

基于高通量测序的植入前遗传学检测技术在1例染色体平衡易位家系中的应用

何轶群 何天文 卢建*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心,广东 广州 511400)

【摘要】 目的 报道应用基于高通量测序的植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)技术对1例染色体平衡易位家系的胚胎染色体进行分析,探讨了染色体平衡易位夫妇的胚胎整倍体率和形成机制。方法 应用体外受精(in vitro fertilization, IVF)、囊胚培养和基于高通量测序的PGT技术对胚胎染色体进行分析,统计染色体平衡易位夫妇的胚胎整倍体率。结果 经卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术受精,获得囊胚15个,活检10个。依据Garnder囊胚分级法分级,1号胚胎为B/4ab,2~7号胚胎为B/4bb,8~9号胚胎为B/6bb,10号胚胎为B/5bc。高通量测序数据提示:6枚整倍体囊胚,4枚非整倍体囊胚。女方最终移植1枚B/4bb整倍体囊胚,足月顺产1男婴,体重3.41kg,发育正常。结论 基于高通量测序的PGT技术可准确筛查出染色体整倍体胚胎,有效避免因胚胎染色体异常而导致的流产和出生缺陷。

【关键词】 高通量测序;植入前遗传学检测;染色体整倍体

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Application of preimplantation genetic testing based on high-throughput sequencing in a family with chromosomal balanced translocation

He Yiqun, He Tianwen, Lu Jian*

Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400, Guangdong, China

* Corresponding author; Lu Jian, E-mail: 243561205@qq.com

【Abstract】 Objective To report the analysis of the embryo chromosomes of a family with chromosomal balanced translocation by preimplantation genetic testing (PGT) based on high throughput sequencing. The embryo euploidy rate and its mechanism in couples with balanced chromosome translocation was discussed. **Methods** In vitro fertilization (IVF), blastocyst cultured and PGT technology based on high-throughput sequencing were used to analyze the embryo chromosome, and the euploidy rate of the couples with balanced chromosome translocation was calculated. **Results** 15 blastocysts were formed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and 10 blastocysts were biopsied. According to Garnder blastocyst grading method, embryo no. 1 was B/4ab, embryo No. 2-7 was B/4bb, embryo No. 8-9 was B/6bb, and embryo No. 10 was B/5bc. The high-throughput sequencing data indicated that there were 6 euploid blastocysts and 4 aneuploid blastocysts. Finally, a euploid blastocyst of B/4bb was transplanted, and a baby boy was born naturally, weighing 3.41kg and developing normally. **Conclusions** PGT technology based on high-throughput sequencing can accurately screen chromosome euploidy embryos and effectively avoid abortion and birth defects caused by embryo chromosome abnormalities.

【Key words】 High-throughput sequencing; Preimplantation genetic diagnosis; Chromosome euploidy

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.009

* 通信作者:卢建, E-mail: 243561205@qq.com

染色体平衡易位是2条不同源的染色体各发生断裂后,互相变位重接而形成两条结构上重排的染色体。这种易位大多数都保留了原有基因总数,对基因作用和个人发育一般无严重影响,通常易位携带者表型正常。平衡易位人群携带频率约为0.2%,不孕夫妇约为0.6%,复发流产夫妇约为9.2%^[1]。植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing,PGT)是胚胎植入前检测胚胎染色体的整倍性和基因组染色体拷贝数的变异。基于高通量测序的PGT技术,以大规模并行序列为特征,一次性完成几十万到几百万条的DNA分子进行序列测序。通过囊胚活检获得5~8个滋养外胚层细胞,经全基因组扩增(whole genome amplification,WGA),高通量测序和生信分析,可筛选出染色体正常/平衡易位携带者的整倍体囊胚,减少流产发生和出生缺陷。本研究运用基于高通量测序的PGT技术对1例染色体平衡易位家系的胚胎染色体进行分析,并探讨了染色体平衡易位夫妇的胚胎整倍体率和形成机制。

