

R
0088
8010
87

私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

人類無精子症及寡精子症之
細胞染色體及基因分析

**Cytogenetic Investigation and Gene Analysis in
Human Azoospermia and Oligozoospermia**

指導教授：李宣佑 博士 (Shuan-Yow Li, Ph.D.)

研究生：曾  (Shan-Li Tseng)

中華民國八十七年六月

June 1998

中山醫學院圖書館



C050060

參考書恕不外借

授權書
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所 甲組 86 學年度第 二 學
期所撰碩士學位論文。

論文名稱：人類無精子症及寡精子症之細胞染色體及基因分析

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院
國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之
網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟
或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術
資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心
微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍
佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後
至民國 年 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人
畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權
他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行
權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：李宣佑 教授

研究生簽名：曾三立 學號：R85104
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 5 月 22 日

-
- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。

2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。

3. 授權人的權利與義務：

在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意的是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。

4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：

在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞

地址：台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名：曾三立 聯絡電話：03-4630596

地址：中壢市興仁路二段 297 巷 13 號 3 樓

本論文為中山醫學院授與醫學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及
口試通過。

口試委員

國立台灣大學醫學院優生保健部主任

柯滄銘 教授

柯滄銘

私立中山醫學院醫學研究所副教授

謝明麗 博士

謝明麗

私立中山醫學院醫學研究所教授
(論文指導教授)

李宣佑 博士

李宣佑

中華民國八十七年五月

學生曾三立論文題目為人類無精子症及寡精子症之細胞染色體及基因分析，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李宣佑 博士

簽名：李宣佑

中華民國八十七年六月

致 謝

猶記得剛進醫學院當醫學生的時代，學長說過的 3 S — Smart (聰敏)、Smooth (處事平順)、Solid (紮實)。隨著醫學院年級的增長 Smart 的感覺似乎真的離我越來越遠了，要做到 Smooth 有時又感到有些鄉愿；醫學院畢業之初又曾面臨一空前的人生低潮期，家庭親情、朋友情誼等都曾疏離過，一陣子甚至都覺得世界是否已遺忘了我的存在。後幸運地進入醫學中心開始住院醫師的生涯並一路到主治醫師的歷程中，Solid 似乎是我唯一可以掌握的東西，於是乎於升任主治醫師後我選擇了重拾書包回到母校的研究所再充實自己。

兩年研究所的感受真如「寒天飲冰水，點滴在心頭」，因須同時兼顧醫院臨床工作及研究所課業，往往須往來於台中及桃園間。對這段進修過程，首先，特別要感謝我的指導老師李宣佑教授及省立桃園醫院婦產科陳光煒主任。由於有陳主任的寬容及信任，我才得以能在無後顧之憂下得到李宣佑教授的親炙。也由於我的指導老師的豐富學識及悉心教導，使我在這兩年中獲益良多，在此致上無限的感激與謝意。亦向省立桃園醫院婦產科的諸位住院醫師說聲「謝謝您！」，感謝兩年來在院內分擔照料病患的工作。

在學習及實驗方面要特別感謝王怡鈞老師、謝淑卿學姐、林孜伶學姐的指導及協助，陪伴我渡過兩年的研究生生涯。尤其是王怡鈞老師在分生技術方面的帶領，使得本論文得以順利完成。亦感謝王旭明老師、林定邦老師、劉生明老師、楊世忠老師及劉俊惠先生於實驗初期提供自己寶貴的血液讓我進行嘗試。

在細胞染色體方面真的要感謝麗嬌、淑卿、文惠、舒惠、保英、

容珠、翠倫、丫姐(惠媚學姐)、佩宜等細胞遺傳室人員。尤其要謝謝麗嬌，沒有妳的幫助，我實驗中個案的細胞有一大半會出狀況。亦謝謝淑卿、舒惠於技術上的大力協助。此外亦要謝謝蔡錦珠學姐於實驗上給予的照顧及幫忙，沒有大家的幫忙我真的無法想像研究所這兩年要如何渡過。

感謝我的同學：嘉仁及秀美在兩年研究所生涯中於研究室內的患難與共及相伴。感謝實驗室的東城、和茂學弟及佳慧學妹在實驗及生活上的相互扶持與照顧，沒有你們的陪伴將會失去許多歡笑。另外要感謝李宣佑老師、王怡鈞老師及孫孝芳老師不辭辛勞的為論文內容作修正使之趨向完整。謝謝兩位口試委員—柯滄銘教授及謝明麗教授於百忙中對於論文內容的審閱及斧正。

千言萬語，不知從何敘；謝謝在我人生徬徨路上，曾不吝於黑暗中伸出手拉我一把的師長及朋友。最後謹以此論文獻給我的父母、家人及所有關心我的人。

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	3
序 論	5
材料與方法	9
結 果	15
討 論	18
參考文獻	25
圖 表	29
附錄一、儀器設備	41
附錄二、試 藥	43
附錄三、試劑及緩衝溶液之配法	45



中文摘要

根據研究資料顯示造成不孕的原因中有 25 ~ 40 % 是由於男性因素(male factor)所引起[Hornstein et al., 1996]。造成男性不孕症的原因雖多但絕大部份是和精子的數目、型態及運動功能有關。

目前的研究資料顯示 Y 染色體在精子生成過程中扮演相當重要的角色；傳統的染色體檢查(cytogenetic)雖發現男性不孕患者有較高的染色體異常率，但對於由 Y 染色體微缺失(microdeletion)所造成的無精子症及寡精子症，染色體檢查往往無法有任何的助益。

本研究主要針對 58 位非阻塞性無精子症(non-obstructive azoospermia)及 32 位寡精子症進行細胞染色體檢查，並於 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域進行 multiplex-PCR screening 以期發現 microdeletion。

在細胞染色體檢查方面於無精子患者中發現 4 位(4/58)47,XXY 的染色體異常，於寡精子患者群中發現 1 位(1/32)的染色體異常—45,XY,der(14;15)(q10;q10)，本次研究中全部男性不孕症患者其染色體異常率為 5.6 %；且發現無精子患者的染色體異常率大於寡精子症患者的染色體異常率。至於 microdeletion 的檢查方面亦於無精子患者中發現 5 位(5/58)於 AZF 區有程度不一的斷裂缺失。

本研究由於採用 multiplex-PCR 的方法可以節省大量的時間及藥

劑，並達成快速診斷的目的，並將由於染色體、基因之原因所導致不孕之診斷率由原來染色體檢查的 6.9 % (4/58) 提高到 15.5 % (9/58)。可見到無精子症及寡精子症的男性不孕症患者，如於接受 cytogenetic 檢查外再接受 *AZF* microdeletion 的 PCR screening，對欲接受人工協助生殖技術以達成擁有下一代的夢想的不孕症患者，將可提供更理想的治療方法及完整的遺傳諮詢。

英文摘要

Approximately 25 to 40 % of infertility is caused by male factor. The major clinical manifestation of infertility with male factor is poor semen quality. Azoospermia and oligozoospermia are popular in infertile men. Infertile men are found to have chromosomal abnormalities, with the incidence increasing as the sperm count decreases. However, cytogenetic study provides little information about azoospermia and oligozoospermia caused by microdeletion of the *AZF* region.

58 patients with non-obstructive azoospermia and 32 patients with oligozoospermia were included in this study. Cytogenetic investigation and *AZF* region microdeletion screening were performed. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was employed for detection of *AZF* region microdeletion analysis. The sequence-tagged-site (STS) primers that cover the entire length of the euchromatic region in the long arm of Y chromosome were used.

In azoospermia group, 4(4/58) with 47,XXY karyotype were noted. One with 45,XY,der(14;15)(q10;q10) karyotype was found in oligozoospermia. Five patients of azoospermia with normal karyotype have diverse *AZF* region microdeletion. Cytogenetic investigation combining with multiplex PCR screening on *AZF* improves the detection rate on azoospermia and oligozoospermia contributed to an understanding of the genetic etiology.

Some infertile men can achieve pregnancy by assisted reproductive technology (ART). Therefore, cytogenetic investigation and *AZF* region

multiplex PCR screening can provide more information for genetic counselling.

