

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] Ménézo 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 Iulius 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 μmol/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、Mg²⁺ 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

究,主要方法是采用单因素设计,即在稳定其余因素的情况下,对其中一项因素进行梯度调整,从而得出一个相对最优的反应体系,以期获得稳定、可靠的实验结果。

1 材料与与方法

1.1 材料 菌株为金黄色葡萄球菌。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 DNA 扩增仪为 PE480 型 PCR 热循环仪,美国 PE 公司产品; GENE GENIUS 图像分析处理系统,美国 Stratagen 公司产品。

1.2.2 试剂 随机引物:5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'由上海生工合成;细菌基因组 DNA 提取试剂盒(含蛋白酶 K)购自上海生工;琼脂糖凝胶系 BBI 产品;10×buffer(不含 Mg²⁺)、DNA Marker 均购自上海生工。

1.3 方法

1.3.1 菌株 DNA 提取 复苏冰冻保存菌,挑取单个菌落转入肉汤培养基中,培养 8~18 h,按试剂盒说明书提取基因组 DNA。

1.3.2 RAPD 反应体系的优化设计方案: 逐次固定模板、引物、Mg²⁺ 中的 2 个,优化出另外 1 个因素的“最佳水平”,最后将 3 个因素的“最佳水平”简单合成一个“最佳方案”。因素水平设置见表 1。扩增总体积为 25 μL,其中 10×buffer 2.5 μL,灭菌双蒸水补足;其上覆盖灭菌液体石蜡 30 μL。

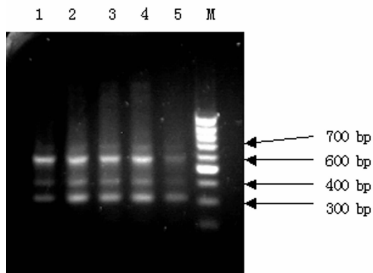
表 1 RAPD 反应体系单因素设计浓度

因素	水平				
模板(μL)	2	4	6	8	10
引物(μmol/L)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Mg ²⁺ (mmol/L)	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5

1.4 RAPD 扩增条件 95℃ 预变性 5 min;95℃ 1 min,25℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 终延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳参照《分子克隆》3 版实验指南,琼脂糖浓度为 1.5%,电压 60 V,电泳 120 min,凝胶成像系统拍照。

2 结果

2.1 优化模板浓度电泳图 当模板浓度为 2 μL,扩增条带数较少;当模板浓度为 10 μL,扩增条带数少,且扩增带亮度变弱;当模板浓度为 4、6、8 μL 均可扩增较多条带,但根据条带亮度选择 6 μL 为最终模板量,电泳扩增结果见图 1。

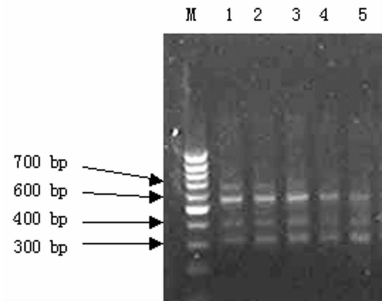


1~5:模板量分别为 2、4、6、8、10 μL;M:DNA Marker。

图 1 优化模板电泳图

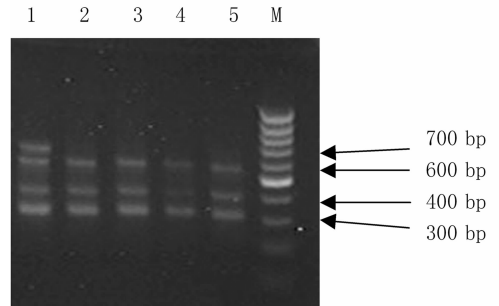
2.2 优化引物浓度电泳图 固定模板为 6 μL,当引物浓度为 1.5、2.0、3.0 μmol/mL 时,扩增条带少,扩增强度弱;引物浓度为 0.5、1.0 μmol/mL 时,均可扩增出较多条带,但当引物浓度为 0.5 μmol/mL 时条带亮,选择引物浓度为 0.5 μmol/mL,扩增结果见图 2。

2.3 优化 Mg²⁺ 浓度电泳图 固定模板浓度为 6 μL,引物浓度为 0.5 μmol/mL,当 Mg²⁺ 浓度过高时,扩增条带数少,当 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增效果最好,所有选择 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L,结果见图 3。