1 对象与方法

1.1 对象 患者,女,29岁,G1P0A1,既往自然流产1次,不孕7⁺年,女方HPV 12型(+),双侧卵巢多囊改变,男方精液检查提示:弱精子症;女方染色体核型提示:46,XX(未见异常),男方染色体核型提示:46,XY,t(1;12)(p32;q24.3)。夫妇二人于2020年1月来广东省妇幼保健院进行体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer,IVF-ET)治疗。卵泡期长方案促排获卵20枚,卵泡浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)受精获得囊胚15个,活检10个。依据Garnder囊胚分级法分级,1号胚胎为B/4ab,2~7号胚胎为B/4bb,8~9号胚胎为B/6bb,10号胚胎为B/5bc。高通量测序结果提示:6枚整倍体囊胚,4枚非整倍体囊胚。移植1枚B/4bb整倍体囊胚,

移植12d后血清HCG 661.6IU/ml,移植28d超声提示:宫内单活胎。唐氏筛查提示:临界风险,21-三体风险值1:318。胎儿颈项透明层厚度(nuchal translucency,NT)提示:1.6mm。羊水染色体核型提示:46,XN(未见异常核型),羊水染色体微阵列提示:(-),羊水定量荧光聚合酶链反应(quantitative fluorescence polymerase chain reaction,QF-PCR)提示:(-)。胎儿足月后,顺产1男婴,体重3.41kg,发育正常。

1.2 方法

1.2.1 IVF和囊胚培养 在夫妻双方签署知情同意后,采用卵泡期长方案,月经第2d注射达菲林降调节,30d后注射果纳芬针促进卵泡生长,当3个以上卵泡直径 ≥ 18 mm时,肌注HCG,36h后取卵。通过ICSI受精,将受精胚胎培养5d或6d后,使用摩擦解剖法进行囊胚活检5~8个滋养外胚层细胞,放置聚合酶链式反应管中,-20℃储存,待WGA。

1.2.2 WGA和高通量测序分析 通过Sureplex扩增试剂盒对聚合酶链式反应管中滋养外胚层细胞进行WGA。构建文库,使用胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒进行测序。通过MiSeq平台进行胚胎文库的大规模高通量平行测序。测序数据采用平均值算法,对基因组染色体进行连续窗口划分,统计每个样本每个窗口内的DNA序列片段数目,使用PGXcloud进行数据分析。

2 结果

经测序数据分析,提示该夫妇共获6个整倍体囊胚,4个非整倍体囊胚,其中1号和9号胚胎染色体结果为46,XN,-(1)(p36.33-p32.3)(52.91Mb),+(12)(q24.32-q24.33)(5.68Mb),6号胚胎染色体结果为47,XN,+1,8号胚胎染色体结果为46,XN,-(5)(p15.33-p13.2)(37.97Mb),+(mosaic)(9)(32%),其他6个整倍体胚胎染色体结果为46,XN,共6个胚胎可供移植,详见表1和图1。

表1 10个囊胚染色体结果汇总表

胚胎序号	胚胎评级	染色体拷贝数检测结果(>10Mb)	是否可移植胚胎
1	B/4ab	46,XN,-(1)(p36.33-p32.3)(52.91Mb),+(12)(q24.32-q24.33)(5.68Mb)	否
2	B/4bb	46,XN	是
3	B/4bb	46,XN	是
4	B/4bb	46,XN	是
5	B/4bb	46,XN	是
6	B/4bb	47,XN,+1	否
7	B/4bb	46,XN	是
8	B/6bb	46,XN,-(5)(p15.33-p13.2)(37.97Mb),+(mosaic)(9)(32%)	否
9	B/6bb	46,XN,-(1)(p36.33-p32.3)(52.91Mb),+(12)(q24.32-q24.33)(5.68Mb)	否
10	B/5bc	46,XN	是

