

## Real-time PCR 技术筛查男性不育患者的 Y 染色体微缺失

崔 瑾,程 伟,张阳丽,詹 茜,白慧丽,李 影,向海华,张玉洪

(重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心,重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨 real-time PCR 技术检测 Y 染色体微缺失的适用性,并研究男性不育患者中无精症和少精症 Y 染色体微缺失的发生率。**方法:**本研究收集 6 例 Y 染色体微缺失阳性样本,4 例女性样本和 4 例正常生育男性样本分别采用 real-time PCR 及多重 PCR 电泳法对 Y 染色体无精子因子(azoospermia factor, AZF) AZFa、AZFb、AZFc 区进行检测;再收集 452 例临床男性不育患者的外周血样本,采用 real-time PCR 检测 Y 染色体微缺失位点。**结果:**2 种方法对 14 例对比样本 6 个共有序列标签位点检测的结果一致;452 例男性不育症包括 96 例少弱精症、9 例重度少弱精症、69 例无精症、3 例畸精症和 275 例其他男性不育症,real-time PCR 法共检出 8 例 AZFc 区缺失、1 例 AZFb 区缺失和 2 例 AZFbc 共缺失,其中在少弱精症、重度少弱精症和无精症中 Y 染色体微缺失阳性率分别为 5.21%、11.1% 和 7.25%,而另外 2 组均未检测到微缺失。**结论:**real-time PCR 法检测 Y 染色体微缺失结果与经典的多重 PCR 电泳法结果相同,且该法的检测结果与临床诊断相符,因此 real-time PCR 适用于 Y 染色体微缺失的临床实验室筛查。

**【关键字】**男性不育;Y 染色体微缺失;实时荧光定量 PCR

**【中图分类号】**R698.2

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2014-11-26

## Y chromosome micro-deletions in male infertility screened by real-time PCR

Cui Jin, Cheng Wei, Zhang Yangli, Zhan Qian, Bai Huili, Li Ying, Xiang Haihua, Zhang Yuhong

(Center for Clinical Molecular Medical Detection, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objectives:** To investigate the applicability of real-time PCR in detecting Y chromosome micro-deletions and the incidence of Y chromosome micro-deletions in male infertility due to azoospermia and oligozoospermia. **Methods:** The specimens, respectively derived from 6 patients with Y chromosome micro-deletions, 4 female cases and 4 normal fertile men, were gathered and detected by real-time PCR and multiplex PCR-electrophoresis for Y chromosome azoospermia factor(AZF) AZFa, AZFb, AZFc. Then peripheral blood of 452 male infertile patients were collected, and sequence tagged sites(STSs) of micro-deletions in Y chromosome AZF were detected using real-time PCR. **Results:** The detection results from the two methods described above respectively, for six consensus STSs of 14 samples, were wholly consistent. In 452 patients with male infertility, including 96 patients with oligo-asthenospermia, 9 patients with severe oligozoospermia, 69 patients with azoospermia, 3 patients with teratospermia and 275 patients with other male infertility, eight AZFc region deletions, one AZFb region deletion and two AZFbc region deletions were all found by real time PCR. The positive rate of Y chromosome micro-deletions was respectively 5.21%, 11.1% and 7.25% in oligo-asthenospermia, severe oligozoospermia and azoospermia, while in other two groups no micro-deletion was detected. **Conclusion:** Real-time PCR, used to detect Y chromosome micro-deletions, has the same results with that of the classical multiplex PCR-electrophoresis, and the test results are consistent with the corresponding clinical diagnosis, therefore real-time PCR is suitable for clinical laboratory screening for Y chromosome micro-deletions.

