

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00895

QF-PCR 在染色体异常男性不育症诊断中的应用

齐漫龙, 张媛媛, 刘晓亮, 何蓉, 赵彦艳

中国医科大学附属盛京医院临床遗传科, 沈阳 110004

摘要: 为评估定量荧光 PCR (QF-PCR) 方法在男性不育遗传学诊断中的应用价值, 文章对 78 例非梗阻性男性不育患者, 采用精液常规检测精子情况, 并检测患者性激素水平; 采用 QF-PCR 方法对患者性染色体多态性 STR 位点及特异性位点进行检测; 采用常规染色体 G 显带方法进行核型分析; PCR 检测 *AZF* 微缺失。结果显示 78 例非梗阻性男性不育患者中发现无精子症患者 18 例, 少精子症患者 20 例, 总检出率为 48.72%。采用 QF-PCR 方法检出 3 例 47, XXY 患者, 2 例 46, XX(*SRY*+) 性反转患者, 1 例 *AZFc* 区微缺失患者, 与细胞培养染色体分析和 *AZF* 微缺失 PCR 检测结果相符。与传统方法相比, QF-PCR 技术能更迅速、直接、可靠地检测到男性不育患者的染色体异常区域, 及早发现染色体细微结构异常, 有助于染色体异常造成的男性不育症的鉴别诊断。

关键词: 无精子症; 遗传学; 基因; STR; *SRY*

Chromosomal abnormality diagnosis of male infertility by QF-PCR

QI Man-Long, ZHANG Yuan-Yuan, LIU Xiao-Liang, HE Rong, ZHAO Yan-Yan

Department of Clinical Genetics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract: To assess the clinical practice of quantitative fluorescence PCR (QF-PCR) in genetic diagnosis of male infertility patients, 78 nonobstructive male infertility patients were pooled for semen routine screening and sexual hormone determination; QF-PCR was applied to detect the polymorphic short tandem repeat (STR) and specific sequence tagged site (STS) of sex chromosomes; routine chromosome G-band was used for karyotype analysis and PCR was used for the detection of *AZF* microdeletion. Routine screening of semen found 18 azoospermia and 20 oligospermia patients (48.72%). Three patients with 47, XXY, two with 46, XX(*SRY*+) and one with *AZFc* microdeletion were detected using QF-PCR technique which were verified by chromosome G-band and PCR. This study suggests that QF-PCR is a comprehensive, rapid and reliable method for detecting abnormal chromosomal regions and microstructures compared with traditional tests and provides a better candidate for diagnosis of male infertility caused by chromosomal anomalies and gene mutation.

Keywords: azoospermia; genetics; gene; STR; *SRY*

男性不育约占育龄夫妇不孕的 50%^[1], 其病因非常复杂, 可分为阻塞性与非阻塞性两大类, 主要涉及遗传因素、内分泌因素、免疫因素、感染等方面。现有诊断技术的局限性, 使误诊及过度治疗时有发生。开发快速灵敏的检测技术, 及时准确的找

出男性不育的病因, 对于寻求可能的治疗途径和提高治疗效果都具有重要的临床意义。基因组中分布广泛的短串联重复序列 (Short tandem repeat, STR) 作为遗传标记已越来越多的应用在临床检测中。本研究将性染色体上多态性 STR 及特异位点与定量荧光

收稿日期: 2011-04-29; 修回日期: 2011-07-14

作者简介: 齐漫龙, 博士在读, 研究方向: 复杂疾病的分子遗传学研究。Tel: 024-96615-13439; E-mail: 2005fyuan@sina.com

通讯作者: 赵彦艳, 博士, 教授, 研究方向: 复杂疾病的分子遗传学研究。E-mail: yzhaos@sj-hospital.org

PCR (Quantitative fluorescence PCR, QF-PCR)技术相结合,检测无精和少精不育患者,同时进行了染色体核型分析,旨在寻找快速、灵敏和特异性高的男性不育遗传学诊断的新技术。本文通过与通用检测技术相比较,举例说明 QF-PCR 技术在男性不育的病因及其鉴别诊断方面的优越性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 10 月-2011 年 3 月来中国医科大学附属盛京医院辅助生殖门诊 78 例男性不育患者作为研究对象,均经临床门诊和实验室检查排除阻塞性不育病因。