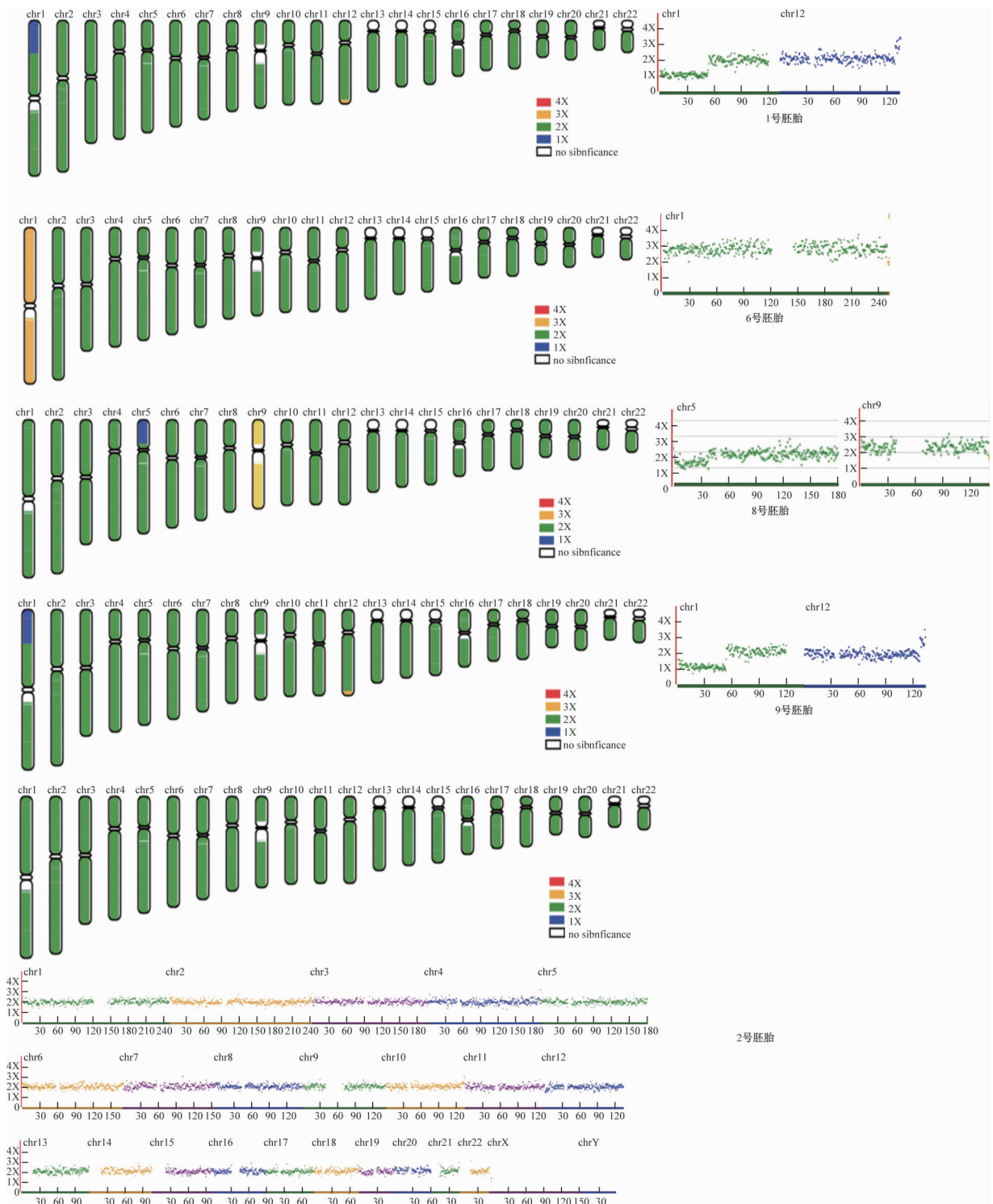


图1 高通量测序的基因组变异图谱

3 讨论

本例家系男方携带1号和12号染色体的平衡易位,女方染色体核型正常。理论上,染色体平衡易

位携带者,其表型一般正常,可形成18种配子,若其配偶染色体正常,子代中1/18为正常染色体核型,1/18为与受检者相同类型的平衡易位携带者,其余16/18的染色体核型为单体或部分单体、三体或部分