**【Key words】**male infertility; Y chromosome micro-deletions; real-time PCR

目前,全世界共有不育症患者约 5 000~8 000 万人,已婚孕龄夫妇中不孕不育症的发病率约为 15%,其中男性不育约占 50%<sup>[1]</sup>。由遗传缺陷引起的精子发育障碍约占男性不育的 30% 以上,其中 Klinefelter

综合征与 Y 染色体微缺失是最主要的遗传缺陷因素<sup>[2]</sup>。1976 年 Tiepolo 和 Zuffardi 发现人类 Y 染色体长臂上的无精子因子(azoospermia factor, AZF),携带有精子发生所必需的遗传信息<sup>[3]</sup>。AZF 通常分为 AZFa、AZFb、AZFc 3 个不同亚区, AZFa 缺失通常导致唯支持细胞综合征(sertoli cell only syndrome, SCOS),临床表现为无精子症; AZFb 和 AZFbc 整段缺失的典型睾丸组织学特征是 SCOS 或生精阻滞;

作者介绍:崔 瑾, Email:363082852@qq.com,

研究方向:疾病的分子检测与诊断治疗。

通信作者:张玉洪, Email:873254472@qq.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150414.2232.004.html>

(2015-04-14)

AZF<sub>c</sub>缺失患者尚残存精子生成能力,见于无精子症或严重少精子症患者,且少精子症患者的精子数目有进行性下降的趋势;AZF<sub>abc</sub> 3 个区全部缺失的患者,100%表现为无精子症,任何伴有无精或严重少精诊断的患者均推荐进行 AZF 缺失的检测<sup>[4]</sup>。

2005 年我国在 2004 版欧洲男科协会/欧洲分子遗传学质量网的 Y 染色体微缺失分子诊断指南(简称欧洲指南)基础上制定了中国人 Y 染色体微缺失分子诊断指南(草案),推荐使用多重 PCR 方法特异性扩增 Y 染色体 AZF 3 个亚区的至少 6 个序列标签位点(sequence tagged site, STS),扩增产物用电泳等方法进行检测<sup>[5-6]</sup>。2013 版欧洲指南指出 real-time PCR 省时且无需琼脂糖电泳已成为备选方法,但该法在同时检测 Y 染色体 AZF<sub>abc</sub> 3 个亚区微缺失上国内还少有报道。因此本研究尝试采用在靶基因扩增时对特异性探针的杂交信号进行检测的 real-time PCR 法进行 Y 染色体微缺失分析<sup>[7]</sup>。

本研究首先分别采用 real-time PCR 及多重 PCR 电泳法检测 14 例样本,比对 Y 染色体微缺失结果,评估实 real-time PCR 在该检测中的适用性;再采用 real-time PCR 法对 452 例男性不育患者进行 Y 染色体微缺失的分析,探讨不育男性的 Y 染色体微缺失发生率及其与精子生成的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

14 例比对样本中,6 例 Y 染色体微缺失阳性样本为艾德威试剂厂家提供,4 例女性样本和 4 例正常生育男性样本均来自本院体检中心。452 例男性不育患者均来自本院 2013 年 11 月至 2014 年 11 月辅助生殖中心门诊和泌尿外科门诊,年龄 20~57 岁,平均 32 岁,患者均未患过严重的腮腺炎、睾丸炎或附睾炎,未服用对睾丸损伤的药物,没有毒物放射

线接触史,解脲支原体、沙眼衣原体检测呈阴性。按照 WHO (2010)《人类精液检验与处理实验室手册》进行精液分析。

### 1.2 仪器与试剂

Real-time PCR 仪为罗氏 Cobas Z480,检测试剂为厦门艾德生物医药有限公司生产基于 real-time PCR 方法的 Y 染色体微缺失检测试剂盒和深圳亚能生物技术有限公司生产基于多重 PCR 方法的 Y 染色体微缺失检测试剂盒。

### 1.3 检测方法

1.3.1 人外周血基因组 DNA 的提取 采用 QIAGEN 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit (51 104) 提取人外周血基因组 DNA,取 20 μl 蛋白酶 K、200 μl 全血和 200 μl AL 缓冲液到 1.5 ml 离心管底,涡旋混匀,56 °C 孵育 10 min,再加入 200 μl 无水乙醇,混匀后瞬时离心;将液体转移到 DNA 吸附柱中,8 000 r/min × 1 min,丢弃滤液;加入 500 μl AW1 缓冲液,8 000 r/min × 1 min;倒掉滤液,加入 500 μl AW2 缓冲液,14 000 r/min × 3 min;丢弃收集管,换用新的收集管,14 000 r/min × 1 min;将 DNA 吸附柱置于干净的 1.5 ml 的离心管中,加入 200 μl AE 缓冲液,室温放置 1 min,8 000 r/min × 1 min,收集产物,检测 DNA 浓度及纯度。

