技术方法

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201412181

活细胞工作站使用中的视野漂移与矫正

杜 娟[1],孙剑会[1],李 力[2],杨 策[1],曾 灵[1],王海燕[1],蒋建新[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1],呼吸内科[2])

[摘要] **目的** 在现有的硬件水平上找到一种简便可行的方法来矫正影像漂移问题。**方法** 利用活细胞工作站采集细胞运动的数据,并利用Imaris软件对视野中的细胞和不动点进行轨迹分析。提出了一种利用视野中的不动点矫正视野移动的方法,即借鉴数学微积分的原理,还原细胞运动的真实情况。共进行了3次重复实验,每次实验分别选择了5个细胞和3个不动点进行轨迹追踪。**结果** 视野中存在不动点,利用这些不动点可获得细胞的真实坐标,并对细胞移动方向进行矫正,通过矫正,消除了影像漂移带来的对细胞运动方向的影响,矫正前后差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 基于定点标记的数学模拟矫正方法能有效克服活细胞摄影过程中的漂移问题。

[关键词] 表皮干细胞;创伤;修复;电刺激;迁移;视野移动;不动点;矫正

[中图法分类号] R329-33 [文献标志码] B

活细胞工作站是研究者观察活细胞各种生命现象的重要工具,在利用活细胞工作站动态观察电活细胞生物学行为时,观察视野常常存在非动力性偏移,这对我们判断细胞生物学行为的变化产生较大的影响。但是,视野的偏移是一个长期存在的问题,是一种存在于显微镜镜头和样本之间的物理漂移。可能由系统本身的不稳定性或温度变化引起。在成像过程中,各种系统均不可能处于绝对恒温状态,故均不可避免的出现视野的偏移[1-2],如何解决这个问题显得十分关键。目前,各研究机构和实验室也采用了很多方法来矫正视野偏移。Lee等[3]采用人为添加标记点的方法矫正视野移动,但该方法操作复杂,且可能对细胞状态有影响。Husain等[4]开发了一个软件系统,并将其整合进入图像采集系统,控制偏移的产生。但该方法对于大部分实验室难以推广,技术要求高。Kim等[5]采用恒温材料制作培养体系,但造价昂贵,难以推广。另外,Carter等[2]也采用特殊的载物台减弱偏移。大部分的矫正方法都由于造价昂贵而难以推广,因此在目前硬件水平难有很大提升的情况下,找到一种简便可行的矫正方法很有必要。本研究采用不动点示踪结合数学矫正的方法,矫正由于视野移动造成的细胞运动速率和运动方向的偏差。具有无需提升固有的硬件和软件水平,简便、快速,只需做一次轨迹分析,即可利用数学公式进行矫正,且操作技术要求低的优点。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518104);国家自然科学基金重点项目(81030037)

[通信作者] 蒋建新,电话:(023)68757448,E-mail:hellojjx@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150410.1503.010.html(2015-04-10)

1 材料与方法

1.1 设备和软件

采用的成像系统是由美国API公司生产的Deltavison活细胞工作站,它可使研究者了解细胞在正常生理生化条件下的各种状态变化,从而发现和确定细胞间相互作用、信号传导的过程,以及在外界条件干预下,细胞的迁移特性。细胞轨迹分析采用的软件为Bitplane公司提供的Iamris分析软件,通过对视野内细胞运动的追踪,软件会自动生成关于轨迹分析的各种数据,如:X/Y方向上的位移(Track displacement X/Y)、各个细胞在不同时间点的XY坐标(Position)、位移(Track displacement length)、轨迹长度(Track length)等。

1.2 图像采集的方法

分离培养的大鼠表皮干细胞接种在10 cm塑料培养皿的趋电小室中,其中细胞接种面积大小为2 cm×5 cm。在电刺激的作用下,我们利用活细胞成像系统对细胞的运动能力及方向进行长时观察。我们共选择了10个视野的细胞进行追踪观察,每个视野约20个细胞。物镜放大倍数为20×(1pixel=0.794 2 μm),目镜为×10,我们设置每隔5 min对这10个视野采集1次图像,共观察2 h,程序运行完成后,我们共获得10个DV文件,每个DV文件对应1个视野24个时间点的图片。重复3次实验。

本研究采用200倍观察视野,因为在低倍下如果都能观察到明显漂移,那在高倍下的漂移现象就更明显,

另外,在200倍下观察细胞大小合适,故选择200倍进行观察。

1.3 *轨迹追踪及细胞迁移分析方法*

单个的表皮干细胞的形态为近似椭圆形或多角形,故我们选取视野中形态近似椭圆的细胞进行轨迹追踪,使用软件为Bitplane公司的Imaris分析软件。各时间点追踪的中心为细胞核或不动点的形态中心。

视野中的不动点可以是培养皿底部的划痕、固定不动的杂质,也可以是电刺激系统盖玻片上的污渍。原则是固定在培养皿中不动,不会因为细胞的移动而移动,只会随着视野的移动而产生相同移动。对于不动点的形态、大小没有特殊要求。如果成像系统中不存在这样的不动点,我们也可以人为的用利器在培养皿底部加入这样的标记。

轨迹追踪得到的数据包括Track displacement X(Dx:起点到终点在X方向上的移动距离)、Track displacement Y(Dy:起点到终点在Y方向上的移动距离)、Track displacement length(Td:起点到终点的位移)、Track length(Tt:起点到终点的轨迹长度)、Positon(各个时间点的X/Y坐标)等。根据以上参数,我们得到4个用于评价细胞运动特征的指标,首先是反映在既定方向的定向迁移能力的指标:X轴迁移速率 = Dx/t。其次是反映细胞定向迁移快慢的指标:位移速率 = Td/t。再次是反映细胞定向性的指标:cosθ = Dx/Td。最后是反映细胞自身迁移能力的指标:迁移速度 = Tt/t(图1)。

1.4 *矫正细胞迁移数据*

1.4.1 获取目的细胞各时间点的原始坐标值及不动点各时间点原始坐标值 利用Imaris的Track功能,在分析完成后,我们可以直接获得细胞及不动点在各时间点的原始坐标值。

