doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.018

·临床研究·

MDA-DHPLC 技术在 PGS 中的应用 *

林德伟[1] 吴炜霖[2] 曾 嵘[3△] 谢素嫣[1] 谢 妍[1] 杨冬宇[1]

（1 广州军区广州总医院生殖医学中心 广东 广州 510010；2 广东省中医院生物资源库 广东 广州 510120；
3 南方医科大学基础医学教学中心 广东 广州 510515）

摘要 目的：评估丙二醛变性高效液相色谱法在胚胎移植过程中的临床价值。**方法：**收集我院生殖中心 2010 年 2 月～2012 年 3 间未做移植的废弃胚胎，由 D2 胚胎培养到 D3 胚胎期，提取遗传物质并进行 PRC 扩增，采用高形态学评分的 D3 作为对照，高效液相色谱法测定遗传 DNA 过氧化产物丙二醛（MDA）的含量。**结果：**多核Ⅰ组 D2 期卵裂球核≥ 2 个，共 24 枚胚胎，DNA 过氧化产物丙二醛（MDA）的含量 5.32± 0.19 μmol/L，对比正常胚胎 0.67± 0.08 μmol/l 有显著差异（P＜0.05）。多核Ⅱ组 D2 期卵裂球核=2，共 19 枚胚胎，MDA 的含量 4.12± 0.22 μmol/L，对比正常胚胎 0.67± 0.08 μmol/l 有显著差异（P＜0.05）。Ⅰ组与Ⅱ组间没有统计学差异。然而，空泡胚胎与非空泡胚胎之间 MDA 并没有差异。**结论：**多核 D2 期胚胎培养到 D3 期会产生很高异常率，因此临床上应减少使用此种进行移植。

关键词：种植前遗传学筛查（PGS）；丙二醛（MDA）；变性高效液相色谱（DHPLC）

中图分类号：Q344；R169 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2014）15-2875-04

Application Research of MDA-DHPLC in Preimplantation Genetic Screening*

LIN De-wei[1], WU Wei-lin[2], ZENG Rong[3△], XIE Su-yan[1], XIE Yan[1], YANG Dong-yu[1]

*(1 Center for Reproductive Medicine, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong, 510010, China;
2 Biological Resource Library, Guangdong Province Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510120, China;
3 Basic Medical Education Center, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)*

ABSTRACT Objective: To assess the application of MDA-DHPLC in the process of Embryo transferation. **Methods:** Select the abandoned D2 embryo from reproductive center of our hospital between the period of Feb.2010 to Jan.2012. Detect the content of the Peroxidation products MDA on DNA by DHPLC, take the good morphology D3 group as control. **Results:** There were 24 embryos in group Ⅰ whose D2 embryo is Multinucleated and blastomere nucleus ≥ 2, Peroxidation products MDA on DNA detected by DHPLC was 5.32 ± 0.19 μmol/l, compared with the controlled group 0.67± 0.08 μmol/L(P＜0.05); 24 D2 embryos in group Ⅱ were Multinucleated and blastomere nucleus=2, Peroxidation products MDA was 4.12± 0.22 μmol/L, compared with the controlled group 5.32± 0.19μmol/l (P＜0.05). There were no statistical deference between group Ⅰ and group Ⅱ (P>0.05). Neither between Multinucleated Vacuoles embryos and non-Vacuoles embryos. **Conclusion:** Development of Multinucleated D2 embryos to D3 derives high abnormal rates, we avoid to use those embryos to conduct Embryo transplantation.

Key Words: Preimplantation genetic screening; Malondialdehyde Denaturing; High performance liquid chromatography

Chinese Library Classification（CLC）: Q344; R169 Document code: A

Article ID:1673-6273（2014）15-2875-04

前言

生物遗传物质分子结构发生碱基对组成或排列顺序的改变，主要包括碱基的替换和小片段的缺失或插入，它是导致基因型疾病的重要原因之一[1-3]。然而环境致癌剂、营养不良或局部炎症等都可增加机体的氧化负荷，进而引起脂质过氧化和 DAN 的氧化损伤，从而造成基因变异。丙二醛 (malondialdehyde，MDA) 是脂质过氧化和花生四烯酸代谢过程中形成的一种活性很强的代谢产物，已被用作衡量脂质过氧化程度的生物标志物[7-9]。丙二醛可与 DNA 共价结合形成 DNA 加合物，其中与脱氧鸟嘌呤形成的加合物最为重要[12,13]。优良胚胎与发生基因突变的胚胎 DNA 与 MDA 形成的加合物程度不同，从而可利用变性高效液相色谱法测定胚胎 MDA 含量，对胚胎的质量作出判断，为胚胎的种植前遗传学诊断提供依据。

