

荧光原位杂交(FISH)检测人精子染色体非整倍体率方法的研究

郑履康 邓丽霞 张 桥

中山大学公共卫生学院遗传毒理研究室 广州 510089

摘要 本研究建立了荧光原位杂交(FISH)方法,并测定了十名正常健康男子精子 X 染色体非整倍体率。取少量精液经洗后制片,用二巯苏糖醇(DTT)和二碘水杨酸锂(LIS)处理,使精子头部紧密的染色质去凝集,然后与生物素标记的 α -卫星 X 染色体特异 DNA 探针(DXZ1)作原位杂交;用 Cy3-链亲和素检测杂交信号。结果在荧光显微镜下可清楚见到带有红色杂交点信号的 X 精子。杂交率平均为 48.62% (47.54% - 49.36%)。此值与 X 精子占 50% 的理论值差别无显著性。总共计数 55453 个 X 精子,X 染色体双体率为 0.06%;此结果与国外一些学者先前报导的结果一致,本研究提供的正常人 X 精子双体率的资料,为今后研究职业或环境潜在非整倍体诱导剂对人精子的影响提供有价值的材料。

关键词 荧光原位杂交;人精子染色体;非整倍体率

STUDY ON THE ANEUPLOIDY FREQUENCY IN HUMAN SPERM CHROMOSOME USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

Zheng Lukang, Deng Lixia, Zhang qiao

Lab. of Genetic Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089

Abstract The frequency of Human sperm chromosome aneuploidy was assessed from 10 normal and health adults by using the method of FISH. Sperm heads were decondensed with dithiothreitol (DTT) and lithium diiodosalicylate (LIS), then the sperm nuclei were hybridized with biotin labeled alpha satellite X chromosome specific DNA probe (DXZ1) in 37 °C overnight. The hybridization signals were detected with Cy3-Streptavidin. The red hybridization signals in X sperms were clearly visible under the Nikon fluorescence microscope. The hybridization efficiency was 48.62% (range 47.54% to 49.36%). A total 55453 X sperm nuclei were observed. The frequency of disomic sperms was 0.06%. There was no significant difference observed in disomic frequency of X sperms between ours and that reported by former authors. The information provided by this paper is valuable for further studies on men exposed occupationally or environmentally to potential aneuploidogenic agents.

Key words Fluorescence in situ hybridization (FISH); Human sperm chromosome; Aneuploidy

frequency

荧光原位杂交 (FISH) 试验是结合分子生物学、免疫学等的高新技术。近年来发展很快,其最大优点是可以与间期细胞核杂交,测定染色体非整倍体率,这可以省去由细胞培养获取中期相的麻烦。对一些体外不能分裂的细胞如人成熟精子尤为合适。近年国外学者已经用 FISH 测定人精子染色体非整倍体率;包括正常健康人⁽¹⁾;易位携带者⁽²⁾,不育者⁽³⁾等。其用途越来越广, Martin 等认为不久可用于潜在环境致突变剂和职业性致突变剂的研究。现已有作者⁽⁴⁾用 FISH 测定肿瘤患者在化疗前后精子染色体非整倍体率的改变。至于接触工业化学物质后接触工人精子染色体非整倍体率的改变尚未见有报道,有关这方面的工作亟待研究。为此我们建立了 FISH 法,并测定了 10 名正常健康男子精子 X 染色体非整倍体率。兹将我们的初步研究结果报道如下:

材料和方法

1 对象 选不接触化学毒物的献精员及正常健康男子 10 名,年龄在 24 至 41 岁,平均 32.4 ± 6.7 岁。近期末接触 X 线和致突变化学物质和药品。

用手淫法采集精液,液化后分装于小塑料离心管,-70℃ 冷冻保存(精液中未加化学防护剂)。

2 荧光原位杂交方法 荧光原位杂交方法按 Williams 等的方法,我们已有简短报道⁽⁵⁾,现简述于下:

2.1 精子标本的制备及杂交前处理 取冷冻精液 0.5ml,解冻后用精子洗涤液(10mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl pH 8.0)洗 3 次(1500r/min, 8min),末次洗涤后,将精子配成适当浓度涂于干净玻片。老化至少 1d 后作杂交前处理:将载有精子标本的玻片用二硫苏糖醇(DTT)(10mmol/L DTT, 100mmol/L Tris pH 8.0)处理 30min。再用二碘水杨酸锂(lithium diiodosalicylate LIS)(10mmol/L LIS, 1mmol/L DTT, 100mmol/L Tris pH 8.