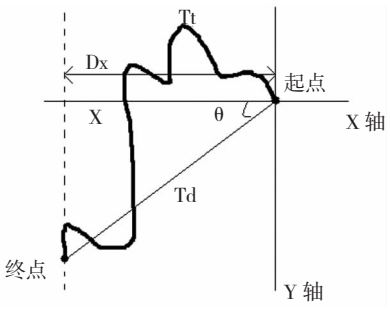


图1 评价细胞运动特征的指标

1.4.2 获得不动点振幅 将不动点的各时间点的坐标值均减去第1个时间点的坐标值得到振幅,即:第n个时间点的振幅 = Xn − X1。用相同的方法对视野中的3个不动点完成振幅计算,并计算出平均振幅,以此来矫正细胞的坐标。

1.4.3 获取目的细胞各时间点真实坐标值 细胞各时间点的真实坐标值 = 细胞各时间点的原始坐标值 − 不同点各时间定的平均振幅。

1.4.4 利用真实坐标值进行系列计算 获得X方向上的真实位移:Dx = Xn − X1(X:x方向的坐标值,n:终点,1:起点)。系统会自动把向右的Dx定义为正值,向左的Dx定义为负值。

获得Y方向上的真实位移:Dy = Yn − Y1(Y:y方向的坐标值,n:终点,1:起点)。

获得起点到终点的真实位移:总的位移^2 = X方向的位移^2 + Y方向的位移^2,即 $Td = \sqrt{Dx^2 + Dy^2}$

获得细胞运动的真实cosθ(图2),Cosθ = Dx/Td。因为Dx是有正负的,运动方向与电场方向相同则为正,运动方向与电场方向相反则为负,故cosθ数值的正负可表示迁移方向。即0~1:运动与电场方向相反,向正极运动:−1~0:运动与电场方向相同,向负极运动。

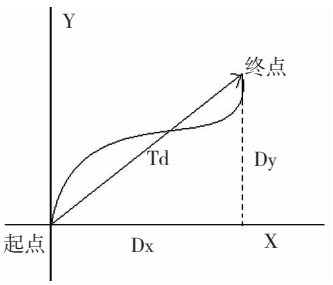


图2 位移示意图

获得细胞运动的真实轨迹长度(Tt)。因为细胞运动轨迹和视野移动轨迹在方向上不重合,故不能直接相加减。但我们可以利用微积分的原理,将曲线轨迹分成N个小段(N为总的拍摄的时间点,如60个时间点就可分成60段),每条线段是一条直线,这样,我们再将小线段分解到X和Y方向上进行加减。

结合前期结论:$Td = \sqrt{Dx^2 + Dy^2}$ 及 $Dx_{1,2} = X2 - X1$, $Dy_{1,2} = Y2 - Y1$(Dx为细胞在相邻时间点之间X方向上的位移,Dy为细胞在相邻时间点之间Y方向上的位移),得到:$Tt = Td_{1,2} + Td_{2,3} + \cdots\cdots + Td_{n-1,n}$($Td_{n-1,n}$为相邻时间点之间的轨迹长度)(图3)。

$$Tt = \sqrt{Dx_{1,2}^2 + Dy_{1,2}^2} + \sqrt{Dx_{2,3}^2 + Dy_{2,3}^2} + \cdots + \sqrt{Dx_{n-1,n}^2 + Dy_{n-1,n}^2}$$

$$Tt = \sqrt{(X_2 + X_1)^2 + (Y_2 - Y_1)^2} + \sqrt{(X_3 + X_2)^2 + (Y_3 - Y_2)^2} + \cdots + \sqrt{(X_n - X_{n-1})^2 + (Y_n - Y_{n-1})^2}$$

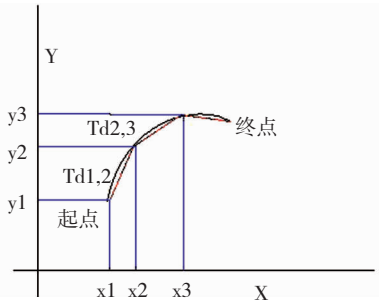


图 3　获得真实轨迹长度的示意图

1.5　统计学分析

所有数据利用 SPSS 11.5 软件进行配对 *t* 检验。

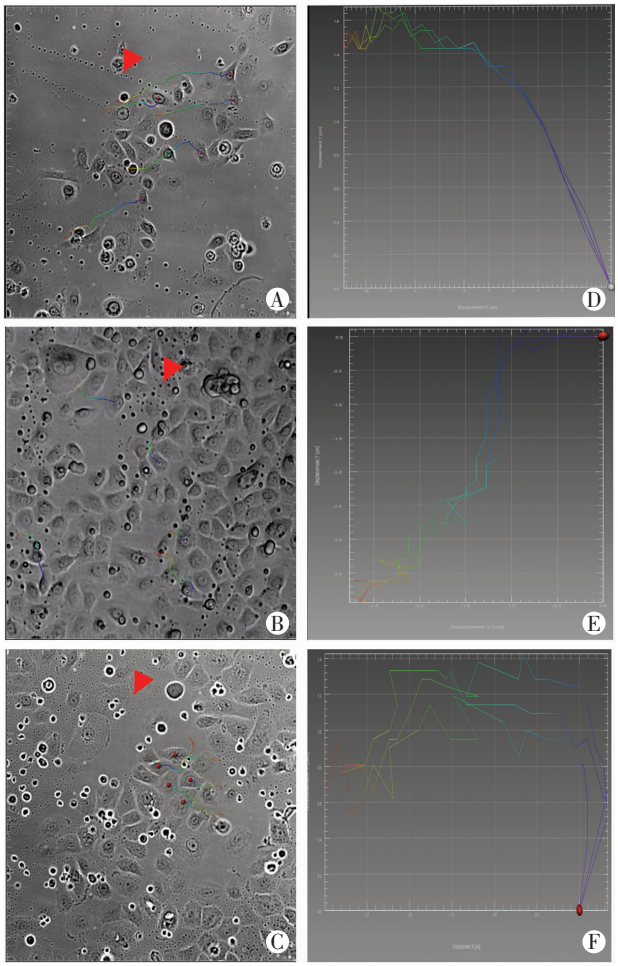
2　结果

2.1　不动点的确定及分析

我们进行了 3 次重复实验，每次实验均选取 3 个不动点，利用 Imaris 软件分析发现，不动点的运动方向和位移在误差范围内均一致，说明视野中确实存在不动点，可用于视野移动的矫正（图 4）。

