

单细胞 PCR 对种植前胚胎的性别鉴定^①

李晓红 庄广伦 李 满

(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: 用单一胚胎细胞进行人类种植前胚胎的性别鉴定。方法: 巢式 PCR 技术同时扩增单个活检细胞 Y 染色体上的 SRY 序列及位于 7 号染色体上的 ZP₃ 基因。结果: 卵裂期胚胎活检所得的 24 个单细胞中 5 个已变性, 无 DNA 扩增, 其余 19 个中 11 个显示 SRY 和 ZP₃ 基因阳性, 8 个显示 ZP₃ 基因阳性而 SRY 阴性。结论: 选择 SRY 和 ZP₃ 基因引物对单个细胞进行巢式 PCR 扩增是种植前胚胎性别鉴定的一种可靠的方法。

关键词 聚合酶链反应/方法; 胚胎/妇科学; 性别预选

中图分类号 R 711.6

SEX DETERMINATION OF PREIMPLANTATION EMBRYOS BY NEST PCR

Li Xiaohong Zhuang Guanglun Li Man

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

Abstract Objective: To avoid the birth of a child with a harmful x-linked disease, we report sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. **Methods:** Single embryo cell biopsied from human polyspermic embryos was amplified by nest polymerase chain reaction (PCR) with the SRY and control (ZP₃) gene primers. **Results:** 5 of 24 single embryo cells that is recognised at biopsy to have degenerated produced negative results. The other 11 of the embryo cells were positive for the SRY and ZP₃ gene, and 8 of the embryos were negative for the SRY gene and positive for the ZP₃ gene. **Conclusions:** Selecting SRY and ZP₃ gene primers can get accurate results in sex determination and is a reliable and precise method for routine preimplantation genetic diagnosis.

Subject headings polymerase chain reaction/methods; embryo/embryology; sex preselection

种植前遗传性疾病的诊断 (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) 是伴随着单精子卵母细胞显微注射受精 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) 的第 2 代试管婴儿技术结合分子生物学演进的新技术, 它是对体外受精的胚胎在移植前取出部分卵裂球进行检测, 经证实无遗传及代谢性疾病后再移植入子宫, 在种植前阻止遗传病发生。自 Handy side 等^[1]首次报告 PGD 后妊娠至今已 6 年, PGD 最常应用在 X 性连锁遗传病。本文报道用巢式 PCR 技术同时扩增单个活检细胞 Y 染色体上的睾丸决定基因 (SRY) 及位于 7 号染色体上的精子

受体基因 (ZP₃), 对有性连锁遗传高危的夫妇进行种植前胚胎的性别鉴定^[2]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 全血 DNA 抽提 4 例正常男性和 5 例正常女性的全血 DNA, 置低温备用。

1.1.2 淋巴细胞收集 以淋巴细胞分离液分离血中淋巴细胞, 采用显微操作获得男性与女性单个淋巴细胞各 15 个。

1.1.3 胚胎细胞活检 24 个多精受精胚胎在受精后第 3 天(4~8 个细胞期)进行细胞活检。准备显微操作皿(1006. FALCON)后, 将接受活检的卵裂期胚胎加入皿中微滴, 然后将显微操作皿转送 37 °C 恒温的显微操作仪(Research Instrument, UK)平台上, 用显微固定针固定胚胎, 用酸性的 Tyrodes 液在透明带上烧灼形成大小约 25 μm 裂孔, 然后以内径约 20 μm 的微穿刺针吸出单个卵裂球(图 1), 将吸出的卵裂球移到 Eppendorf 管中, 置 -20 °C 冷藏待用。

