

用精子核荧光原位杂交方法检测罗式易位携带者的配子发生率

方 丛¹, 庄广伦¹, 徐艳文¹, 陈 争²

(中山医科大学 1. 附属第一医院生殖医学中心; 2. 医学遗传教研室, 广东 广州 510080)

关键词: 荧光原位杂交; 染色体; 精子; 罗式易位(自由词)

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-封2, 插页2 封3

罗式易位是常见的染色体结构异常, 在新生儿中的出现率为 1/1 000^[1]。患者由于在减数分裂时可形成不平衡配子, 因而常伴随不育、反复自然流产、死胎或生育染色体异常后代。通过观察出生儿的染色体情况得到的统计数字不能完全反映其配子生成的染色体分离规律, 因为有一部分致死型的配子由于早期自然流产而不能被观察到。而通过荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)方法可以快速检测大量精细胞的染色体情况^[2]。本文通过精子核 FISH 的方法对一罗式易位男性携带者进行其配子发生率的初步探讨。

1 资料与方法

1.1 病例介绍

32岁男性, 已婚6年未育, 外周血染色体核型分析诊断为罗式易位: 45, XY, t(13q14q)。

1.2 方法

1.2.1 探针 选用 Vysis LSI 13q14(绿色标记), Tel Vysion14q(橙色标记)探针, 在 7 μL 杂交缓冲液内加 0.5 μL 探针, 振荡、离心后备用。

1.2.2 探针的外周血淋巴细胞对照 用正常男性外周血淋巴细胞作 FISH 杂交率的对照。

1.2.3 精子标本制备 患者用手淫方法取精, 精液液化后, 离心, 沉淀加 PBS 离心 2 次, 用固定液甲醇:冰醋酸(3:1)适当稀释后, 滴片。对照者为正常健康男性, 用相同方法取精及精液处理。

1.2.4 精子 FISH 步骤 ①将制备好的玻片置于 10 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothriitol, DTT)/0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(tris-hydroxy-methyl-aminomethane, Tris)中 30 min, 再置于 10 mmol/L 3, 5-diiodosalicylic acid lithium salt(LIS)/0.001 mol/L DTT/0.1 mol/L Tris 中 3~4 h。用 2×氯化钠/柠檬酸钠缓冲液(SSC)冲洗, 系列酒精脱水。②玻片置于 73 °C 70%的甲酰胺中变性 5 min, 系列酒精脱水。③探针在 73 °C 变性 5 min。④标本上加探针, 加盖玻片, 封口, 放入湿盒内。⑤37 °C 杂交 4~6 h。⑥去盖玻片后, 将玻片置于 73 °C 0.4×SSC/0.3%乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40)中 2 min, 室温下 2×SSC/0.1%NP-40 中 1 min 洗脱非特异性杂交。⑦加 10 μL 1.25 μg/L 的 4, 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)复染。⑧奥林巴斯 B×650 荧光镜下观察结果。如显示 1 个橙色信号与 1 个绿色信号判断为正常, 因所用探针为染色体长臂特异片段的探针, 因而记录为 13q/14q; 仅显示 1 个橙色信号的精子为 13 号染色体缺体, 记录为-14q; 显示 1 个橙色、2 个绿色信号的精子为 13 号染色体双体, 记录为 13q, 13q/14q 依此类推。

2 结 果

2.1 淋巴细胞 FISH 结果

(下转插页 2)

收稿日期: 2000-08-10

基金项目: 部分获卫生部临床学科重点项目(50)资助

作者简介: 方 丛(1970-), 女, 河南郑州人, 博士, 主治医师, 导师庄广伦教授, 专长生殖医学。

(上接封2)

计数 505 个淋巴细胞, 有信号的 495 个细胞, 杂交率 98.02%, 其中显示 13, 13/14, 14 的 454 个, 占 91.72%。

2.2 精子 FISH 结果

观察计数精子 1 618 个, 有信号 1 524 个 (94.19%), 对照者精子 2 138 个, 有信号 2 053 个 (96.02%), 其结果如表 1, 精子结果见图 1。