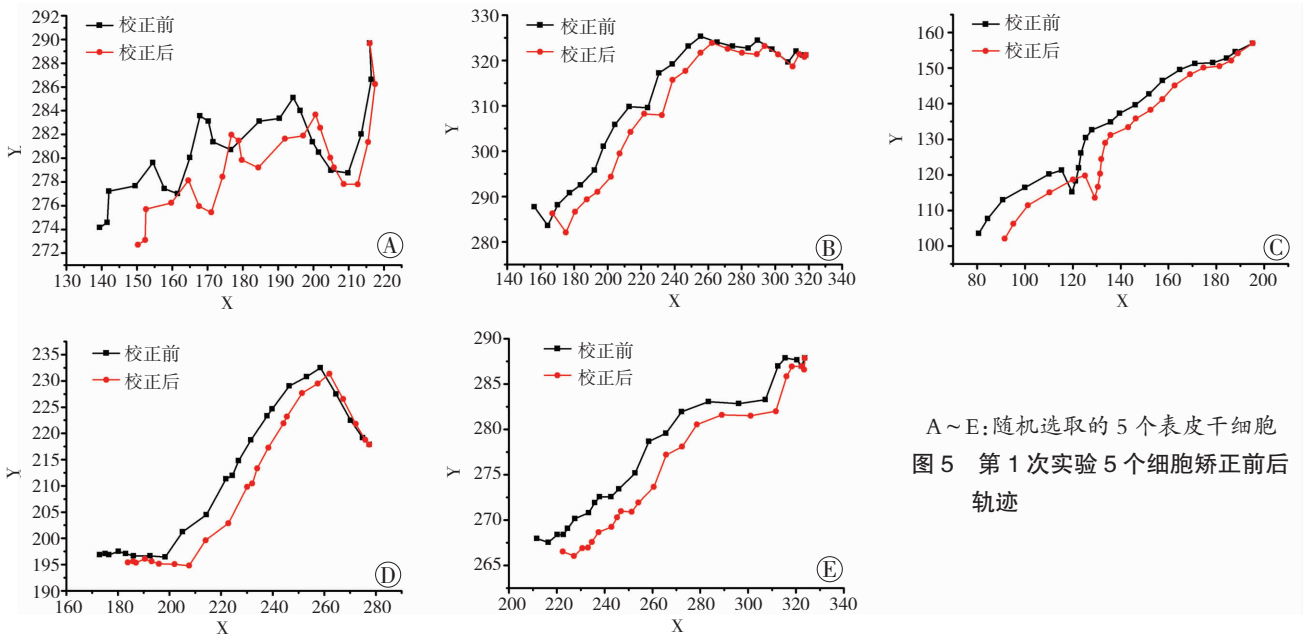
2.2　矫正前后细胞的坐标

我们对 3 次实验均进行 2 h 的观察，并利用不动点对 3 个重复的 15 个细胞进行了轨迹矫正。结果表明，不同批次的实验，其视野移动方向是不确定的，我们通过矫正成功的扣除了视野移动带来的影响（表 1，图 5～7）。



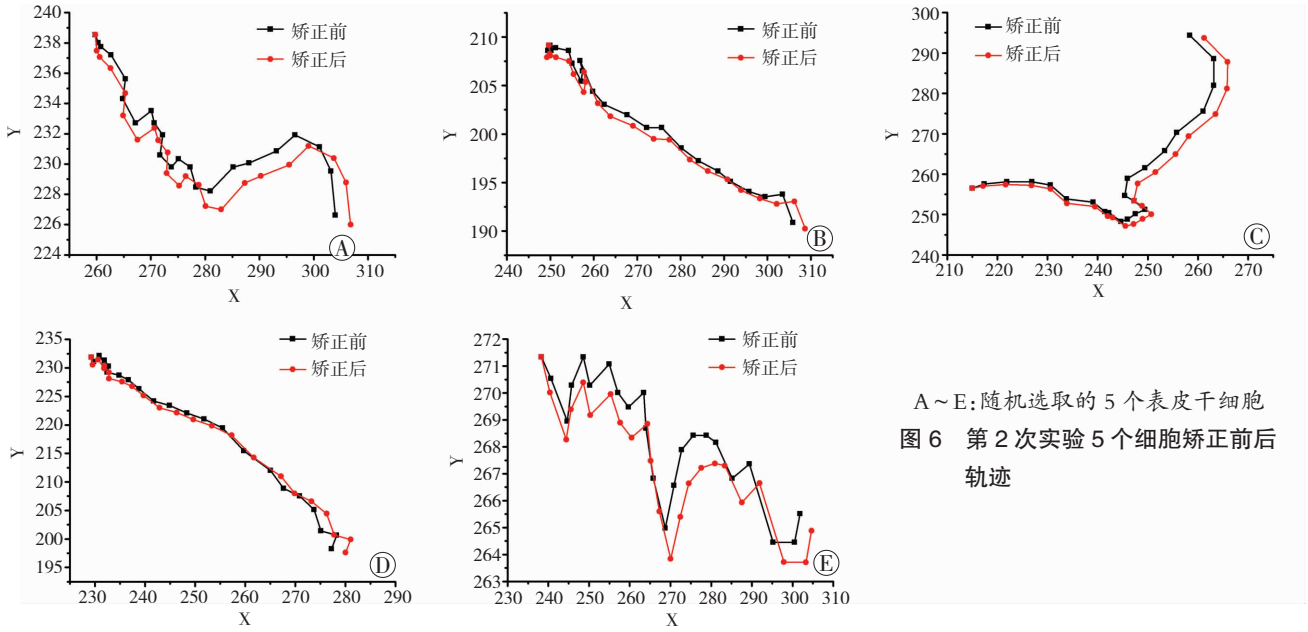
A～C：分别为 3 次重复实验（×200），红色箭头示选择的不动点；D～F：分别为 3 次重复实验的不动点在 X 和 Y 轴上的位移

