

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00983

引物原位标记技术快速检测人类染色体非整倍性

朱一剑, 刘涤石, 丁显平

四川大学生命科学学院遗传医学研究所, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064

摘要: 染色体数目异常是人类染色体疾病的重要类型, 经常导致胚胎丢失、胎儿流产、婴儿死亡、先天畸形和神经发育异常等出生缺陷。文章应用引物原位标记(Primed *in situ* labeling, PRINS)技术快速检测人类染色体非整倍性, 率先采用更新的非 ddNTP 阻断的多色 PRINS 技术, 对人类外周血淋巴细胞和精子等多种样本进行标记; 然后对不同靶标序列的标记效率及不同荧光色素的发光特点通过实验进行评估, 获得关于 PRINS 技术的多项反应原理参数, 并筛选标记顺序以获得均一稳定的标记效果, 最后进行临床 FISH 探针与 PRINS 的标记比较实验。通过实验比较 PRINS 技术与传统 FISH 技术之间的标记特点与差别, 评估 PRINS 的实际应用效果。在 2.5 h 内标记了同一精子核内的多条染色体, 单色以上标记达到 99%。同时在人类外周血淋巴细胞中也得到较好的标记效果。与 FISH 技术相比, PRINS 的这些优点使得它成为诊断染色体非整倍性变异的首选技术。

关键词: 引物原位标记; 人类染色体; 非整倍性

Detecting human chromosome anomalies with primed *in situ* labeling (PRINS)

ZHU Yi-Jian, LIU Di-Shi, DING Xian-Ping

Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, Institute of Medical Genetics, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: Numerical chromosome anomaly was one of the most important kinds of human chromosome diseases by inducing pregnancy loss, miscarriage, infant death, congenital malformations and nerve damage. The present study was to establish a rapid, reliable and reasonable multicolor primed *in situ* labeling (PRINS) protocol for diagnosing numerical anomaly in human chromosome. First, nuclei of cultured lymphocytes and sperms were labeled with the method of PRINS, and then nuclei of cultured lymphocytes, sperms and other specimen were labeled with the method of updated non-ddNTP-blocking multicolor PRINS technique. The labeling effect of different target sequences and the feature of different fluorochromes were evaluated by experiment. Meanwhile, several parameters of PRINS were optimized to obtain more homogeneous and stable labeling effect. At last, the applicative value of PRINS was evaluated by comparing the clinical effect and labeling characteristics between FISH probe and PRINS. In the present study, several chromosomes were simultaneously marked successfully in the same sperm nucleus within 2.5 hours. And the frequency of one-color-labeling reached 99%. The many advantages, compared with FISH, make PRINS become the first choice in diagnosing diseases related to numerical anomaly in human chromosome.

收稿日期: 2007-12-16; 修回日期: 2008-03-12

基金项目: 四川省计划生育委员会基金课题(编号: 2001-05)资助[Supported by the Funds from Population and Family Planning Commission of Sichuan Province(No.2001-05)]

作者简介: 朱一剑(1980-), 男, 山东人, 博士, 研究方向: 医学遗传学。Tel: 028-85413096; E-mail: zyjlife@163.com

通讯作者: 丁显平(1963-), 男, 重庆人, 博士, 教授, 研究方向: 医学遗传学。Tel: 028-85415895; E-mail: brainding@263.net

Keywords: primed *in situ* labeling (PRINS); human chromosome; anomalies

配子染色体异常是导致人类胚胎丢失、流产、夭折、先天表型畸变和神经损伤等染色体疾病的重要原因之一。生殖细胞减数分裂过程中的染色体不分离会导致非整倍体(或二倍体)配子的产生,从而诱发非整倍体(或三倍体)合子的产生。因此,分析成熟的生殖细胞的整倍性,对监控非正常精子含量及进一步揭示非正常精子的发生机制具有重要意义^[1]。精子比成熟卵子更易获得,精子染色体的相关研究也较多。

引物原位标记技术(Primed *in situ* labeling, PRINS)是应用于DNA原位标记的一种FISH衍生技术^[2],它将PCR的特异性与特异DNA序列的细胞学定位结合起来,拥有简单快速的步骤和高度易控的特异性,对于DNA检测和定位既节省时间又节省成本。十几年来,相关新技术不断地简化和优化了PRINS的设计和制作,使PRINS更广泛地适用于不同样本的染色体研究和诊断^[3]。2001年,Yan等^[4]在非ddNTP阻断的三色PRINS技术方面的研究工作,更使我们能够在不牺牲标记效果的同时,提高检测通量,节省大量的时间和成本。PRINS寡核苷酸引物分子小,适用于适度去浓缩的精子核,已逐渐成为FISH的一个替代方法用于精子非整倍体研究^[5,6]。