1.3.2 Real-time PCR 按每管 22.8 μl 和 0.2 μl 的比例将 Y-DEL 反应液和 Taq 酶混合,以 23 μl/管的量分装上述混合液到 PCR 反应管中,加入 2 μl 待检的 DNA 样品(DNA 浓度在 10~100 ng/μl 之间)、阴性对照(正常男性基因组 DNA)、阳性对照(AZF<sub>abc</sub> 缺失的人工构建质粒)和空白对照(灭菌水),离心后放入 PCR 仪,按以下程序进行扩增:①95 °C 3 min;②95 °C 15 s,61 °C 20 s,72 °C 20 s,10 个循环;③95 °C 15 s,61 °C 32 s,72 °C 20 s,30 个循环,第 3 阶段 61 °C 时收集 FAM、HEX、ROX 和 CY5 信号,执行 real-time PCR,保存文件,结果判读见表 1。

1.3.3 多重 PCR 电泳法 根据检测数量 Y=n 份待检样本数+1 份空白对照(灭菌水)+1 份阴性对照(正常男性基因组 DNA),取出 PCR 反应液管 I、II、III、IV 各 Y 管,室温融化后,瞬时离心,标记后各管先加 10 μl 灭菌水,再分别加 1 μl 待测 DNA 样本(DNA 浓度在 10~100 ng/μl 之间)到 I~IV PCR 管,瞬时离心后按以下程序进行扩增:①50 °C 10 min;②95 °C 15 min;③94 °C 30 s,58 °C 60 s,72 °C 60 s,35 个循

表 1 Real-time PCR 检测 Y 染色体微缺失结果判读表

Tab.1 Results of Y chromosome micro-deletions detected by real-time PCR

| 荧光通道<br>位点 | A反应管           |             |              |              | B反应管           |             |              |              | 结果判定                  |
|------------|----------------|-------------|--------------|--------------|----------------|-------------|--------------|--------------|-----------------------|
|            | FAM<br>Sry     | HEX<br>sY86 | ROX<br>sY127 | CY5<br>sY254 | FAM<br>ZFX/Y   | HEX<br>sY84 | ROX<br>sY134 | CY5<br>sY255 |                       |
| 检测<br>数据   | - <sup>a</sup> | -           | -            | -            | -              | -           | -            | -            | 空白对照                  |
|            | -              | -           | -            | -            | + <sup>b</sup> | -           | -            | -            | 女性                    |
|            | +              | +           | +            | +            | +              | +           | +            | +            | 阴性对照                  |
|            | +              | -           | -            | -            | +              | -           | -            | -            | 阳性对照                  |
|            | +              | +           | +            | +            | +              | +           | +            | +            | AZF <sub>a</sub> 缺失   |
|            | +              | +           | -            | +            | +              | +           | -            | +            | AZF <sub>b</sub> 缺失   |
|            | +              | +           | +            | -            | +              | +           | +            | -            | AZF <sub>c</sub> 缺失   |
|            | +              | +           | -            | -            | +              | +           | -            | -            | AZF <sub>b</sub> c缺失  |
|            | +              | -           | -            | -            | +              | -           | -            | -            | AZF <sub>abc</sub> 缺失 |

注:a,“-”代表相应的荧光通道无 S 形扩增曲线;b,“+”代表相应的荧光通道有 S 形扩增曲线

环;④72 ℃ 10 min。取 5 μl PCR 产物,直接加入 2.0%琼脂糖电泳上样槽(20 cm),先 160 V 电泳 3 min,后 110 V 电泳 30 min,把胶放入凝胶成像系统拍照,结果判读见表 2。

2 结 果

2.1 Y 染色体微缺失结果比对

Real-time PCR 检测 1~4 号样本:A 反应管扩增曲线见图 1,B 反应管扩增曲线同 A 反应管,提示 1 号和 2 号 AZFc 缺失,3 号 AZFb 缺失,4 号为正常男性;检测 5~9 号样本:结果显示 5 号 AZFa 缺失,6 号 AZFabc 全缺失,7 号 AZFbc 共缺失,8 号为正常男性,9 号为女性(图略);检测 10~14 号样本:结果显示 10~12 号为女性,13 和 14 号为正常男性(图略)。