0)处理 1~3h 使精子头部紧密的染色质去凝集,头部胀大便于探针穿透。

2.2 杂交过程 探针:为生物素标记的 - 卫星 X 染色体特异 DNA 探针(DXZ1, Oncor 公司),取 0.5ul 探针加于 10ul 杂交混合液中(含甲酰胺 55%,硫酸葡聚糖 10%,鲑鱼精子 DNA 0.05μg/μl, pH 7.0)。变性及杂交:将精子标本置 70%甲酰胺(2SSC 配 pH 7.0)的变性液中,70℃ 变性 2min,取出于 70%, 85%和 100%的乙醇中脱水各 2min;含探针杂交混合液置 70℃ 变性 5min,取出立即置于冰水浴中至少 10min,取 10ul 含探针杂交混合液加于已变性的精子标本上,盖上盖玻片,用橡胶水(rubber cement)封紧,放入预温至 37℃ 的湿盒中,将盒置 37℃ 培养箱杂交过夜(16~18 小时)。

2.3 杂交后冲洗及杂交信号检测 取出玻片除去盖玻片,置 50%甲酰胺(2SSC 配 pH 7.0)43℃ 洗 3 次,每次 5min;2SSC 液 37℃ 洗 2 次每次 4min,将未杂交上的探针洗去。将玻片置磷酸缓冲液(0.1mol/L NaH₂PO₄, 0.1mol/L Na₂HP₄, 0.1% Nonidet-P40 pH 8.0, PBD)中。杂交信号检测:依次加 Cy3-链亲和素(Cy3-Streptavidin Amersham 公司)(10ug/ml)10ul, 37℃ 保温 30min;生物素抗链亲和素抗体(biotinylated-anti-streptavidin antibody, Vector 公司)(10μg/ml)10μl, 37℃ 30min;Cy3-链亲和素 37℃ 30min。每次保温结束后将玻片置 PBD 洗液中,室温下洗 3 次,每次 2min。加 0.5μg/ml 的 DAPI(联咪二苯吲哚 4, 6-diamidino-2-phenylindole),复染 10min, PBD 洗 3 次每次 2min,最后加抗退色液(2.3% 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane DABCO),盖上盖玻片,指甲油封片,4℃ 冰箱存放。

3 观察 在 Nikon 荧光显微镜油镜下观察,用 DAPI/Texas Red/FITC 三色滤色块观察和计数,精子头部呈兰色荧光,杂交信号为红色荧光。在低倍显微镜时用 Nikon UV-2A 滤色块观察显蓝色荧光的精子核。在油镜下选

精子头部不重叠,分散和边缘清楚的精子为观察对象;凡有1个红色杂交信号,且清楚位于精子头部者计为1个X染色体精子(X精子)。若在1个精子头部有二个荧光杂交信号,其大小及荧光强度相等,两荧光点信号之间相距1个荧光点信号直径者计作1个双X染色体精子(X双体精子或XX精子)。每名受试者计数5000个荧光杂交点信号的精子(X精子),记录X双体精子数,X精子双体率以精子总数计,即以观察的X精子数乘2作为精子总数计算。下列情况不作计数:两精子头部有部分重叠,不能确定两个荧光杂交点信号有同一精子头部者;精子头部核破裂边缘不清者;精子胀得过大,大于未经处理时精子核2倍以上,或荧光杂交点信号呈弥散有间断者均不计数。

结 果

1 受试者精液:10名受试者精液量;平均 3.0 ± 1.31 ml;精子计数为 $107.7 \pm 55.1 \times 10^9/L$,畸形率 $32.5 \pm 9.4\%$,活动度在正常范围。

2 精子染色体非整倍体检测结果:在荧光显微镜下可见精子头部经DAPI复染后呈兰色荧光,边缘清楚,在兰色的精子头部见有红色杂交点信号者为X精子。标本背景清晰,精子头部以外很少有非特异性红色荧光点干扰。