图 4　视野移动追踪的 3 次重复实验



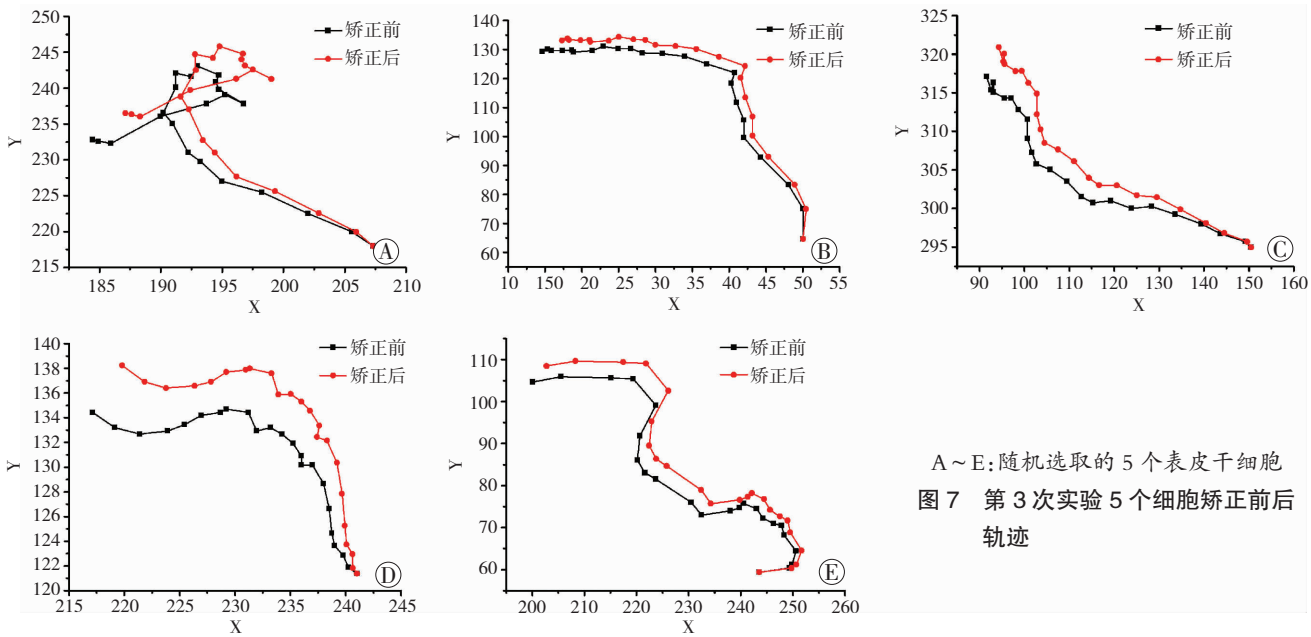
A～E：随机选取的 5 个表皮干细胞

图 5　第 1 次实验 5 个细胞矫正前后轨迹



A～E:随机选取的 5 个表皮干细胞

图 6　第 2 次实验 5 个细胞矫正前后轨迹



A～E:随机选取的 5 个表皮干细胞

图 7　第 3 次实验 5 个细胞矫正前后轨迹

2.3　矫正前后的细胞运动特征指标——cosθ 值

迁移方向(cosθ)是反映细胞对外界刺激的关键性指标,从图 8～10 可以看出,细胞运动的初期视野移动对运动方向的判断影响非常大,对 15 个细胞矫正前后的 cosθ 值进行配对 t 检验($P<0.01$),说明视野移动可对细胞迁移方向产生显著性影响。

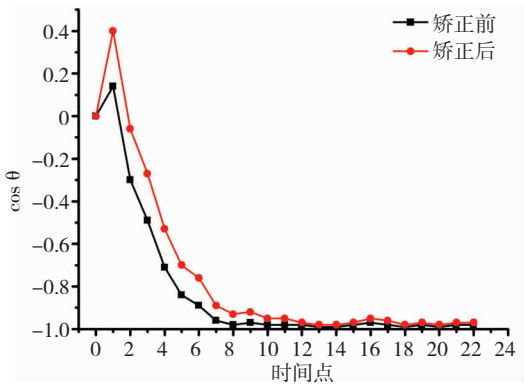


图 8　第 1 次实验第 2 个细胞矫正前后 cosθ 值比较

表 1 细胞原始坐标及校正后坐标对比

实验次数	细胞编号	校正前 X 坐标	校正前 Y 坐标	校正后 X 坐标	校正后 Y 坐标
1	1	139.42	274.16	150.27	272.71
	2	156.27	287.72	167.12	286.28
	3	80.76	103.56	91.61	102.12
	4	172.94	196.86	183.79	195.42
	5	211.66	267.96	222.51	266.52
2	1	303.99	226.62	306.81	225.99
	2	305.84	190.87	308.66	190.24
	3	258.41	294.37	261.23	293.74
	4	277.21	198.25	280.03	197.62
	5	301.84	265.51	304.66	264.88
3	1	184.93	232.55	187.62	236.34
	2	14.60	129.33	17.30	133.12
	3	91.61	317.10	94.31	320.89
	4	217.13	134.44	219.82	138.24
	5	200.04	104.66	202.73	108.45