1 材料方法

1.1 一般材料

收集 2010 年 11 月～2012 年 3 月期间在省医院生殖医学

* 基金项目：广东省科技攻关项目（2011B032000004）

作者简介：林德伟（1980-），男，硕士学历，技师，从事胚胎植入前遗传学筛查方面的研究

△通讯作者：曾嵘（1969-），女，博士学历，副教授，从事细胞遗产产前诊断方面的研究，E-mail:875402844@qq.com

（收稿日期：2014-01-08 接受日期：2014-01-30）

中心实行体外受精 - 胚胎移植(IVF-ET)的培养阶段出现 D2 期多核特征的废弃胚胎。共收集符合条件的废弃胚胎 43 枚。全部胚胎为正常受精(2 原核),卵裂球内多核(≥ 2 个核)为Ⅰ组,卵裂球内多核(=2 个核)为Ⅱ组。以 35 岁为限,年龄≤ 35 周岁胚胎共 26 枚,年龄＞35 周岁胚胎共 17 枚,采用生殖医学中心正常移植的胚胎 32 枚胚胎作为对照,它们慢速冷冻的第三天形态学评分为优质的胚胎解冻复苏,复苏后溶解卵裂球比例较高。提取胚胎 DNA,进行 PCR 扩增,扩增产物保存于 4 摄氏度冰箱中准备 DHPLC 检测 MDA 含量。

1.2 试剂与仪器

四乙基丙烷(TFP)、TBA 均购自日本东京化成株式会社;色谱纯级甲醇购自南京化学试剂采购站,其余试剂均为分析纯级,高效液相色谱检测系统:包括 LC-3A 高压泵、SPD-1 多波长紫外分光检测器为日本岛津仪器公司产品;N-2000 色谱数据工作站市孵化中心智能信息系统提供,LichrospherC18 高效液相色谱分离柱为江苏汉邦科技有限公司产品。

1.3 扩增产物 MDA 含量 DHPLC 检测

取各扩增产物 150 μL和 150 μL 的 1.5 mol/L 三氯乙酸于 1.5 mL 离心管中,盖紧管盖,混合 45 s 后 7000 r/min 离心 16 min;取 400 μL 0.3% TBA 溶液和 200 μL 离心后的上清液至 5 mL 带塞玻璃离心管中。在 85 ℃ 水浴中温浴 30 min,流动水冷却至室温后,并用 0.22 μm 微孔滤器过滤后待 DHPLC 测定 MDA 含量。DHPLC 测定时进样 25 μL 定量测定,进样流动相缓冲液为 50:40 体积比的磷酸盐和甲醛,选择流速为 1.2 mL/min,选择紫外线波长 532 nm 进行检测,并记录 MDA 含量。DNA 片段通过紫外分光光度检测器检测,并且,模拟信号会转换成数值。

1.4 统计分析

采用 SPSS11.0 统计软件,统计数据以均数± 标准差($\bar{x}$ ± s)表示,采用 T 检验对Ⅰ、Ⅱ两组 MDA 平均值进行差异显著性检验,P<0.05 说明两组染色体异常率有显著性差异,具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常胚胎 DHPLC 检测

正常胚胎由 D2 胚胎培养到 D3 胚胎期,提取遗传物质并进行 PRC 扩增,经 DNA 提取 PCR 扩增显示,32 例对照组正常胚胎基因组 DHPLC 检测,丙二醛(MDA)含量为 0.67± 0.08 μmol/l (见表 2)。另外,观察女性年龄对胚胎移植的影响,年龄≤ 35 周岁胚胎 MDA 含量 5.32± 0.19 μmol/L,女性年龄＞35 周岁胚胎 MDA 含量 5.32± 0.19 μmol/L,两组基因组 MDA 含量比较 P＞0.05,没有统计学差异(见表 1)。