多重 PCR 电泳法检测 1~4 号样本(图 2A):结果提示 1 号和 2 号 AZFc 缺失,3 号 AZFb 缺失,4 号为正常男性;检测 5~9 号样本(图 2B):结果提示 5 号 AZFa 缺失,6 号 AZFabc

缺失,7 号 AZFbc 缺失,8 号为正常男性,9 号为女性;检测 10~14 号样本(图略),结果如下:10~12 号样本同 9 号为女性,13、14 号同 4 号为正常男性。

比对试验结果详见表 3,2 种方法检测结果的一致性以 6 个共有的检测位点即 sY84、sY86、sY127、sY134、sY254、sY255 为准,14 例样本的结果一致率达到 100%。

2.2 452 例男性不育患者 Y 染色体微缺失的检测结果及与临床表现型的关系

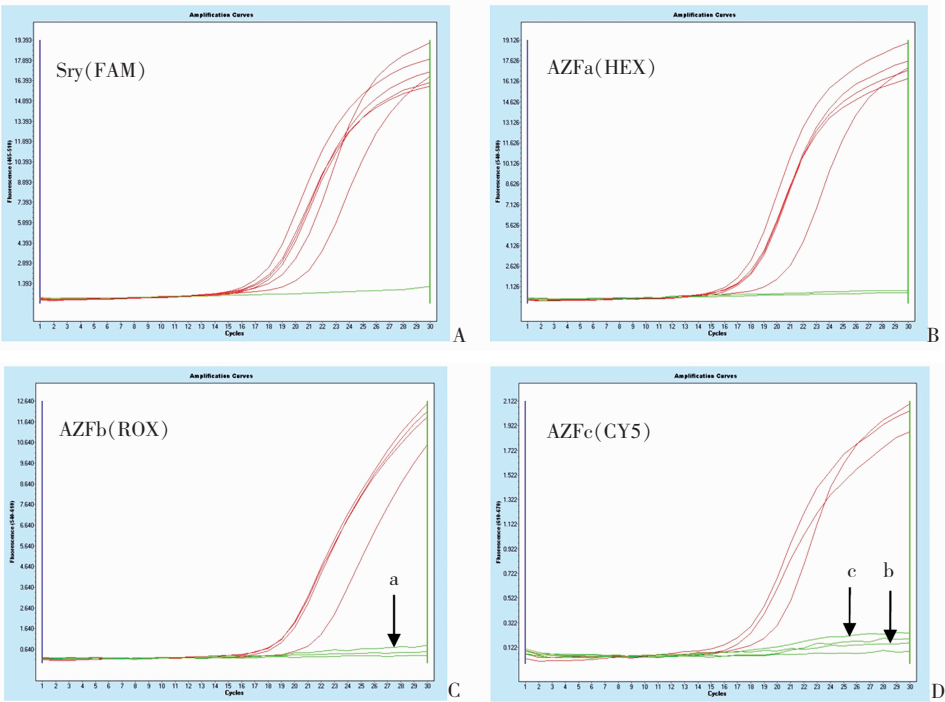
提取 452 例男性不育患者外周血的基因组 DNA,再采用 real-time PCR 检测是否存在 Y 染色体微缺失。根据 WHO 精液分析指导原则,452 例男性不育症包括 96 例少弱精症,9 例重度少弱精症,69 例无精症,3 例畸精症及 275 例未收集到精液信息者,其中少弱精症患者检测到 5 例 AZFc 缺失,缺失率为 5.21%;重度少弱精症患者检出 1 例 AZFc 缺失,缺失率为 11.1%;无精症患者检测到 2 例 AZFbc 共缺失,1 例 AZFb 缺失及 2 例 AZFc 缺失,缺失率为 7.25%;畸精症及其他不育患者组均未检测到缺失(表 4)。