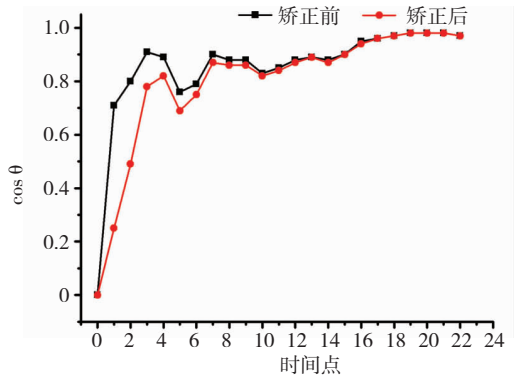


图 9 第 2 次实验第 1 个细胞矫正前后 cosθ 值比较

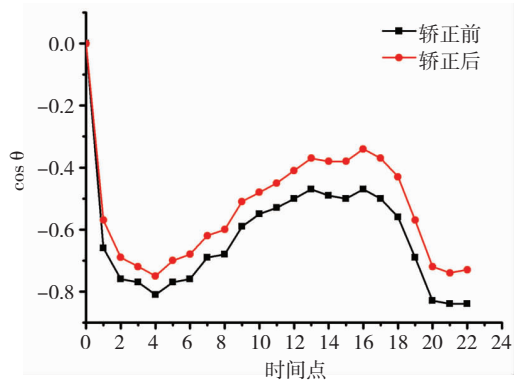


图 10 第 3 次实验第 1 个细胞矫正前后 cosθ 值比较

3 讨论

表皮干细胞定向迁移至创伤处进行创面修复是皮肤创面修复的重要机制，电刺激指导细胞定向迁移的重要作用可能是加速皮肤创面愈合的重要手段[1,6-8]。在体外观察电刺激指导表皮干细胞的迁移行为为揭示表皮干细胞参与创面修复的机制提供了重要证据。系统的视野移动对表皮干细胞在电场作用下的定向性判断产生显著干扰，特别是在运动初期，对细胞运动方向的判断会产生质的影响。并且，对于那种处于左右临界处的细胞，如果细胞感应刺激后应有向左的运动方向，但由于视野移动是向右的，则有可能我们得出的数据是细胞向右运动，造成实验结果的错误。本研究采用了不动点示踪结合数学矫正的方法去矫正视野移动产生的影响，从而纠正了对细胞运动方向的错误判断，提供了科学的数据，为我们进一步研究细胞的运动机制奠定了正确基础。虽然去除平台漂移是活细胞工作站应该具备的功能。但我们在研究中发现，其自带的纠正功能并不能完全实现“零漂移”，即从硬件水平上不能解决平台漂移的问题，这就需要对软件进行升级，或者自行纠正。然而升级软件成本高、耗时长，且效果并不明确。而我们提出的方法经济、实用，快速，很简便地解决了这个问题，因此具有一定的创新性。

综上所述，基于定点标记的数学模拟矫正是有效克服活细胞动态示踪非动力性细胞漂移的重要方法，是精确观察活细胞生命现象，揭示生物世界动态归路的重要技术路径。

参考文献：

[1] Li L, Gu W, Du J, *et al*. Electric fields guide migration of epidermal stem cells and promote skin wound healing[J]. Wound Rep Reg, 2012, 20(6): 840-851.

[2] Carter A R, King G M, Ulrich T, *et al*. Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions[J]. Appl Opt, 2007, 46(3): 421-427.

[3] Lee S H, Baday M, Tjioe M, *et al*. Using fixed fiduciary markers for stage drift correction[J]. Opt Express, 2012, 20(11): 12177-12183.

[4] Husain M, Boudier T, Paul-Gilloteaux P, *et al*. Software for drift compensation, particle tracking and particle analysis of high-speed atomic force microscopy image series[J]. J Mol Recognit, 2012, 25(5): 292-298.

[5] Kim J, Shen M, Nioradze N, *et al*. Stabilizing nanometer scale tip-to-substrate gaps in scanning electrochemical microscopy using an isothermal chamber for thermal drift suppression[J]. Anal Chem, 2012, 84(8): 3489-3492.

[6] Reid B, Vieira A C, Cao L, *et al*. Specific ion fluxes generate cornea wound electric currents[J]. Commun Integr Biol, 2011, 4(4): 462-465.

[7] Zhao M. Electrical fields in wound healing-an overriding signal that directs cell migration[J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20(6): 674-682.

[8] Zhao M, Song B, Pu J, *et al*. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN[J]. Nature, 2006, 442(7101): 457-460.

（收稿：2014-12-17；修回：2015-02-06）

（编辑 张 维）

技术方法

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501046

加尾引物多重PCR技术检测Y染色体微缺失

邹德亮[1],温晓君[2],张雪莲[2],吴晓伟[3],周万军[2],吴英松[1] (510515 广州,南方医科大学:生物技术学院[1],基础医学院医学遗传学教研室[2],华银医学检验中心[3])

[摘要] **目的** 设计加尾引物多重PCR策略,并采用此技术建立一种快速检测Y染色体15个STS位点微缺失的多重PCR方法。**方法** 以Y染色体无精子因子(azoospermia factor, AZF)区域15个特异性序列标签位点(sequence-tagged site, STS)为扩增子,根据加尾引物多重PCR策略设计5′端加尾引物,建立一种Y染色体微缺失多重PCR体系;并检测18例已知样本和112例临床样本观察其灵敏度与准确性。**结果** 基于此策略的多重PCR体系优化过程简单快速,建立的多重PCR检测体系稳定可靠,各目的条带的电泳分析亮度基本一致;18例已知样本的检测结果与靶值相符;112例临床样本的检测结果也与对照方法一致。**结论** 本研究设计的加尾引物策略可提高多重PCR扩增效率,简化优化过程,为其他多重PCR检测体系的设计与建立提供参考和借鉴;建立的Y染色体AZF15个STS位点微缺失多重PCR检测方法结果稳定,可供临床样本的快速检测。

[关键词] 多重PCR;Y染色体;微缺失
[中图法分类号] R394-33;R446.9;R596.1 [文献标志码] B

多重PCR是在同一检测体系中包含2对以上的引物,同时扩增多个目的DNA片段的PCR反应,快速高效和低检测成本,目前广泛应用于临床检测,如地中海贫血[1]、杜氏型肌营养不良、Y染色体微缺失[5]等基因检测项目。从一般PCR到多重PCR,其实验设计难度也大大增加。由于各扩增反应间相互竞争、引物结构与浓度、DNA模板二级结构等多方面的因素,必须对检测体系及反应条件进行一系列优化调整,尽可能使各PCR反应的扩增效率基本一致而保证各目的DNA片段的检出。因此,科研工作者一直致力于采用有效的方法和策略,提高多重PCR体系中各PCR反应的扩增效率,简化优化步骤。本研究设计了一种加尾引物多重PCR策略,以低退火温度预扩增结合后续高退火温度PCR扩增,可明显降低引物及模板二级结构对扩增效率的影响,简化多重体系优化。Y染色体AZF(无精子因子,azoospermia factor)区域微缺失分析,目前常规采用的即为多重PCR方法[2-6]。本研究即以AZF 15个特异性序列标签位点(sequence tagged site, STS)为扩增子,应用此策略,设计对应的5′端加尾引物,建立一种Y染色体微缺失多重PCR检测方法,并验证加尾引物多重PCR策略的有效性与实用性。现报告如下。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370670)
[通信作者] 吴英松,E-mail: yingsongwu@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.011.html(2015-06-17)

