



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102608323 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201210082219. 1

(22) 申请日 2012. 03. 26

(71) 申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨陵区邠诚路 3
号

申请人 杨凌科元克隆股份有限公司

(72) 发明人 彭辉 张涌

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任
公司 61200

代理人 陆万寿

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,以分别在囊胚的内细胞团和滋养外胚层细胞中表达的 OCT4 和 CDX2 关键转录因子的表达作为分析哺乳动物囊胚的依据,根据其免疫染色结果来进行细胞水平、分子水平的分析,既涵盖传统的囊胚质量评定方法,又提出了准确性更高的谱系分化来进行评定:选择内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞比值合适、第一次谱系分化完全的囊胚作为质量好的囊胚。与传统的囊胚质量评定方法相比,本发明不但可以从细胞水平来评定囊胚的质量,还可以从分子水平准确的对囊胚的质量和以后的发育潜能进行评定,方法简单且准确率高,能够为胚胎移植提供技术支持。

1. 一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将哺乳动物囊胚置入含有一抗的免疫染色液中,于4℃孵育12~16h,然后进行清洗;所述的一抗包括抗OCT4和抗CDX2的单克隆或多克隆抗体;

2) 以染料标记的能够分别与一抗结合的抗体作为二抗,在避光条件下,将与一抗结合后的哺乳动物囊胚在含二抗的免疫染色液中,于室温避光孵育1h,然后进行清洗;

3) 将哺乳动物囊胚放在载玻片上,滴加抗荧光淬灭封片液后用盖玻片压好,荧光显微镜照相获得照片;

4) 根据照片进行囊胚质量的分析:

细胞水平:OCT4阳性的细胞为内细胞团细胞,CDX2阳性的细胞为滋养外胚层细胞,二者细胞数之和为囊胚的总细胞数,二者细胞数之比为内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数之间的比值;

分子水平:OCT4蛋白完全在内细胞团细胞中定位,则第一次谱系分化完全,囊胚发育正常,囊胚质量好;

OCT4蛋白在内细胞团细胞和滋养外胚层细胞中均有定位,则第一次谱系分化不完全,囊胚发育异常,囊胚的质量不高;

5) 选择内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数比值在0.3~0.45、第一次谱系分化完全的囊胚作为质量好的囊胚。

2. 如权利要求1所述的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,其特征在于,所述的染料为Alexa Fluor 488或Alexa Fluor 555。

3. 如权利要求1所述的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,其特征在于,所述的含一抗的免疫染色液是用免疫染色一抗稀释液分别将抗OCT4的鼠单克隆抗体和抗CDX2的兔多克隆抗体稀释50~200倍;

所述的含二抗的免疫染色液是用免疫荧光二抗稀释液将Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG和以Alexa Fluor 555标记的山羊抗兔IgG避光稀释500~1000倍。

4. 如权利要求1所述的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,其特征在于,所述的步骤1)的清洗是将哺乳动物囊胚在PBS-PVP溶液中吹洗多次,每次3~5min。

5. 如权利要求1所述的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,其特征在于,所述的哺乳动物囊胚在与一抗进行免疫染色之前,还需进行以下预处理:

1) 将哺乳动物囊胚进行固定:把获得的哺乳动物囊胚置入4%多聚甲醛/PBS中室温固定1~4h或4℃过夜固定;

2) 将哺乳动物囊胚在PBS-PVP溶液中吹洗多次,每次3~5min;所述的PBS-PVP溶液为含有体积浓度为0.2%PVP的PBS溶液;

3) 将哺乳动物囊胚进行通透处理:将固定后的哺乳动物囊胚转移到含有体积浓度为0.2% Triton X-100的PBS溶液中孵育10~20min后清洗;

4) 将哺乳动物囊胚进行封闭处理:将哺乳动物囊胚转移到免疫染色封闭液中封闭,于室温封闭4h或4℃过夜封闭,完成预处理。

一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于胚胎质量评估技术领域,涉及一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法。

背景技术

[0002] 胚胎质量能够用来评价胚胎的生存能力,它关系到胚胎发育的潜力,而这种发育潜力直接关系着胚胎的着床以及能否形成正常的个体。因此,在体外受精技术和体细胞核移植技术中对于胚胎的质量进行准确评价以选择优良胚胎是确保胚胎移植效率的重要前提。