1.2 方法

1.2.1 精液常规与性激素检查

采用以色列全自动精子分析仪,正常参考值按照 WHO 标准^[2]进行判断。检测内容包括精液量、pH 值、精子浓度、精子总数、精子活力、精子存活率、精子形态分析、非精子细胞成分如白细胞分析。经 3

次或 3 次以上精液常规检测精子密度均为 0、将精液离心沉淀后,显微镜下仍未发现精子者诊断为无精子症;精子密度 $<2 \times 10^9/L$ 诊断为少精子症。性激素检查采用北京倍爱康 BH P9507 化学发光免疫分析仪和试剂盒测定血清促黄体生成素(Luteotropic hormone, hLH)、促卵泡生成素(Follicle stimulating hormone, hFSH)、泌乳素(Prolactin, PRL)、睾酮(Testosterone, Testo)、绒毛膜促性激素(Chorionic gonadotrophin, TBHCG)、雌二醇(Estradiol, E2),操作方法按说明书。

1.2.2 基因组 DNA 提取

对于无精和少精患者,依据知情同意原则,取患者 EDTA 抗凝静脉血 2 mL,采用微量血柱式 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司),依照说明书提取基因组 DNA。

1.2.3 QF-PCR 技术

引物设计和合成:针对 X、Y 染色体杂合度较高的 STR(含 *AZFc* 区 STR *DYS448*)和特异性位点,以及 *SRY* 基因设计合成引物(引物序列见表 1)。正向引物 5'末端以不同颜色荧光标记。

表 1 X、Y 染色体扩增引物序列

| 名称 | 位点 | 引物序列(5'→3') | 片段大小(bp) |
|------------------|-------------|--|----------|
| QF-PCR 检测引物 | | | |
| <i>AMEL</i> | Xp22.2 | CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG | 106 |
| | Yp11.2 | ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG | 112 |
| <i>DXS6803</i> | Xq21.2 | GAAATGTGCTTTGACAGGAA | 97-125 |
| | | CAAAAAGGGACATATGCTACTT | |
| <i>X22</i> | Xq28 | TCTGTTAATGAGAGTTGAAAAGAAA | 194-238 |
| | | ATTGTTGCTACTTGAGACTTGGTG | |
| <i>SRY</i> | Yp11.31 | AGTAAAGGCAACGTCCAGGAT | 243 |
| | | TTCCGACGAGGTCGATACTTA | |
| <i>DYS488</i> | <i>AZFc</i> | CAAGGATCCAAATAAAGAACAAGA GGTTATTCTTGATTCCTGTG | 346-376 |
| AZF 微缺失 PCR 检测引物 | | | |
| <i>sY84</i> | <i>AZFa</i> | AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT | 328 |
| | | GCCTACTACCTGGAGGCTTC | |
| <i>sY86</i> | <i>AZFa</i> | GTGACACACAGACTATGCTTC | 320 |
| | | ACACACAGAGGGACAACCCT | |
| <i>sY127</i> | <i>AZFb</i> | GGCTCACAAACGAAAAGAAA | 271 |
| | | CTGCAGGCAGTAATAAGGGA | |
| <i>sY134</i> | <i>AZFb</i> | GTCTGCCTCACCATAAAACG | 301 |
| | | ACCACTGCCAAAACCTTTCAA | |
| <i>sY254</i> | <i>AZFc</i> | GGGTGTTACCAGAAGGCA AA | 381 |
| | | GAACCGTATCTACCA AAGCAGC | |
| <i>sY255</i> | <i>AZFc</i> | GTTACAGGATTCGGCGTGAT CTC GTC ATG TGC AGC CAC | 126 |