1 材料与方法

1.1 样本与试剂

2014年8月,于华银医学检验中心进行Y微缺失检测的样本18例,均为男性,EDTA-K_3抗凝全血,传统酚氯仿法抽提基因组DNA(gDNA),均已用亚能(深圳)生物技术有限公司提供的Y染色体微缺失检测试剂盒(含15个STS位点),严格按照试剂盒操作说明书进行检测,其中阴性样本13例,微缺失阳性样本5例,作为方法学研究的已知基因型样本。另收集2014年8-12月,于华银医学检验中心进行Y染色体微缺失检测的EDTA-K_3抗凝外周全血样本112例,传统酚氯仿法抽提gDNA,作为方法学对比验证样本。

Taq DNA聚合酶及配套PCR Buffer、dNTPs均购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR仪为ABI Veriti(美国ABI公司)。

1.2 加尾引物多重PCR策略

本研究设计的加尾引物策略,是根据待扩增的gDNA目的序列,分别设计上下游引物(Tm值为55~60 ℃);然后再于引物的5′端,再加上4~6个与gDNA非互补碱基,将整条引物的Tm值提高10~15 ℃(Tm值为68~70 ℃)。以此引物特点,再设计相应的PCR扩增条件,检测体系的技术原理即为:gDNA模板95 ℃变性后,于较低的退火温度(即引物与gDNA模板互补序列的Tm值,55~60 ℃),引物与gDNA模板结合、延

表1 各检测管STS及引物序列与片段大小

检测管	STS	正向引物序列(5′→3′)	反向引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
TC[a]	sY14	ccagcAATATTCCCGCTCTCCGGA	ccaacGCTGGTGCTCCATTCTTGAG	479
1	sY254	gccacGGGTGTTACCAGAAGGCAAA	gccacGAACCGTATCTACCAAAGCAGC	390
1	sY143	cggaggTGCAGGATGAGAAGCAGGTAG	ccacGCCGTGTGCTGGAGACTAATC	323
1	sY242	ccatcGCACAGTAGCAGCGGGAG	gcccacTCTGCCACTAAACTGTAAGCTCC	245
1	sY255	ccgacGTTACAGGATTCGGCGTGAT	ccaacCTCGTCATGTGCAGCCAC	134
2	sY84	gaccacGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	gccaccAAGCCTACTACCTGGAGGCTTC	341
2	sY239	gccaacCATTCATCTTCCCTTTTGAAGG	gccaacCATTTATGCAAGTCACAGGAAATCT	218
2	sY152	cgcaGAAAGACAGTCTGCCATGTTTCA	gccaccTTTGACAGGAGGGTACTTAGCAGT	141
3	sY86	gcatcGGGTGACACACAGACTATGCTTC	gcacCACACACAGAGGGACAACCC	330
3	sY127	ccaccGGCTCACAAACGAAAAGAAA	ccatcGCTGCAGGCAGTAATAAGGGA	285
3	sY145	cgtgagCAACACAAAAACACTCATATACTCG	gccaggTTGAGAATAATTGTATGTTACGGG	155
3	sY124	gccagCAGGCAGGACAGCTTAAAAG	cgcaccTACTGTGGCAAAGTTGCTTTC	121
4	sY134	gcctgGTCTGCCTCACCATAAAACG	gcctcACCACTGCCAAAACTTTCA	313
4	sY82	ggattgATCCTGCCCTTCTGAATCTC	gcgtgCAGTGTCCACTGATGGATGA	275
4	sY128	ggtcgGGATGAGACATTTTTGTGGG	gccagcAGCCCAATGTAAACTGGAC	239
4	sY133	tccaagATTTCTCTGCCCTTCACCAG	ggctggTGATGATTGCCTAAAGGGAA	189

引物序列中,小写为gDNA非互补加尾序列,大写为gDNA互补序列。a:此对引物为正常内参。每一检测管均包含此引物对

伸,经2~4个循环,即实现对原始gDNA模板目标序列的预扩增。紧接着,以稍低的变性温度(92 ℃)对预扩增的DNA模板变性;再采用稍高的退火温度(即整条引物所有序列的Tm值,68~70 ℃),此条件下引物只结合与之完全互补的预扩增PCR产物DNA模板,完成对目的片段的PCR扩增检测。

1.3 引物设计

以文献[5]及NCBI数据库STS位点信息,按4个多重PCR检测体系,将AZF区域15个STS位点为扩增子,根据1.2所述策略设计加尾引物。每反应管的STS位点及引物序列见表1。

1.4 多重PCR检测体系的建立与优化

按表1所列的4个多重PCR扩增管,配制反应体系,每管含PCR Buffer,*Taq* DNA酶,dNTPs,gDNA模板,各STS扩增引物等;按1.2所述PCR扩增检测设计原理设置扩增反应条件;首先采用等引物浓度扩增,再根据各目的条带电泳分析的亮度,对引物浓度及反应条件进行优化调整,以保证凝胶电泳各目的条带亮度基本一致而便于结果判断与分析。

1.5 结果观察及分析

按5.0 μL扩增产物+1.0 μL 6×Loading Buffer的比例,将各管扩增产物于3.0%琼脂糖凝胶(含EB)100V电泳45~60 min,紫外凝胶成像仪观察结果,根据各目的条带而分析是否存在缺失及缺失的STS位点。

1.6 准确性和灵敏度验证

用已优化的检测体系,检测18例Y微缺失已知阴性和阳性样本,观察检测结果的符合程度。并应用建立的检测体系,与深圳亚能生物公司生产的Y染色体微缺失试剂盒,平行检测112份临床常规样本,对比分析两种方法的检测结果。