1~5:引物浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 μmol/mL;M:DNA Marker。

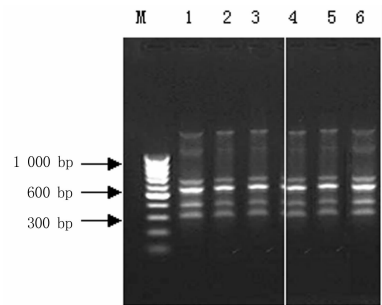
图 2 优化引物电泳图



1~5:Mg²⁺ 浓度分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L;M:DNA Marker。

图 3 优化 Mg²⁺ 电泳图

2.4 重复性实验结果 采用选定的优化体系进行 2 次重复实验,每次实验同时做 3 份平行样,均能获得稳定的实验结果,见图 4。



1~3:第一次重复性实验电泳图;4~6:第二次重复性实验电泳图;M:DNA Marker。

图 4 重复性实验电泳图

3 讨论

RAPD 的基本原理是在比较低的退火温度下,随机引物可与模板上一些与之配对的位点结合,这些结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件,就可扩增出 DNA 片段。电泳后,扩增片段将在凝胶上按大小排列而呈现指纹图谱,通过图谱间的比较即可将差异区分开。其作为一种新的 DNA 指纹图谱分析法,不仅具有常规 PCR 技术快速、安全、简便、灵敏等特点,而且由于其引物具有通用性,不需预先明确靶基因的核苷酸序列,自 1990 年报道后,已得到广泛应

用^[2-4]。RAPD 也有其局限性,其中最主要的是其结果的重复性与实验条件密切相关,不同实验室得到的结果可能缺乏可比性,同一实验室因其选择的引物不同、反应控制的条件(如 Mg²⁺ 浓度、模板浓度、引物浓度)不同,所得指纹图谱亦不相同,所以必须进行条件优化实验以寻找最佳扩增条件。RAPD 条件优化中最常用的方法为多次单因素设计方案^[5-6],即逐次固定 3 个关键因素中的 2 个,优化出另外 1 个因素的“最佳水平”,最后将 3 个因素的“最佳水平”组合成一个“最佳方案”。

在 RAPD 反应中,引物浓度随模板 DNA 浓度而定,因此,首先对模板浓度进行优化,根据实验结果可见,当模板浓度为 2 μL,扩增条带数较少;当模板浓度为 10 μL,扩增条带数少,且扩增带亮度变弱;当模板浓度为 4、6、8 μL 均可扩增较多条带,但根据条带亮度选择 6 μL 为最终模板量。

当模板浓度选定为 6 μL 后,即对引物浓度进行了优化选择。引物浓度过低无法检测出所有 RAPD 位点,因此,本实验设计的最低引物浓度从 0.5 μmol/mL 开始,当引物浓度为 0.5、1.0 μmol/mL 时,均可扩增出较多稳定条带,而随着引物浓度的增高,浓度为 1.5、2.0、3.0 μmol/mL 时,扩增条带少,扩增强度也减弱;综合条带数和亮度两方面考虑,最终选定引物浓度为 0.5 μmol/mL。

Mg²⁺ 为 Taq 酶活性所必需, Mg²⁺ 浓度过低时,酶活力显著降低;过高时,酶则催化非特异的扩增。PCR 混合物中的 DNA 模板、引物和 dNTP 的磷酸基团均可与 Mg²⁺ 结合,降低 Mg²⁺ 实际浓度。Taq 酶需要的是游离 Mg²⁺, 因此,在对 Mg²⁺ 进行优化时,必须首先选定模板 DNA 量、引物和 dNTP 浓度。本研究综合考虑这些因素,因此将 Mg²⁺ 放在最后进行优化。RAPD 分析时,一般需将 Mg²⁺ 浓度控制在大于 1.5 mmol/L, 低于此浓度会导致扩增条带的稳定性及重复性差。从图 3 可

见,当 Mg²⁺ 浓度在 1.5 mmol/L 以上时扩增条带清晰,相对分子质量大和小的片段都能得到很好的扩增,以 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增效果最好,条带也最多。

虽然 RAPD 的影响因素较多,但只要采用优化的反应体系和条件、规范性的操作并采用同一批次的试剂,就能得到比较稳定、可靠的实验结果。随着科研人员对 RAPD 技术的不断深入了解,实验条件的逐步规范化,以及推出商品化的试剂盒等因素,RAPD 技术势必成为分子流行病学研究中广泛使用的方法,在细菌分型和鉴定等方面发挥重要作用。