本文采用非ddNTP阻断的不同原位标记组合,探索更为快速和合理的多色PRINS系统程序,并评估其用于人类染色体诊断的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料

正常健康男性的外周血标本以及常规精液分析结果正常的男性精液标本。

1.2 方法

1.2.1 样本处理

外周血样本按照细胞遗传操作步骤将固定好的细胞悬液滴在4℃蒸馏水中浸泡保存的洁净载玻片上,滴液要使细胞足够浓度且散开,并在分布细胞的部位用铅笔或钻石笔做标记,晾干并镜检。将玻片置入50 mL 预热37℃的2×SSC中温育40 min(多加1张玻片,温度提高1℃),之后在室温下置于

70%、80%、100%的乙醇系列中进行脱水,玻片放入(73±1)℃水浴预热的70%甲酰胺变性液中(28 mL 甲酰胺,4 mL 20×SSC,8 mL 蒸馏水)变性10 min(多加1张玻片,温度提高1℃),随后在冰的乙醇系列中各1~2 min脱水。玻片可以保留在100%的乙醇中。

精液样本取于2个精液常规分析正常的健康男子,分别为27和34岁。手淫法射精于灭菌容器中室温保存30 min。待精液液化之后,一部分样本被用作常规精液分析,其余的样本加入1×PBS溶液清洗3次,并在3 000 r/min下离心5 min来沉淀精子。之后用新鲜配制的冰固定液在4℃下固定35 min,更换固定液后精子悬液可以在-20℃保存。精子悬液滴加于洁净的载玻片上,风干后在室温下老化1~2 d。PRINS反应之前,精子滴片浸入室温下3 mol/L的NaOH溶液中4~5 min,同时进行去浓缩和变性,随后依次经70%、90%、100%的梯度乙醇溶液脱水,风干。

靶标序列的标记体系采用biotin-16-dUTP和digoxigenin-11-dUTP(Roche applied science, USA),每个引物反应准备8 μL的反应体系,内含单一染色体特异引物,0.1%BSA,0.2 mmol/L dATP、0.2 mmol/L dGTP、0.2 mmol/L dCTP,0.02 mmol/L dTTP(Promega corporation, USA),0.02 mmol/L dUTP,2.5 U Taq DNA聚合酶(TaKaRa Bio Inc., Japan),10%含Mg²⁺的10×Taq buffer以及蒸馏水。为保证dUTP的插入反应直至最终标记的均一效果,每个PRINS反应的复性采用引物特异温度,延伸反应均在Taq酶的最优温度下进行。

1.2.2 单色 FISH

探针准备:室温解冻FISH探针试剂,将7 μL JAB杂交缓冲液、1 μL JAB探针和2 μL dH₂O混匀,离心至EP管底;探针混合物EP管置73℃水浴中加热5 min,或PCR仪中76℃7~10 min。

杂交:从100%酒精中取出玻片,将玻片的底角接触吸水纸以干燥玻片;并用纸巾将背面擦干;将玻片放在45~50℃的玻片加热模块上,蒸发掉剩余的乙醇;玻片上1个变性区域滴加7 μL探针混合物,并立即盖上盖玻片、滴上封片剂封片。

清洗:平移移去封片剂和盖玻片,将玻片置于

72~74 预热的 $1 \times \text{SSC}$ 中漂洗 5 min(多加 1 张玻片, 温度提高 1°C), 之后再置入 Na_2HPO_4 溶液中清洗 3 次, 每次 2 min, 清洗时轻晃 3~5 s, 最后在蒸馏水中清洗 30 s, 风干(或浸没在 $0.4 \times \text{SSC}/0.3\%$ NP-40, 摇动 1~3 s, 2 min 之后取出; 再浸入 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ NP-40。摇动 1~3 s; 5 s~1 min 之后取出玻片)。洗涤过程中严格保证温度。

复染: 杂交区域滴加 $7 \mu\text{L}$ DAPI 复染液, 封片等待 10 min 复染, 并在暗处风干玻片。玻片可以在 -20°C 冰箱中保存。

1.2.3 单色精子 PRINS

引物标记精子的有效性首先通过单色 PRINS 预实验进行评估。分别采用 biotin-11-dUTP-avidin-Rhodamine 和 digoxigenin-11-dUTP-antidig-FITC 的组合来获得红色和绿色荧光信号。将变性后的玻片及盖玻片置于 Peltier Thermal Cycler MG48G 的原位反应模块上于复性温度预热。玻片到达引物特异的复性温度后滴加反应混合物(74 预热), 随后覆盖 $22 \times 22 \text{ mm}$ 的盖玻片并封片, 反应在复性温度持续 7 min, 后 72°C 延伸 10 min, 反应完成后, 玻片立即置于 72°C 的 NE 溶液和 50°C 的 $4 \times \text{SSC}$ 、 0.5% Tween 20