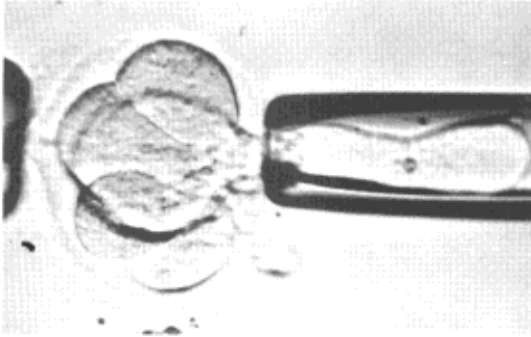


图 1 胚胎细胞活检

Fig. 1 Embryo biopsy

1.2 方法

检测单个细胞的 SRY 基因引物序列来决定性别, 用 ZP₃ 基因引物序列来作内对照。所有引物均由上海细胞生物所合成。

1.2.1 全血 DNA 的 PCR 扩增体系 PCR 反应总体积 25 μL , 试剂包括 2 mmol/L dNTP (Bohring-ma), 2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液(包含 15 mmol/L MgCl)和 17.8 μL 的超纯水。SRY 基因引物(5'-CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC-3'; 5'-CTGCGGGAAGCAA ACTGCAATTCTT-3'; 和 ZP₃ 基因引物(5'-AGCCATCCTGAGACGTCCGTACA-3'; 5'-CCTGACCACATCTTCTGT-GTCCAT-3'.)引物浓度为 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 加 0.6 μL Taq 聚合酶(GIBCO)和 5 μL (1.5 μg)人血 DNA, 40 μL 矿物油覆盖, 95 °C 变性 5 min, 随后在 Thermal Cycler (PE960)94 °C, 60 °C 和 72 °C 60 s 30 循环, 70 °C 10 min。扩增的 DNA (15 μL)和分子量标准(CIBCO)加到 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB (Ethidium bromid)染色, 紫外透光器下检查和拍照。

1.2.2 单个淋巴细胞和单个胚胎细胞的 PCR 扩增 配制总体积为 25 μL PCR 混合液, 含 SRY 基因引物(5'-CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT-3'; 5'-GTT-GTCCAGTTGCACTTCGCTGCA-3'); 和 ZP₃ 基因引物(5'-GTTGTCCAGTTG-

CACTTCGCTGCA-3'; 5' AACTC-G TGGAGTCC-TACCTCAA-3')。将此混合液加到 0.5 μL 含细胞样本 Eppendorf 管中, 95 °C 变性 5 min; 随后 30 个循环, 94 °C、60 °C 和 72 °C 60 s; 70 °C 10 min。制备一批 PCR 管, 总体积 25 μL , 含巢式 SRY 基因引物(5'-CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC-3'; 5'-CTGCGGGAAGCAA ACTGCAATTCTT-3')和 ZP₃ 基因引物(5'-AGCCATCCTGAGACGTCCGTACA-3'; 5'-CCTGACCACATCTTCTGTGTCCAT-3')。然后加入 1 μL 第 1 次 PCR 扩增的产物, 再扩增 30 循环。扩增的 DNA 和分子量标准加到 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色在紫外透照器下检查并拍照。

2 结果

2.1 全血 DNA 试验

PCR 扩增后 4 个男性血 DNA 样本显示 SRY 和 ZP₃ 基因阳性, 而 5 个女性血 DNA 样本显示 SRY 基因阴性和 ZP₃ 基因阳性。显示合成的 SRY 和 ZP₃ 引物是合适的。

2.2 单个淋巴细胞试验

所有 15 个来源于男性血的淋巴细胞 PCR 扩增后 SRY 和 ZP₃ 基因阳性; 而所有 15 个来源于女性血的淋巴细胞 SRY 基因阴性, ZP₃ 基因阳性。结果提示该 PCR 系统可以用于扩增单个细胞的基因片段。

2.3 胚胎的性别鉴定

24 个卵裂球中 5 个卵裂球经 PCR 后不扩增, 其它 19 个卵裂球都得到扩增产物。11 个卵裂球显示 SRY 和 ZP₃ 基因阳性; 8 个显示 SRY 阴性而 ZP₃ 阳性(图 2)。

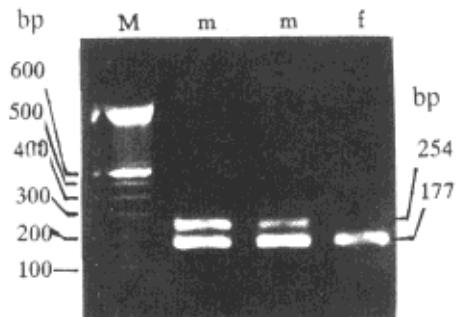


图 2 胚胎单细胞 PCR 产物电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of DNA amplified from a single blastomere by nested polymerase chain reaction (PCR)