序論 (Introduction)

逐漸走向已開發的台灣，由於社會結構的改變每個家庭的生育數目前已大幅下降，但在生育率下降的同時卻有一些夫妻為結婚多年無法生育所苦，在美國根據統計，約 10~15% 的家庭有不孕方面的困擾。

臨床上所謂的不孕是指在一年中有正常的性生活且未避孕的情況下無法懷孕。根據研究，不孕的原因中有 25 ~ 40% 為男性因素 (male factor) 所引起，有 40 ~ 55% 為女性因素 (female factor) 所引起，而由於夫妻雙方皆有問題的佔了近 10%，剩下有近 10% 為不明原因 (unexplained infertility) 造成的 [Hornstein et al., 1996]。男性不孕症可因其精子帶有異常基因或染色體，產生反覆性流產而造成，或因患有系統性疾病 (systemic disease) 如腎臟病 (renal disease)、糖尿病 (diabetes mellitus) 等原因；造成原因雖多但絕大部份是和精子的數目、型態及運動功能有關，其中由於精子生成 (spermatogenesis) 過程的停滯或障礙所導致的無精子症 (azoospermia) 及寡精子症 (oligozoospermia) 即分別佔男性不孕原因的 17% 及 38% [Baker et al., 1993]。

精子的形成及成熟是一複雜的過程，胚胎早期發育的障礙 [Sadler

1995]、解剖構造的異常、功能失調的內分泌、不良外在環境因子、藥品、毒物、染色體異常及遺傳疾病等都有可能造成精子生成的障礙[Sigma et al., 1998]。目前的研究資料顯示約 6% 的男性不孕患者有不同程度上的染色體異常，其中無精子症的患者染色體異常率最高約為 10 ~ 15% [Bourrouillou et al., 1992]，而寡精子症的患者染色體異常率則為 4 ~ 5%，相較於有正常精子數目的不孕男性則只有 1 % 有染色體異常[Matsuda et al., 1992]。由染色體異常率的高低及男性不孕患者精子數目的多寡，顯見染色體在精子生成過程中扮演相當重要的角色。

人類性染色體 — X 和 Y 染色體為性別分化所必需，個體如具有 Y 染色體將會發育成男性，因此推測 Y 染色體除了具有可使原生殖索(primitive sex cord)分化成男性性腺的基因外，亦可能存在有一些基因會影響精子生成。精子生成過程中 Y 染色體扮演重要角色的觀念最早為 Tiepolo 等學者於其研究所支持。1976 年 Tiepolo 於研究 1170 個男性不孕患者的染色體核型(karyotype)中，發現 6 個無精子症患者在 Y 染色體長臂遠端(distal Yq)於顯微鏡下可查覺到染色體斷裂缺失(microscopically detectable deletions)的現象，經仔細檢查這些個案父親的 Y 染色體卻是完整無斷裂缺失，顯示此種斷裂缺失是屬於 *de novo* 的方式，當時推測可能 Y 染色體有一些對精子生成相當

重要的基因，於 *de novo* 方式的斷裂缺失中遺失了，而導致無法產生精子，是故 Tiepolo 根據此研究提出 Y 染色體 q arm 上有精子生成基因(spermatogenesis gene)或稱 *Azoospermia Factor (AZF)*，如 Y 染色體因斷裂缺失、轉位等原因，將這些基因所在的區域遺失掉了將造成精子生成困難[Tiepolo et al., 1976]。

自 Tiepolo 後陸續有學者投入 *AZF* 的研究，並認為 *AZF* 應位於 Yq11 的位置。其後因分子生物技術的開發，有學者進一步研究此區域顯微鏡下無法分辨的缺失(submicroscopic Yq deletion)，即所謂的微缺失(microdeletion)，以了解此區域和精子生成的關係。1995 年 Reijo 於 89 位無精子症病人中發現 12 位經由細胞染色體檢查沒有異常的患者，但在 Yq11 的遠端區(distal portion)卻有著不同程度的 microdeletion，當時 Reijo R.認為 *AZF* 是位於 Yq11 的遠端區[Reijo et al., 1995]。而 Vogt 等人(1996)則認為 *AZF* 包括整個 Yq11，並根據臨床嚴重程度的不同將 *AZF* 細分為位於 Yq11 近端區(proximal portion)的 *AZF_a*，Yq11 中段區(middle portion)的 *AZF_b*，及 Yq11 遠端區(distal portion)的 *AZF_c*。

本研究的目的是針對臨床上非阻塞性無精子症(non-obstructive azoospermia)及寡精子症病患，進行細胞染色體及分子生物學的基因分析。以瞭解其染色體異常的型式、異常率及 Y 染色體微缺失

(microdeletion)分佈的情形。

材料與方法 (Materials and Methods)

研究對象(Examined Subjects)

本研究對象之年齡層為 25 ~ 40 歲的成年男性，包括了 58 位罹患無精子症(azoospermia)及 32 位精蟲數目少於 20×10^6 /ml 臨床上屬於寡精子症(oligozoospermia)的男性不孕症患者，並以 51 位曾順利讓其妻子懷孕且已育有子女的同年齡層男性為對照組的成員。這些研究組的男性不孕症患者皆曾接受泌尿科或婦產科醫師檢查並排除輸精管阻塞及精索靜脈曲張(varicocele)等物理性因素所造成的無精子症或寡精子症。這些寡精子症及非阻塞性無精子症(non-obstructive azoospermia)患者則抽取周邊血液中的淋巴球供細胞培養以進一步作細胞染色體檢查之用並純化細胞核中的 DNA 以進行基因分析。

細胞染色體檢查(Cytogenetic Investigation)

淋巴球細胞的初級培養(Primary Culture of Lymphocyte)

符合本研究計畫之個案在欲採取周邊血液中的淋巴球供細胞培養前須先準備 10 ml 針筒抽取約 0.2 ml heparin 並留於針筒內，以防抽血時血液凝結。於無菌培養瓶中分別加入 0.15 ml phytohaemagglutinin(Life Ltd.) 及 10 ml RPMI-1640(Life Ltd.)培養

液，再將經靜置後紅血球、白血球已呈現分離的血液檢體，略加震搖針筒使白血球與血清稍稍混合，取 0.5 ~ 0.6 ml 血清混合白血球打入培養瓶中，將培養瓶蓋緊，置於 37°C 5% CO₂ 之恆溫箱中培養 66~72 小時。

收取血液培養細胞(Harvest Culture Cell)

經過 66~72 小時培養的血液細胞先加入 0.1 ml Ethidium Bromide (5 µg/ml, Sigma)作用 60~90 分鐘後，再加 0.1 ml Colcemid (10µg/ml, Life Ltd.)作用 25~30 分鐘，再後將細胞混合液倒入離心管中以 1500 rpm 離心 10 分鐘。吸去離心管中上清液，只留 0.1~0.2 ml 與底部細胞輕輕混合均勻，加入 6 ml 0.075M (0.54%) KCl 低張液並與細胞均勻混合後靜置約 15 分鐘。再加入 3~5 滴固定液(methanol : glacial acetic acid = 3:1, E. Merck)，混合均勻後以 1500 rpm 速度離心 10 分鐘並小心吸去上清液，將餘液與細胞混勻之後再加 6 ml 固定液，與其細胞混合均勻靜置 30 分鐘後再以 1500 rpm 離心 10 分鐘並吸去上清液。重覆加入固定液→混合→靜置→離心→吸去上清液的步驟數次，最後以固定液調整細胞液濃度後，噴滴細胞於玻片上使其均勻分佈。

染色體染色(Wright's Stain)

玻片染色前須經烘片 aging 的過程，故將前述玻片置於 56~60°C hot plate (Corning)烘片 24~48 小時，或依空氣中相對溼度(RH)置 95°C 烘箱 25 ~ 45 分鐘(25 min for 50% RH, 40 min for 60%, 45 min for 75%) 後染色。