中各洗 5 min。

1.2.4 双色 PRINS 反应

由于在非 ddNTP 阻断的 PRINS 方案中首先标记的靶点显示优势荧光颜色(Rhodamine 激发出的红色荧光), 反应采用两种标记顺序标记 X 和 Y 染色体, 即先 X 后 Y 和先 Y 后 X。同时相应 dUTP 的加入顺序为不变的 biotin-digoxigenin 顺序, 以先后获得红色和绿色荧光信号, 具体加入试剂见表 1。

将反应混合物放在 73°C 水浴箱中预热, 变性后的样本玻片和盖玻片置于 PCR 仪原位反应模块上于复性温度预热。玻片达复性温度后滴加第一反应混合物(74 预热), 立即覆盖 $22 \times 22 \text{ mm}$ 的盖玻片并封片。设置适当温度程序, 复性 16 min, 复性温度因所用引物而异。先在复性温度下预热载玻片 7 min, 然后每张玻片加上 $25 \mu\text{L}$ 预热的反应混合液, 盖盖玻片, 再用复性温度继续孵育 9 min, 延伸 10 min 以上, 两次反应的延伸温度均为 72°C 。两次反应之间, 玻片在 $1 \times \text{PBS}$ 溶液中略洗 2 min。反应完后小心去掉盖玻片, 将玻片迅速浸泡在 NE 溶液中 72°C 中 5 min, 然后将玻片移到 $4 \times \text{SSC}/0.2\%$ Tween20 中, 50°C 5 min。

表 1 双色 PRINS 标记的不同顺序

Table 1 Different orders of labeling of dual-color PRINS

顺序 1 Order 1		顺序 2 Order 2	
第一次反应 The first reaction	第二次反应 The second reaction	第一次反应 The first reaction	第二次反应 The second reaction
X 染色体引物 Primer for X chromosome	Y 染色体引物 Primer for Y chromosome	Y 染色体引物 Primer for X chromosome	Y 染色体引物 Primer for Y chromosome
生物素标记的 dUTP Biotin-16-dUTP	地高辛标记的 dUTP Digoxigenin-11-dUTP	生物素标记的 dUTP Biotin-16-dUTP	地高辛标记的 dUTP Digoxigenin-11-dUTP
X 为红色 X chromosome is red	Y 为绿色 Y chromosome is green	Y 为红色 Y chromosome is red	X 为绿色 X chromosome is green

1.2.5 三色 PRINS 反应

通过评估双色 PRINS 预实验的结果, 三色 PRINS 程序采用 digoxigenin-biotin-digoxigenin 的反应标记物加入顺序以依次标记 18 号、X 和 Y 染色体上的着丝粒靶标为黄色、红色和绿色。

每条引物复性 7 min, 延伸 10 min; 每两次 PRINS 反应之间用 $1 \times \text{PBS}$ 漂洗去除前次的反应体系。最后一次反应结束后, 玻片依次放入 72°C 的 NE 溶液和 50°C 的 $4 \times \text{SSC}$ 、 0.5% Tween 20 中各洗 5 min

以终止延伸反应。

1.2.6 精子三色 PRINS

对于精子的快速三色 PRINS, 依据双色 PRINS 预实验的实验结果, 反应标记物的加入顺序采用了 digoxigenin-biotin-digoxigenin, 来顺序标记 18/21 号染色体、X 染色体和 Y 染色体。每个引物的标记反应分别于特异温度下复性 5 min, 72°C 下延伸 5 min; 每两个标记反应之间用 $1 \times \text{PBS}$ 洗去上一次的反应体系。最后一次反应结束后, 玻片放入 50°C 的 $4 \times$

