

• 检验技术与方法 •

精子染色质扩散法检测精子 DNA 完整性方法探讨及临床意义

王玮玮,王厚照,张 玲,刘 芳
(中国人民解放军第一七四医院检验科,福建厦门 361003)

摘 要:目的 探讨精子染色质扩散法检测精子 DNA 完整性这一实验方法的操作及其应用价值。方法 对 200 例男性不育患者及 50 例健康对照者进行精液常规检查后,用染色质扩散法进行 DNA 完整性分析,观察实验条件的改变对检测结果的影响,从而为这一实验方法的应用和改进提供参考价值。结果 DNA 完整性正常的精子染色质扩散而在核周形成晕环,并且晕环的宽度不小于精子头部的半径;而受损伤产生 DNA 碎片的精子则不形成晕环或晕环的宽度小于精子头部的半径。实验中,试剂、实验条件及操作方法的改变均影响检测结果的判读,从而为临床诊断带来一定困难。结论 精子染色质扩散法对男性不育患者的病因诊断有较大临床意义,该实验过程中应掌握好实验条件及操作方法。

关键词:不育;男性; 精子染色质扩散; 精子; DNA
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 14. 028 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)14-1723-02

目前,有约 15% 的夫妇患有不孕不育,这与遗传、生态环境、内分泌等多种因素密切相关,而由男性精子质量下降引起者约占不孕不育人群的一半^[1],常规的精液分析能够从精子密度、精子活力和精子形态等方面反映精液质量,但是其在精子功能的评价方面价值有限,不能直接反映精子受精能力和对胚胎发育的影响^[2]。近年来的研究表明精子 DNA 的完整性与精子活力、精子形态及精子功能有显著相关性,并且可以影响受精卵的分裂以及胚胎的发育^[3]。DNA 损伤的精子比例在 30% 以上就可能是男性不育的重要因素,有时虽可以受孕发育成胚胎,但多在早期发生自然流产^[4]。精子 DNA 是遗传信息的载体,但是精子生成过程中染色质的浓缩异常、受损精原细胞的凋亡异常、环境毒物以及不良的生活习惯都会造成精子 DNA 损伤^[5]。本研究对 200 例不育者进行精液常规检查后用精子染色质扩散法检测 DNA 完整性,通过改变实验条件分析该实验过程中的注意事项及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验对象为厦门市 2010 年 10 月至 2011 年 12 月来本院就诊的不育患者,以来本院进行健康体检者作为对照。年龄 25~40 岁,平均(31±2)岁。

1.2 仪器与试剂 精液分析仪为以色列欧霸 SQA-V 全自动精液分析仪,OLYMPUS 显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、硼酸、低熔点琼脂、标准琼脂、瑞士吉姆萨染液均购自美国 Sigma 公司;其他试剂有 70%、90%、100% 浓度梯度乙醇、pH 试纸条等由国内生产。

1.3 精液常规分析 用手淫法收集所有精液于洁净取精杯内,采样前禁欲 3~5 d,记录收集时间后置于 37℃ 恒温水浴箱,30 min 后取出,若已液化,则记录精液量、pH 值后用精子采集器定量吸取精液后按仪器操作要求进行各项测试;若尚未液化,则延长温育时间至 60 min 再检测。正常精液指标参数:液化时间少于 60 min,精液量大于或等于 2 mL,密度大于或等于 20×10⁶/mL,存活率大于或等于 30%。一般应做 3 次精液常规检查,不以 1 次检查结果为准。

1.4 SCD 实验 (1)精液样本准备:将精液标本用 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后离心,弃上清,再用 PBS 调至 10×10⁶/mL。(2)制片:取 1 管 1% 低熔点琼脂糖(70 μL)于 65~90℃ 水浴箱融化并于 37℃ 恒温放置 3 min;每管加入处

理后的精液标本 30 μL 并混匀;取 20 μL 滴于预先用 0.65% 标准琼脂糖凝胶包被的玻片上,迅速盖上 22 cm×22 cm 盖玻片后置 4℃ 冰箱 3~5 min,待琼脂糖固化后取出,小心揭去盖玻片。(3)样本处理:立即将载玻片水平浸入新鲜制备的 0.08 mol/L 盐酸中,与 22℃ 避光放置 7 min 使其变性;然后浸入由 TRIS、DTT、SDS、EDTA 制备而成的含 0.4 mol/LDTT 的精子裂解液内静置 25 min;再将载玻片置于去 PBS 中 5 min;然后以此放入 70%、90%、100% 的乙醇中脱水,自然晾干待染色^[6]。(4)染色:用瑞士吉姆萨染液作用 3~5 min 后,加 PBS 至染色液形成表面张力,染色 25~20 min。(5)观察并计数:待玻片干燥后,40 倍普通光学显微镜观察。每份标本至少计数 200 个精子。判断标准:如果精子头部周围有晕环,且晕环宽度不小于精子头部半径,则认为该精子染色质 DNA 完整,记为 SCD 阴性;如果精子头部周围没有晕环或晕环宽度小于精子头部半径,则认为该精子 DNA 完整性破坏,DNA 碎片增加,记为 SCD 阳性。SCD 阳性率=SCD 阳性精子数÷计数精子总数×100%。

2 结 果

2.1 不同年龄段精子 DNA 碎片完整性检测结果,见表 1。从表 1 可以看出,随着年龄的增长,DNA 碎片阳性率大于 10% 者所占比例越来越高,依次为 23.1%、32.3%、38.2%、42.9%、25.0%、66.7%,最后两组因统计量太小予以剔除,有研究表明阳性率小于 10% 组的正常受孕率显著高于大于 10% 组。