將 30 ml 緩衝溶液與 20 ml trypsin-EDTA (1×) 混合均勻，注入染色缸 I 中，將 50 ml 95%酒精注入染色缸 II 中，另準備一杯去離子水注入染色缸 III 中，再以 1 ml Wright's stock 加上 4 ml Gurr buffer (1:1000)配製成染劑。玻片冷卻後先於染 I 作用約 4 ~ 10 秒，並立刻過 II，III 號染色缸及將水瀝乾，之後將玻片平放在染色盤上，覆蓋 Wright's dye 染色約 60 ~ 120 秒最後用水沖去染劑，待乾即可觀察。

基因分析(Gene Analysis)

淋巴球細胞 DNA 的萃取 (DNA Extraction from Lymphocyte)

將 5 ml 的病患血液檢體加入等體積的 Solution I (10 mM Tris-Cl pH 7.6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂)，待充分混合均勻後再加入 120 μl Nonidet P-40 以將細胞膜溶解，並離心 2000 rpm 10 分鐘，將上清液移除。之後再加入 300 μl 的 Solution I 輕輕地將沉澱的 Pellet 打散，並轉移至 1.5 ml eppendorf tube 中，再加入 300 μl Solution II (10 mM

Tris-Cl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 1% SDS, 4 mM EDTA pH 8.0)混合均勻並放置於 65°C 水浴中 30 分鐘以充分作用，待細胞核膜溶解後加入等體積的 saturated phenol 並輕輕搖動 eppendorf tube 使之充分混合均勻進行萃取過程，待反應完成以 12krpm 離心 10 分鐘，吸取上層水層至新的 eppendorf tube 中，再加入等體積的 phenol/ chloroform 並輕輕搖動使其均勻，再以 12 krpm 離心 10 分鐘，待離心後吸取上層水層至另一新的 eppendorf tube 中，再加入兩倍體積的 chloroform 並混合均勻後以 12 krpm 離心 10 分鐘，吸取上層水層並加入 0.8 倍 isopropanol 以沉澱 DNA。待 DNA 沉澱物出現，移除多餘液體並分別以 70%及 98% alcohol 各清洗一次，陰乾後將 DNA 溶於 200 ~ 300 µl TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mMEDTA)中，並以光電比色儀(spectrophotometer; DU-640, Beckman)測定 DNA 的質與量，儲存備用。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR)

本研究用於聚合酶連鎖反應(PCR)所使用的引子(primer)【表一】之設計乃參考自 1992 年 Vollrath [Vollrath et al., 1992]及 1995 年 Reijo [Reijo et al., 1995]等學者之研究。這些引子的序列辨識位置(sequence-tagged sites; STS)涵蓋 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域

【附圖一】，並以 multiplex PCR 的方式組合這些引子，以達到快速檢查的目的。第一組 multiplex experiment mixture 【圖一】所含的引子包括有 sY 254、sY 105、sY 127、sY 160、sY 102、sY 122、sY 130、sY 116、sY 152、sY 221。第二組 multiplex experiment mixture 【圖二】則將引子改為 sY 85、sY 84、sY 82、sY 87、sY 169、sY 202。總反應體積為 40 μ l，其中含 1 \times Taq buffer、2.5 mM MgCl₂(Promega)、200 μ M dNTP、2 U Taq DNA polymerase、100 ng genomic DNA 及各組 primers，將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer Cetus. Inc.)中。其反應之熱週期循環(thermal cycle)為：DNA 的 denaturation 為 95°C 5 分鐘，然後 95°C 1 分鐘(denature)，以 58°C 為 Anneal temperature 1.5 分鐘，72°C 1.5 分鐘(extension)經 30 個熱週期循環(Thermal cycle)，最後週期為 72°C 10 分鐘，反應終了將產物收下作為電泳分析之用。

電泳分析 (Electrophoresis)

預先製備 3%的 agarose gel (Ultra pure; Life Ltd.)置於電泳槽中，加入約 250 ml 1 \times TBE buffer 為 running buffer 及 8 μ l 的 ethidium bromide (Sigma)，再將上述聚合酶連鎖反應(PCR)的產物 4 μ l 加上 1 μ l 的 10X DNA loading dye，均勻混合後加入 agarose gel 的插槽(well)

中，以固定 70V 電壓的條件下進行膠體電泳分析。

結果(Results)

細胞染色體檢查(Cytogenetic Investigation)

在本次研究對象於 58 位非阻塞性無精子症(non-obstructive azoospermia)患者中發現 4 位(4/58)有染色體異常現象均為 47,XXY【圖三】，並自 32 位寡精子症(oligozoospermia)患者中發現 1 位(1/32)有 Robertsonian translocation 染色體異常現象，核型圖是 45,XY,der(14;15)(q10;q10)【圖四】。總共 90 位男性不孕症患者中，發現 5 例的染色體異常，染色體異常率為 5.6% (5/90)。

應用聚合酶連鎖反應(PCR)進行基因分析

本研究乃利用 multiplex PCR 的方式來進行檢視 Y 染色體 q arm 之 euchromatin 區有否異常。如這些引子的序列辨識位置(Sequence-tagged sites; STS)有發生微缺失(microdeletion)；則經電泳分析後將看不到應有的 PCR 產物【圖五、六】，如此則可根據 STS 的相關位置找到 deletion 的區域【圖七】。

在本研究中無精子症及寡精子症之患者在 sY 84 的 locus 分別有 10 位(10/58)及 4 位(4/32)有微缺失(microdeletion)的現象，經比對於 51 位有正常生育能力之對照組後，發現對照組中 6 位(6/51)於此區域亦有缺失的現象【圖八】。於是再經由卡方檢定(χ^2 -test)【表二】，

計算出 $\chi^2_{df=2} = 1.37, p > 0.05$ 。此結果顯示 sY 84 所在的區域微缺失的情形於對照組、無精子患者和寡精子患者這三組中沒有差異。

部份男性不孕患者如以引子 sY 116 進行 PCR 反應，經由電泳分析觀察可見到其產物較同組的其他患者少約 20 base pairs 的情形【圖五】，在對照組的電泳分析圖中亦可見到此種大小不一的產物【圖二】。經過 DNA 核苷酸序列分析(DNA sequence analysis)後發現此 DNA 核苷酸序列中有一 Poly-T 的構造【圖九】，由於 Poly-T 中重複的數目不同造成此種 DNA 長度大小不一的現象。

故本研究在經涵蓋 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域的引子，經 multiplex PCR Screen 於總共 90 個男性不孕症患者中，偵測到 19 位(19/90)在 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域有大小不一的缺失，於男性不孕症患者全體發生率為 21.1 %。其中無精子症佔 15 人，發生率為 25.9 %；寡精子症佔 4 人，發生率為 12.5 %。但如考慮在對照組亦有缺失現象，且經統計學上顯示缺失情形在對照組、無精子症和寡精子症三組無差異的 sY 84 locus，則只有五位男性不孕症患者在 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域有微缺失(microdeletion)的現象；這五位全為無精子症患者，故有 8.6 % (5/58)的無精子症患者在 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區域有微缺失(microdeletion)的現象；寡精子症患者在本研究中並沒有發現有微缺失(microdeletion)的

情形故發生率為 0 %。

五個發生微缺失的無精子症患者中，有 3 個患者的斷裂缺失區只發生在 Y 染色體 q arm euchromatin 的遠端區(distal portion)，1 位的斷裂缺失區出現在 euchromatin 的近端區(proximal portion)；另 1 位的斷裂缺失區則在接近端區且橫跨整個 euchromatin 的遠端及中段(middle portion)。上述這 5 位有著不同程度微缺失的無精子症患者，其細胞染色體的檢查皆無特別發現。

討論 (Discussion)

本實驗除了以細胞遺傳的方法，分別於罹患無精子症及寡精子的男性不孕症患者中，發現 4 位 47,XXY 及 1 位 Robertsonian translocation，另外以 PCR 分析 Y 染色體 euchromatin 區域，結果發現此區域有不同程度的微缺失。

