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)。

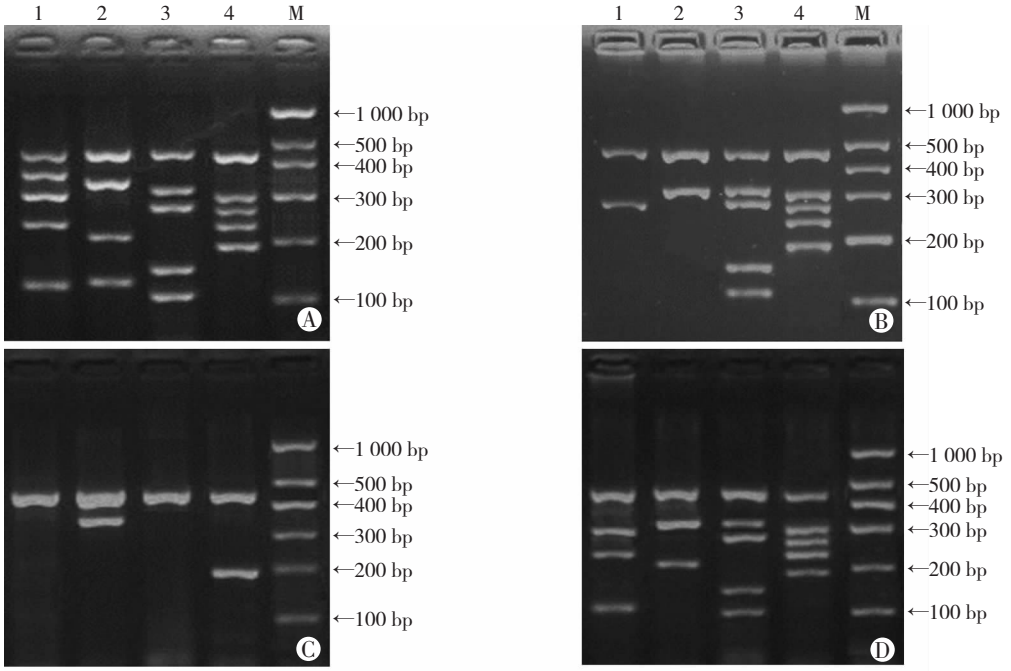
表2 各反应管扩增的STS位点及其上下游引物量

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：

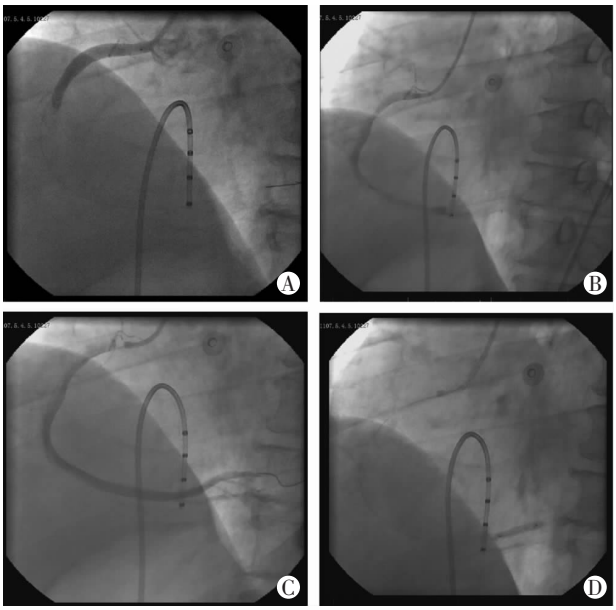
[1] Zhou W, Wang G, Zhao X, *et al*. A multiplex qPCR gene dosage assay for rapid genotyping and large-scale population screening for deletional α-thalassemia [J]. J Mol Diagn, 2013, 15 (5): 642 – 651.

[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)