表 2 多重 PCR-电泳检测 Y 染色体微缺失结果判读表

Tab.2 Results of Y chromosome micro-deletions detected by multiplex PCR- electrophoresis

| I     |        |                | II    |        |      | III   |        |      | IV    |        |      |
|-------|--------|----------------|-------|--------|------|-------|--------|------|-------|--------|------|
| 位点    | 产物     | 区域             | 位点    | 产物     | 区域   | 位点    | 产物     | 区域   | 位点    | 产物     | 区域   |
| SRY   | 472 bp | / <sup>a</sup> | SRY   | 472 bp | /    | SRY   | 472 bp | /    | SRY   | 472 bp | /    |
| sY254 | 400 bp | AZFc           | sY84  | 326 bp | AZFa | sY86  | 320 bp | AZFa | sY134 | 301 bp | AZFb |
| sY143 | 310 bp | AZFb           | sY239 | 200 bp | AZFc | sY127 | 274 bp | AZFb | sY82  | 264 bp | AZFa |
| sY242 | 233 bp | AZFc           | sY152 | 125 bp | AZFd | sY145 | 140 bp | AZFd | sY128 | 228 bp | AZFb |
| sY255 | 126 bp | AZFc           |       |        |      | sY124 | 109 bp | AZFb | sY133 | 177 bp | AZFb |

注:a,“/”指 Y 染色体微缺失 PCR 反应的内控基因



a,3 号样本的 ROX 荧光通道无 S 形扩增曲线;b,2 号样本的 CY5 荧光通道无 S 形扩增曲线;c,1 号样本的 CY5 荧光通道无 S 形扩增曲线

图 1 Real-time PCR A 反应管检测 1~4 号标本、阴性对照、阳性对照及空白对照

Fig.1 1~4 samples , negative , positive and blank control were detected in A reaction tube by real-time PCR

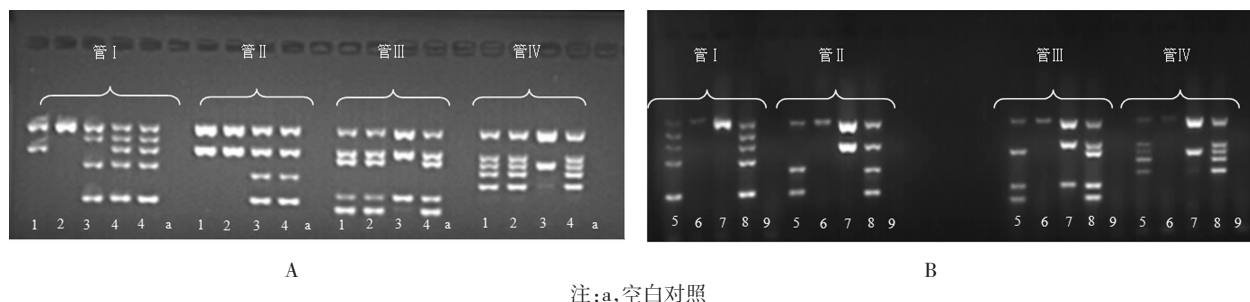


图2 多重 PCR 电泳法检测 1~9 号标本及空白对照

Fig.2 1~9 samples and blank control were detected by multiplex PCR- electrophoresis

表3 2种方法的检测结果比较

Tab.3 Comparison of the detection results by two different methods

| 样本<br>编号 | real-time PCR                            |      | 多重 PCR                                                                      |              |
|----------|------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|
|          | 缺失位点                                     | 缺失区域 | 缺失位点                                                                        | 缺失区域         |
| 1        | <u>sY254</u> , <u>sY255</u> <sup>a</sup> | AZFc | <u>sY254</u> , <u>sY242</u> , <u>sY255</u> , <u>sY239</u><br>sY152          | AZFc<br>AZFd |
| 2        | <u>sY254</u> , <u>sY255</u>              | AZFc | sY143<br><u>sY254</u> , <u>sY242</u> , <u>sY255</u> , <u>sY239</u><br>sY152 | AZFc<br>AZFd |
| 3        | <u>sY127</u> , <u>sY134</u>              | AZFb | sY143, <u>sY127</u> , sY124, <u>sY134</u> , sY128, sY133                    | AZFb         |
| 4        | 无                                        | 无    | 无                                                                           | 无            |
| 5        | <u>sY84</u> , <u>sY86</u>                | AZFa | <u>sY84</u> , <u>sY86</u>                                                   | AZFa         |
| 6        | <u>sY84</u> , <u>sY86</u>                | AZFa | <u>sY84</u> , <u>sY86</u> , <u>sY82</u>                                     | AZFa         |
|          | <u>sY127</u> , <u>sY134</u>              | AZFb | sY143, <u>sY127</u> , sY124, <u>sY134</u> , sY128, sY133                    | AZFb         |
|          | <u>sY254</u> , <u>sY255</u>              | AZFc | <u>sY254</u> , <u>sY242</u> , <u>sY255</u> , <u>sY239</u><br>sY152 和 sY145  | AZFc<br>AZFd |
| 7        | <u>sY127</u> , <u>sY134</u>              | AZFb | sY143, <u>sY127</u> , sY124, <u>sY134</u> , sY128, sY133                    | AZFb         |
|          | <u>sY254</u> , <u>sY255</u>              | AZFc | <u>sY254</u> , <u>sY242</u> , <u>sY255</u> , <u>sY239</u><br>sY152          | AZFc<br>AZFd |
| 8        | 无                                        | 无    | 无                                                                           | 无            |
| 9-12     | 6 个 STSs                                 | 全部缺失 | 15 个 STSs                                                                   | 全部缺失         |
| 13-14    | 无                                        | 无    | 无                                                                           | 无            |