表 1 不同年龄段精子 DNA 碎片完整性检测结果(n)					
年龄分层(岁)	<10	≥10~<15	≥15~<20	≥20~<27	≥27
<25	10	2	0	1	0
≥25~<30	44	10	6	4	1
≥30~<35	47	16	5	6	2
≥35~<40	20	10	2	1	2
≥40~<45	6	2	0	0	0
≥45	1	2	0	0	0

2.2 精液常规检测结果与精子 DNA 碎片检测结果对比分析 发现 DNA 碎片增加与前向运动精子百分率呈负相关。

2.3 实验过程中变性液、裂解液的配置及作用时间对结果影

响较大。

3 讨 论

精子染色质具有由 DNA 双链和碱性鱼精蛋白相结合形成的高度浓缩的特殊结构,这种结构的形成涉及精子发生中的核蛋白组型转换、二硫键交联等一系列过程,容易受到环境因素、生物因素、药物接触、感染、吸烟等作用会导致染色质结构异常^[7],同时,高度浓缩的结构造成精子缺乏修复 DNA 缺陷的能力,结构损伤比较稳定,可一直存在。染色质结构异常的发生机制假说包括染色质包装缺陷、凋亡异常及氧化应激等^[8],表现为核蛋白组型异常和 DNA 链碎片化。核蛋白核型异常的精子由于核蛋白对 DNA 的保护作用减低,更容易出现 DNA 链断裂。而这种损伤较难由传统的如精子密度、精子活力、活率等指标来反映,这种由 DNA 损伤导致的男性不育在原发性不育患者中占有较大比例^[9],因此进行精子 DNA 完整性检测对于诊断男性不育患者的病因及采取相应治疗措施非常必要。

随着年龄增长,DNA 碎片阳性率呈增高趋势,也使得辅助生殖技术的成功率大大降低^[10],当阳性率大于 27%时一般认为性宫腔内人工授精、IVF 和单精子卵细胞质内注射治疗没有怀孕或妊娠率很低^[11-12]。而该项检测与精液常规中的精子前向运动百分率降低相吻合,这也解释了 DNA 损伤导致受孕率降低的机制。

精子 DNA 碎片检测方法较多,目前应用较多的有精子染色质结构分析、彗星实验、末端转移酶介导的 dUTP 末端标记法及精子染色质扩散法(SCD)。SCD 法检测精子 DNA 碎片简便易行、灵敏度高、费用低,但实验中所用试剂尤其是变性液、裂解液一定保证质量且在使用期限内,严格掌握实验条件对结果的准确判读非常必要,其进一步临床指导意义有待后续分析研究。

参考文献

- [1] Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation; mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis[J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1027-1036.
- [2] Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation

using the sperm chromatin structure assay[J]. Reproductive Bio Medicine Online, 2006, 12(4, article 2037): 466-472.

- [3] Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa[J]. Hum Reprod, 2000, 15(4): 830-839.
- [4] Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful[J]. Pros and Cons Journal of Andrology, 2009, 30(3): 219-229.
- [5] Ergerie M, Mieusset R, Croute F, et al. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness[J]. Fertil Steril, 2007, 88(4): e1. 970-e7. 970.
- [6] Ménéz YJR, Hazout A, Panteix G, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect[J]. Reproductive Bio Medicine Online, 2007, 14(4): 418-421.
- [7] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome[J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 174-179.
- [8] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(1): 331-345.
- [9] Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line[J]. International Journal of Andrology, 2009, 32(1): 46-56.
- [10] Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE[J]. Hum Reprod, 2008, 23(4): 756-771.
- [11] Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects[J]. Asian Journal of Andrology, 2006, 8(1): 11-29.
- [12] Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study[J]. International Journal of Andrology, 2010, 33(1): e221-e227.

(收稿日期: 2012-01-10)

• 检验技术与方法 •

随机扩增多态性 DNA 反应体系优化的研究

陈华桂

(湖南省怀化市第三人民医院 418000)

摘要:目的 筛选出反应体系的最佳优化方案用于金黄色葡萄球菌的随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD)。方法 应用单因素设计进行 RAPD 反应体系的优化。**结果** 通过优化后得出稳定性良好的优化反应体系(关键成分浓度)为模板 6 μL 引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和镁离子 1.5 mmol/L。**结论** 采用单因素设计优化 RAPD 反应体系,可获得较稳定、可靠的实验结果。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 聚合酶链反应; 单因素设计; 多态性, 单核苷酸

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 14. 029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)14-1724-03

随机扩增多态性 DNA(RAPD)反应中,由于使用的引物较短,退火温度低,且允许存在一定的错配,一般认为会影响实验的重复性。RAPD 的重复性是限制其应用的主要因素,影响其重复性的因素很多^[1],如模板浓度及纯度、Taq 酶、dNTP 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 的用量等。由于 RAPD 的基本原理与聚

合酶链反应(PCR)相同,因此, RAPD 反应体系的部分是与 PCR 一致的, dNTP 使用饱和浓度、Taq 酶量(催化 100 μL 的典型 PCR 反应)一般为 2 个单位。因此,镁离子浓度、引物浓度和模板浓度则成为 RAPD 反应体系优化的关键因素。本研究以金黄色葡萄球菌为研究对象,对反应体系做了一些比较研