2.1 杂交效率:每1受试者的标本在油镜下依次观察500个精子细胞,记录有及无荧光杂交点信号的精子数,计算杂交效率,结果如表1。由表可见,杂交效率平均 $48.62 \pm 0.53\%$ ($47.54\% - 49.36\%$)。即X精子占总数的 48.62% ,此值与X精子占 50% 的理论值,差别无显著性($P > 0.05$)。

表1 FISH 杂交效率

受试者	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	总计
观察细胞数	439	563	482	449	528	476	548	472	424	439	4 870
有荧光杂交点信号精子数	212	271	235	244	251	235	266	231	208	215	2 368
杂交效率%	48.29	48.13	48.76	48.90	47.54	49.36	48.54	48.94	49.05	48.97	48.62 ±0.53

2.2 X精子双体率:每一受试者观察5000个X精子,记录有双荧光杂交点信号的精子,求出X精子双体率(以观察X精子数乘2作为精子总数计算),结果如表2。对10名正常健

康男子总共观察有荧光杂交点信号精子55453个,精子头部有二个荧光杂交点信号者68个,X精子双体率为 $0.063 \pm 0.013\%$ 。

表2 FISH 测定正常人精子X染色体双体率

受试者	观察精子数	有1个荧光杂交点信号精子数	有2个荧光杂交点信号精子数	XX精子率%
1	10 204	10 193	11	0.05
2	5 190	5 183	7	0.07
3	5 223	5 219	4	0.04
4	5 080	5 074	6	0.06
5	4 722	4 714	8	0.08
6	5 004	4 998	6	0.06
7	5 260	5 254	6	0.06
8	5 100	5 093	7	0.07
9	5 100	5 094	6	0.06
10	4 570	4 563	7	0.07
合计	55 453	55 385	68	0.063 ±0.013

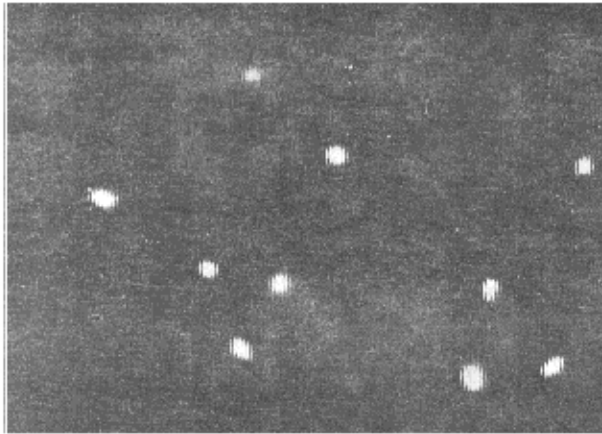


图1 正常 X 精子。用生物素标记 X 染色体特异 DNA 探针与人精子核 DNA 原位杂交, Cy3 - 链亲和素检测杂交信号。图中可见精子头部为 DAPI 复染成蓝色, 在蓝色的精子头部有红色杂交点信号者为 X 精子, 杂交点清晰, 背景亦很清楚, (本照片为 Koda1000 自动对光拍摄)