注:a, “\_”标注的缺失位点为2种方法都检测的6个共有位点

表4 452例男性不育患者临床表现型与Y染色体微缺失类型的关系

Tab.4 Relationship of clinical phenotypes and different Y chromosome micro-deletions in 452 patients with male infertility

| 缺失类型  | 少弱精症(n=96) | 重度少弱精症(n=9) | 无精症(n=69) | 畸精症(n=3) | 其他(n=275) | 总计(n=452) |
|-------|------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| AZFa  | 0          | 0           | 0         | 0        | 0         | 0         |
| AZFb  | 0          | 0           | 1         | 0        | 0         | 1         |
| AZFc  | 5          | 1           | 2         | 0        | 0         | 8         |
| AZFbc | 0          | 0           | 2         | 0        | 0         | 2         |
| 总计    | 5          | 1           | 5         | 0        | 0         | 11        |
| 缺失率   | 5.21%      | 11.1%       | 7.25%     | 0        | 0         | 2.43%     |

### 3 讨论

Y染色体微缺失的类型对男性不育治疗手段的选择具有很重要的价值,目前常用的检测方法有多重PCR电泳法、real-time PCR法、基因芯片法和荧光原位杂交技术等<sup>[8]</sup>。多重PCR电泳法是我国Y染

色体微缺失分子诊断指南(草案)推荐使用的方法,可检测的STS较多,价格便宜,但该法在配制琼脂糖凝胶时需加入有毒的核酸染料,电泳时易发生实验室污染,自动化程度不高,导致该法在Y染色体微缺失大规模的筛查时具有局限性。real-time PCR技术操作简单,省时,已成为备选检测方法,闭管检测,有效地避免了PCR产物污染,结果判定直观迅

速,但该法仅检测 6 个 STSs,欧洲指南指出这 6 个 STSs 能够检测到几乎所有临床相关的缺失,并覆盖了超过文献报道中 3 个 AZF 区缺失的 95%,对于常规诊断是足够的<sup>[4-5,7]</sup>,强烈推荐所有的实验室使用上述 6 个 STSs,以方便实验室间结果的比对及实验室内质量的控制<sup>[9]</sup>。值得注意的是,实时荧光定量 PCR 技术使用的仪器一般包括 FAM(483~533 nm)、HEX(523~568 nm)、Red 610(558~610 nm)和 CY5(615~670 nm)等检测通道,可在同一反应管中检测多个靶序列,但荧光染料之间存在交叉发射波长,因此在开展具有多色荧光探针的检测项目之前,要对仪器进行各检测通道颜色补偿的验证及校正,以消除染料间干扰,使检测更准确。