表 1 妇女年龄对胚胎异常率影响分析

Table 1 Analysis of MDA-DHPLC of women at different ages

Ages	Cases	MDA(μmol/l)	Differences
≤ 35 years	26	0.62± 0.28	p＜0.05
＞35 years	17	0.73± 0.19	

2.2 多核形态特征胚胎基因组分析

多核 A 组与 B 组胚胎由 D2 胚胎培养到 D3 胚胎期,多核 A 组共 24 枚 D2 期胚胎,基因组 DHPLC 检测,丙二醛(MDA)含量为 5.32± 0.19 μmol/l。与对照组 MDA 含量 0.67± 0.08 μmol/l 相比较,两组 MDA 含量差异显著,有统计学意义(P< 0.05)。多核 A 组共 19 枚 D2 期胚胎,基因组 DHPLC 检测,丙二醛(MDA)含量为 4.12± 0.22。与对照组 MDA 含量 0.67 士 0.08 μmol/l 相比较,两组 MDA 含量差异显著,具有统计学意义(P<0.05)。多核 A 组与 B 组异常率差异不显著(P＞0.05),不具有统计意义(见表 2)。

表 2 多核形态特征胚胎 MDA-DHPLC 分析

Table 2 Analysis of MDA-DHPLC of three groups

Groups	Cases	MDA(μmol/l)	Differences
Normal group	32	0.67± 0.08	
Group Ⅰ	24	5.32± 0.19	P＞0.05
Group Ⅱ	19	4.12± 0.22	P＞0.05

2.3 多核形态有泡和无泡胚胎分析特征胚胎基因组分析

43 枚胚胎由 D2 胚胎培养到 D3 胚胎期,有 12 枚胚胎在显微镜先出现空泡,31 枚胚胎正常。基因组 MDA-DHPLC 检测,空泡组丙二醛(MDA)含量为 4.54± 0.21 μmol/L。与对照组 MDA 含量 0.67± 0.08 μmol/l 相比较,两组 MDA 含量差异显著(P<0.05)。无泡组基因组 MDA-DHPLC 检测,丙二醛(MDA)含量为 5.03± 0.46 μmol/l。与对照组 MDA 含量 0.67± 0.08 μmol/l 相比较,两组 MDA 含量差异显著,具有统计学意义(P<0.05)。多核空泡与无泡组 MDA 含量差异不显著(P＞0.05),不具有统计意义(见表 3)。

3 讨论

从 20 世纪后半叶开始,辅助生殖技术开始用于不育症的治疗,在全世界范围内广泛开展胚胎植入前遗传学诊断(Preimplantation genetic diagnosis,PGD),这项新技术的诞生,是伴随辅助生殖技术与基因技术的发展应运而生的,其在胚胎植入前对胚胎进行遗传病筛查,确定胚胎正常后再进行移植,从而对移植胚胎进行有效的质控[14-16]。近年来,遗传学诊断技术

表 3 多核形态空泡和无泡胚胎 MDA-DHPLC 分析

Table 3 Analysis of Multinucleated Vacuoles embryos and non-Vacuoles by MDA-DHPLC

Groups	Cases	MDA(μmol/l)	Differences
Normal group	32	0.67± 0.08	
Vacuoles embryos	12	4.54± 0.21	P＞0.05
non-Vacuoles embryos	31	5.03± 0.46	P＞0.05

发展迅速,从最初的用聚合酶链式反应(PCR)技术对基因变异进行检测,到如今用荧光原位杂交(FISH)技术对人胚胎性别及遗传物质变异进行检测,而后者因其独特的优势成为性别鉴定及染色体结构与数量异常检测的主要手段。