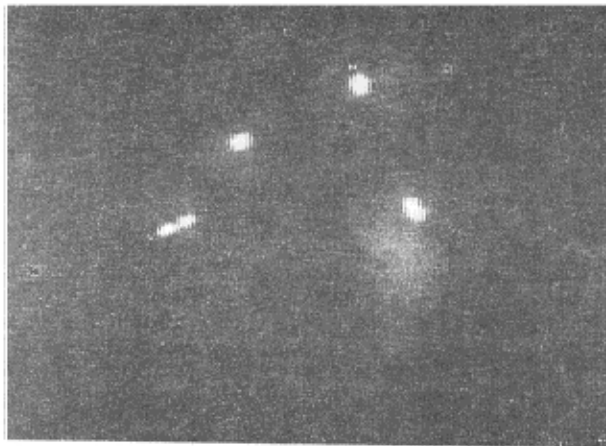


图2 双 X 精子。图中可见 3 个精子有白(红)色杂交交点信号为 X 精子, 1 个精子无杂交信号为 Y 精子, 另一精子有二个杂交点信号, 为双 X 精子

讨 论

荧光原位杂交试验的成功有二个要点: 精子染色质去凝集; 由于成熟精子染色质排列紧密, 探针难以穿透。本次试验我们用 DTT 和 LIS 处理精子使染色质去凝集, 精子头部胀大至适当大小探针易于穿透。10 次试验平均杂交效率为 $48.62 \pm 0.53\%$ ($47.53\% - 49.36\%$), 即 X 精子占 48.62%。此结果表明精子去凝集是恰当的。杂交信号的检测: 杂交信号荧光强, 背景清晰才能使计数准确。最初我们用得克萨斯红亲和素 (Texas Red-avidin) 作检测剂, 效果不是很理想, 本次试验我

们采用 Cy3 - 链亲和素 (Cy3-Streptavidin) 作为杂交信号检测剂。其优点是 Cy3 为新型氟化荧光色素, 其荧光强度大于 Texas Red 1 倍, 大于荧光素 (Fluorescein FITC) 5 - 10 倍⁽⁶⁾, 故荧光信号强。而链亲和素与亲和素 (Avidin) 不同, 分子中没有碳氢侧链, 不与受试物非特异结合故背景非常清晰, 荧光杂交点信号很清楚。

本次我们选择杂交效率在 47% 以上的标本作计数, 总共计数 55453 个精子, 其中头部有二个荧光杂交点信号的精子 68 个, X 精子双体率为 $0.063 \pm 0.013\%$ (略作 0.06%), 此

值与文献报道多数作者用 FISH 法测定的 X 双体值(0.03 - 0.08%)一致(表 3)。如 Martin 等⁽¹⁾ 96 年报道 10 位正常健康人,每人计数 5000 个 Y 精子,5000 个 X 精子,X 双体率为 0.07%(以总精子数计),我们的结果亦与 Holmes 等⁽⁷⁾ chevret 等^(8,9) 的结果(0.3 - 0.05%)相近,但与 Bischoff 等⁽¹⁰⁾ (1994) 及 Han 等^(11,12) 的结果相差较大。他们分别报道 X 双体率为 0.37%和 0.28 - 0.29%。这些差

别主要是不同实验室方法的不同;如精子去凝集;计数杂交点信号的标准;计数细胞数;受试人数等。由于精子非整倍体率低,故有人认为每一受试者需计数 10000 精子计算才较可靠。Bischoff 等人仅测定 2 名受试者,总共计数 6071 个精子,Han 等虽然测定了 13 名受试者,但每例仅计数 1000 个精子的双体率,故有差别。

表 3 不同作者用 FISH 法检测人精子 X 染色体双体率(%)

作者	受试人数	每例观察精子数	观察精子总数	XX 精子数	X 精子双体率 %	备注	文献号
Holmes 等	1	7 003	7 003	2	0.03		7
Han 等	13	1 000	13 396	39	0.29		11
Guttenbach 等	7	2 000	13 810	47	0.17	*	14
Miharu 等	9	4 000	38 748		0.07	*	3
Han 等	12	1 000	12 636	35	0.28		12
Wyrobek 等	1	17 810	17 810	7	0.04		15
Chevret 等	1	10 638	10 638	5	0.05		9
Williams 等	9	5 000	69 788	55	0.04	*	16
Bischoff 等	2	3 000	6 071	23	0.37		10
Chevret 等	4	10 000	94 575	26	0.04		8
Martin 等	10	10 000	102 691	75	0.07		1
本文	10	5 000	55 453	68	0.06	*	

* X 精子双体率以 X 精子乘 2 作为总精子数计算 原文无只有 %率

由于本试验仅用 1 条探针,还不能区别有二个荧光杂交点信号的精子属双体(n+1)或二倍体(2n)精子;一些作者认为精子头部大者为二倍体精子,排除计数,本试验在观察时亦排除头部过大的精子不计数,减少误差。Martin 等⁽⁷⁾和 Robbins 等⁽¹³⁾ 曾用 1 条探针用 FISH 法测定人精子染色体非整倍体率并与传统人精子染色体核型分析获得的非整倍体率加以比较,两种方法的结果是一致的。

