活检的卵母细胞无显著差异,其胚胎植入率也无差异。而对已出生的 109 例经过极体活检的新生儿进行随访未发现异常,也证明极体活检是安全的^[12]。

3.3 第一极体 FISH 诊断的准确性

第一极体是卵母细胞发生第一次减数分裂的产物,极体和相对应的卵母细胞的染色体组成呈镜像互补(mirror image)的关系。理论上,通过对极体的分析,可以间接推测卵母细胞的染色体组成,但是由于第一极体的染色体较短,且在 FISH 之后处于膨胀状态,丧失了最初的形态,给诊断带来了一定的困难,而且在极体活检和固定过程中有可能人为的造成染色体的丢失,因此极体诊断的准确性也一直是学者所关注的问题。本研究中同时对 11 个卵母细胞及其相对应的极体进行了成功固定,获得了可分析的 FISH 结果,其中 10 对是正常的,剩余 1 个卵母细胞在第一次减数分裂过程中发生错误,极体多了 1 条 14 号染色体,相对应的卵母细胞则缺少 14 号染色体,二者亦是互补的。本研究结果证实了第一极体分析结果可代表相对应的卵母细胞。文献报道亦证实,采用着丝粒探针(CEP)、端粒探针(Tel)、WCP 对极体分析的结果和相应卵母细胞分析结果是一致的^[13]。

对于染色体结构异常的患者,选择 PGD 中诊断染色体正常的胚胎才能最终实现优生的目的,因此采用 WCP 进行第一极体染色体的 FISH 有其特殊的临床应用价值,可能成

为女性染色体易位患者 PGD 的最佳选择。

参考文献:

- [1] STERN C, PERTILE M, NORRIS H, et al. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(8):2097-2101.
- [2] MUNNE S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001 (183):S55-558.
- [3] MUNNE S, SANDALINAS M, ESCUDERO T, et al. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1209-1218.
- [4] MUNNE S, SCOTT R, SABLE D, et al. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin[J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(4): 675-681.
- [5] 章静波. 细胞生物学常用方法与技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995: 3-5.
- [6] MUNNE S, DAILEY T, SULTAN KM, et al. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy[J]. *Hum Reprod*, 1995,10(4):1014-1420.
- [7] HANDYSIDE AH, KONTOGIANNI EH, HARDY K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification [J]. *Nature*, 1990, 344(6268) : 768-770.
- [8] RECHITSKY S, VERLINSKY O, KULIEV A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for familial dysautonomia[J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 6(4): 488-493.
- [9] KULIEV A, VERLINSKY Y. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2004, 10(5): 401-407.
- [10] PELLESTOR F, ANAHORY T, HAMAMAH S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures[J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(1):15-32.
- [11] XU Y, ZHUANG G, SHU Y, et al. Preimplantation gender diagnosis by fluorescence in situ hybridization[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115(6):874-877.
- [12] STROM CM, LEVIN R, STROM S, et al. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants[J]. *Pediatrics*, 2000, 106(4): 650-653.
- [13] DURBAN M, BENET J, BOADA M, et al. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(6): 591-602.

(编辑 张恩健)