目前資料均顯示染色體的異常和男性不孕症相當有關，異常的細胞染色體往往阻礙生殖細胞(Gamete cell)的正常發育，故男性不孕症的臨床症狀嚴重程度亦和細胞染色體異常的發生率呈相當的關連性。預後最不好的無精子症其染色體異常率就比預後較好的寡精子症患者高約 2 ~ 3 倍[Bourrouillou et al., 1992; Matsuda et al., 1992]。就整體染色體發生異常的種類來看，牽涉到性染色體的機會大於體染色體的機會[Dutrillaux et al., 1982]。在本實驗中亦發現無精子症患者染色體異常率(4/58)高於寡精子症患者(1/32)的異常率幾乎 2 倍；且無精子症之染色體異常皆伴隨性染色體的異常。

本實驗中寡精子症患者中有 1 病患其異常的染色體核型為 45,XY,der(14;15)(q10;q10)，根據統計男性如有 Robertsonian translocation 得到寡精子症而發生不孕機會較一般人高出約 10 倍 [Chandley 1988; Guichaoua et al., 1990; De Braekeleer et al., 1991]。

1985 年 Tharapel 等學者亦指出在不孕的夫婦中有 Robertsonian

translocation 的機會較一般正常夫婦高 7 倍[Tharapel et al., 1985]。其原因據推測乃由於發生 Robertsonian translocation 的體染色體，於精子形成中進行減數分裂時產生 unpaired segments，而此 unpaired segments 和 X-Y bivalent 中的 X 染色體發生 association 的現象，而造成精子生成作用的停頓[Johannisson et al., 1987]。Johannisson 等學者於其研究中發現在 Rob(14;21)的 trivalent，有 90 %的機會和 X-Y complex 發生 association；據此推測 Rob(14;15) 的 trivalent 可能亦有很高的機會和 X-Y complex 發生 association。此作用亦可用來解釋為何其他體染色體發生轉位(translocation)後，個體產生精蟲數目降低甚至無精子的現象。

據估計有約 2~3 %的男性其 Y 染色體的長度明顯和一般人不同 [Court Brown 1967]，但這些男性的身體還是相當地健康亦擁有正常的身高、性徵發育及生育功能[Meisner et al., 1972]；這些特別短小的 Y 染色體都是來自親代的遺傳[Harvey et al., 1970; El-Alfi et al., 1970; Meisner et al., 1972]。正因如此，要以傳統細胞遺傳的技術來判斷 Y 染色體是否有缺失(deletion)有實際上的困難，故本實驗以分子生物學的方法，利用序列辨識位置(sequence-tagged site; STS)在 Y 染色體 q arm euchromatin 的引子以 multiplex-PCR 的方式進行是否有缺失(deletion)的快速篩檢。

在本實驗所使用的引子 sY 84 的 locus 位於 Y 染色體 interval 5C 的位置，屬於 Yq11 的近端區。在此區中存在有一些基因如 *DFFRY*、*DBY*、*UTY*、*TB4Y* 等，在 X 染色體亦可見到有相似同質基因 (homolog)；如此區有微缺失 (microdeletion) 會造成精子生成的困難 [Lahn et al., 1997]。在本實驗中我們發現在無精子症、寡精子症之男性不孕症患者，及有正常生育能力之對照組在 sY 84 的 locus 均發現有缺失的現象。經由卡方檢定 (χ^2 - test)，顯示 sY 84 locus 缺失的情形在對照組、無精子症組及寡精子症組這三組是沒有差異的。且經複檢 1 位在 sY 84 有缺失 (deletion) 的對照組成員的精液以確定並非寡精子症之患者 [其他成員檢體無法取得]，發現其精液為正常；在自然狀況下精子的正常功能和能否受孕有密不可分的關係，而在本實驗發現 sY 84 locus 和不孕及精子數目多寡沒有關聯性的現象看來，推論 sY 84 locus 可能並沒有參與精子形成及成熟的過程；至於是否為基因的多形性現象 (polymorphism) 可能須再做更大規模的人口調查，且 Y 染色體的功能並非只負責精子形成及成熟；故須進一步探討此 locus 製造產物為何？功能為何？才可加以判斷。

在本實驗中 sY 116 locus 經 PCR 反應後，在男性不孕症患者及有正常生育能力之對照組，於電泳分析後均可見到大小不一的產物。經過 DNA 核苷酸序列分析 (DNA sequence analysis) 後，發現此現象

為 DNA 核苷酸序列 poly-T 構造中 thymine 重複數目不同，此殆為一基因的多形性現象(polymorphism)。

故如扣除 sY 84，及具多形性現象(polymorphism)的 sY 116，本實驗於無精子症群中發現五位(5/58)，寡精子症群中發現 0 位(0/32)在 Y 染色體 q arm 的 euchromatin 區有微缺失(microdeletion)的現象，值得注意的是這些有微缺失的患者他們的染色體檢查皆為正常。在本研究中，藉由 PCR screening 的方法成功地發現這些染色體檢查為正常患者的微缺失。在本次實驗中藉由染色體方法且併用 multiplex PCR 的方法，在無精子症患者中發現 4 位異常染色體，5 位有微缺失，檢查陽性率為 15.5 % (9/58)，較如只用染色體檢查的方法只有 6.9 % (4/58)的檢出率提高甚多；是故以細胞遺傳方法加上 PCR screening 可有效提高對男性不孕症病因的診斷率。

由 PCR screening 所發現的 5 名無精子症患者其微缺失的範圍並不一樣大，但臨床的表現卻都是一樣，令人會產生許多的疑問。有四點問題是本實驗所須面對的盲點。

第一、引子使用種類的多寡可能會直接影響檢出率，PCR screening 如使用越多種類的引子，越可能找出更多的微缺失，定位出越精確的微缺失範圍，本實驗所使用的引子乃根據過去學者的研究，於發生頻率較高的區域或已

經證實較重要的區域來進行檢查[Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1996; Lahn et al., 1997]，對於未檢視的區域並無法排除其可能的異常。

第二、目前 *AZF* 區域其基因缺乏其蛋白質功能的分析 (functional assay)，目前僅有少數的研究以 transgenic mice 或 gene knock-out 的方式，證明 *AZF* 區域中某些特定位置 (critical region) 的重要性，須上述區域完整才有正常的精子生成作用 [Elliott et al., 1997; Ruggiu et al., 1997]，至於這些基因產物在精子生成作用過程中的詳細功能目前尚不很清楚。

第三、本實驗 PCR screening 僅能用於檢測是否有微缺失，並無法知曉這些基因是否發生點突變 (point mutation)，但事實上點突變往往造成基因功能的喪失。

第四、本實驗 PCR screening 所用的引子皆位於 Y 染色體 euchromatin 上，僅能用於找尋 Y 染色體上的 microdeletion。但精子生成過程中體染色體亦可能扮演重要角色，例如在人類 Y 染色體上所謂的 *DAZ* (Deleted in Azoospermia) 基因，於 3p24 的區域亦可找到一相似的基因 *DAZLA* (DAZ-like autosomal)，自演化的觀點 Y 染色

色體上的 *DAZ* 基因可能來自於體染色體上 *DAZLA* 基因轉移，再經放大修剪形成[Saxena R., et. al., 1996]。兩基因雖相似但本實驗 PCR screening 並無法得知 *DAZLA* 基因正常與否，是故一位無精子症患者可能 Y 染色體上的 *AZF* 區域完整，體染色體上卻有異常 *DAZLA* 基因，如此或可解釋 *AZF* 區域 genotype 和 phenotype 不盡相同的原因。

人類的 *AZF* 位於 Y 染色體的 nonrecombining portion (NRY) 中，此區域於減數分裂(meiosis)不同其他的染色體，NRY 缺乏重組(recombination)的能力。由上述的現象或可解釋由 *AZF* microdeletion 所導致的無精子症及寡精子症，幾乎全為來自 *de novo* 方式，和為何無精子症患者 *AZF* microdeletion 有高約 13.5 %發生率的原因[Reijo et al., 1995; Saxena et al., 1996]。