[0003] 胚胎质量的评定是多层次的。胚胎发育到囊胚的速度、囊胚的形态、囊胚的内细胞团是否明显、囊胚的总细胞数以及内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数的比值等都是评价囊胚质量的重要参考指标。

[0004] 目前对胚胎发育到囊胚的速度、囊胚的形态和囊胚的内细胞团是否明显的观察主要在普通光镜下进行。这些评价指标虽能部分反映囊胚的质量,但只能从囊胚的形态上去评定胚胎的质量,这些方法只停留在表面上,不能准确的评定囊胚的质量。形态学好的囊胚在分子水平上也可能是存在缺陷的,尤其是通过体细胞核移植而发育来的囊胚,这也是核移植囊胚的着床率和妊娠率低的一个原因。

[0005] 在实践中发现,囊胚的总细胞数可以作为评定囊胚质量的一个指标。通常使用Hoechst33342、DAPI或PI等细胞核染料来染核并计算囊胚的细胞总数。囊胚总细胞数的多少在一定程度上可以反映出囊胚的细胞活性,细胞活性高、代谢正常,则细胞分裂也就快。在着床率和妊娠率方面,总细胞数较多的囊胚都优于总细胞数少的囊胚。但在实践中也发现,总细胞数的多少也不能准确的评价囊胚的质量。随着研究的深入人们发现,只有囊胚的内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数的比值在一定的范围内,囊胚的后续发育潜力才大。因为囊胚着床以后,内细胞团细胞将发育成胎儿,而滋养外胚层细胞则主要发育为胎儿的胎盘,二者哪一个发育有异常都将导致胎儿死亡。于是就产生了用两种染料分别染内细胞团和滋养外胚层的细胞核,并计算二者之间的比值,进而评价囊胚的质量。常用的染料分别是Hoechst33342和PI。这种方法的运用能较好的评价囊胚的质量,但也存在很大的缺陷,这种方法只能确定二者的位置和细胞数,不能从分子水平上准确预测细胞的分化命运。

发明内容

[0006] 本发明解决的问题在于提供一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,能够对囊胚的质量进行准确的评定并能预测胚胎着床后的发育潜力,为胚胎移植提供技术支持。

[0007] 本发明是通过以下技术方案来实现:

[0008] 一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 将哺乳动物囊胚置入含有一抗的免疫染色液中,于4℃孵育12~16h,然后进行清洗;所述的一抗为抗OCT4和抗CDX2的单克隆或多克隆抗体;

[0010] 2) 以染料标记的能够分别与一抗结合的抗体作为二抗,在避光条件下,将与一抗结合后的哺乳动物囊胚在含二抗的免疫染色液中,于室温避光孵育1h,然后进行清洗;

[0011] 3) 将哺乳动物囊胚放在载玻片上,滴加抗荧光淬灭封片液后用盖玻片压好,荧光显微镜照相获得照片;

[0012] 4) 根据照片进行囊胚质量的分析:

[0013] 细胞水平:OCT4阳性的细胞为内细胞团细胞,CDX2阳性的细胞为滋养外胚层细胞,二者细胞数之和即为囊胚的总细胞数,二者细胞数之比为内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数之间的比值;

[0014] 分子水平:OCT4蛋白完全在内细胞团细胞中定位,则第一次谱系分化完全,囊胚发育正常,囊胚质量好;

[0015] OCT4蛋白在内细胞团细胞和滋养外胚层细胞中均有定位,则第一次谱系分化不完全,囊胚发育异常,囊胚的质量不高;

[0016] 5) 选择内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞比值在0.3~0.45、第一次谱系分化完全的囊胚作为质量好的囊胚。

[0017] 所述的染料为Alexa Fluor 488或Alexa Fluor 555。

[0018] 所述的含一抗的免疫染色液是用免疫染色一抗稀释液分别将抗OCT4的鼠单克隆抗体和抗CDX2的兔多克隆抗体稀释50~200倍;

[0019] 所述的含二抗的免疫染色液是用免疫荧光二抗稀释液将Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG和以Alexa Fluor 555标记的山羊抗兔IgG避光稀释500~1000倍。

[0020] 所述的步骤1)的清洗是将哺乳动物囊胚在PBS-PVP溶液中吹洗多次,每次3~5min。

[0021] 所述的哺乳动物囊胚在与一抗进行免疫染色之前,还需进行以下预处理:

[0022] 1) 将哺乳动物囊胚进行固定:把获得的哺乳动物囊胚置入4%多聚甲醛/PBS中室温固定1~4h或4℃过夜固定;