PCR 扩增: 取 DNA 模板 50~100 ng, TransStart Taq 酶(Transgene Biotech 公司)进行总体积 25 μ L 的多重 PCR 扩增。PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物的检测: PCR 产物经试剂盒(Axygen 公司)纯化后, 与去离子甲酰胺及 LIZ500 内标混合, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立刻放入冰浴中 5 min; 在 ABI 3730 遗传分析仪上进行电泳, GENEMAPPER 软件分析结果。结果判断标准为(以正常人为例): 若检测位点为杂合子, QF-PCR 产物显示为双峰, 其荧光强度(峰高)比值为 1: 1; 若为纯合子, QF-PCR 产物显示单个高值的峰。遇到检测结果异常的重新进行 DNA 提取和 QF-PCR 检测, 两次检测结果一致时方可诊断。

1.2.4 染色体核型分析

取肝素抗凝外周血常规淋巴细胞培养、制片、G 显带, 计数 30 个中期分裂相, 分析 3~5 个核型。遇到嵌合型时计数加倍。

1.2.5 AZF 微缺失检测

以无精和少精患者外周血基因组 DNA 为模板, 多重 PCR 扩增 AZFa、AZFb、AZFc 区各 2 个序列标签位点(Sequence tagged sites, STS), 分别为 *sY84* 和 *sY86*、

sY127 和 *sY134*、*sY254* 和 *sY255*(引物序列见表 1)。以健康已生育男性 DNA 为阳性对照, 女性 DNA 为阴性对照。PCR 产物经琼脂糖电泳检测 AZF 微缺失。

2 结果与分析

2.1 精液常规检测

78 例男性非阻塞性不育患者中共检出无精子症患者 18 例, 发生率为 23.08%, 少精子症患者 20 例, 发生率为 25.64%。

2.2 QF-PCR 检测

对于无精子症和少精子症患者, 应用 QF-PCR 方法, 检测时间为 3~5 d, 检测出异常病例如下:

2.2.1 47,XXY 3 例, 检出率为 7.89%

代表性峰图(图 1)显示: X、Y 特异性位点 *AMEL* 呈 2:1 峰, X 多态性 STR 位点 *DX56803* 为 1:1 峰, X、Y 多态性 STR 位点 *X22* 为 1:1:1 峰, *SRY* 位点呈阳性峰, *AZFc* 区 STR 位点 *DYS448* 呈阳性峰。结果提示 X 染色体二倍体, Y 染色体阳性。与染色体核型分析结果一致。