近年来变性高效液相色谱(Denaturing high performance liquid chromatography)技术在基因变异诊断和检测中得到了广泛应用,此技术在 DNA 部分变性的情况下,不完全匹配的双链 DNA 通过离子反相高效液相色谱技术检测到。DHPLC 技术最先由 Oefner 等于 1995 年建立,该技术使用的仪器设备是由 HPLC 仪、PCR 仪、生物纳米材料吸附分离柱等组成[17,18]。DHPLC 系统包括固定相和有缓冲液充当的流动相,依据 DNA 片段的大小及其李欢性质不同,随流动相 DNA 色谱柱-DNASep 柱系(USA)经过固定相时的吸附和停留时间不同,DNA 片段将在分析柱中被分离开,紫外分光光度检测器构成的检测系统将检测 MDA 含量,并且可以并将模拟信号转换为数值,结果也可以色谱图的形式显示,也就是不同的 DNA 片段对应一系列的波峰。DHPLC 技术既不需要使用放射性同位素,也不需要凝胶电泳,操作简便、经济,真正做到了自动、高效、快速、准确地检测遗传物质变化,且检测结果可以以图形数值形式直观的显示[19]。在检测与疾病相关基因的突变方面,其提供了一种有效可行的检测方法。本实验就是利用 DHPLC 之优点为胚胎体外遗传物质变异的筛选提供了参考依据。

DHPLC 技术和其它技术一样不能成为基因检测的万能工具,检测数据只能说明基因组有无突变,而难以检测基因突变的种类,因此只能作为筛查的标准,要做到确认还需要其它技术的辅助检测;如果同时进行多个基因片段检测,因 DNA 分子不同片段发生变性温度不同,要逐个片段进行检测,工作量将大大增加。尽管如此,在目前公认的有效检测手段中,DHPLC 仍是一种快速、高效、准确、经济及半自动化筛查基因杂合突变的工具,优于测序等其他分子生物学方法,相信在未来的基因组学研究领域中必将继续发挥重要的作用[20]。

参 考 文 献(References)

[1] Bredenoord AL, Pennings G, Smeets HJ, et al. Dealing with uncertainties: ethics of prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis to prevent mitochondrial disorders[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(1): 83-94

[2] White SL, Shanske S, McGill JJ, et al. Mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue or age-related variation [J]. J Inherit Metab Dis, 1999, 22(8): 899-914

[3] Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates [J]. Fertil Steril, 2007, 87(3): 496-503

[4] Combelles CMH.What are the trade-offs between one-cell and two-cell biopsies of preimplantation embryos [J]. Hum Reprod, 2008, 23(3): 493-498

[5] Poulton J, Marchington DR. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications[J]. Reproduction, 2002, 123(6): 751-755

[6] Bredenoord AL, Pennings G, Smeets HJ, et al. Dealing with uncertainties: ethics of prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis to prevent mitochondrial disorders [J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(1): 83-94

[7] Kosaki K, Yoshihashi H, Ohashi Y, et al. Matsuo Fluorescence-based DHPLC for allelic quantification by single-nucleotide primer extension[J]. J Biochem Biophys Methods, 2001, 47(1-2): 111-119

[8] Udaka T, Torii C, Takahashi D, et al. Comprehensive screening of the thiopurine methyltransferase polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Genet Test, 2005, 9(2): 85-92

[9] O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, et al. McGuffin Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection[J]. Genomics, 1998, 52(1): 44-49

[10] Biggin A, Henke R, Bennetts B, et al. Christodoulou Mutation screening of the mitochondrial genome using denaturing high-perfo-rmance liquid chromatography [J]. Mol Genet Metab, 2005, 84(1): 61-74

[11] Lam CW, Li CK, Lai CK, et al. DNA-based diagnosis of isolated sulfite oxidase deficiency by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Mol Genet Metab, 2002, 75(1): 91-95

[12] Schollen E, Dequeker E, McQuaid S, et al. Matthijs Diagnostic DHPLC Quality Assurance (DDQA): a collaborative approach to the generation of validated and standardized methods for DHPLC-based mutation screening in clinical genetics laboratories Hum [J]. Mutat, 2005, 25(6): 583-592

[13] Dehainault C, Laugé A, Caux-Moncoutier V, et al. Houdayer Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(18): e139

[14] Flanagan JM, Tighe O, O' Neill C, et al. Croke Identification of sequence variation in the galactose-1-phosphate uridyl transferase gene by Dhplc Mol[J]. Mol Genet Metab, 2004, 81(2): 133-136

[15] Liu W,Smith DI, Reehtzigel KJ, et al. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(6): 1396-1400