表 1 45, XY, t (13q 14q) 患者及对照者精子 FISH 结果

Table 1 Result of sperm FISH in a 45, XY, t (13q 14q) patient and in a control case Case(%)

Chromosome	Number of sperm (percentage)	
	Patient	Control
13q/14q	757(49.67)	2 004(97.61)
13q/14q, 14q	126(8.27)	1(0.05)
13q/-	117(7.68)	1(0.05)
13q, 13q/14q	135(8.86)	11(0.54)
-/14q	79(5.18)	0
13q, 13q/14q, 14q	214(14.04)	29(1.41)
Trisomy	43(2.82)	1(0.05)
Others	53 ¹⁾ (3.48)	7(0.34)
Total	1 524	2 053

1) Include 4 of 13q, 13q, 13q/14q (0.26%), 16 of 13q, 13q/14q, 14q 3 of 13q, 13q, 13q/14q, 14q (1.97%), 23 of 13q/14q, 14q (1.51%), 4 of -/14q, 14q (0.26%) and 3 of 13q, 13q/14q, 14q (1.97%)

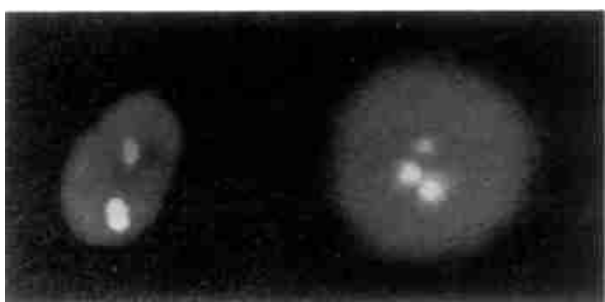


图 1 患者精子 FISH 结果

Fig 1 FISH results on spermatozoa of the patient

One normal or balanced sperm with signals for LSI 13q14 (green), Tel 14q (orange); one unbalanced sperm with a signal for Tel 14q and twice for LSI 13q14

3 讨论

由于人精子产生的数量巨大, 如能对精子的染色体结构进行分析, 则可准确分析染色体异常患

者的染色体减数分裂规律提供大样本研究的途径。Martin^[3]通过人精子仓鼠卵融合技术对罗式易位携带者的精子染色体核型进行分析, 从分析的 116 条精子得出的结果认为罗式易位患者的交互型分离(产生正常与平衡的配子)占优势(74%)。虽然通过人精子仓鼠卵融合技术可以精确分析所有染色体的全部结构异常情况, 但缺点是这项技术很费时、费力, 由于只有能与仓鼠卵子融合的精子才能进行研究, 因而使可供研究的样本量减小。而用 FISH 方法可以快速检测大量精子细胞的染色体情况^[2], 但缺点是难以同时观察全部染色体的结构。

罗式易位携带者理论上可产生 6 种类型的配子。本研究中, 罗式易位交互分离产生的配子占 49.67%(包括正常及平衡的配子), 邻位-1 型和邻位-2 型分离产生的配子共占 29.99%, 提示交互分离占一定的优势。值得注意的是, 理论上 13q/14q, 14q 与 13q/-、13q, 13q/14q 与 -/14q 所占的比例应相同, 但本研究中其比例均不同。Rousseaux 等^[4]对一罗式易位携带者 t(14q21q)作精子 FISH 研究中以及 Martini 等^[5]在对 1 例 t(3; 11)(q27.3; q24.3)患者的精子 FISH 的研究中均显示同一种类型的分离产生的两种配子所占比例有差异。分析原因可能是由于不同的探针对精子的杂交率不同以及观察误差所致。

Rousseaux 等^[4]在研究中发现患者的精子中的二倍体及多倍体均高于正常对照者, 本研究结果亦证实这一点, 但是否提示染色体异常者的减数分裂过程中, 染色体不分离现象更多见还有待于更多的样本及对不同类型的染色体异常患者的分析。

用 FISH 方法对染色体结构异常患者的精子进行分析, 可以了解其分离规律, 并为优生优育咨询提供更客观的数据。

参考文献:

- [1] Coon C M, Harper J C, Winston R M L, et al. Infertile couples with Robertson translocations; preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions [J]. Hum Genet, 1998, 102(1): 117.
- [2] Lu Y, Hammit D, Zinsmeister A, et al. Dual color fluorescence in situ hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2; 4; 8)(q23; q27; q21) [J]. Fertil Steril, 1994, 62(2): 394.