某些工业化学物质可以使接触女工及男工妻子自发流产率增高(如二硫化炭,氯丁二烯等),而染色体数目畸变可引起自发流产,不论二倍体或双体精子,若受精后,均有可能使胚死亡发生流产,目前对工业化学物是否能诱导人生殖细胞非整倍体率增加尚不清楚。FISH 方法的建立和对正常人 X 精子双体率的测定,为今后研究环境和职业性潜在非整倍

体诱导剂,致突变剂后对生殖细胞的遗传损伤作用,以及探讨某些化学物质生殖毒性作用的机理提供了有价值的材料。

参考文献

- 1 Martin RH, Spriggs E, and Rademaker AW. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225846 sperm from 10 normal men. *Biol Reprod* 1996;54:394
- 2 Rousseaux S, Cheverte E, Monteil M et al. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: Analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1995; 71:240
- 3 Miharu N, Best RG and Young SR. Numerical Chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, 1994;93:502
- 4 Martin RH, Ernst S, Rademaker AW. Chromosomal abnor-

喉鳞癌组织中 Bcl - 2 和 P53 蛋白表达及意义

周晓蓉¹ 吴 坤¹ 韩多吉² 赵瑞波³

¹哈尔滨医科大学公卫学院毒理教研室 哈尔滨 150001

²黑龙江省肿瘤医院头颈外科 ³ 哈尔滨医科大学病理教研室

摘要 为了探讨 bcl - 2、P53 在喉鳞癌组织中的表达情况、预后的意义,我们应用免疫组化 LSAB 法对 53 例喉鳞状上皮细胞癌组织进行 bcl - 2、P53 基因蛋白表达的测定。结果显示:(1)47.17% 的喉癌中检出突变型 P53 蛋白,在部分喉癌癌旁不典型增生上皮中可见 P53 蛋白表达,癌旁组织细胞已发生 P53 基因突变可能是术后复发的根源,突变型 P53 蛋白过度表达是喉癌发生的早期事件。P53 蛋白表达与较低的病理学分级、较高的核分裂数有关($P < 0.05$, $P < 0.01$),P53 蛋白表达阳性者肿瘤组织坏死例数高于 P53 表达阴性者($P < 0.01$),P53 蛋白表达阳性者生存期低于 P53 表达阴性者,P53 表达与淋巴结转移及患病年龄无关,对判断肿瘤的恶性程度、预测肿瘤分化及预后较高实用价值。(2)喉鳞癌组织中 bcl - 2 蛋白表达与较低的核分裂数及较小的患病年龄有关($P < 0.05$, $P < 0.05$),而与病理学分级、组织坏死、淋巴结转移及患者存活期无关,没有独立的预后价值。

关键词 Bcl - 2;P53;免疫组织化学;喉癌;预后

- rmalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Hum Genet* 1997;99:24
- 5 郑履康,邓丽霞,张桥.用荧光原位杂交检测人精子染色体非整倍体方法. *卫生毒理学杂志*,1996;10:183
 - 6 Yurov YB, Soloviev IV, Vorsanova SG. et al. High resolution multicolor fluorescence in situ hybridization using cyanine and fluorescein dyes: rapid chromosome identification by directly fluorescently labeled alphoid DNA probes. *Hum Genet*,1996;97:390
 - 7 Holmes JM & Martin RH. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, 1993;91:20
 - 8 Chevret E, Rousseaux S; Monteil M, et al. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet*, 1995;71:126
 - 9 Chevrt E, Rousseaux S, Monteil M, et al. Male meiotic segregation of gornosomes analysed by two colour FISH in human interphase spermatozoa. *Hum Genet*,1994;94:701
 - 10 Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt, KJ, et al. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet*,1994;66:237
 - 11 Han TL, Webb GC, Flaherty SP, et al. Detection of chromosome 17-and X-bearing human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*;1992;33:189
 - 12 Han TL, Ford JH, Webb GC, et al. Simultaneous detection of X-and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*,1993;34:308
 - 13 Robbins WA, Seagraves R, Pinkel D, et al. 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;52:799
 - 14 Guttenbach M, Schakowski R, and Schmid M. Incidence of chromosome 3,7,10,11,17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by noradioactive in situ hybridization. *Hum Genet*, 1994;93:7
 - 15 Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, et al. Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*, 1994;53:1
 - 16 Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, et al. Non-disjunction in human sperm: Results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet*, 1993;2:1929