参考文献

[1] 孙桂芹,陈菁,王宗欣,等. 随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)在甲型副伤寒沙门菌同源性分析中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20(4):786-787.
 [2] 万根平,黄勇,顾晓琼,等. 新生儿呼吸道感染肺炎克雷伯菌随机扩增 DNA 多态性研究[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(4):295-297.
 [3] 张保华,付光林,余桂香,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(2):131-132.
 [4] 杨长顺,刘文恩,李宪,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌随机引物 DNA 扩增多态性分型研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(5):601-604.
 [5] 周秀萍,杨长顺,李争鸣,等. RAPD 反应体系优化的研究[J]. 微生物学杂志,2010,30(3):96-99.
 [6] 厉荣玉,钱森和,王萍,等. 白色念珠菌 RAPD 反应体系优化的研究[J]. 生物学杂志,2010,27(1):39-42.

(收稿日期:2012-01-07)

(上接第 1713 页)

大^[9-10],有可能与当时的标本采集方法、测定方法、分析仪器和研究对象不一而导致的^[11]。

3.4 早产儿出生后不同时间分组的各组间两两比较,除红细胞均值组间比较差异无统计学意义外(P>0.05),其余的血细胞参数均值都有较为明显的差距,这些参数的变化在一定程度上反映婴儿的生理变化或病理的变化趋势,其中最为明显的特征是:≥5~<12 h 后,RBC、Hb、HCT、MCV、WBC、L% 呈现明显的下降趋势,而 PLT 和 N% 呈现上升趋势;≥5~<12 h 时间节点上,白细胞分类表现更为明显,L% 由最初的高值(41.03±16.38)% 达到最低值(26.09±8.50)%,而 N% 也达到最高值(65.48±9.55)%,其变化曲线表现出两个交叉,即其在出生后 1 h 内和出生大于或等于 5~<30 d 几乎相等,从数据上表明,出生后 12 h 为细胞参数变化的分界线;由于样本的局限性,其变化还需进一步验证。

3.5 早产儿出生后不同时间与血细胞参数变化相关性显示,早产儿出生后的时间与血红蛋白参数呈负相关,而与 PLT 呈现正相关^[6];与 WBC 的线性相关性不显著,但仍可以看出 WBC 的变化趋势。

参考文献

[1] 汉珍,黄德珉,官希吉. 实用新生儿学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003:10-12.
 [2] 赵翠生. 不同部位采血与动脉血细胞结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(2):161-162.

[3] 李德发,曹科,罗小娟,等. XS-800i 血细胞分析仪异常报警在儿科血液分析中的评价[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(3):293-294.
 [4] Fanaroff AA, Martin RJ. Neonatal perinatal medicine: disease of the fetus and infant[M]. 7th ed. Mosby; St. Louis, 2002: 17-23, 56-72, 287-291.
 [5] Alexejew B, Handrick W, Braun W, et al. The significance of various hematological parameters for the early diagnosis of bacterial infection in premature and full-term neonates. 1. patients and study methods, normal values for the blood picture of newborn infants[J]. Padiatr Grenzgeb, 1990,29(6):433-442.
 [6] Wasiluk A, Osada J, Dabrowska M, et al. Does prematurity affect platelet indices[J]. Adv Med Sci, 2009,54(2):253-255.
 [7] 赵翠生,何莉,张翀,等. 兰州市健康新生儿动脉血细胞 14 项参数参考范围调查[J]. 临床检验杂志,2007,25(4):310.
 [8] Patrick CH, Lazarchick J, Stubbs T, et al. Mean platelet volume and platelet distribution width in the neonate[J]. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1987,9(2):130-132.
 [9] 王广方,蒋智勇,秦振庭. 新生儿不同日龄电子计数法血常规检查结果分析[J]. 中国小儿血液,1996,1(1):31-34.
 [10] 董雪梅. 健康新生儿动脉血与末梢血细胞参数的对比[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(4):378-379.
 [11] 陈朝晖,周铁民,柳玲. 血细胞分析仪血小板假性减少的原因及探讨[J]. 国际检验医学杂志,2011,31(6):697-698.

(收稿日期:2012-02-11)