2.2.2 46,XX(SRY+)性反转 2 例, 检出率为 5.26%

代表性结果如图 2 所示, X、Y 特异性位点呈

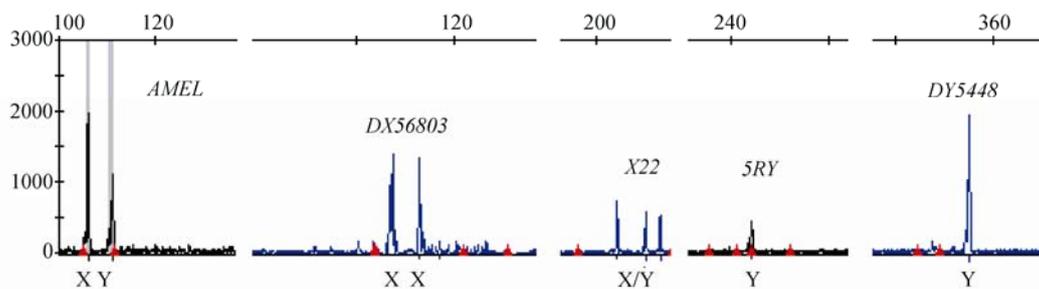


图 1 47,XXY 患者 QF-PCR 检测峰图

X 轴为扩增片段大小, Y 轴为荧光强度值。

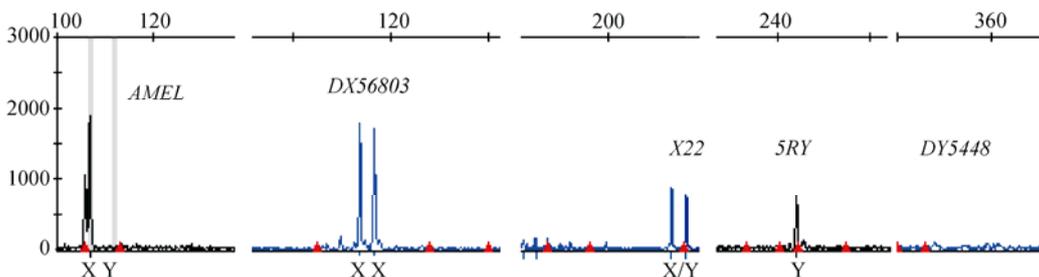


图 2 46,XX(SRY+)性反转患者 QF-PCR 检测峰图

AMEL 单峰, X 多态性 STR 位点 *DX6803* 为 1:1 峰, X、Y 多态性 STR 位点 *X22* 为 1:1 峰, *SRY* 位点呈阳性峰, *AZFc* 区 STR 位点 *DYS448* 阴性。上述结果说明 X 染色体二倍体, *SRY* 阳性。这 2 例患者经染色体核型分析, 仅 1 例检出 Y 染色体 *SRY* 基因所在区域易位到 X 染色体短臂末端, 易位片段较长, 达到镜下可识别范围, 患者核型为 46,X, der(X), t(X;Y)(p22;p11) (图 3A); 另 1 例未发现 *SRY* 基因易位位置,

提示该患者发生易位的含 *SRY* 基因片段较短(图 3B)。

2.2.3 46,XY,*AZFc* 区微缺失 1 例, 检出率为 2.63%

该病例峰图如图 4 所示, X、Y 特异性位点 *AMEL* 呈 1:1 峰, X 多态性 STR 位点 *DX6803* 为单峰, X、Y 多态性 STR 位点 *X22* 为 1:1 峰, *SRY* 位点呈阳性峰, *AZFc* 区 STR 位点 *DYS448* 阴性。说明是男性核型, 而

