

孕牛外周血中胎儿 Y-特异性序列的检测

杨建民* 王骊山* 姜小军 蒋耀青 刘连瑞

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘要 根据公牛 Sry 特异性序列设计两对寡核苷酸引物。并对 20 份妊娠晚期母牛外周血 DNA 样品进行 PCR 扩增,结果有 9 份样品检测出有 Sry 片断(阳性),其余 11 份为阴性。经分娩牛犊性别验证,在 20 份被检测的样品中,有 16 份 PCR 检测结果与犊牛实际性别相符,其余 4 例不符。我们的实验结果说明,胎儿细胞可以进入到孕牛的外周血中去。

关键词 Sry 序列, PCR, 性别, 外周血

胎儿细胞能否进入母体外周血循环,多年来一直是许多学科的研究者所争论的课题之一。据有关报道,胎儿细胞不仅能通过胎盘屏障进入母体外周血循环^[1~3],而且母体有核细胞也可透过胎盘屏障进入胚胎血液系统^[4]。由于 PCR 技术的出现,人们有了更为简单和可靠的方法来确定胎儿细胞能否进入母体外周血循环^[5,6]。Y. -M. Dennis Lo 等甚至报道了直接从母体外周血总 DNA 中扩增出 Y-染色体特异性序列(DY S14)进行胎儿性别诊断^[7]。目前基本可以肯定胎儿细胞可以进入母体外周血循环;但几乎所有的报道都局限于医学研究。我们从 1993 年 4 月至 11 月对 20 头妊娠晚期母牛外周血进行 Sry 扩增,其结果和方法如下。

1 材料和方法

1.1 样品

实验动物为北京西郊农场黑白花奶牛,采取静脉血,按照 J. Sambrook 等人的方法进行 DNA 提取,用作 PCR 反应的模板^[8]。

1.2 寡聚核苷酸引物的设计

根据文献报道的人 Y-特异性 Sry 序列^[9]设计一对引物扩增出牛 Sry 序列后,测序分析,再设计合成两对对牛 Sry 特异的引物—Sry1, 2 和 Sry3, 4;用两对引物对乙知性别的牛血 DNA 进行 PCR 扩增,证明这两对引物均能正确、灵敏地鉴别牛雌雄 DNA。引物 Sry1, 2 扩增的片段长度为 147bp,引物 Sry3, 4 扩增的片断长度为 97bp,详见图 1 (a, b)。

1.3 PCR 反应条件

反应总体积为 50 μ l,每一反应体积中含:Tris-HCl(pH8.3)10 μ mol/L, KCl50 μ mol/L, MgCl₂ 1.5mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 引物 0.1 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2u, Gelatin-

本研究得到国家自然科学基金资助。

* 对本工作的贡献是同等的。

本文于 1994 年 11 月 30 日收到。

100 0.05%。PCR 反应的条件是:煮沸变性 10min, 进入自动循环体系; 变性 94℃, 1min; 复性, 55℃, 1.5min (引物 Sry3, 4 为 54℃); 延伸, 72℃, 1.5min; 35 个循环完成后, 72℃放置 10min, 取 12 μ l 反应液于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙锭染色后在紫外灯下观察 PCR 扩增产物并照相。

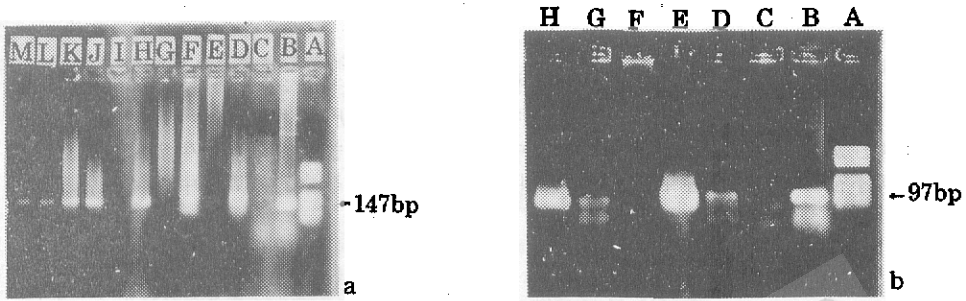


图 1 引物 Sry 1、2 (a)、3、4 (b) PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of bovine fetal Sry sequence with Sry 1、2 (a)、3、4 (b) primers

a. Sry 1: 5'-TCTGTGTATGGCTAGTAGTCTCTG-3'