SSC, 0.5% Tween 20 中洗 5 min。

1.2.7 信号检测与图像分析

本实验采用两套检测系统观察荧光信号: (1)AxioPlan 2 imaging 荧光显微系统; (2)Olympus BX51 荧光显微系统 Olympus UPlanFI 100×/1.30 Oil ∞/0.17 C1 物镜。两套系统均带有 DAPI/FITC/Rhodamine 通频带滤色镜, 分别由 AxioCam Camera 模块和 COHU Cooled CCD Camera 模块进行采样、ISIS 5(Meta Systems Company, Germany)和 Video Test-FISH 4.0(VideoTest Ltd., Russia)软件进行图像处理和分析。对每个精子样本至少鉴定 5 000 个核, 有两个独立的操作人员分别记录每个精子核内明晰的不同颜色信号。单色 PRINS 标记中, 看到一个精子核中有清晰的单个有色信号, 视为正常标记。三色精子 PRINS 实验由于包含性染色体检测, 一个精子核内出现 2 个明晰的不同颜色信号(分别为常染色体和性染色体)视为成功标记, 有 2 个黄色信号, 1 个红色或绿色信号为常染色体二体(18/21, 18/21, X/Y); 1 个黄色信号, 2 个红色或绿色信号为性染色体二体(18/21, X/Y, X/Y); 3 个不同颜色的信号(黄红绿)视为性染色体二体(18/21, X, Y); 并比较信号大小和强度, 两个进行统计的信号之间至少相隔一个相对小信号直径进行区别。重叠的或缺乏明确界线的精子不予统计。

2 结果与分析

2.1 单色 FISH

JAB FISH 探针与 Y 染色体杂交, 在 Y 染色体长臂末端获得清晰的红色杂交信号, 结果如图 1a, b 所示。

2.2 单色 PRINS

Y 染色体单色 PRINS 标记, 在每个标记的中期核或中期分裂相中获得了单个的红色荧光信号, 结果如图 1c 所示。

2.3 双色 PRINS 结果

两种不同顺序的外周血淋巴细胞双色 PRINS 标记成功。反应顺序 1(表 1), 将 X 染色体先标记为橙红色, Y 染色体后标记为绿色, 核内显示明晰的两个有色信号, 结果如图 1d 所示。

2.4 三色 PRINS 结果

在培养的正常男性外周血淋巴细胞中所做的三

色 PRINS 同时分别将 18 号染色体(2 条)、X 染色体(1 条)和 Y 染色体(1 条)成功标记了黄色(2 个)、红色(1 个)和绿色荧光信号(1 个), 单色标记率在 95%以上, 全色标记率在 80%以上, 结果如图 1e 所示。同时在探讨三色 PRINS 的方法时, 我们利用外周血中期淋巴细胞来摸索条件, 并利用克氏综合症患者(47, XXY)外周血中期淋巴细胞证明其特异性, 如图 1f 所示。

2.5 精子单色 PRINS

常规精液分析正常的男性精子样本中进行的单色 PRINS 用于摸索各条引物精子标记的最优使用条件, 以及精子去浓缩的程度。成功的在精子核中将靶标染色体标记为单一的有色信号(由于 Rhodamine 的发光效率更高, 单色 PRINS 多采用此方法)。单色标记率在 98%以上。结果如图 2a, b 所示。

2.6 精子三色 PRINS

在正常的男性精子核中所做的三色 PRINS 实验中采用 dig-bio-dig 的标记顺序, 获得了很高的标记率。正常单倍体精子核内可见明晰的一个黄色信号(常染色体)和一个红色或绿色信号(性染色体)。单色标记率在 95%以上, 全色标记率在 85%以上。结果如图 2c, d, e 所示。

三色 PRINS 实验采用 dig-bio-dig 的标记顺序, 依次将常染色体、X 染色体和 Y 染色体标记为清晰明亮的黄色、红色和绿色荧光信号, 整个标记实验由滴片至荧光显微镜下镜检, 时间控制在 2.5 h 以内。

精子实验获得了很高的标记率(99%), 与之前的引物单色预实验结果相符。精子标记率、不同染色体的二体率和二倍率的统计分析结果见表 2。对于每条染色体至少分析了 5 000 个(性染色体为 10 000 个)精子核, 其中可以看到, 常染色体二体率介于 0.125% ~ 0.152%, 性染色体二体率介于 0.085% ~ 0.102%, 与之前的单色 PRINS 相关研究结果类似^[7], 即 21 号染色体的二体率略高, 常染色体比性染色体的二体率略高。但本研究中, 各染色体二体率之间($\chi^2 = 2.655 < \chi_{0.05}^2(4) = 9.487$, $P > 0.05$)和各染色体组合的二倍率之间($\chi^2 = 2.721 < \chi_{0.05}^2(5) = 11.070$, $P > 0.05$)均不存在统计学显著差异。2 名供体的精子二体率比二倍率略高, 这可能意味着在减数分裂过程中二体比二倍体更易发生, 但仍需要更大样本量的验证^[7]。