2 结果

2.1 优化确定的多重PCR反应体系

优化的4个多重PCR反应体系,总体积25.0 μL,每管均含1×PCR Buffer、0.2 mmol/L dNTPs、2.0 U *Taq*酶、20~100 ng gDNA、各STS位点上下游引物(各STS的上下游引物量见表2所列)。优化的PCR扩增条件为:95 ℃变性5 min;95 ℃45 s→56℃ 60 s→72 ℃ 30 s,3个循环(预扩增);92 ℃ 30 s→68 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s,30个循环;72 ℃再延伸5 min,15 ℃ Hold。此优化体系,PCR产物凝胶电泳观察,各反应管扩增目的条带的亮度基本一致(图1A)。

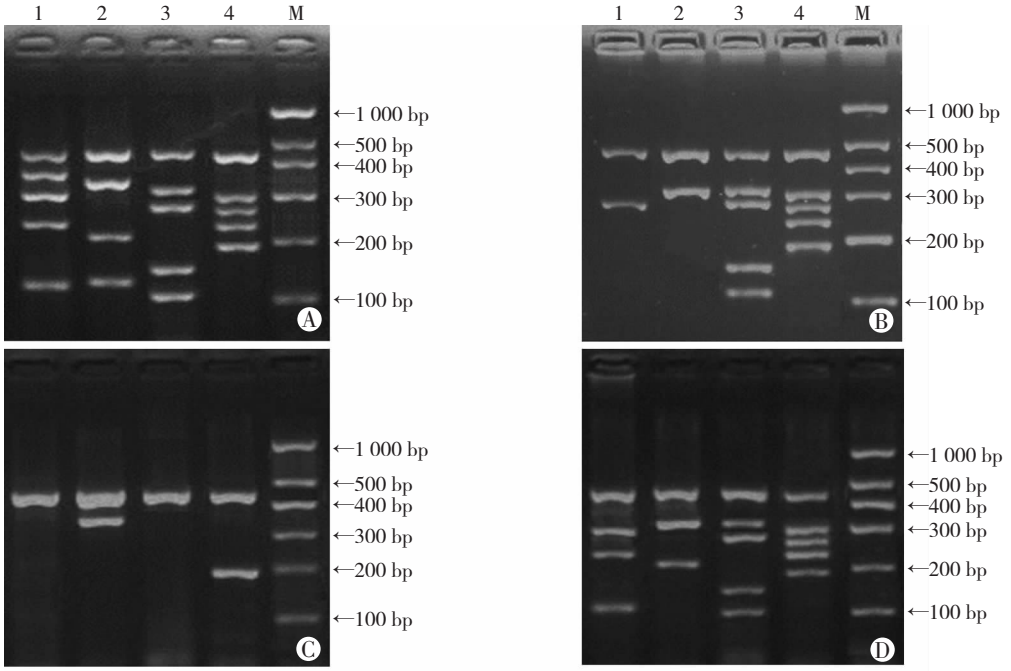
表2 各反应管扩增的STS位点及其上下游引物量

反应管1		反应管2		反应管3		反应管4	
STS	引物量(pmol)	STS	引物量(pmol)	STS	引物量(pmol)	STS	引物量(pmol)
sY14	7.0	sY14	7.0	sY14	7.0	sY14	7.0
sY254	5.0	sY84	5.0	sY86	4.0	sY134	5.0
sY143	5.0	sY239	5.0	sY127	7.0	sY82	5.0
sY242	4.0	sY152	5.0	sY145	4.0	sY128	5.0
sY255	4.0			sY124	4.0	sY133	5.0

每管总体积为25 μL;各位点上、下游引物量相同,均为表中所列

2.2 灵敏度和准确性

应用此体系检测18例已知阴性和阳性样本的结果与靶值相符。112例临床常规样本,此体系及对照试剂盒均检出阳性标本15例,且检出的缺失位点范围一致,显示这两种检测方法的符合率为100%。图1为应用本体系检测的样本中,1个正常样本(图1A)和3个缺失阳性样本(图1B、C、D)的凝胶电泳结果。



1～4：分别为各反应管；M：DNA 标准

图 1 1 例正常样本（A）和 3 例缺失阳性样本（B、C、D）琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

多重 PCR 体系的优化过程繁琐且基本上取决于经验，一直以来都是科研人员所面临的难题。检测体系中各 PCR 反应的扩增效率基本一致而保证各目的序列均能有效检出，是多重 PCR 检测体系成功的关键。然而，影响扩增效率的诸多因素之中，引物结构与浓度、DNA 模板的影响尤为明显，所以在体系优化过程中，通常先采用相等的引物量，再根据各 PCR 反应的强弱而调整反应中各引物的比例，即增加“弱”反应的引物量，而减少“强”反应的引物量[7]；另外，再采用 PCR 添加剂、调整反应体系其他组分浓度及反应条件等手段而尽可能减小 DNA 模板对扩增效率的影响。本研究设计的加尾引物设计策略，引物只在预扩增阶段结合原始 gDNA 模板进行扩增，后续 PCR 反应则以预扩增的短片段 PCR 产物为模板，所以基本消除了长链 gDNA 模板二级结构对扩增效率的影响。并且短片段 DNA 模板在 PCR 扩增的变性步骤中更易于解成单链，稍低的变性温度也保护了 *Taq* 酶的活性。另外，预扩增阶段合成的 DNA 模板两端引入了人工添加的 gDNA 模板非互补碱基序列，提高了 PCR 扩增检测步骤中 DNA 模板的单一性及扩增反应的特异性。据此，本策略从引物和模板这 2 个最关键的因素，减小了多重 PCR 体系中各 PCR 反应间扩增效率的差异，大大简化了多重 PCR 体系的优化过程。本研究中，通过最初相同引物量扩增后的电泳结果，对其中亮度不一致的扩增子的引物稍作调整即完成了体系优化。如表 2 所示，只有少数位点的引物量有较小差异，说明了本研究设计的加尾引物多重 PCR 技术策略切实可行、效果明显。