由 *AZF* microdeletion 所導致的男性不孕，除有寡精子症及無精子症的問題外，幾乎少有其他身體的疾病(somatic disease)發生，這些患者基本上相當的健康[Reijo et al., 1995]。其所造成的無精子症中有些患者睪丸中全為 Sertoli cell 沒有生殖細胞，有些患者為生殖細胞的 premeiotic arrest，部份患者則為生殖細胞的 postmeiotic maturation arrest [Saxena et al., 1996]，故有些屬於 postmeiotic

maturation arrest 的無精子症患者，可藉 testicular sperm extraction 的技術取得 spermatozoa，再經 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 的方式將 spermatozoa 打入卵子完成受精過程。目前根據研究顯示 *AZF* 功能和受精、著床及胚胎發育無甚有關連，故部份的 *AZF* microdeletion 無精子症患者仍可能有子代產生 [Mulhall et al., 1997]。

由本實驗可見到在無精子症及寡精子症的男性不孕症患者，如於接受細胞遺傳檢查外再接受 *AZF* microdeletion 的 PCR screening，將可提高由於染色體、基因之原因導致不孕的診斷率；由細胞遺傳方法的 6.9 % (4/58) 檢查陽性率提高為 15.5 % (9/58)，對欲接受人工協助生殖技術以達成擁有下一代的夢想的不孕症患者，提供更理想的治療方法及完整的遺傳諮詢。

參考文獻 (References)

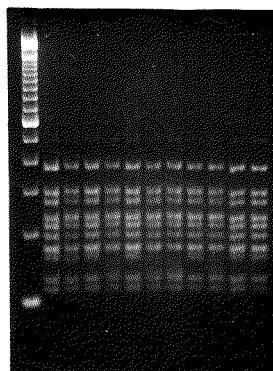
- Baker HMG, Ng FLH and Liu D: Preparation and analysis of semen for IVF/GIFT. In *Handbook of In Vitro Fertilization*. Victoria Australia: CRC Press, Inc., 1993 pp 33-56
- Bourrouillou G, Bujan L and Calvas P (1992) Role and contribution of karyotyping in male infertility. *Prog Urol* 2:189-195
- Cacheiro NLA, Russell LB and Swartout MS (1974) Translocations, the predominant cause of total sterility in sons of mice treated with mutagens. *Genetics* 76:73-91
- Chandley AC: Meiotic studies and fertility in human translocation carriers. In *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: A.R. Liss, 1988 pp 361-382
- Chandley AC, Christie S, Fletcher J, Frackiewicz A and Jacobs PA (1972) Translocation heterozygosity and associated subfertility in man. *Cytogenetics* 11:516-533
- Court Brown WM: *Human Population Genetics*. Amsterdam: North-Holland Publ, 1967
- De Braekeleer M and Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Human Reproduction* 6:245-250
- Dutrillaux B, Rotman J and Gueguen J: Chromosomal factors in the infertile male. In *Aspects of Male Infertility*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1982 pp 89-113
- El-Alfi OS (1970) A family with a large Y chromosome. *Journal of Medical Genetics* 7:37-40

- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PTK, Vogt PH, Chandley AC and Cooke H (1997) Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94:3848-3853
- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC and Luciani JM (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Human Genetics* 86:162-166
- Harvey PW, Muldal S and Wauchob D (1970) Antisocial behavior and a large Y chromosome. *Lancet* 1:887-889
- Hornstein MD and Schust D: Infertility. In *Novak's Gynecology*. 12th ed, Pennsylvania USA: Williams & Wilkins, 1996 pp 915-962
- Johannisson R, Lohrs U, Wolffn HH and Schwinger E (1987) Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in man. *Cytogenetics & Cell Genetics* 45:222-230
- Lahn BT and Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680
- Mastuda T, Horii Y and Ogura K (1992) Chromosomal survey of 1001 subfertile males: Incidence and clinical features of males with chromosomal anomalies. *Hinyokika Kiyo* 38:803-809
- Meisner Lf and Inhorn SL (1972) Normal male development with Y chromosome long arm deletion (Yq-). *Journal of Medical Genetics* 9:373-377

- Mishell DR, Stenchever MA, Droegemueller W and Herbst AL:
Infertility In *Comprehensive Gynecology*. 3rd ed, Missouri USA:
Mosby-Year Book, Inc., 1997 pp 1113-1158
- Mulhall JP, Reijo r, Alagappan R, Brown L, Page D, Carson R and Oates
RD (1997) Azoospermic men with deletion of the *DAZ* gene cluster
are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal
embryonic development and pregnancy occur when retrieved
testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection.
Human Reproduction 12:503-508
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen
S, Faffe T, Straus D, Hovatta O, Chappelle ADL, Silber S and Page DC
(1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y
chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein
gene. *Nature Genetics* 10:383-393
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P,
Dorin J and Cooke HJ (1997) The mouse *Dazla* gene encodes a
cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389:73-77
- Sadler TW: *Langman's Medical Embryology*. 7th ed. Maryland USA:
Williams & Wilkins, 1995 pp 272-311
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve
MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM and Page DC (1996)
The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an
autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned.
Nature Genetics 14:292-299
- Sigman M and Howards SS: Male infertility. In *Campbell's Urology*. 7th
ed. Pennsylvania USA: W.B. Saunders, 1998 pp 1287-1330

- Tharapel AT, Tharapel SA and Bannerman RM (1985) Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 92:899-914
- Tiepolo L and Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics* 34:119-124
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W and Haidl G (1996) Human Y chromosomal azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 5:933-943
- Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS and Page DC (1992) The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258:52-59

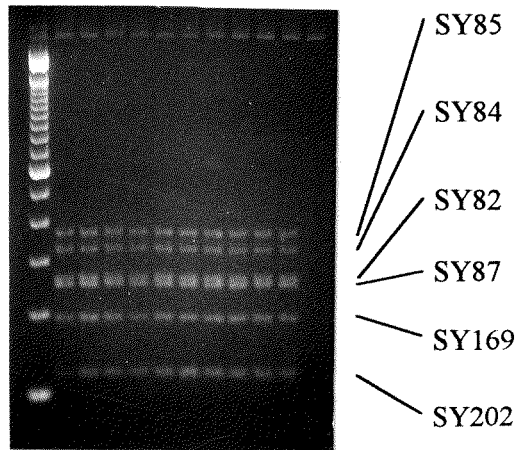
M1234567891011



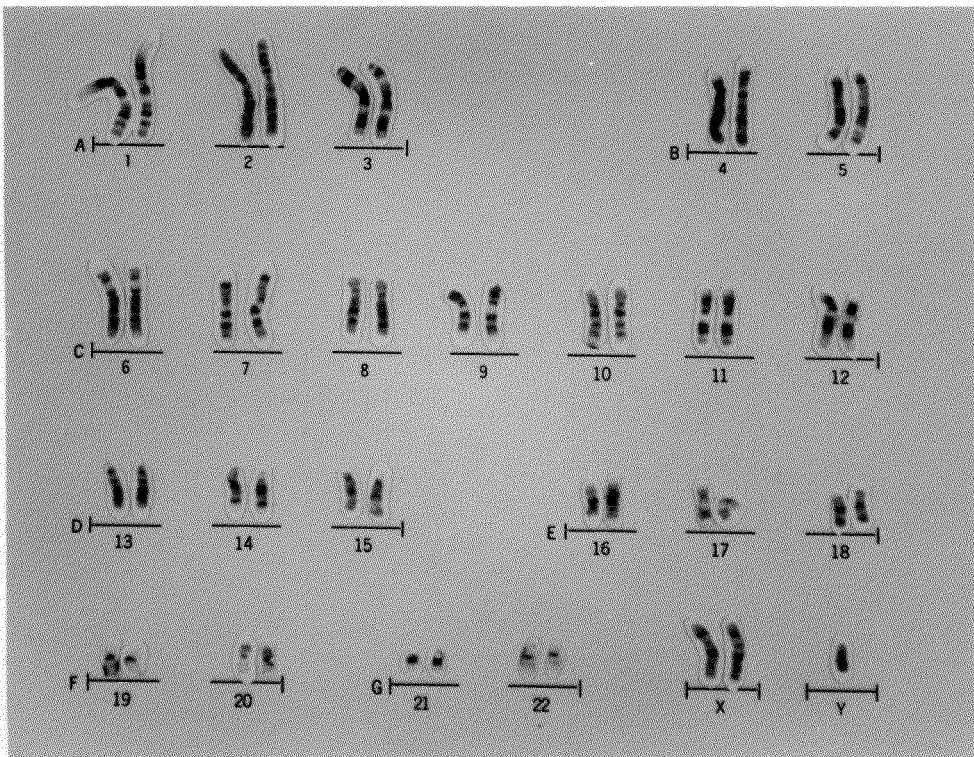
sY 254
sY 105
sY 127
sY 160
sY 102
sY 122
sY 130
sY 116
sY 152
sY 221