本研究采用上述 2 种方法即 real-time PCR 和多重 PCR 电泳法比对了 14 例样本的 Y 染色体微缺失的检测结果,共有的 6 个检测位点一致率达到 100%。第 2 号样本 2 种方法的检测结果均显示 AZFb 区的 sY127 和 sY134 存在,但多重 PCR 电泳法还检测出 AZFb 区的 sY143 缺失,real-time PCR 法则未包含该位点,欧洲指南指出:sY127 和 sY134 2 个位点缺失反映 AZFb 区的全缺失,常常存在于 AZFb 区缺失的少精症及无精症男性样本中,与临床具有相关性;在此基础上进一步检测 sY143 和 sY153 位点可以确定是否为远端缺失<sup>[4-5]</sup>,而单独的 sY143 位点缺失临床意义尚不明确。研究中 1、2、6 号和 7 号样本采用多重 PCR 电泳法均检测到 AZFb 或(和)AZFc 缺失时常伴有 AZFd 的 1 个或 2 个 STS 缺失,但 Y 染色体的男性特异区序列及微缺失的机制已明确显示 AZFd 区是不存在的<sup>[9]</sup>,因此检测 AZFd 缺失可能无临床价值。Y 染色体微缺失在男性不育症中比例低,阳性样本较难收集,本研究选择 14 例(包含 6 例阳性)样本进行比对,比对结果具有一定的局限性,将在以后的工作中收集更多的阳性样本进行验证。

鉴于 real-time PCR 省时省力且检测结果与推荐方法结果一致性高,本研究随后采用该法筛查男性不育患者 Y 染色体微缺失,其中在 174 例无精症和少精症患者中检出 11 例 AZF 微缺失,缺失率为 6.32%(11/174)。朱晓斌等<sup>[9]</sup>在 1 052 例 Y 染色体微缺失检测及 14 例微缺失家系调查的研究中采用多重 PCR 检测发现在男性不育患者中 Y 染色体微缺失的缺失率达到 9.73%,张媛媛等<sup>[10]</sup>采用 QF-PCR 及毛细管电泳技术筛查男性非梗阻性无精症和少

精症的不育患者 Y 染色体微缺失时缺失率达到 8.62%。与以往数据相比,本研究 Y 染色体微缺失阳性检出率偏低,其主要原因可能是对研究群体中的非梗阻性无精症及少精症样本筛选不严格,其次可能是 Y 染色体微缺失存在地域差异。

Y 染色体微缺失的检测可以明确无精子症或少精子症的病因,为临床辅助生殖和遗传咨询提供指导依据<sup>[4,6,11]</sup>。本试验通过比对 2 种方法的检测结果及采用 real-time PCR 法对临床不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失进行检测,发现 real-time PCR 的检测方法与推荐方法的检测结果一致,与临床诊断相符且该法省时省力,因此 real-time PCR 适用于临床 Y 染色体微缺失的临床实验室筛查。

## 参 考 文 献

- [1] O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(1): 1-12.
- [2] Luddi A, Margollicci M, Gambera L, et al. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(9): 881-885.
- [3] Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the Y chromosome in man[J]. *Hum Genet*, 1976, 34: 119-124.
- [4] Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. state of the art 2013[J]. *Andrology*, 2013, 2(1): 5-19.
- [5] Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004[J]. *Int J Androl*, 2004, 27(4): 240-249.
- [6] 李 铮, 朱晓斌, 郭安亮, 等. 中国人 Y 染色体微缺失分子诊断指南(草案) [DB/OL] // 中国人 Y 染色体微缺失分子诊断研讨会, 上海, 2005 [2014-11-26]. <http://wenku.baidu.com/view/896eaa0203d8ce2f006623e2.html>.
- [7] Guo QW, Lan FH, Xu LP, et al. Quadruplex real-time polymerase chain reaction assay for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(4): 864-869.
- [8] 高 云, 陈嘉昌, 彭焕玉, 等. Y 染色体微缺失及其检测方法[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(5): 326-329.
- [9] 朱晓斌, 冯 云, 智二磊, 等. 1 052 例 Y 染色体微缺失检测及 14 例微缺失家系调查[J]. *中华男科学杂志*, 2014, 20(7): 637-640.
- [10] 张媛媛, 杜 强, 刘晓亮, 等. QF-PCR 筛查男性不育患者 Y 染色体无精子因子微缺失[J]. *遗传*, 2014, 36(6): 552-557.
- [11] Zhu XB, Liu YL, Zhang W, et al. Vertical transmission of the Yq AZFc microdeletion from father to son over two or three generations in infertile Han Chinese families[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2010, 12: 240-246.

(责任编辑:关蕴良)