[16] Bagattin A, Veronese C, Bauce B. Denaturing HPLC based approach for detecting RYR2 mutations involved in malignant atrhythmias[J]. Clin Chem, 2004, 50(7): 1148-1155

[17] Underhill PA, Jin L, Lin AA, et al. Detection of numerous Y

chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high- performance liquid chromatography[J]. Genome Res, 1997, 7(10):996-1005

[18] Dastsooz H, Vahedi N, Fardaei M. DNA Sequence Fragment Containing C to A Mutation as a Convenient Mutation Standard for DHPLC Analysis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(8): 946-949

[19] Hayward-Lester A, Oefner PJ, Sabatini S, et al. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC[J]. Genome Res, 1995, 5(5): 494-499

[20] Oefner PJ, Huber CG. Huber A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 782(1-2): 27-55

(上接第 2830 页)

[7] Gomes P S, Botelho C, Lopes M A, et al. Evaluation of human osteoblastic cell response to plasma-sprayed silicon-substituted hydroxyapatite coatings over titanium substrates [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2010, 94(2): 337-346

[8] 王明海, 董有海, 洪洋, 等. 四种不同载体材料体外生物相容性比较[J]. 中华实验外科杂志, 2009(11): 1539-1541
Wang Ming-hai, Dong You-hai, Hong Yang, et al. The comparative study on the biocompatibility of four kinds of scaffolds [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2009(11): 1539-1541

[9] 卢向东, 郭庆华, 刘强, 等. 转基因干细胞构建组织工程骨的初步实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 2010, 33(2): 143-145
Lu Xiang-dong, Guo Qing-hua, Liu Qiang, et al. Preliminary experimental study of genetically modified stem cells to build tissue engineering bone [J]. Chinese Journal of Microsurgery, 2010, 33(2): 143-145

[10] 左林, 柏树令, 潘锋, 等. 镁合金表面含硅涂层对成骨细胞的黏附, 形态和细胞周期的影响[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(2): 152-155
Zuo Lin, Bai Shu-ling, Pan-Feng, et al. Influence of silicate coating on the surface of the magnesium on osteoblastic adhesion, morphous and cell cycle [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2011, 34(2): 152-155

[11] 赵彬, 翁文剑, 王慧明,等. 含氟羟基磷灰石涂层体外细胞相容性研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2005, 24(5): 606-610
Zhao Bin, Wen Wen-jian, Wang Hui-ming, et al. In vitro Study on the Cytocompatibility of Fluoridated Hydroxyapatite Coatings [J]. Chinese Journal of Biomedcal Engineering, 2005, 24(5): 606-610

[12] Manzano M, Lozano D, Arcos D, et al. Comparison of the osteoblastic activity conferred on Si-doped hydroxyapatite scaffolds by different osteostatin coatings[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(10): 3555-3562

[13] Thian E S, Huang J, Best S M, et al. Novel silicon-doped hydroxyapatite (Si HA) for biomedical coatings: An in vitro study using acellular simulated body fluid [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2006, 76(2): 326-333

[14] Kim S R, Lee J H, Kim Y T, et al. Synthesis of Si,Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors [J]. Biomaterials, 2003, 24: 1389-1398

[15] Kim S R, Lee K S, Chang J S, et al. Biocompatibility of Si-substituted hydroxyapatite[J]. Key Engineering Materials, 2004, 254: 135-138

[16] Shepherd J H, Shepherd D V, Best S M. Substituted hydroxyapatites for bone repair[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012, 23(10): 2335-2347

[17] Botelho C M, Brooks R A, Best S M,et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006, 79(3): 723-730

[18] 陆博, 郑启新. 羟基磷灰石/聚 DL-乳酸复合内固定材料对成骨细胞活性影响的体外研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(4): 350-357
Lu Bo, Zheng Qi-xin. An in vitro study of hydroxyapatite/ poly-dl-lactide composite internal fixation on osteoblasts [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2003, 22(4): 350-357

[19] Kikuchi M. Hydroxyapatite/Collagen bone-like nanocomposite [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2012, 36(11): 1666-1669

[20] Liu X, Chu P K, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications[J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2004, 47(3): 49-121