维普资讯 http://www.cqvip.com

41-42

(13)

第24卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.1
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

巢式多聚酶链反应快速检测胎儿性别

R714.52

临床学院中心实验室 柳 青*
检验系 陈宏琳

提 要 为建立一种非侵入性的对X性连锁遗传性疾病胎儿的早期产前性别鉴定方法，我们采用了巢式PCR方法来扩增孕妇外周血中男性胎儿的Y染色体特异序列，并与新生儿出生性别相对照。44例孕妇中22例分娩男性婴儿，其中19例扩增出Y特异片段，阳性检出率为86.4%(19/22)，其余22例分娩女性婴儿，其中无一例出现Y特异扩增带。结果提示用巢式PCR方法可快速判断胎儿性别，使临床上无伤性产前检查X性连锁遗传性疾病的胎儿性别成为可能。

关键词 巢式多聚酶链反应；胎儿性别鉴定
中图分类号 R446.61

聚合酶链反应.

X性连锁遗传性疾病与X染色体连锁遗传有关，主要引起男孩发病，如杜氏肌营养不良症(DMD)，血友病及X连锁智力低下等，目前这些疾病已能进行产前基因诊断[1,2,3]，故在产前早期明确胎儿的性别，减少这类患儿的出生就显得尤为重要。传统的吸取绒毛或抽取羊水等方法，不仅技术要求复杂，而且容易诱发流产、出血及宫腔感染等并发症，给胎儿及孕妇造成一定的危害。为避免这些缺点，我们采用巢式PCR方法，可快速从孕妇外周血检测到胎儿的Y染色体特异序列，从而为X性连锁遗传性疾病的胎儿产前性别诊断提供了一种简便快速及无创性的检测新方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 44例正常孕妇，孕龄8～37周，每例患者抽血10ml，另取正常新生儿脐带血女性及男性各10例，分别作为阴性和阳性对照。用全血红细胞溶解法获得白细胞，用蛋白酶K及十二烷基磺酸钠(SDS)，在37℃消化过夜，用简易盐析法抽提DNA，溶于适量T.E中。

1.2 引物设计及PCR 引物设计参照文献[4]提供的位于Y染色体长臂的特异序列设计了两对引物，通过基因库配对检查，无非特异性配对结合，其Y特异性配对结合为100%。第一对引物序列为:49aF1:5'.AAG TCG CCA CTG GAT ATC AC.3';49a R1:5'.GAA GAG AAC ACC AAA TCT CAC.3'，其PCR产物为275 bp。第二对引物在第一对引物的内侧，其序列为:49a F2:5'.TAT CAG GTA ATG TCA GAG GCA.3';49a R2:5'.TAC AGA AAA GTT ATT GCC AAC T.3'，其PCR产物为207 bp。

PCR反应总体积为50μl，其中包括0.5μg DNA，Taq酶1个单位(BRL)，以及终浓度为1XPCR缓冲液，5mM MgCl 2，1mM dNTPs(Pharmacia)，1μM的第一对引物及ddH_2O。经94℃变性8min，然后进行94℃ 1min，58℃50秒，72℃ 1min，进行35个循环，最后在72℃延伸10min。取第一次PCR产物1μl，加Taq酶1个单位(BRL)，以及终浓度为1XPCR缓冲液，5mM MgCl2，1mM dNTPs(Pharmacia)，1μM的第二对引物及ddH_2O到50μl。经94℃变性8分钟，然后进行94℃ 1min，58℃50s，72℃ 1min，进行30个循环，最后在72℃延伸10min。取第二次PCR产物10μl点样于含溴乙淀的2%琼脂糖凝胶上电泳，紫外灯下观察。

2 结果

44例孕妇中22例分娩男性婴儿，其中19例扩增出Y 特异DNA，阳性检出率为86.4%(19/22)，其余22例分娩女性婴儿，其中无一例出现Y特异扩增带(见图)，两对引物的特异性及敏感性检查发现，10例女婴脐带血DNA无一例扩增出Y特异片段，10例男婴脐带血DNA全部扩增出Y特异片段，并可以检测到5pg水平的男性DNA，表明其特异性及敏感性均较高。