[0023] 2) 将哺乳动物囊胚在PBS-PVP溶液中吹洗多次,每次3~5min;所述的PBS-PVP溶液为含有体积浓度为0.2%PVP的PBS溶液;

[0024] 3) 将哺乳动物囊胚进行通透处理:将固定后的哺乳动物囊胚转移到含有体积浓度为0.2%Triton X-100的PBS溶液中孵育10~20min后清洗;

[0025] 4) 将哺乳动物囊胚进行封闭处理:将哺乳动物囊胚转移到免疫染色封闭液中封闭,于室温封闭4h或4℃过夜封闭,完成预处理。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0027] 本发明提供的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,将现有的细胞染色提高到分子染色水平,操作简单且准确率高;

[0028] 以分别在囊胚的内细胞团和滋养外胚层细胞中表达的OCT4和CDX2关键转录因子的表达作为分析哺乳动物囊胚的依据,根据其免疫染色结果来进行细胞水平、分子水平的分析,既涵盖传统的囊胚质量评定方法,又提出了准确性更高的谱系分化来进行评定;

[0029] OCT4和CDX2蛋白分别定位在内细胞团和滋养外胚层的细胞核中,OCT4阳性的细

胞数即是内细胞团的细胞数,CDX2 阳性的细胞数即是滋养外胚层的细胞数。OCT4 阳性的细胞数与 CDX2 阳性的细胞数之间的比值即是内细胞团和滋养外胚层的细胞数比值;OCT4 阳性的细胞数与 CDX2 阳性的细胞数相加之和即是整个囊胚的总细胞数;

[0030] OCT4 蛋白完全在内细胞团细胞中定位,则第一次谱系分化完全,囊胚发育正常,囊胚质量好;OCT4 蛋白在内细胞团细胞和滋养外胚层细胞中均有定位,则第一次谱系分化不完全,囊胚发育异常,囊胚的质量不高。

[0031] 与传统的囊胚质量评定方法相比,本发明不但可以从细胞水平来评定囊胚的质量,还可以从分子水平准确的对囊胚的质量和以后的发育潜能进行评定,方法简单且准确率高,能够为胚胎移植提供技术支持。

附图说明

[0032] 图 1 为不同染色结果的显微照片,其中:

[0033] 图 A-a 和 B-a 为基于 CDX2 蛋白的免疫染色显微照片,发红色荧光的细胞为滋养外胚层细胞;

[0034] 图 A-b 和 B-b 为基于 OCT4 蛋白的免疫染色显微照片,发绿色荧光的细胞为内细胞团细胞;

[0035] 图 A-c 和 B-c 分别为图 Aa 和图 Ab 以及 Ba 和 Bb 的重叠荧光照片。

具体实施方式

[0036] 本发明提供一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法,通过对分别在囊胚内细胞团和滋养外胚层特异表达的两种关键的标志蛋白(OCT4 和 CDX2)进行染色,根据这两种蛋白在囊胚中的表达情况,进而从分子水平上评定囊胚的质量。下面结合具体的染色过程和染色结果对本发明做进一步的详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0037] 一种哺乳动物囊胚质量的评定方法,包括以下步骤:

[0038] 由于需要对哺乳动物囊胚进行免疫染色,首先对囊胚进行以下预处理:

[0039] a、将哺乳动物囊胚进行固定:把获得的哺乳动物囊胚置入 4%多聚甲醛/PBS 中室温固定 1~4h 或 4℃过夜固定;

[0040] b、将哺乳动物囊胚在 PBS-PVP 溶液中吹洗多次,每次 3~5min;所述的 PBS-PVP 溶液为含有体积浓度为 0.2% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)的 PBS 溶液;

[0041] c、将哺乳动物囊胚进行通透处理:将固定后的哺乳动物囊胚转移到含有体积浓度为 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液中孵育 10~20min,之后清洗;

[0042] d、将哺乳动物囊胚进行封闭处理:将哺乳动物囊胚转移到免疫染色封闭液(P0102,碧云天,江苏,中国)中封闭,于室温封闭 4h 或 4℃过夜封闭;完成预处理。

[0043] 在预处理完成之后,对 OCT4 和 CDX2 蛋白进行免疫染色,具体操作包括以下步骤:

[0044] 1) 利用免疫染色方法,以抗 OCT4 鼠单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-5279,美国)和抗 CDX2 的兔多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-134468,美国)作为一抗,将其与分别在囊胚内细胞团表达的 OCT4 蛋白和滋养外胚层细胞表达的 CDX2 蛋白进行特异性结合:将哺乳动物囊胚置入含上述两种单抗(1:100 稀释)

的免疫染色一抗稀释液 (P0103, 碧云天) 中, 于 4℃ 孵育 12 ~ 16h, 然后用 PBS-PVP 溶液进行清洗 (吹洗 5 次, 每次 5min);

[0045] 以下操作从步骤 2) 开始全部避光;

[0046] 2) 利用免疫染色方法, 以 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠 (碧云天, A0428) 和以 Alexa Fluor 555 标记的羊抗兔 (碧云天, A0452) 能够分别与抗 OCT4 和抗 CDX2 的抗体结合的抗体作为二抗, 对清洗后的结合有一抗的哺乳动物囊胚进行免疫染色: 在避光条件下, 将哺乳动物囊胚在含上述两种二抗 (1 : 500 稀释) 的免疫染色二抗稀释液 (P0108, 碧云天) 中, 于室温避光孵育 1h, 然后用 PBS-PVP 溶液进行清洗 (吹洗 5 次, 每次 5min);

[0047] 3) 将哺乳动物囊胚放在载玻片上, 滴加抗荧光淬灭封片液后用盖玻片压好, 之后用荧光显微镜照相;

[0048] 4) 囊胚质量的判断:

[0049] 细胞水平: OCT4 阳性的细胞即为内细胞团细胞, CDX2 阳性的细胞即为滋养外胚层细胞, 二者细胞数之和即为囊胚的总细胞数, 二者细胞数之比即为内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞数之间的比值, 这些基本数据可以反映囊胚的质量;

[0050] 分子水平: OCT4 蛋白和 CDX2 蛋白在囊胚中的定位可以反映第一次谱系分化是否彻底, 第一次谱系分化完全彻底, 则囊胚的质量就高。

[0051] 为了更好的说明免疫染色的结果, 具体结合附图来进行说明:

[0052] 图 A-a 和 B-a 为完成步骤 1) ~ 3) 之后, 基于 CDX2 蛋白的免疫染色显微照片, 发红色荧光的细胞为滋养外胚层细胞;

[0053] 图 A-b 和 B-b 为完成步骤 1) ~ 3) 之后, 基于 OCT4 蛋白的免疫染色显微照片, 发绿色荧光的细胞为内细胞团细胞;

[0054] 图 A-c 和 B-c 分别为图 Aa 和图 Ab 以及 Ba 和 Bb 的重叠荧光照片。

[0055] 图 A-a 中的滋养外胚层细胞数较多, 有利于囊胚附植; 图 A-b 中的 OCT4 蛋白完全在内细胞团细胞中定位, 说明第一次谱系分化比较完全和彻底, 囊胚发育很正常, 预示着囊胚的质量很好。

[0056] 图 B-a 中的滋养外胚层细胞数较少, 不利于囊胚附植; 图 B-b 中的 OCT4 蛋白不仅在内细胞团细胞中定位, 还在滋养外胚层细胞中定位, 说明第一次谱系分化不完全, 囊胚发育有些异常, 预示着囊胚的质量不高。

[0057] OCT4 和 CDX2 蛋白是两个转录因子, 分别在囊胚的内细胞团和滋养外胚层细胞中表达, 并在细胞核中定位。因此, OCT4 和 CDX2 阳性的细胞数即为内细胞团和滋养外胚层的细胞数。胚胎发育到囊胚时, 滋养外胚层细胞数随着胚胎的发育显著增多, 为胚胎附植做好准备, 而内细胞团细胞数的增多却不显著, 二者之间的比值在一定程度上可以反映出囊胚的质量。研究表明内细胞团的细胞数和滋养外胚层的细胞数之间的比值在 0.3 ~ 0.45 之间时, 预示着囊胚的质量较好。此外, OCT4 和 CDX2 蛋白能够启动谱系特异性基因的表达, 进而促使细胞进一步向内细胞团和滋养外胚层分化。如果在早期胚胎发育过程中, 第一次谱系分化发生异常将直接导致囊胚着床障碍或着床后胚胎死亡。

[0058] 本发明提供的基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法, 将现有的细胞染色提高到分子染色水平, 不仅从分子水平评价囊胚的质量, 还能预测胚胎着床后的发育潜能, 为胚胎移植提供技术支持。