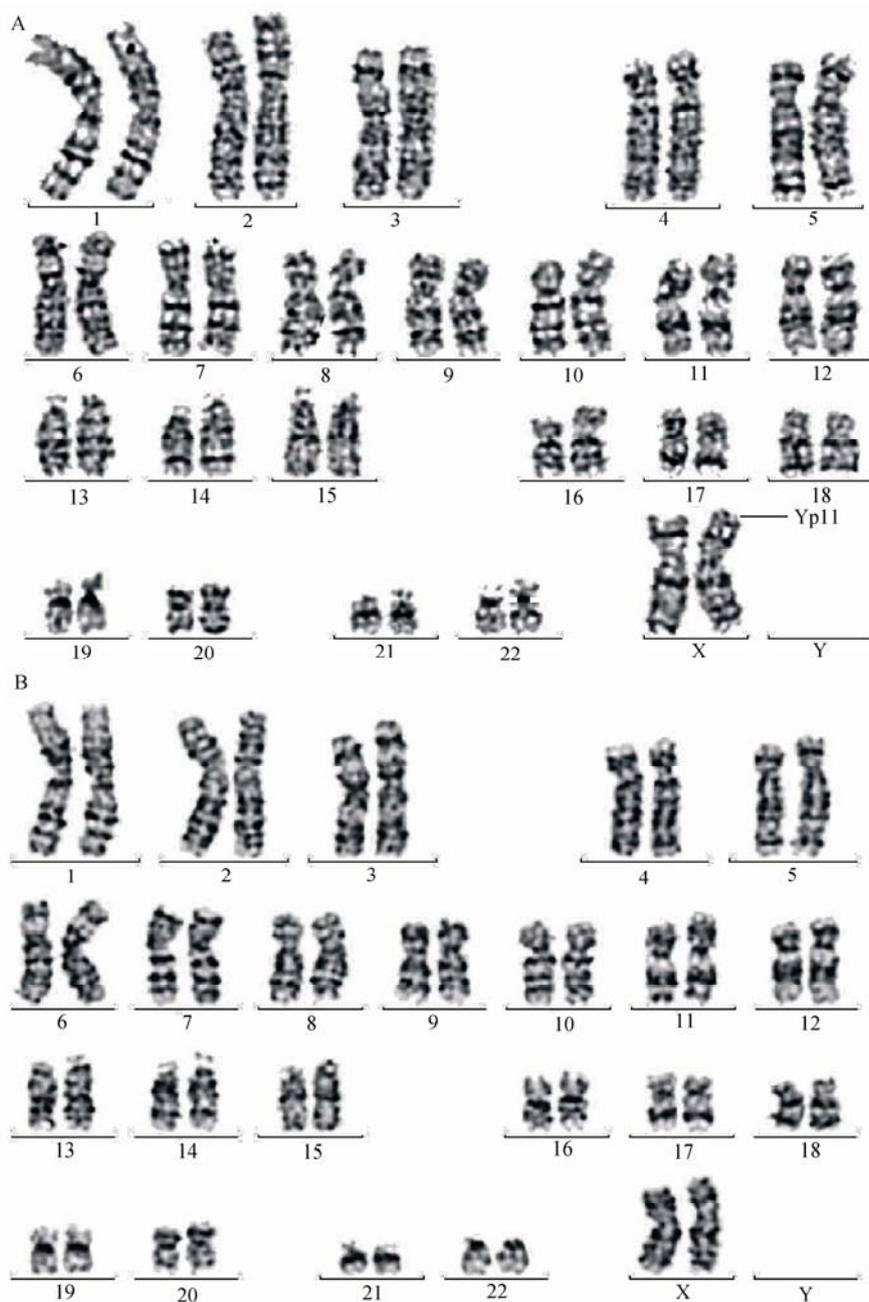


图 3 46,XX(*SRY*+)性反转患者染色体核型分析示意图

A: 46,X,der(X),t(X;Y)(p22;p11)(*SRY*+)患者核型图; B: 46,XX(*SRY*+)患者核型图。

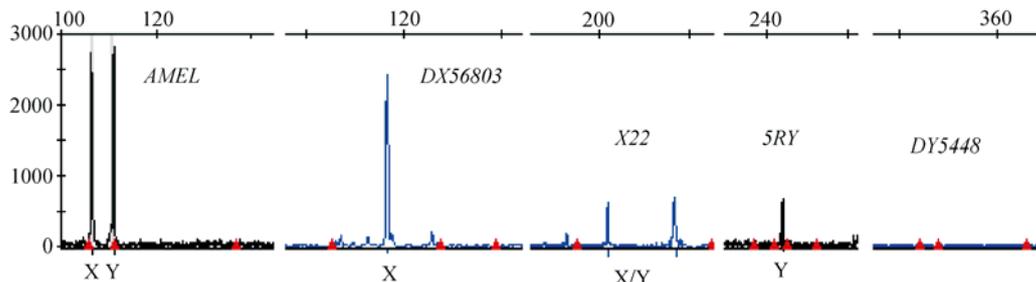


图 4 46,XY,AZF_c 区微缺失患者 QF-PCR 检测峰图

存在 AZF_c 区微缺失。患者 AZF 缺失热点区 AZF_a、AZF_b、AZF_c 区各 2 个 STS 多重 PCR 检测发现 AZF_c 区 *sY254* 和 *sY255* 序列缺失, 与 QF-PCR 结果一致。

2.3 染色体核型分析

常规培养细胞的染色体核型分析检测到 3 例 47,XXY, 2 例 46,XX 性反转患者, 与 QF-PCR 结果相符合。但与 QF-PCR 方法相比, 染色体核型分析检测时间较长, 为 2 周, 而且存在培养失败的风险。

