

°技术交流°

# 种植前人胚胎细胞荧光原位杂交检测染色体非整倍体<sup>①</sup>

李晓红 庄广伦

(中山医科大学附属第一医院生殖医学中心; 广州, 510080)

**摘要** 目的: 建立应用 13/21 染色体特异性探针荧光原位杂交技术(FISH)检测种植前人类胚胎 13/21 染色体非整倍体的方法。方法: 应用 FITC 标记的 13/21 染色体着丝粒部位杂交的  $\alpha$  卫星重复序列探针针对 27 个未受精卵母细胞和 36 个多精受精胚胎的卵裂球进行原位杂交。结果: 单倍体卵母细胞核呈现 2 个杂交信号, 固定率 80%, 杂交效率 67%; 多精受精胚胎的卵裂球核呈现 6 个杂交信号, 固定率 72%, 杂交效率 65%。结论: 应用荧光原位杂交技术在卵母细胞和胚胎细胞可检测 13/21 染色体非整倍体。

**关键词** 非整倍体性; 染色体畸变; 胚泡; 原位杂交; 荧光

**中图分类号** R 711.6

## Detection of Aneuploides of Chromosome in Human Blastomeres *in Vitro* by FISH

Li Xiaohong Zhuang Guanglun

(Department of Obstetric and Gynecology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

**Abstract Objective:** To study the aneuploidy of chromosome 13 and 21 in blastomeres developed *in vitro*.

**Methods:** Using alpha satellite repetitive probe specific for chromosome 13 and 21, hybridizing 27 infertilization ovum and 36 blastomeres from polyspermic embryos for inter-FISH. **Results:** Ovum produced 2 hybridization signals, fixing rate was 80%, hybridization rate was 67%; Blastomeres produced 6 hybridization signals, fixing rate was 72%, hybridization rate was 65%. **Conclusions:** FISH can detect chromosome aneuploidy effectively in ovum and blastomeres and can be applied to preimplantation genetic diagnosis.

**Subject headings** aneuploidy; chromosome aberrations; blastocyst; in situ hybridization, fluorescence

种植前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 是产前诊断方法学上的一项新内容, 并已展现出良好的应用价值和前景<sup>[1]</sup>。已知染色体非整倍体是引起自然流产、婴儿死亡及神经系统发育迟缓的重要原因, 为此, 我们探索荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 检测人胚胎细胞 13/21 染色体非整倍体的方法。以便为经历体外受精胚胎移植 (IVF-ET) 的高龄妇女避免染色体三体胚胎的移植。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵母细胞胚胎卵裂球标本的准备

1.1.1 27 个卵母细胞和 36 个卵裂球的来源 于 1998 年 7~10 月在本中心接受体外受精胚胎移植 (IVF-ET) 患者的未受精卵母细胞。36 个卵裂球来源于同期接受 IVF-ET 患者的多精受精配子发育的胚胎。先制备内径约 70~90  $\mu\text{m}$  和 20~30  $\mu\text{m}$  的玻

璃吸管,用玻璃吸管分别将卵母细胞及多精受精胚胎在 Tyrode's acid 液(pH 2.4)中约 1 s, 去掉透明带取卵母细胞及单个卵裂球分别进行荧光原位杂交程序(图 1)。

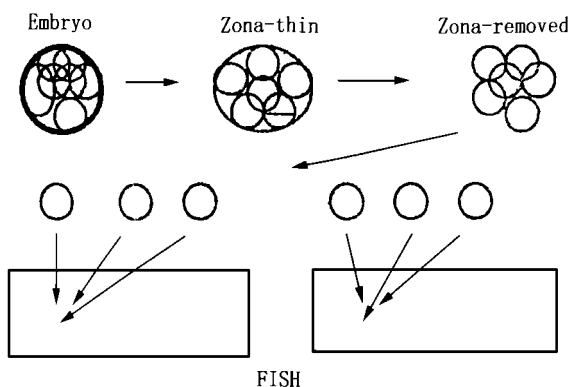


图 1 胚胎卵裂球

Fig. 1 Blastomere of embryo

1.1.2 低渗及固定处理 低渗液为 0.075 mol 氯化钾, 固定液为  $V$ (乙酸):  $V$ (甲醇)=(1:3)(自制)。分别将去除透明带的卵母细胞和单个卵裂球置于滴有 2~3  $\mu$ L 低渗液的玻片上(37  $^{\circ}$ C)。低渗液干之前在卵裂球上方滴加固定液至胞浆消失。固定好的载玻片置装有甲醇的染色罐中 2 min。若不立即作 FISH, 把载玻片晾干后放入盒内密封, -20  $^{\circ}$ C 保存。

## 1.2 探针

采用直接 FITC 标记的 13/21 染色体着丝粒部位杂交的  $\alpha$  卫星重复序列探针[ chromosome 13/21 alpha-satellite ( D13L1/D21Z1 ) Direct-labeled/Fluorescein, Oncor 公司]。