(下转封3)

(上接插页 2)

- [3] Martin R H. Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13; 14 Robertsonian translocation [J] . Hum Genet, 1988 80(3): 357.
- [4] Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, *et al.* Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(914q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes [J] . Hum Genet,

1995, 96(4): 655.

- [5] Martini E, von Bergh ARM, Coonen E, *et al.* Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3; 11)(q27. 3; q24. 3) by triple FISH [J] . Hum Genet, 1998, 102(2): 157.

(编辑 关淡庄)

(上接第 80 页)

利用 DIG 标记的瘦素 cDNA 探针进行的 RNA 斑点杂交结果显示汉族肥胖症患者腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 水平明显高于正常体重者, 且与 BMI 呈正相关关系。我们的结果与 Vidal^[6] 和 Considine^[7] 等在不同肥胖人群中检测到的结果一致, 可见在不同人群中大多数肥胖个体脂肪组织中瘦素 mRNA 表达均呈异常增高, 此异常增高无种族差异性。BMI 可作为肥胖程度的粗略指标, 脂肪组织瘦素 mRNA 水平与 BMI 呈正相关, 提示瘦素基因表达水平与个体肥胖程度相关。目前多项研究提示人类肥胖者中瘦素基因突变罕见^[3], 结合本组结果说明大多数肥胖患者脂肪细胞表达瘦素基因产物的功能是正常的, 推测多数的肥胖缺陷并不是由于瘦素基因产物绝对不足, 而可能是机体对内源性瘦素基因信号敏感性下降所致。

参考文献:

- [1] Halaas J L, Gajiwala K S, Maffei M, *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese

gene [J] . Science, 1995, 269(5223): 543.

- [2] Maffei M, Stoffel M, Barone M, *et al.* Absence of mutations in the human ob gene in obese/ diabetic subjects [J] . Diabetes, 1996, 45(5): 679.
- [3] Strobel A, Issad T, Camoin L, *et al.* A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity [J] . Nature Gene, 1998, 18(3): 213.
- [4] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects [J] . Nature Med, 1995, 1(11): 1155.
- [5] 徐明彤, 吕 凌, 钟光恕, 等. 人瘦素基因克隆与序列测定 [J] . 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 104.
- [6] Vidal H, Auboeuf D, Vos P D, *et al.* The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue [J] . J Clin Invest, 1996, 98(2): 251.
- [7] Considine R V, Sinha M K, Heiman M L, *et al.* Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans [J] . New Engl J Med, 1996, 334(5): 292.

(编辑 黄小延)

· 简 讯 ·

中国高等学校自然科学学报研究会 第 8 次学术年会报道

中国高校自然科学学报研究会第 8 次学术年会于 2000 年 11 月 26~30 日在河南省开封市召开。会议中心议题是:“21 世纪初我国高校自然科学学报面临的形势和对策”。参加会议来自全国高校自然科学学报的主编、编辑及有关人员约百余人, 提供大会学术研讨的论文约 80~90 篇。其内容均围绕着新经济时代需要建立什么样的编辑人才理念与传统编辑人才观有何不同; 网络将怎样影响传统的高校学报的属性、地位、作用和办刊模式; 高校学报深化改革的方向和集团化的前景; 合并后的高校如何进一步办好学报; 高校学报英文版的作用、地位和前景; 影响我国高校进入国际著名检索系统的因素是什么; 有关编辑学理论与编辑工程问题……等。

会上发言、分组讨论热烈, 会后评出优秀论文 1、2、3 等奖共 87 篇, 我校学报也参与会议论文也获了奖励。

(学 讯)