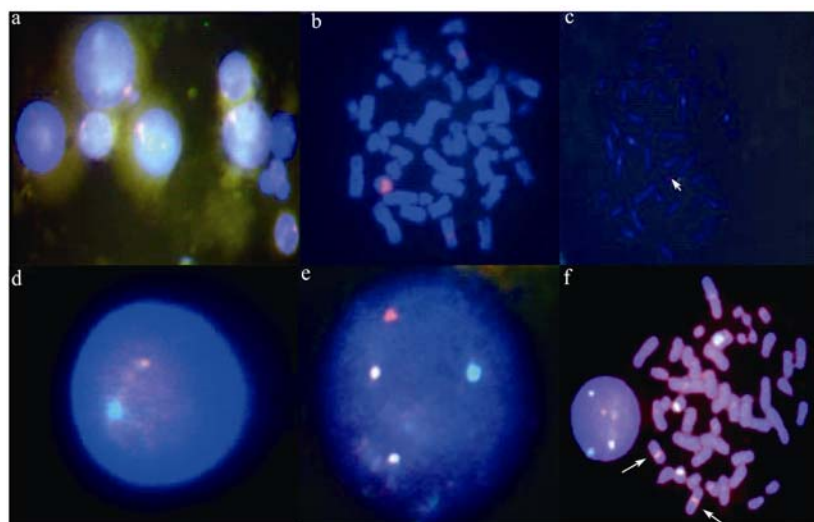


图 1 用 FISH 和 PRINS 技术标记人外周血中期淋巴细胞

a: Y 染色体 JAB FISH 探针标记正常男性外周血淋巴细胞; b: Y 染色体 JAB FISH 探针标记正常男性外周血淋巴细胞中期分裂相; c: Y 染色体单色 PRINS 标记正常男性外周血中期淋巴细胞, 箭头所示为 Y 染色体(红色部分); d: 双色 PRINS 标记人类外周血中期淋巴细胞其中 X 染色体先标记为红色, Y 染色体后标记为绿色; e: 三色 PRINS 标记人类外周血中期淋巴细胞, 其中 18 号染色体先标记为黄色, X 染色体先标记为红色, Y 染色体后标记为绿色; f: 三色 PRINS 标记克氏综合征外周血中期淋巴细胞核与分裂相, 其中 18 号染色体标记为黄色(2 个信号), X 染色体标记为红色(箭头所示 2 个信号), Y 染色体后标记为绿色(1 个)。

Fig. 1 Labeling of male peripheral lymphocytes with the methods of FISH and PRINS

a: Labeling of normal male peripheral lymphocytes with Y chromosome specific JAB FISH probe; b: Labeling of normal male metaphase peripheral lymphocytes with Y chromosome specific JAB FISH probe; c: single-color PRINS labeling of normal male metaphase peripheral lymphocytes; d: Dual -color PRINS labeling of metaphase peripheral lymphocytes; e: Triple-color PRINS labeling of metaphase peripheral lymphocytes; f: Triple-color PRINS labeling of metaphase peripheral lymphocytes from Klinefelter patient.

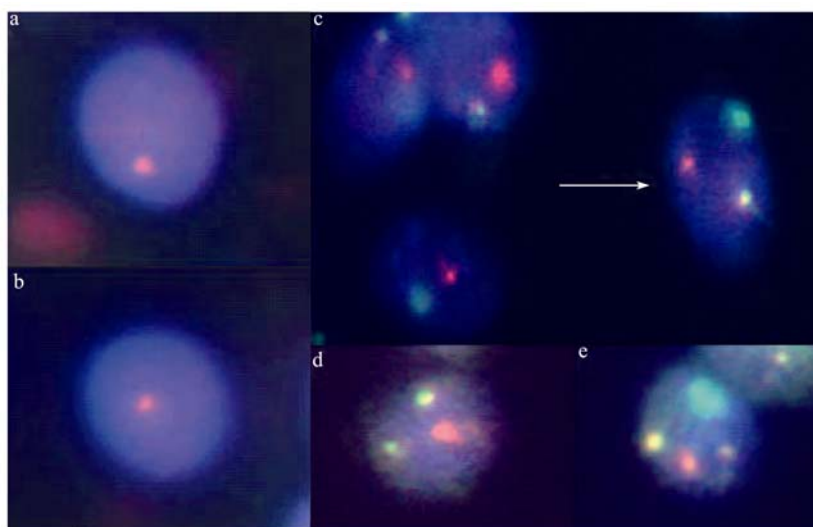


图 2 PRINS 技术标记人精子细胞

a,b: 单色精子 PRINS 标记 18 号染色体; c,d,e: 三色精子 PRINS 标记人类精子核, 其中 c 图所示为(18, X, Y)性染色体二体精子, d 图所示为(18, 18, X)二体精子, e 图为(18, 18, X, Y)二倍体精子。

Fig. 2 Labeling of sperm nuclei with the method of PRINS

a,b: Single-color PRINS labeling of chromosome 18 on sperm nuclei; c,d and e: Triple-color PRINS labeling of sperm nuclei. c: a Disomic sperm cell with chromosome (18, X and Y); d: A disomic sperm cell with chromosome (18, 18 and X); e: A diploid sperm cell with chromosome (18, 18, X and Y).