## 1.3 原位杂交

将标本从甲醇中取出自然晾干后置倒置显微镜下确认固定的单个细胞是否存在, 置体积分数为 70% 甲酰胺(Oncor)中 73  $^{\circ}$ C 5 min, 取出立即置 -20  $^{\circ}$ C 体积分数为 70%, 85% 和 100% 乙醇脱水各 2 min。取 1  $\mu$ L 探针加入 20  $\mu$ L 杂交混合液(Oncor), 混匀, 含探针的杂交混合液在 70  $^{\circ}$ C 变性 5 min 后置冰水中, 取 2~3  $\mu$ L 已变性的含探针的杂交混合液准确地滴于载玻片的样本上, 盖上盖玻片, 用胶粘合剂(rubber cement)封片, 置于已预湿的湿盒中, 37  $^{\circ}$ C 温箱杂交 4 h。

## 1.4 杂交后洗脱及信号检测

从湿盒取出标本, 除去盖玻片, 依次置 0.4 $\times$

SSC/体积分数为 0.3% NP-40 液(Oncor) 73  $^{\circ}$ C 5 min, 2 $\times$ SSC/体积分数为 0.1% NP-40 (Oncor) 室温 1 min, 暗盒中晾干。加含 DAPI (Oncor) 的抗褪色液复染, 封片, 镜检。

## 2 结果

采用 Olympus EX 60 荧光显微镜观察, 结果见图(2,3):  $\alpha$  重复序列探针与卵母细胞及卵裂球核杂交信号集中, 荧光在油镜下可见在蓝色背景上有绿色的荧光杂交斑点, 单倍体卵母细胞标本核多呈现 2 个杂交信号, 三原核发育的胚胎卵裂球核多呈现 6 个杂交信号(表 1)。



图 2 2 个杂交信号

Fig. 2 Two Hybridization signals



图 3 6 个杂交信号

Fig. 3 Six Hybridization signals

表1 卵母细胞及卵裂球标本的固定率、杂交率及核中杂交信号数

Table 1 Fixing-Hybridization Rate in ovum-blastomere

Resource	Fixing rate (%)	Hybridization rate (%)	Hybridization signals					
			1	2	3	4	5	6
Ovum	21/27(80)	14/21(67)	4/14	9/14	1/14			
Blastomere	26/36(72)	17/26(65)				3/17	2/17	12/17

胞分别杂交较杂交单个细胞更好。

### 3 讨论

1986年Cremer等<sup>[2]</sup>将FISH技术应用于产前诊断,成功地检出了18-三体,开始了间期细胞遗传学在临床上的应用,1990年Handyside等<sup>[3]</sup>报道了世界首例PGD后试管婴儿诞生,随后又以不同标记的X、Y特异性DNA探针通过FISH鉴别胎儿性别。近年Munne等<sup>[4,5]</sup>应用多色FISH以不同标记的探针同时与卵裂球细胞杂交,诊断胚胎非整倍体。FISH已成为医学遗传学领域中一项极为重要的研究手段<sup>[6]</sup>。目前先天性疾病已经成为婴儿死亡率的主要原因之一,其中染色体畸变占有很大比例。本试验证明运用FISH技术,以重复序列探针与卵母细胞及胚胎细胞杂交,能迅速检出染色体非整倍体,对胚胎染色体畸变的PGD具有重大的临床意义。本试验的13/21染色体 $\alpha$ 重复序列探针因其DNA片段重复几百到几千次,故杂交信号强,在核中分布集中,能迅速地做出诊断(8h之内),满足了胚胎在种植窗(preimplantation window)内移植的需要。本试验的结果表明该探针能有效的区分单倍体及非整倍体。尽管该探针不能区分13和21号染色体,但13、18、21、X、Y数目异常占染色体数目异常的95%<sup>[7]</sup>,因此可在PGD中检测部分染色体单体或三体。

由于PGD获得的样本量少,胚胎细胞本身又有嵌合体的可能。因此,当作一个诊断时取两个细

### 参 考 文 献

- 1 Joseph G. Schenker progress in preimplantation genetics. J Assist Reprod and genet. 1998; 15(1):9
- 2 Cremer T, Langeent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization technique diagnosis of trisomy 18 with probe Ll. 84 Hum Genet. 1986; 74(4): 346
- 3 Handyside A H, Kontogianni E H, Hardy K, et al. pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. Nature, 1990; 344(6268): 768
- 4 Munne S, Weier U. Simultaneous enumeration of chromosomes X, Y, 13, 18, 21 in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Cytogenet Cell Genet. 1997; 75(4): 263
- 5 Conn C M, Harper J C, Winston R M, et al. Infertile couples with Robertsonian translocation; preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. Hum Genet. 1998; 102(1): 117
- 6 Raap A K. Advances in fluorescence in situ hybridization. Mutat Res. 1998; 400(2): 287
- 7 Roger V, Robert R, Flandemeyer R, et al. Prenatal diagnosis with repetitive in situ hybridization probes. Am J Med Genet. 1992; 43(5): 848

(1999-01-15 收稿 1999-08-03 修回)