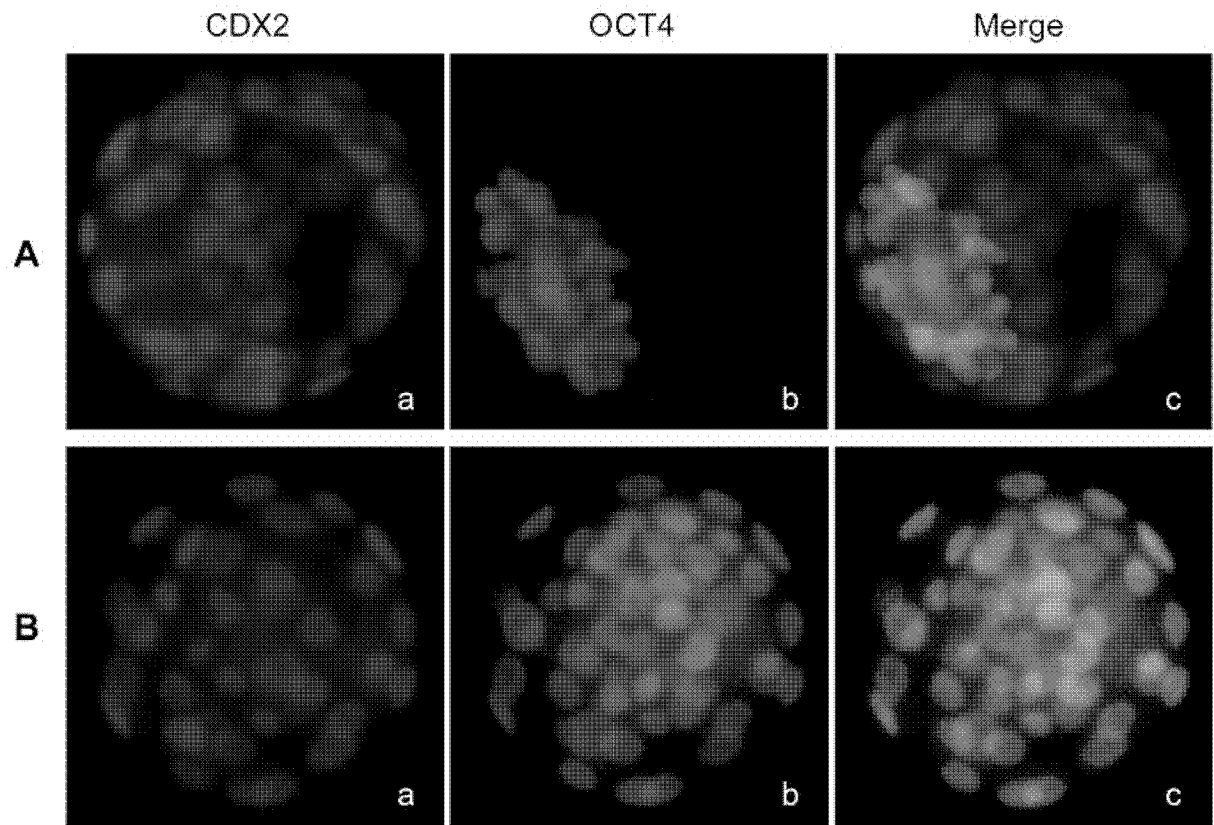


图 1

专利名称(译)	一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法		
公开(公告)号	CN102608323A	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201210082219.1	申请日	2012-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学 杨凌科元克隆股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学 杨凌科元克隆股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学 杨凌科元克隆股份有限公司		
[标]发明人	彭辉 张涌		
发明人	彭辉 张涌		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于哺乳动物囊胚的分子免疫检测的胚胎质量分析方法，以分别在囊胚的内细胞团和滋养外胚层细胞中表达的OCT4和CDX2关键转录因子的表达作为分析哺乳动物囊胚的依据，根据其免疫染色结果来进行细胞水平、分子水平的分析，既涵盖传统的囊胚质量评定方法，又提出了准确性更高的谱系分化来进行评定：选择内细胞团细胞数和滋养外胚层细胞比值合适、第一次谱系分化完全的囊胚作为质量好的囊胚。与传统的囊胚质量评定方法相比，本发明不但可以从细胞水平来评定囊胚的质量，还可以从分子水平准确的对囊胚的质量和以后的发育潜能进行评定，方法简单且准确率高，能够为胚胎移植提供技术支持。