Sry 2: 5'-GTGTGGTCTCGTGAACGAAGACG-3'

Notation: Lane A-DNA molecular weight marker V

Lane B-male positive control

Lane C-female negative control

Lane D...M-63a, 80, 86, 79, 63b, 81,

64, 75, 89, 87

b. Sry 3: 5'-CCTACCTAATAGATTCCAGCTG-3'

Sry 4: 5'-CTGTCTCTGAAACAGATGAGCTG-3'

Notation: Lane A-DNA molecular weight marker V

Lane B-male positive control

Lane C-female negative control

Lane D, F, G-83; 84, 85

Lane E, H-83, 85 (results after two

rounds of amplification of 83, 85,

showing much stronger signal)

2 结 果

应用本方法对 20 份妊娠晚期母牛外周血 DNA 进行检测, 结果见表 1。以公牛全血 DNA 作为阳性对照, 以母牛全血作为阴性对照。我们的结果表明胎儿的 Sry 片段是可以进入到孕牛外周血中去的。9 例 PCR 阳性者均与分娩犊牛的性别相符, 在 11 例 PCR 阴性者中, 有 7 例与犊牛性别相符, 而其余 4 例呈假阴性, 即 PCR 判断为雌性胎儿, 而实际分娩的却为雄性犊牛。

表 1 PCR 扩增孕牛外周血中胎儿的 Sry 序列

Table 1 Amplification of bovine fetal Sry sequence from maternal blood by PCR

Samples	PCR signal	Sex assigned by baby	Samples	PCR signal	Sex assigned by baby
1 (63)	Male	Male	6 (77)	Female	Male
2 (64)	Male	Male	7 (79)	Female	Female
3 (71)	Female	Female	8 (80)	Female	Female
4 (72)	Female	Male	9 (81)	Female	Female
5 (73)	Female	Female	10 (83)	Male	Male

续表

Samples	PCR signal	Sex assigned by baby	Samples	PCR signal	Sex assigned by baby
11 (84)	Female	Female	16 (89)	Male	Male
12 (85)	Male	Male	17 (75)	Male	Male
13 (86)	Male	Male	18 (77)	Female	Male
14 (87)	Male	Male	19 (82)	Male	Male
15 (88)	Female	Female	20 (74)	Female	Male

3 讨 论

早在 60 年代国外就有探索胎儿细胞在母体外周血循环中出现的可能性及其应用价值。由于采用的多数方法是细胞学和免疫学方面的, 受到抗体特异性和检测灵敏度的影响, 各家研究结果常不一致, 甚至相互矛盾^(1,2)。近几年不少文章报道了利用 PCR 技术鉴定母体外周血 DNA 中来自胎儿的 Y-特异性序列, 取得了显著进展, 有望利用这一技术进行早期产前诊断^(2,5~7)。

鉴于这方面的研究多局限于人体研究, 我们以奶牛为研究对象, 以期找到一种简便无创性检测方法, 应用于畜牧业的育种中。我们尝试从母体外周血总 DNA 中进行胎儿 Y-特异性序列的检测, 并取得了一些结果; 与此同时, 在人体上的研究也有了进展, 1993 年 10 月有报道说从母体外周血 DNA 中直接检测来自胎儿的 Y-特异性序列获得了成功⁽⁷⁾, 这在实际应用中有着重要的意义, 它省去了从前许多研究者认为的先分离到胎儿细胞, 再通过培养扩增, 然后鉴定这一系列步骤中的许多麻烦之处。不过, 结合细胞分离技术和 PCR 这两项技术, 仍然是提高灵敏度的有效措施之一^(2,3,6)。