圖一、對照組以 10 組引子之 multiplex PCR 電泳分析圖，lane 1 ~ lane 11 分別為對照組成員 Con-1 ~ Con-11，M 為 100 bp marker，引子名稱標定於右。此圖中可見到 sY 116 locus 之 PCR 產物有大小不一的現象。

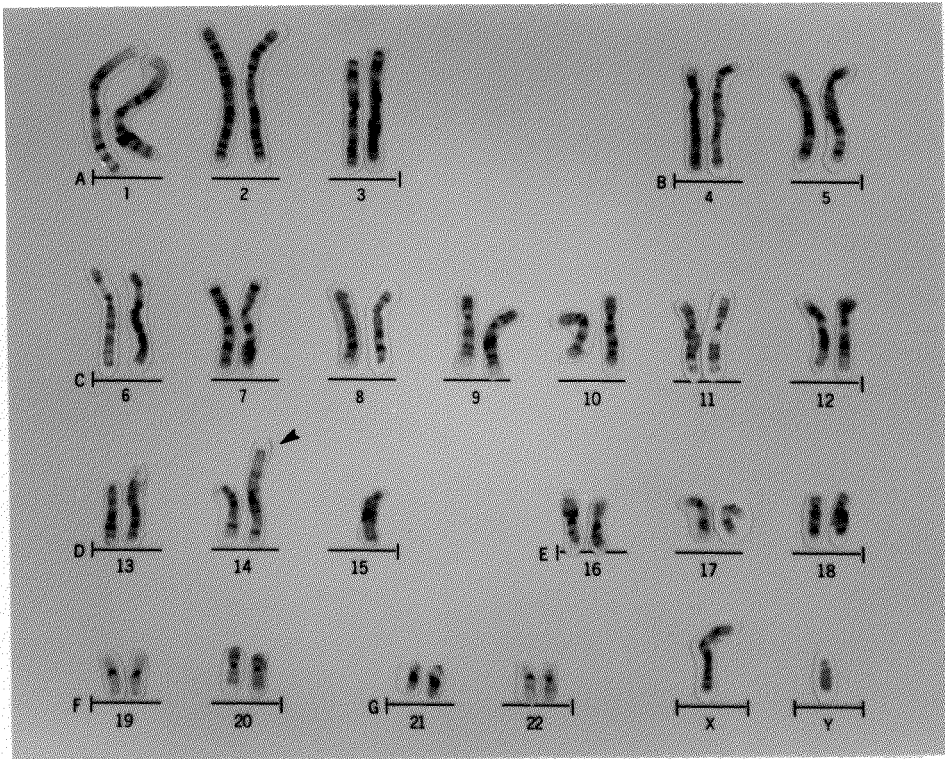
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 B



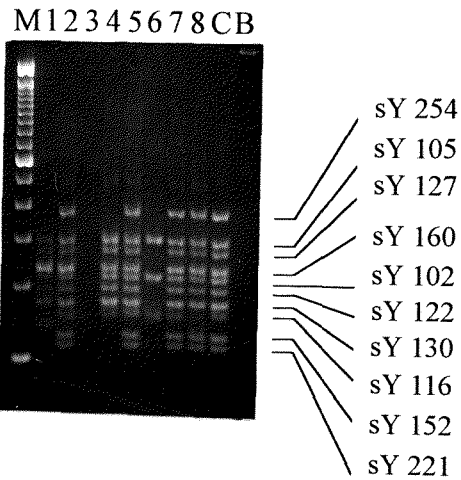
圖二、對照組以 6 組引子之 multiplex PCR 電泳分析圖，lane 1 ~ lane 10 分別為對照組成員 Con-1 ~ Con-10，M 為 100 bp marker，B 為空白試驗，引子名稱標定於右。



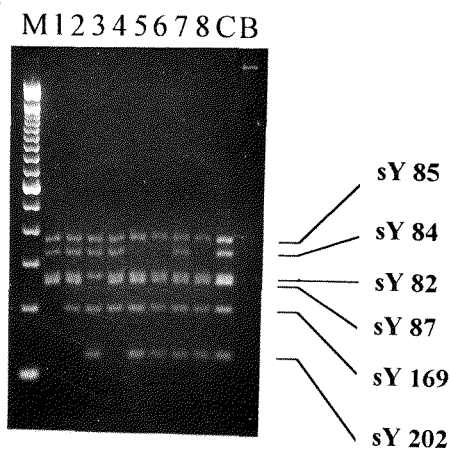
圖三、一無精子症患者(Azo-58)所具之異常染色體核型 47,XXY



圖四、一寡精子症患者(Oli-28)所具之異常染色體核型 45,XY,der(14;15)(q10;q10)