3 讨论

* 女，1956－03出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

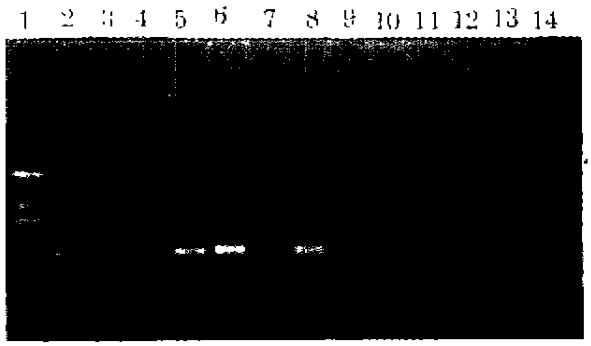


图 巢式PCR扩增电泳结果
1、pUC19分子量标准;2、男性脐血DNA;3、女性脐血DNA;4.ddH_2O;5～10:怀男胎孕妇血DNA;11～14:怀女胎孕妇血DNA。

胎儿细胞存在于孕妇外周血，已被许多学者所证实[5,6,7]，这些胎儿细胞包括胎儿淋巴细胞，胎儿有核红细胞，胎儿滋养细胞。Thomas[8]等在妊娠第5周从孕妇外周血检测到胎儿的Y特异DNA，并认为产后8周胎儿细胞从孕妇外周血消失，我们也在一例孕8周的孕妇外周血检测到男性胎儿的Y特异DNA，表明胎儿细胞在妊娠早期就能进入母体血循环，并存在于整个妊娠过程中，这为建立无创伤性的产前基因诊断方法提供了理论依据，使胎儿的性别及X性连锁遗传性疾病的早期产前基因诊断成为可能。虽然进入母体血循环的胎儿细胞为数不多，大量的母体细胞DNA干扰了胎儿细胞DNA的检出，但我们采用巢式PC R方法克服了这一不足，同时提高了检测的敏感性。

产前无创伤性基因诊断方法是目前国内外研究的新热点，巢式PCR法是其中之一。该方法为无创性，对胎儿及孕妇无任何伤害，容易被广大孕妇所接受。该方法简便易行，无需特殊设备，全过程在48小时内即可完成，其阳性检出率相对较高，其特异性及敏感性也较高，与文献[4]报道的特异性及敏感性相一致。该研究中三例假阴性的出现，可能系个体差异，胎儿细胞进入母体血循环极少的缘故。该方法具有简便、快速、灵敏、特异性强等优点，有助于产前X性连锁遗传性疾病胎儿的性别鉴定，对减少这类患儿的出生具有重要的参考价值。X性连锁遗传性疾病危害极大，早期诊断对优生优育，提高人口素质具有重要的实际意义。

参 考 文 献

1.Sekizawa, A. et al. Neurology 1996;46(5):1350
2.Kogan, SC. et al. N Engl J Med 1987;317:985
3.Sutherland, GR. et al. N Engl J Med. 1991 Dec. 12; 325(24):1720
4.Lucotte, G.et al. Molecular and Celluar Probes. 1991;5:359
5.Bianchi, DW. et al. Am J Obstet Gynecol. 1994;10:922
6.Bianchi, DW. et al. Prenatal Diagnosis, 1993;161:13:292
7.Adkison, LR. et al. Am J Obstet Gynecol, 1994;3:952
8.Thomas, MR. et al. Prenatal Diagnosis, 1995;Vol.15:641

(收稿日期 1998－07－20)

Quick fetal sex determination by nested polymerase chain reaction

Liu Qing, et al.
Department of core laboratory, college of clinical medicine

To establish a non－invasive method for early prenatal sex determination of the fetus carrying sex－linked genetic disorder. The fetal specific fragment of Y chromosome was amplified by nested polymerase chain reaction from the preipheral maternal blood, and the results were compared with new born baby gender after parturition. The Y－specific sequence was identfied in 19 of 22 mothers given the male babies, positive rate was 86.4%(19/22), but unidentified in 22 mothers given the female babies. The result show that fetal sex deterination by nested PCR will be (suitable) for clinical prenatal diagnosis of sex－linked genetic disorders.

KEY WORDS Nested polymerase chain reaction; Fetal sex determination