3.1 胎儿细胞在母体外周血中出现的频率

由于胎盘的屏障作用, 仅极少数的细胞可进入母体外周血中, 不同的研究得出的结论相差较大, 有人报道在 1000 个母体有核血细胞中可高达 3 个, 但存在着个体差异^(1,2)。

3.2 PCR 的灵敏度和特异性

根据分娩的犊牛性别判断, 本研究未见假阳性, 而有 4 例假阴性; 这是由于 Sry 序列在物种之间的高度同源性以及所用引物的通用性和特异性等因素的影响, 因此, 在进行检测时可设计一对对照用引物(如牛的卫星 DNA 序列), 这样就可以大大提高准确率⁽¹⁰⁾。PCR 的灵敏度还受胎儿细胞在母体外周血中出现的频率所影响。Y. -M. Dennis Lo 等人发现只要在 30 万个母体外周血有核细胞中有一个胎儿雄性细胞, 即可检测出 Y-特异性片段⁽⁷⁾, 可见灵敏度是相当高的。他们采用重复多次检测的方法, 也有效地提高了灵敏度。我们采用两次 PCR 方法, 明显增强了检测的特异性, 但未见灵敏度的提高, 其原因有待进一步的研究。

3.3 妊娠时间

胚胎只有发育到一定的时期才可能有胚胎细胞进入母体外周血循环。Y. -M. Dennis Lo 等人的研究发现, 在前、中、后三期检测出的阳性率分别为 86%, 67% 和 87%^(5,7), 说明这种方法在妊娠头三个月即可应用, 因为在妊娠前三个月进行早期诊断, 在实际应用

中方有意义；在人体中，早至第 6 或第 9 孕周即可检测到 Y 小体和 Y-特异性序列^[3]。

致 谢 本所翟文学同志参加了本文的工作，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Adinolfi M, Camporese C, Carr T. *The Lancet*. 1989, **8**: 328~329.
- [2] Diana W Bianchi, Jane E Stewart, Mary Frances Gerber *et al.* *Prenatal Diagnosis* 1991, **11**: 523~528.
- [3] Covone A E, Mutton D, Johnson P M *et al.* *The Lancet*. 1984, **10**: 841~843.
- [4] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S *et al.* *Nature*. 1990, **346**: 240.
- [5] 葛丽萍, 周苏文, 夏 蓓等. *中华医学遗传学杂志*, 1993, **10** (5): 280~283.
- [6] Dennis Lo Y-M, Pushpa Patel, Sampietro M *et al.* *The Lancet*. 1990, **16**: 1463~1464.
- [7] Dennis Lo Y. -M., Pushpa Patel, Colin N. Baigen *et al.* *Human Genetics*. 1993, **90**: 483~488.
- [8] Muller U W, Hawes C S, Wright A E *et al.* *The Lancet* 1990, **28**: 197~200.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [10] 王京红, 郭三堆, 杨应昌等. 《生物工程论文集》, 北京: 化学工业出版社, 1994, pp: 17~21.

Detection of Bovine Fetal Y-specific Sry Sequence from Maternal Blood

Yang Jianmin Wang Lishan Jiang Xiaojun Jiang Yaoqing Liu Lianrui
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Abstract Two pairs of primers were designed based on sequence of bovine Sry and applied to assay of Y-specific DNA sequence from maternal blood using the polymerase chain reaction (PCR). Of the total twenty DNA samples from peripheral blood of late pregnant cow, nine appeared positive with male specific sequence. The fetal sex predicted by PCR analysis of maternal blood DNA accorded with the sex of babies on delivery in 16 cows (the remaining four were negative). Our results showed that bovine fetal cells can enter the maternal blood of pregnant cow.

Key words Sry gene, polymerase chain reaction, sex determination, maternal blood