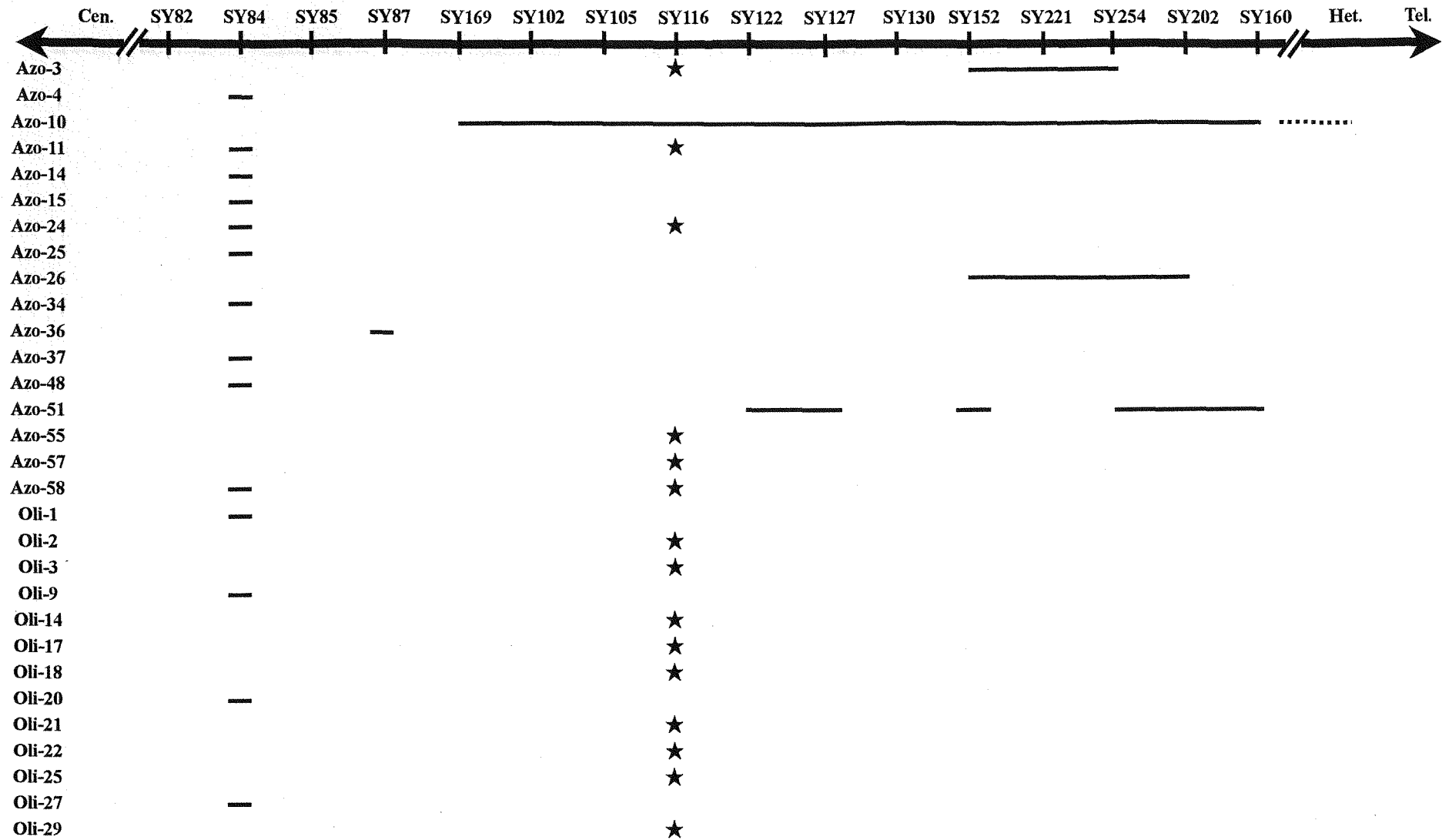


圖五、10 組引子之 multiplex PCR 電泳分析圖，M 為 100 bp marker，C 為對照組，B 為空白試驗，lane 1 ~ lane7 分別為無精子症患者 Azo-3、Azo-4、Azo-10、Azo-26、Azo-36、Azo-51 及 Azo-58，lane 8 為寡精子症患者 Oli-22，引子名稱標定於右。此圖中可見到 Azo-3 於 sY254、sY152、sY221 有缺失 (deletion) 現象，Azo-10 則 10 loci 皆缺失，Azo-26 於 sY254、sY152、sY221 有缺失，Azo-51 於 sY254、sY127、sY160、sY122、sY152 有缺失。於 sY 116 locus 之 PCR 產物有大小不一的現象。

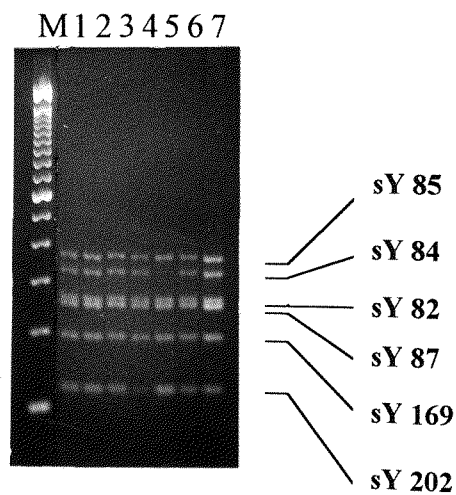


圖六、6 組引子之 multiplex PCR 電泳分析圖，M 為 100 bp marker，C 為對照組，B 為空白試驗，lane 1 ~ lane 5 分別為無精子症患者 Azo-10、Azo-26、Azo-36、Azo-51 及 Azo-58 號，lane 6 ~ lane 8 分別為寡精子症患者 Oli-20、Oli-22 及 Oli-27，引子名稱標定於右。此圖中可見到 Azo-10 於 sY169、sY202 有缺失(deletion)現象，Azo-26 及 Azo-51 於 sY202 缺失，Azo-36 於 sY87 有缺失，Azo-58、Oli-20 及 Oli-27 於 sY84 皆有缺失現象。

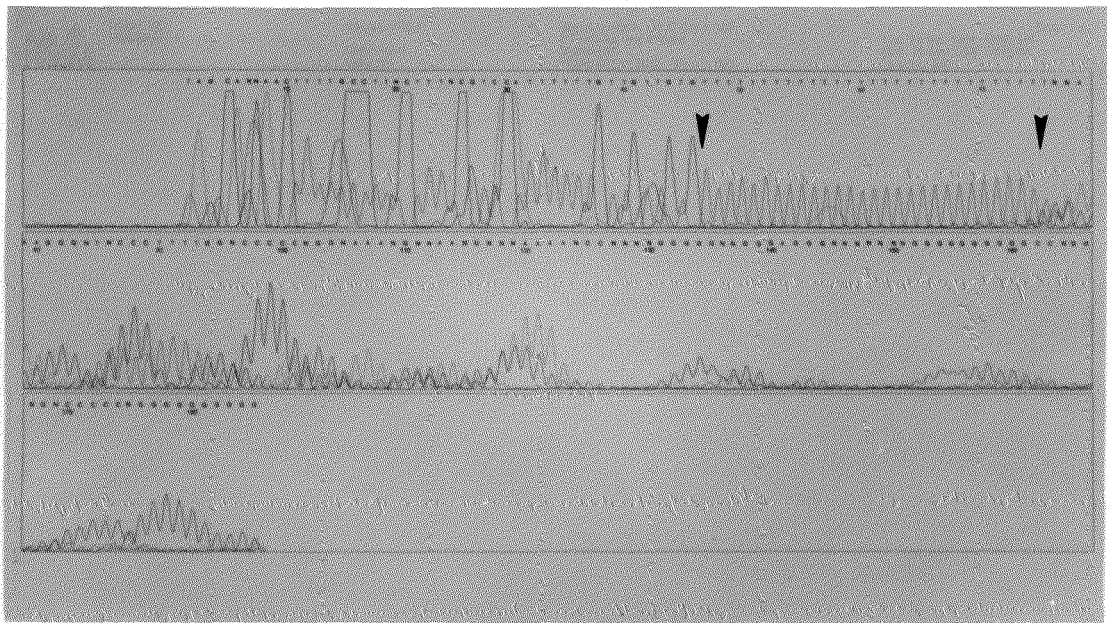
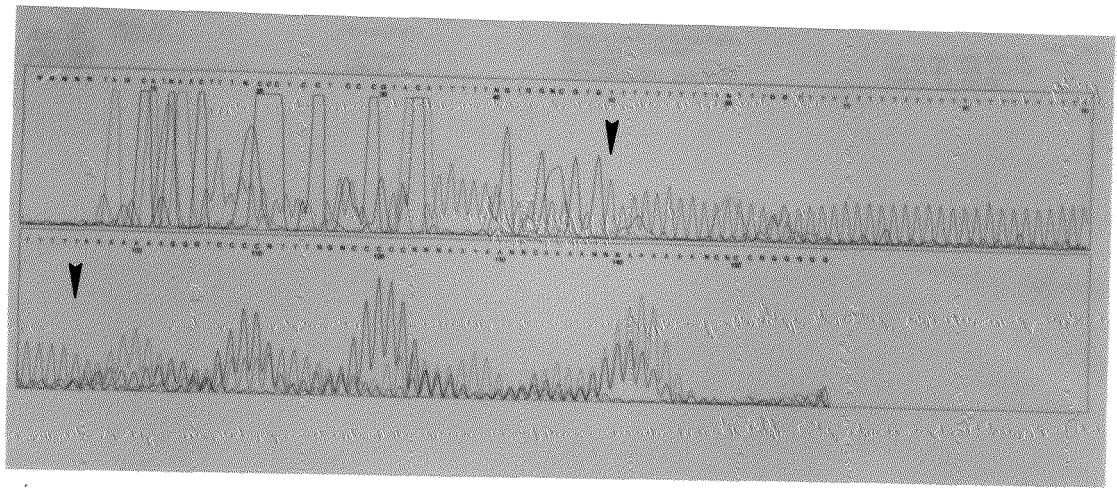
Deletion Mapping the AZF Region on Human Y Chromosome