另外, 病史回顾显示 47,XXY 患者和 46,XX 性反转患者在临床表现及检测指标上有很多的相似性。即社会性别均为男性, 男性第二性征均发育不良, 精液检查均为无精子症患者, 性激素检测显示 47,XXY 患者和 46,XX 性反转患者激素水平变化相近, 其中 hLH 水平及 hFSH 水平均明显升高。3 例 47,XXY 患者 hLH 分别为 36.44 IU/L、78.12 IU/L、56.92 IU/L(正常参考值为 1.24~8.62 IU/L), hFSH 分别为 45.96 IU/L、62.31 IU/L、48.72 IU/L(正常参考值为 1.27~19.26 IU/L)。2 例 46,XX 性反转患者 hLH 分别为 26.73 IU/L、34.76 IU/L, hFSH 分别为 48.89 IU/L、53.61 IU/L。

3 讨论

我国大约有 15% 的育龄夫妇不孕, 其中男性不育约占 50%。男性不育的病因与影响精子发生的因素相关, 遗传因素是导致无精子症及少精子症的主要原因之一^[3], 如染色体异常和基因突变。对于遗传性男性不育, 临床上由于诊断医师经验不足选择检查项目不当, 通常造成误诊和延后诊断, 由于该类患者对各种治疗通常无明显效果, 给患者身心和经济带来巨大损、给医疗资源带来巨大浪费。因此, 选用恰当方法及时发现染色体异常和基因突变造成的

男性不育并进行精确诊断及相应治疗势在必行。

QF-PCR 应用了光谱技术与计算机技术相结合, 其优点主要表现在高敏感性、高特异性、高精度性、高效性等方面, 目前已广泛应用于临床检测^[4-10]。对于男性不育的遗传学诊断, 我们选择 X、Y 染色体上杂合度较高的 STR 多态位点以及特异性位点, 期望定位常见的性染色体异常区域。我们的研究结果显示, 与传统的染色体核型分析相比, QF-PCR 技术能更迅速、直接地检测到染色体异常区域, 有助于染色体异常男性不育患者的检出, 从而大大降低假阴性诊断的发生; 而且, QF-PCR 技术还能及早发现传统染色体核型分析方法无法识别的染色体细微结构的异常, 如微缺失或微易位, 为男性不育患者及早正确治疗提供可靠依据。

根据本研究结果, 我们发现 QF-PCR 技术还有助于染色体异常和基因突变造成的男性不育的鉴别诊断。首先, 该技术可以区分 46,XX(SRY+) 和 46,XX(SRY-) 患者。如患者 SRY 位点呈阳性峰, X 多态性 STR 位点为 1:1 峰, X、Y 多态性 STR 位点为 1:1 峰, AZF 区位点阴性, 提示患者核型为 46,XX(SRY+); 换之 SRY 位点为阴性峰, X 多态性 STR 位点为 1:1 峰, X、Y 多态性 STR 位点为 1:1 峰, AZF 区位点阴性, 提示患者核型为 46,XX(SRY-)。有效区分 46,XX(SRY+) 和 46,XX(SRY-) 患者对于性反转患者接下来的进一步检查和治疗都具有重要的指导意义。其次, QF-PCR 技术还可区分临床表型相近的 klinefelter 综合征和 46,XX 性反转患者。两者在实验室检查结果上有很多相似点, 如无精、激素水平变化相近, 易于混淆。QF-PCR 技术显示: klinefelter 综合征患者在 X、Y 多态性 STR 位点处呈 n:1(n-1) 峰, AZF 区位点呈阳性峰, 而 46,XX 性反转患者在 X、Y 多态性 STR 位点处呈 1:1 峰或单峰, AZF 区位点阴性。

研究表明, Y 染色体长臂 Yq11.23 的 AZF 区缺失与无精子症密切相关^[1]。现已明确至少有 3 个精子生成部位(AZFa、AZFb、AZFc), 分别位于 Yq11.23 的近、中、远端。其中 AZFc 缺失是精子生成障碍最常见原因。本研究中我们在 AZF 基因 c 区选择一个 STR-DYS448, QF-PCR 检测发现了 1 例男性不育患者该位点为阴性, 提示患者 Y 染色体 AZFc 区微缺失, 该结果与传统 PCR 检测 AZFc 区微缺失的结果一致。这一结果提示我们可以通过 AZF 基因的遗传标记, 应用 QF-PCR 技术检测 AZF 微缺失。因此, 我们在接下来的研究工作中, 针对 AZFa、AZFb、AZFc 3 个区分别设计荧光标记引物 sY84 和 sY86、sY127 和 sY134、sY254 和 sY255, 全面完善对于 AZF 区微缺失的检测。由于 QF-PCR 方法一次即可完成对多条染色体多个遗传标记的同时检测, 因此避免了对患者的重复抽血, 为疾病的诊疗赢得更多时间。