表 2 精子标记的统计结果分析以及与传统 FISH 和 PRINS 技术的结果比较

Table 2 Comparison between the results of sperm labeling and those of traditional FISH and PRINS

染色体 Chromosome	标记成功率 Successful labeling (%)	平均二体率 Mean disomy rate (%)					平均二倍体率 Mean diploidy rate (%)		
		18	21	X	Y	XY	XX	XY	YY
三色 PRINS Triple-color PRINS	99.517	0.125	0.152	0.085	0.093	0.102	0.0 83 0.0 58	0.056 0.048	0.040 0.035
传统双色 PRINS* Traditional double-color PRINS	97~100	0.30	0.36	0.09	0.08	0.13		0.08-0.45	
单色 FISH** Single-color FISH	40~99	0.36	0.5 (13/21)	0.03~0.60	0.03~0.27	/***		/***	
双色 FISH** Double-color FISH	92~99.9	0~0.39	0.1~0.29	0.04~0.28	0.04~0.23	0.06~0.23		0.03~0.32	
三色 FISH** Triple-color FISH	95~99.9	0~0.04		0.018~0.375	0.009~0.25	0.089~0.39		0.066~0.32	

*: 此处数据见 Pellestor 等的研究^[8]; **: 详细情况请参考Downie等的综述^[9]; ***: 由于技术所限, 不能区分。

*: Pellestor *et al*^[8]; **: More details in the review by Downie *et al*^[9]; ***: Can not be differentiated with the limitation of the technology.

3 讨论

3.1 精子染色体检测与多色 PRINS

已有大量的相关文献对精子染色体的整倍性进行了研究分析, 但传统的染色体检测方法往往不能达到理想的效果: 诱发精子中期染色体的操作比较费时费力; 精子FISH由于很大程度上依赖去浓缩的效率, 及靶标序列区域的接触效率问题, 不是总能有效的杂交等等^[10,11]。PRINS 技术不仅具有经济、简便快速、特异性高、小探针更易接近靶标等多个关键属性, 而且通过多色PRINS 技术还能够区别单色所不能区分的二体和二倍体精子。通过在外周血淋巴细胞培养上的单色PRINS 与FISH 的比对实验, 我们发现, PRINS在原位标记上有着与FISH相当的标记效果和稳定性, 标记特异性甚至优于某些临床应用的FISH探针^[12]。早期的双色乃至多色PRINS技术与多色FISH类似, 都是采用不同的dUTP-半抗原-抗体-荧光素组合^[13], 即同时标记几个靶标序列, 就加入几个组合, 造成随着同时标记序列的增多, 成本上升非常明显。自Yan 等^[3]发明了新的非ddNTP阻断的多色PRINS程序后, 在不影响标记效率和特异性的同时, 不仅减少了采用的标记组合, 其他试剂和操作步骤也均得到了简化, 很大程度上节约了时间和成本, PRINS也由此获得了FISH所不具备的

优势: 即同时标记的序列越多, 这种非ddNTP阻断的PRINS技术越节约。在理论上n种荧光素能够同时标记 2^n-1 个靶标。

通过非 ddNTP 阻断的多色 PRINS 方法提高检测通量之后, 本实验成功的以不同颜色的荧光标记了 3 个以上的靶标序列, 这为我们在检测样本时提供了一个内对照, 使我们得以区分非整倍体和整倍体。而在此引用染色体数目异常的样本(诸如三体, 克氏综合征等)进行多色标记, 由 G 显带论证的染色体数目异常吻合了多色 PRINS 方法显示的特定数目的有色荧光信号以及染色体靶标位置, 有效的说明了该法的特异性和准确性。

另外, 我们在用外周血中期淋巴细胞染色体摸索单、双、三色 PRINS 方法时发现, 双色和三色 PRINS 操作方法相似, 条件也基本相同, 只是随着标记颜色的增多, 标记的难度相应增大而已, 故在做精子 PRINS 时, 就没有做双色精子 PRINS, 而是做完单色直接做的三色。

3.2 PRINS 技术与 FISH 技术的标记比较

单色 PRINS 与单色 FISH 的实验结果进行比较之后我们发现, 标记相同的染色体 Y 靶序列, 尽管由于 JAB FISH 探针的杂交中信号强度差异的存在使检测结果不会发生混淆, 但确有少许非特异杂交(很小的弱红色信号), 而条件控制良好的单色