Tiepolo 等[8]于 1976 年即提出了 Y 染色体无精子因子（AZF）区域的微缺失与男性生精功能障碍和异常密切相关，可导致临床上的无精子症。虽然辅助生殖的胞质内精子注射技术是男性不育症治疗的突破，但也有可能使遗传缺陷传给下一代，导致子代不育，因此 Y 染色体微缺失检测在男性不育的诊断和研究中具有重要意义[9]。本研究建立的基于加尾引物技术策略的 Y 染色体 AZF 区域 15 个 STS 位点微缺失检测方法，反应体系中各位点的引物浓度差异不大，并在一定程度上消除了原始 gDNA 模板对扩增效率的影响，因而体系稳定，操作简单、结果准确，且可根据电泳图谱确定缺失的 STS 位点，结合本研究提供的引物序列而定位到 Y 染色体上 gDNA 序列的具体物理位置及范围，适合 Y 染色体微缺失的科学研究及临床样本的快速检测。同时，本研究也充分证明了加尾引物多重 PCR 技术策略的可行性与有效性，可为其他多重 PCR 检测体系的设计与建立提供参考和借鉴。

参考文献：

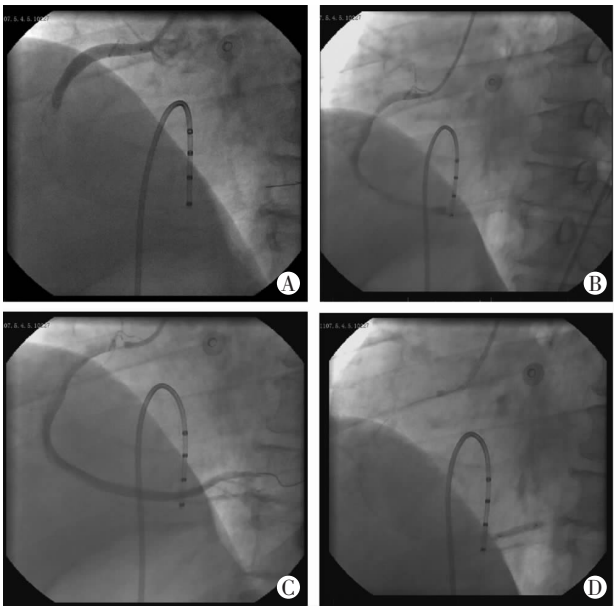
[1] Zhou W, Wang G, Zhao X, *et al*. A multiplex qPCR gene dosage assay for rapid genotyping and large-scale population screening for deletional α-thalassemia [J]. J Mol Diagn, 2013, 15 (5): 642 – 651.

[2] Elfateh F, Rulin D, Xin Y, *et al*. Prevalence and patterns of

Y chromosome microdeletion in infertile men with azoospermia and oligzoospermia in Northeast China[J]. Iran J Reprod Med, 2014, 12(6): 383-388.
[3] Ghorbian S. Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile[J]. Gene, 2012, 503(1): 160-164.
[4] Sheikhha M H, Zaimy M A, Soleimanian S, *et al*. Multiplex PCR Screening of Y-chromosome microdeletions in azoospermic ICSI candidate men[J]. Iran J Reprod Med, 2013, 11(4): 335-338.
[5] Zheng H Y, Li Y, Shen F J, *et al*. A novel universal multiplex PCR improves detection of AZFc Y-chromosome microdeletions[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(5): 613-620.
[6] 宋宁宏, 吴宏飞, 张炜, 等. 严重少精子和无精子的不育患者Y染色体微缺失的检测[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(20): 1376-1380.
[7] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al*. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.
[8] Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm[J]. Hum Genet, 1976, 34(2): 119-124.
[9] Wang R X, Fu C, Yang Y P, *et al*. Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China[J]. J Assist Reprod Genet, 2010, 27(7): 391-396.

(收稿:2015-01-06;修回:2015-03-15)
(编辑 郭建秀)

(上接1895页)



A:右冠脉中段闭塞;B:右冠脉内血栓负荷过重;C:右冠脉内推注阿替普酶后;D右冠脉远段球囊扩张

图1 急性下壁心肌梗死患者冠状动脉造影表现

急诊介入术中使用抽吸导管手工抽吸血栓,应用于AMI可明显改善心肌灌注,可降低病死率及不良心血管事件发生率[2]。但也存在抽吸血栓不充分,造成远端血管床血栓栓塞的问题。冠状动脉内溶栓是清除或减轻血栓负荷的方法之一。阿替普酶是一种可选择性激活血栓部位的纤溶酶原的溶栓药物,溶栓作用力强、开通率高、起效迅速,能尽早和更大限度地挽救濒死心肌,保护心室功能,从而降低病死率、减少心血管并发症的发生[3-4],常用作静脉溶栓药物。

本例中,患者血栓负荷过重,单纯植入支架会增加血栓脱落和远端微循环栓塞的可能性,造成无复流,导致临床预后较差。结合临床经验和以往的研究报道,我们针对该患者实施结合抽吸血栓同时进行冠状动脉内注射阿替普酶溶栓治疗,结果显示,冠脉造影TIMI分级达3级,冠状动脉血流恢复。患者术后无出血并发症,出院后随访1个月,未出现心绞痛及其他心血管不良事件的发生。

在本案例中,冠状动脉内注射阿替普酶溶栓治疗对患者是有效的,且无出血并发症的发生。我们认为冠状动脉内定向接触式靶向注射阿替普酶治疗血栓过度负荷是可行的。另外,阿替普酶经导管注入在肺栓塞、急性脑梗死、下肢动脉闭塞中的运用,国内外报道较多,但目前并无冠状动脉内注射阿替普酶的临床研究,阿替普酶作为冠脉内溶栓的有效性和安全性有待于大规模临床试验进一步研究与证实。

参考文献:

[1] Heusch G, Kleinbongard P, Bose D, *et al*. Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside[J]. Circulation, 2009, 120(18): 1822-1836.
[2] Sardella G, Mancone M, Bucciarelli-Ducci C, *et al*. Thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention improves myocardial reperfusion and reduces infarct size: the EXPIRA (thrombectomy with export catheter in infarct-related artery during primary percutaneous coronary intervention) prospective, randomized trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(4): 309-315.
[3] Koga M, Toyoda K, Nakashima T, *et al*. Carotid duplex ultrasonography can predict outcome of intravenous alteplase therapy for hyperacute stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2011, 20(1): 24-29.
[4] Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, *et al*. Factors predicting outcome in stroke patients treated with 0.6 mg/kg alteplase: evidence from the Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT)[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2011, 20(6): 517-522.

(收稿:2015-01-11;修回:2015-03-02)
(编辑 栾 嘉)