当然, QF-PCR 是一种半定量分析, 其相对定量方法是在测定目的基因的同时测定对照基因。对照基因主要是用于核苷酸的拷贝数的比较、反映反应体系内是否存在 PCR 扩增的影响因素。为保证这种半定量分析的准确性, 需要注意以下两点: (1) 相比较的检测位点最好使用相同的引物扩增, 以保证其扩增效率基本一致; (2) 要优化多重 PCR 的反应条件, 以保证各个位点扩增的效率和特异性。另外, 应用 QF-PCR 方法目前仅能检出包括性染色体数目异常、AZF 区缺失、SRY 缺失或易位的男性不育症患者, 尚不能检出染色体平衡易位及异常核型 < 60% 的嵌合体; 而且, QF-PCR 检测结果还会受到检测位点选择、STR 位点杂合度等因素的影响, 因此在临床项目开展中要考虑到 QF-PCR 方法的上述局限性。在患者来源上主要选择临床上原因不明的无精及少精症患者。

随着 QF-PCR 技术的不断完善和研发, 男性不育症分子遗传学的不断发展, 临床实践中将会有更多有价值的遗传标记被发掘出来, 使男性不育患者迅速、准确找到病因成为可能, 为男性不育实现科学诊疗提供依据。

参考文献(References):

[1] Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. 世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册. 李铮,

张忠平, 黄翼然, 王益鑫, 朱晓斌, 刘毅东, 张斌, 卢慧, 王磊, 曹小蓉, 刘勇, 王一飞, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 1-2.

- [2] 世界卫生组织. 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册 (第 4 版). 谷翊群, 陈振文, 于和鸣, 罗宏志, 裴开颜, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 45.
- [3] Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *J Biosci*, 2003, 28(2): 163-168.
- [4] Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, Rueda L, Lloveras E, Fuster C, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn*, 2009, 29(1): 40-49.
- [5] Liao C, Yang X, Li FT, Li J, Li DZ. The detection of aneuploidy and maternal contamination by QF-PCR in samples undergoing prenatal diagnosis for thalassemia in Southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 144(2): 149-152.
- [6] Onay H, Ugurlu T, Aykut A, Pehlivan S, Inal M, Tinar S, Ozkinay C, Ozkinay F. Rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in amniotic fluid using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest*, 2008, 66(2): 104-110.
- [7] Badenas C, Rodríguez-Reventa L, Morales C, Mediano C, Plaja A, Pérez-Iribarne MM, Soler A, Clusellas N, Borrell A, Sánchez MÁ, Miró E, Sánchez A, Milà M, Jiménez W. Assessment of QF-PCR as the first approach in prenatal diagnosis. *J Mol Diagn*, 2010, 12(6): 828-834.
- [8] Christopoulou S, Christopoulou G, Hatzaki A, Hatzipoulou A, Donoghue J, Karkaletsis M, Kaminopetros P, Sifakis S, Velissariou V. The replacement of cytogenetic analysis by direct chorionic villi sampling preparation with quantitative fluorescence PCR. *Gynecol Obstet Invest*, 2009, 68(4): 255-261.
- [9] Morales C, Sánchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borobio V, Soler A. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(1): 66-70.
- [10] 卢彦平, 程静, 姜淑芳, 张利文, 高志英, 韩冰, 袁慧军, 李亚里. 多重荧光定量 PCR 技术快速诊断 21 三体及 18 三体方法的建立及临床应用. *遗传*, 2010, 32(11): 1141-1146.
- [11] Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*, 1976, 34(2): 119-124.