PRINS 实验没有发现非特异标记。PRINS 在原位标记上有着与 FISH 相当的标记准确性和稳定性, 标记效果在某些情况下甚至优于某些临床应用的 FISH 探针。

3.3 染色体异常的统计

由于精子的大小有限, 同时标记更多的染色体会导致信号重叠, 难于辨认, 所以适于精子的多色 PRINS 可能不适合更高通量的标记(更多的颜色信号)^[14]。尽管之前的精子染色体相关研究之间所得的二体率在平均值上有较大的差异, 然而同一研究中不同(常)染色体二体率之间在统计学上均没有显著差别, 这种检测效率的差异可能源于不同的实验手段。对于精子 PRINS, 21 号染色体略高的二体率的产生, 我们推测至少有部分原因是由于玻片上不同位置 PRINS 反应的客观条件和效率不同, 造成了一些非特异性标记, 尤其是在 13 号染色体上(这主要由于靶标序列的严重同源, 这一问题在 FISH 技术的应用上似乎更难避免^[15]); 另一些研究则表明, 21 号染色体比其他染色体在有丝分裂中更不容易分离^[7]。可以看出, 由于 PRINS 方法的标记反应比 FISH 的探针杂交更为敏感, 其对条件控制的要求也更为严格, 这一点对精子的染色体检测尤为重要, 因为精子不能像中期分裂相那样, 可以根据信号所在的染色体位置来判定特异性标记。

3.4 操作步骤与荧光标记

为了获得更为均一的标记效果, 本文实验中 PRINS 反应的复性和延伸步骤没有采用同一温度的简化步骤, 而仍采用不同的温度分别进行各个特异引物的退火和延伸反应, 从而获得更为稳定的实验结果。实验中我们使用了两套检测设备来进行荧光信号的检测。实际使用证明只要必要的荧光滤镜齐备, 更为便宜和常用的荧光显微镜 Olympus BX51, 已经能够胜任多色 PRINS 的检测要求。

据观察, 实验中退火—延伸—洗涤的重复次数越多, 细胞及染色体骨架受损越明显, 标记的最终背景也越高, 这也是影响多色 PRINS 反应中全色标记率的重要因素。另外在标记淋巴细胞 21 号染色体时我们也在中期染色体上发现了 21 号染色体与 13 号染色体的交叉标记现象^[3,13]。这也说明在条件控制不佳的情况下, 寡核苷酸引物(卫星序列重复单元)之间一个碱基的差异仍很容易导致交叉标记。由于采用了相同的标记序列, 这一问题在 FISH 技术的应

用上更难避免。我们认为, 对于这类先天存在标记难度的序列, 严格控制反应温度和优化反应体系(试剂浓度)显得非常必要。随着技术的日渐成熟, 单基因 PRINS 技术(Single-gene PRINS)可能是一个比较好的解决之道^[16-20]。

本实验采用正常个体的精液标本进行研究, 尽管每份精液样本的精子核计数达到 5 000 以上, 但对于解释普遍意义上的精子染色体异常, 源于不同个体的精液样本量仍远远不足。因此, 使用稳定可靠的多色 PRINS 检测方法, 对更多不同个体样本(包括异常)及其他染色体进行检测, 是进一步深入研究精子染色体数目异常所必需的。

综上所述, PRINS 技术不仅具有 FISH 技术共同优势, 还包含诸多 FISH 技术所不及的优势。FISH 技术所采用的探针较长, 不易透过细胞膜屏障, 同时探针制备耗时费力, 周期较长, 杂交时间也较长。相反的, PRINS 技术的杂交引物小, 更有利于接触靶标, 引物制备方便, 标记效率高, 反应条件易控制, 标记特异性更高, 操作步骤更为简便快速, 成本更为节省, 很适合以标记染色体卫星序列、端粒序列等高度重复序列为基础的染色体数目异常的相关诊断研究, 具有十分良好的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Jacobs PA. The chromosome complement of human gametes. *Oxford Rev Reprod Biol*, 1992, 14: 47-72.
- [2] Koch JE, Kolvraa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L. Oligonucleotide priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma*, 1989, 98(4): 259-265. [\[DOI\]](#)
- [3] Pellestor F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview. *Methods Mol Biol*, 2006, 334: 211-220.
- [4] Yan J, Bronsard M, Drouin R. Creating a new color by omission of 3 end blocking step for simultaneous detection of different chromosomes in multi-PRINS technique. *Chromosoma*, 2001, 109(8): 565-570. [\[DOI\]](#)
- [5] Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ. Detection of aneuploid human sperm by fluorescence *in situ* hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am J Hum Genet*, 1993, 52 (4): 799-807.
- [6] ZENG Mei, DING Xian-Pin, JIANG Min, LI Xiao-Bo. Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Repro Contraception*, 2006, 26(7): 241-244.
曾梅, 丁显平, 蒋敏, 李小波. 引物原位标记技术快速诊断精子染色体非整倍性. *生殖与避孕*, 2006, 26(7):