M = molecular weight marker m = male f = female

177 bp = ZP₃ gene 254 bp = SRY gene

3 讨论

3.1 单细胞PCR检测SRY基因对PGD的意义

PGD对诊断的准确性和敏感性都要求很高,由于极其微量的初始DNA模板以及DNA结构上的不同,使其DNA扩增的PCR反应条件与一般来源的DNA的PCR条件明显不同。然而,用巢式引物检测单细胞单拷贝序列时,PCR具有相当特异性和敏感性^[3]。本试验所用巢式引物的靶DNA序列是人类Y染色体上的SRY基因的主要序列,该基因的转录产物为睾丸特异性的,且一般认为它在男性睾丸发育过程中具有重要作用。另有试验表明,PCR扩增检测睾丸决定基因具有种属特异性^[4]。本试验单个淋巴细胞均得到满意的扩增,结果显示该法对扩增单个细胞是高效率 and 精确的,然而24个卵裂球中有5个无DNA扩增,可能与人胚含有一定比例的退化细胞有关。这点与国外文献报道结果一致^[3]。

3.2 对照基因的应用可增加对诊断的准确性

对照基因对于性连锁疾病的诊断是十分重要的,当单个细胞转送过程或DNA扩增过程失误时应用对照基因而不至于导致误诊。本试验选用了ZP3基因,该基因在女性会有表达,它的蛋白质在卵巢透明带作为精子的受体,而在男性则无表达,但对男性和女性底物均可提供极佳的DNA结果^[5]。另1个避免误诊的方法就是用同1对初始引物对X和Y染色体上均有的同源序列进行扩增,然后根据扩增片段的大小不同来区分^[6]。

3.3 单细胞PCR的污染问题

极端敏感的PCR应用到单细胞是极易污染的,由于试剂和外界环境物质所致的污染可通过认真的试验操作技术得以避免。对于可能包含的精子(粘附于透明带),颗粒细胞等可由对活检前的胚胎进行反复地清洗和多次更换吸管得到避免。现在多采用ICSI后的胚胎进行活检,因而上述污染较少发生。

由于对性连锁遗传病携带者胚胎进行性别鉴定的目的是弃去50%疾病的男胚,因此,若女性胚胎被男性细胞或DNA污染,污染物也得到扩增,这胚胎就可能被诊为男性而不被移植入子宫;1个被女性DNA污染的女性胚胎可以被植入。被女性DNA污染的男性胚胎也同样不被植入,如果女性

细胞或DNA污染了无卵裂球细胞或DNA的标本,而所活检的胚胎恰好是1个受影响的男胚,将导致男胚误诊为女胚而被植入子宫,引起临床后果。因此要选用形态上具有最佳核型的细胞,以避免扩增失败。另外,增加若干个阳性DNA对照可大大减少这种罕见的现象。

3.4 X性连锁疾病的PGD最终是DNA突变检测,而不是性别鉴定

目前已知大量常见的X性连锁疾病出现连锁标记或特殊变异,其致病基因就位于X染色体上,因此,对有特殊疾病倾向的性连锁遗传病高危夫妇,测定胚胎性别仅是1个初步措施。随着分子生物学的发展,大多数情况下进行种植前诊断时精确的DNA突变检测将会取代目前的性别鉴定。任何1种PGD技术包括囊胚活检,由于受检DNA的含量问题,不可能似检测早孕绒毛样本那样可靠。追踪早孕绒毛样本等来确定诊断在PGD后列为常规。无论如何,PGD作为1种遗传病筛选,减少遗传性疾病的发生应该是很有意义的,而巢式PCR法为PGD提供了敏感特异的有效手段。

参 考 文 献

- 1 Handyside AH, Kontogianni FH, Hardy K, *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 244: 768
- 2 Joyce C, Harper. Preimplantation diagnosis of inherited disease by embryo biopsy: an update of the world figures. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13: 90
- 3 Ke-hui Cui, Graham M W, Regan J, *et al.* Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet*, 1994, 343: 79
- 4 Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*, 1990, 345: 240
- 5 Van Duin M, Polman J, Suikerbuik R F, *et al.* The human sperm receptor gene ZP3 is localized on chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet*, 1991, 58: 1927
- 6 Findloy I, Quirke P, Hall J, *et al.* Fluorescent PCR: a new technique for PGD of sex and single-gene defects. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13(2): 96

(1997-08-14 收稿 1997-11-14 修回)