三体,易导致流产、死胎或畸形儿。然而,该夫妇行染色体结构重排的胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement, PGT-SR)助孕后,获得 10 个囊胚,其中 6 个为正常/平衡整倍体,且 1 号和 12 号易位染色体的完全正常或平衡易位携带整倍体率高达 70%(7/10),其易位染色体的整倍体率远远高于理论值 1/9。Ko 等^[2]收集 65 对易位夫妇的 1294 个 3 天卵裂球胚胎,进行减数分裂分离分析,通过 2:2 分离获得 729 个胚胎(56.3%),对位分离占 21.8%,邻位-1 分离占 23.4%,邻位-2 分离占 7.0%。Ogilvie 等^[3]收集 18 对易位夫妇的 149 个 3 天的胚胎,减数分裂分离分析发现,47.7% 为对位分离,24.8% 为邻位-1 分离,10.1% 为邻位-2 分离,15.4% 为 3:1 分离,2.0% 为 4:0 分离。Wang 等^[4]收集 89 对平衡易位夫妇,获得 378 个 5D 或 6D 囊胚,对活检囊胚的减数分裂分离方式进行分析,发现女性携带者对位分离发生率为 44.19%,男性携带者对位分离发生率为 45.15%。Zhang 等^[5]收集 356 例易位夫妇的 1842 个囊胚,其中对位分离模式最常见(749/1842, 40.7%),其次是邻位-1(508/1842, 27.6%)和邻位-2(201/1842, 10.9%)。由此可见,在囊胚中,平衡易位染色体,减数分裂分离方式以 2:2 的分离方式为主,其中以对位分离占主要,接近 40%~50%。这表明同源着丝粒在细胞中向相对极迁移的趋势是增强的。而这种对位分离的比例依然不能直接预测整倍体囊胚的比例。因为在配子形成的过程中,有一定比例的染色体会发生其他新发的染色体变异,而且由于染色体相互效应的影响,平衡易位携带者的囊胚新发异常率要大于染色体正常夫妇。Liu 等^[6]收集 75 对平衡易位夫妇的 252 个囊胚,平衡易位携带者整倍体胚胎率为 27.8%,男性携带者的正常/平衡整倍体胚胎率高于女性携带者(42.4% vs. 23.3%)。Lei 等^[7]收集了 532 对易位夫妇的 3030 个囊胚信息,其中 874(28.8%)为整倍体,男性携带者整倍体胚胎率为 30.68%;女性携带者整倍体胚胎率为 27.20%,男性携带者 D3 胚胎

率、囊胚形成率和囊胚整倍体率高于女性携带者。所以,平衡易位携带者实际产生正常或平衡易位的整倍体率,即可移植胚胎概率接近 30%,而且男性易位携带者实际产生可移植胚胎概率高于女性易位携带者。这可能与 ICSI 技术使用有关,因为优先选择了形态正常的精子,从而起到过滤作用。因此,在临床咨询中,我们不应该只是简单地告知咨询者平衡易位携带者整倍体配子的理论值,而应该在大数据的基础上,结合实验室的数据和经验,以及患者的自身情况,综合评估患者的生育风险。

参 考 文 献

- [1] 黄荷凤,徐晨明,金帆,等. 植入前遗传学诊断临床实践[M]. 上海:上海交通大学出版社,2018,79.
- [2] KO DS, CHOJW, PARKSY, et al. Clinical outcomes of preimplantation genetic diagnosis (PGD) and analysis of meiotic segregation modes in reciprocal translocation carriers[J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(6): 1428-1433.
- [3] OGILVIE CM, SCRIVENPN. Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos[J]. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10(12): 801-806.
- [4] WANG J, LI D, XU ZP, et al. Analysis of meiotic segregation modes in biopsied blastocysts from preimplantation genetic testing cycles of reciprocal translocations[J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12:11.
- [5] ZHANG S, LEI CX, WU JP, et al. Analysis of segregation patterns of quadrivalent structures and the effect on genome stability during meiosis in reciprocal translocation carriers[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(4): 757-767.
- [6] LIU HF, MAO B, XU XJ, et al. The effectiveness of next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for balanced translocation couples[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2020, 160(11-12): 625-633.
- [7] LEI CX, ZHANG S, ZHU SJ, et al. Conventional ICSI improves the euploid embryo rate in male reciprocal translocation carriers[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(1): 129-138.

(收稿日期:2021-08-13)

编辑:宋文颖