- 241–244.
- [7] Pellestor F, Imbert I, Andreo B. Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Am J Med Genet*, 2002, 107 (2): 109–114. [\[DOI\]](#)
- [8] Pellestor F, Imbert I, Andreo B. Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Am J Med Genet*, 2002; 107(2): 109–114.
- [9] Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod*, 1997; 3: 585–598. [\[DOI\]](#)
- [10] Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*, 1997, 3(5): 441–452. [\[DOI\]](#)
- [11] Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl*, 1994, 15(2): 139–144.
- [12] Pellestor F, Anahory T, Andreo B, Regnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M. Fast multicolor primed in situ protocol for chromosome identification in isolated cells may be used for human oocytes and polar bodies. *Fertil Steril*, 2004, 81(2): 408–415. [\[DOI\]](#)
- [13] Speel EJ, Lawson D, Hopman AH, Gosden J. Multi-PRINS: multiple sequential oligonucleotide primed in situ DNA synthesis reactions label specific chromosomes and produce bands. *Hum Genet*, 1995, 95(1): 29–33. [\[DOI\]](#)
- [14] Pellestor F, Malki S, Andreo B, Lefort G. Ultra-rapid multicolor PRINS protocol for chromosome detection in human sperm. *Chromosome Res*, 2002, 10(5): 359–367. [\[DOI\]](#)
- [15] Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescence in situ hybridization. *Hum Reprod*, 1996, 11(4): 722–726.
- [16] Brandt CA, Kierkegaard O, Hindkjaer J, Jensen PK, Pedersen S, Therkelsen AJ. Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolour PRINS. *Clin Genet*, 1993; 44: 26–31.
- [17] Pellestor F, Malki S, Andreo B, Lefort G. Ultra-rapid multicolor PRINS protocol for chromosome detection in human sperm. *Chromosome Res*, 2002; 10(5): 359–367.
- [18] Yan J, Bouchard EF, Samassekou O, Chen BZ. Identification of a human chromosome-specific interstitial telomere-like sequence (ITS) at 22q11.2 using double-strand PRINS. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 116(1-2): 29–37. [\[DOI\]](#)
- [19] Kadandale JS, Wachtel SS, Tunca Y, Martens PR, Wilroy RS, Tharapel AT. Deletion of RBM and DAZ in *Azoospermia*: evaluation by PRINS. *Am J Med Genet*, 2002, 107: 105–108. [\[DOI\]](#)
- [20] Tharapel AT, Wachtel SS. PRINS for mapping single-copy genes. *Methods Mol Biol*, 2006, 338: 59–67.

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介

遗传学：从基因到基因组（原书第三版）（配彩图光盘）

【美】L.H. 哈特韦尔 著 张博 等 选译 戴灼华 审校
978-7-03-021375-4 ¥138.00 2008年5月30日出版

本书试图集成当代遗传学知识和方法，内容主要包括：形式遗传学——基因传递规律；分子遗传学——DNA 结构及其如何指导蛋白质合成；基因组学——基因分离新技术和有机体完整基因组深入分析；人类遗传学——基因如何调控健康和疾病状态；生命形成的统一——来自不同有机体的信息合成为一个整体内核；分子进化——物种如何进化和趋异。

本书适用于高等院校生命科学、遗传学、分子生物学等专业的教师和学生使用，并可供相关专业研究人员阅读参考。

实验细胞资源的描述标准与管理规范

刘玉琴 编著

978-7-03-021135-4 ¥35.00 2008年5月20日出版

实验细胞资源平台的工作内容包括：技术规范研究制定、实验细胞实物库建设、信息库建设、质量检测及评价体系建设、共享体系建设及人才队伍建设。其中实验细胞描述规范的研究制定是实施实验细胞资源有效收集、整理及保藏的前提条件。

本书在各项目工作基础上，参考了国内外相关资料并结合我国具体情况，进一步修改、完善了实验细胞资源共性描述规范，结合平台建设，新制定了实验细胞资源保藏机构应具备的一系列制度和规章，为实验细胞资源实现标准化整理、整合共享提供完整的技术支撑。

本书可供所有实验细胞保藏单位借鉴、参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编：100717

联系人：周文宇 联系电话：010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目