★: polymorphism 圖七、無精子症患者(Azo)及寡精子症患者(Oli)於 Y 染色體 q arm 之 euchromatin 的微缺失圖



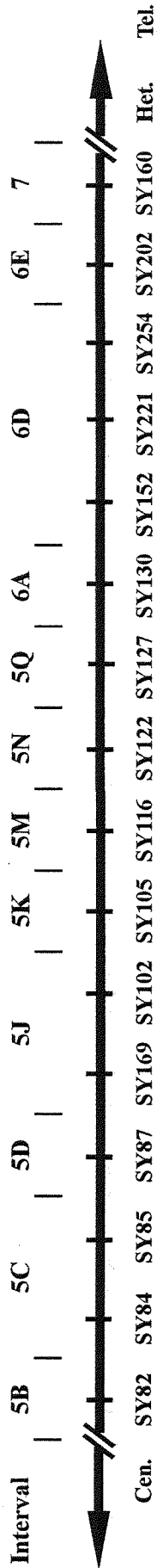
圖八、對照組以 6 組引子之 multiplex PCR 電泳分析圖，lane 1 ~ lane 6 分別為對照組成員 Con-46 ~ Con-51，lane 7 為對照組 Con-1，M 為 100 bp marker，引子名稱標定於右。由此圖可見到 Con-50 亦有 sY 84 locus 缺失的現象。



圖九、由 DNA 序列分析顯示此二序列的差別在 poly-T 數目的不同(箭頭所示)

附圖一

Primer/Probe on Human Yq11



表一、引子名稱及序列

STS	Left Primer	Right Primer	Product Size (BP)
sY82	ATCCTGCCCTTCTGAATCTC	CAGTGTCCACTGATGGATGA	264
sY84	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC	326
sY85	TGGCAATTTGCCCTATGAAGT	ACAGGCTATTTGACTGGCAG	369
sY87	TCTGTTGCTTGAAAAGAGGG	ACTGCAGGAAGAATCAGCTG	252
sY169	AGCCTGTAGACACATTAGCTCA	TTTATTTCTGAAGAAATTACAATGG	194
sY102	CACTACCACATTTCTGGTTGG	CGCTGAGTCCATTCTTTGAG	218
sY105	AAGGGCTTCTTCTCTTGCTT	AGGGAGCTTAAACTCACCGT	301
sY116	TGTGTCATTGCACTTTAGCC	CATTCCCCATGAAGTCAAAC	147
sY122	AGAATGAGTGCACCTGTAAACA	CACCCCTAATAATACAGCTTCC	201
sY127	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
sY130	AGAGAGTTTTCTAACAGGGCG	TGGGAATCACTTTTGCAACT	173
sY152	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA	ACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125
sY221	GTAAGCCCCAGATACCCTCC	AAATTGTTTGAAAAGGACACC	113
sY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	380
sY202	ACAGTTTGAAATGAAATTTTAAATGTGTT	TGACAAAGTGAGACCCTACTACTA	121
sY160	TACGGGTCTCGAATGGAATA	TCATTGCATTCTTTCCATT	236

表 二

		Group			Total
		Normal control	Azoospermia	Oligozoospermia	
sY 84	present	45	48	28	121
	absent	6	10	4	20
Total		51	48	32	141

$$\chi^2 = 1.37 < \chi^2_{95(2)} = 5.99 \quad P > 0.05$$

附錄一、儀器設備

儀器名稱	廠牌
Laminar Flow Hood	Bellco Glass Inc.
Bunsen Burner	CAS
CO2 Incubator	Nuaire
Microscope	Nikon
Stirring Hot Plate	Corning
Hot Plate	Corning
Water bath	HOTECH
4°C refrigerator	Tuntosec
-20°C refrigerator	Kelvinator
-70°C refrigerator	Revcov Scientific Inc.
PH meter	HANNA
Centrifuge	Hitachi
Analytical Balances	Mettler
Micro pipettes	Gilson
Microfuge	eppendorf
Microfuge with refrigerator	Hitachi
Spectrophotometer DU-640	Beckma
DNA Termal Cycler	Perkin-Elmer Cetus Inc.

附錄一、儀器設備

Power Supply	Pharmacia LKB Inc., Stratagene
Horizontal Gel Electrophoresis Tank	Life Ltd.
Vertical Gel Electrophoresis Tank	Life Ltd.
Mupid-2	Cosmo Bio Co.
Gel Casting Clamps	Life Ltd.
UV Box	Vilber Lourmat
Direct Screen Instant Camera	Polaroid
Electrophoresis Hood	Polaroid
Film-pack	Polaroid
Autoclave	Hirayama MFG

附錄二、試藥：

藥劑名稱	廠牌
RPMI medium 1640	Gibco BRL
PSN antibiotic mixture	Gibco BRL
L-glutamine	Gibco BRL
Phytohemagglutinin	Gibco BRL
Heparin sodium Inj.	B. Braun
Ethidium bromide	Sigma
Glacial acetic acid	E. Merck
Methanol	E. Merck
Buffer	Gurr
Wright's stain	Sigma
Potassium dihydrogen phosphate	E. Merk
Dipotassium hydrogen phosphate	E. Merk
Nonidet P-40	Sigma
Phenol	Amresco
Choloform	E. Merck
2-Propanol	E. Merck
Temed	E. Merk

附錄二、試藥：

Ammonium persulfate	Amersham
bis Acrylamide	BRL, Pharmacia Biotech
Acrylamide	BRL, Pharmacia Biotech
SeaKem agarose	FMC
Agarose(ultra pure)	BRL
Ethanol Absolute	E. Merck
MgCl ₂	Sigma
Sodium acetate	E. Merck
NaOH	E. Merk
NaCl	E. Merk
Tris	E. Merck, JLS
β-Mercaptoethanol	E. Merk
EDTA	E. Merk

附錄三、試劑及緩衝溶液製備

1. RPMI-1640: Add powder medium 1 pack (10.4 g/pkg; Life Ltd.) to 1 L double-distilled H₂O and gentle stirring under room temperature. Add 2.0 g of NaHCO₃ per liter of medium. Use 1 N NaOH or 1 N HCl to adjust pH of medium to desired final working pH (pH 7.0). Sterilize immediately by membrane filtration.
2. Wright's Stock: Add 0.3 g Wright's in 100 ml methanol. Stir overnight and filter with filter paper.
3. 10% ammonium persulfate: To 1 g of ammonium persulfate, add double-distilled H₂O to 10 ml.
4. 0.5 M EDTA (PH 8.0): Add 186.1 g of disodium ethylenediamine-tetraacetate-2H₂O to 800 ml of H₂O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (~20 g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.
5. Ethidium bromide (10mg/ml): Add 1 g of ethidium bromide to 100 ml of H₂O. Stir on a magnetic stirrer for several hours to ensure that the dye has dissolved.
6. 1 M Tris: Dissolve 121.1 g of Tris base in 800 ml of H₂O. Adjust the pH to the desired value by adding concentrated HCl (pH=7.4 HCl: 70 ml, pH=7.6 HCl: 60 ml, pH=8.0 HCl: 42 ml). Allow the solution to cool to room temperature before making final adjustment to the pH. Adjust the volume of the solution to 1 liter with H₂O. Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.
7. Solution I: Mix 10 ml 1 M Tris-Cl pH 7.6 with 10 ml 1M KCl and 10

- ml 1M MgCl₂·6H₂O. Adjust volume to 1 liter with double-distilled H₂O. Sterilize by autoclave
8. Solution II: Mix 0.25 ml 2 M Tris-Cl pH7.6 with 0.5 ml 1 M KCl, 0.5 ml 1 M MgCl₂, 10 ml 5M NaCl, 5 ml 10% SDS and 0.4 ml 0.5 M EDTA. Adjust volume to 50 ml with autoclaved double-distilled H₂O.
 9. 50X TAE: Dissolve 242 g of Tris base in 800 ml of H₂O. Add 57.1 ml of glacial acetic acid and 100 ml of 0.5 M EDTA. Adjust volume to 1 liter with double-distilled H₂O
 10. 10X TBE: Dissolve 108 g of Tris base and 55 g of boric acid in 800 ml of H₂O. Add 40 ml of 0.5 M EDTA. Adjust volume to 1 liter with double-distilled H₂O.
 11. 10X DNA loading dye: 50% glycerol, 12.5 mM Tris-Cl (pH 8.0), 60 mM EDTA (pH 8.0), 0.01% bromophenol blue, 0.01% xylene cyanol FF.
 12. Phenol/Chloroform: 15 ml phenol, 14.4 chloroform and isoamyl alcohol 600 µl. Adjust β-mercaptoethanol (β-MSH) to 0.2% of final concentration.