

## SNP 单体型分析在单基因病植入前遗传学检测中的应用

郝燕<sup>1,2,3</sup>, 李欣媛<sup>1,4,5</sup>, 陈大蔚<sup>1,4,5</sup>, 章志国<sup>1,4,5</sup>, 纪冬梅<sup>1,4,5</sup>, 周平<sup>1,4,5</sup>, 魏兆莲<sup>1,4,5</sup>, 曹云霞<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨基于二代测序的植入前单体型分析在单基因病植入前遗传学检测中的应用概况。方法 对发育至第5天或者第6天的囊胚行活检,对活检细胞进行全基因组扩增,将致病基因突变作为目标区域,在该基因突变上、下游选择数十至上百个单核苷酸多态性位点作为连锁遗传标记,通过二代测序技术所获胚胎行植入前单体型分析和染色体非整倍体筛查,胚胎结果经一代测序和妊娠中期羊水穿刺结果验证。结果 22例患者一共获卵421枚,成熟卵子355枚,受精305枚,卵裂301枚,共活检囊胚143枚,经植入前单体型分析和植入前遗传学筛查,40枚胚胎为可移植胚胎,移植周期数为17例,临床妊娠12例,活产9例婴儿(其中1例患者分娩2名婴儿,为单卵双胞胎),随访均健康,4例患者继续妊娠中,妊娠率为70.6%。所有单体型分析结果经过Sanger测序验证,均一致。结论 基于二代测序的植入前单体型分析方法是切实可行的,通过此技术的应用可以帮助具有高遗传风险的单基因病家庭获得健康子代,最终达到阻断遗传病发生的目的。

**关键词** 植入前遗传学检测;单基因病;二代测序;单体型分析;单核苷酸多态性

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1556-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.015

单基因病即单基因遗传病,是按照孟德尔方式

传递的疾病,由单个基因突变引起,涉及到单个核苷酸至整个基因改变,其发病率低,但种类繁多。目前已知的被发现的单基因病有7000余种,却只有约超过一半的致病基因被明确<sup>[1]</sup>。植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)是首先对胚胎或卵母细胞行活检,再通过遗传学方法进行基因或染色体检测,经筛选正常的胚胎移植入母方子宫,是一种辅助生殖技术与分子生物学和遗传学基础相结合的新的产前诊断技术手段<sup>[2]</sup>。主要分为3个子类,分别是非整倍体筛查(PGT-A)、单基因病检测(PGT-M)和染色体结构异常(PGT-SR)<sup>[3]</sup>。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)主要指基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性,约占人类DNA多态性的90%,是染色体源性分析常用标志物<sup>[4]</sup>。通过对胚胎的SNP位点检测结合家系SNP连锁分析,从理论上说可以解决单细胞扩增等位基因脱扣的问题<sup>[5]</sup>。该研究通过二代测序技术结合SNP单体型分析对17种单基因病进行PGT-M。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集2016年1月~2018年12月夫妻一方或者双方携带致病基因突变,均有先证者或完整家系者纳入本研究。本研究的开展已经获得安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准,纳入研究的夫妇均在助孕前签署PGD/PGT知情同意书。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 家系遗传学咨询** 针对夫妻双方生殖中心遗传门诊咨询结果进行PGT术前评估。从先证者着手,询问相关病史,分析家系基因报告,绘制家系图。采集家系外周血进行家系单体型预实验,遗传物质可以是外周血、羊水或组织DNA。

**1.2.2 基于二代测序的家系单体型预实验** 以基因突变为目标区域,在该突变上、下游选择数十到数百个SNP位点作为遗传标记。利用引物设计网站

2020-06-23 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2019A0287);  
2018年度安徽省中央引导地方科技发展专项(编号:  
2018080802D0081)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

<sup>2</sup>国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

<sup>3</sup>出生人口健康教育重点实验室,合肥 230032

<sup>4</sup>生殖健康与遗传安徽省重点实验室,合肥 230032

<sup>5</sup>安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心,合肥 230032

作者简介:郝燕,女,博士;

曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

设计引物。经 DNA 纯化、建库和高通量测序后,选择有效 SNP 位点进行连锁分析以构建家系单体型。

### 1.2.3 超促排卵、取卵、体外受精、囊胚培养和活检

通过家系单体型预实验后,采用本中心常规超促排卵方案(长方案)在女方进行控制性超促排卵。结合 B 超与性激素监测卵泡发育情况,酌情调整促排卵药物剂量,当至少有 2 个优势卵泡直径  $\geq 18$  mm 时,予以注射 HCG 10 000 IU 或者艾泽 0.25 mg 进行扳机诱发排卵。HCG 扳机后 34 ~ 36 h 后行 B 超引导下经阴道穿刺取卵术。

取卵后 2 ~ 4 h 对成熟 MII 期卵母细胞进行卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)以排除男方精子对 PGT 结果的干扰。第 2 日晨观察胚胎受精,第 3 日晨观察胚胎卵裂,再将正常受精和卵裂的胚胎转入囊胚培养液中继续培养,每个培养液滴内放置一个胚胎进行培养。取卵后第 5 日、第 6 日观察囊胚形成情况并详细对应编号记录,囊胚质量的分级参考最常用的 Gardner 评分标准<sup>[6]</sup>。

囊胚活检:取卵后第 5 ~ 6 天的发育到 4 期的囊胚,将内细胞团置于 9 点上下位置,活检 3 点位置滋养层细胞 3 点处透明带激光打孔(激光脉冲 400 微秒,强度 100%);待囊胚皱缩,将活检针(ID 20  $\mu\text{m}$ )吸住少量滋养层细胞(5 ~ 10 个细胞),卵子固定针和活检针慢慢向两边拉;对准被拉开的滋养层细胞之间的连接连续发射激光,同时继续轻轻将囊胚和活检的滋养层细胞向两边拉,直至滋养层细胞与囊胚分离。

1.2.4 活检细胞收集和多重置换扩增 吸 2  $\mu\text{l}$  PBS 至 0.2 ml PCR 管中,再将活检的细胞通过拉制的巴斯德管吸入 0.2 ml 的 PCR 管中,短暂离心。同时准备空白对照,即直接在 PCR 管中放入 2  $\mu\text{l}$  PBS。收集的细胞通过多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)方法——单细胞扩增试剂盒操作指南(REPLI-g Single Cell Kit)进行全基因组扩增,活检后囊胚通过玻璃化冷冻保存。

### 1.2.5 胚胎植入前单体型分析、植入前遗传学筛查

经 DNA 纯化、文库构建、测序行胚胎植入前单体型分析,对于单体型正常的胚胎,进一步行染色体拷贝数分析,主要包括文库构建、模板制备和富集、测序等几个步骤。对单体型分析结果同时行 Sanger 测序验证。

1.2.6 胚胎解冻和胚胎移植 待遗传学检测结果出来之后,选择正常胚胎解冻进行移植。

1.2.7 妊娠确定及随访 移植后 14 d 测血 HCG 阳性者继续应用黄体支持药物,待移植后 30 ~ 35 d B 超检查,若宫内见孕囊,并见胚芽及原始心管搏动者为临床妊娠,并继续黄体支持至移植后 65 d。若成功妊娠,妊娠中期行羊水穿刺,进行基因检测,同时了解胎儿发育情况。产后随访有无出生缺陷。

## 2 结果

2.1 患者基本资料以及胚胎发育情况 22 例患者平均年龄为(31.00  $\pm$  4.79)岁,包括常染色体显性遗传病 5 例,常染色体隐性遗传病 10 例,X-连锁隐性遗传病 7 例。22 例患者一共获卵子 421 枚,成熟卵子 355 枚,受精 305 枚,卵裂 301 枚,共活检囊胚 143 枚。

2.2 PGT 检测结果 共构建有效 SNP 位点数目为 2 668 个(表 1),其中有 20 例患者同时行单体型分析和染色体非整倍体筛查,54 枚胚胎单体型分析正常,但其中染色体拷贝数正常的胚胎数目仅为 32 枚,所占比例为 59.2%(表 2)。有 2 例患者要求仅行单体型分析,这 2 例患者获得可移植胚胎的数目为 8 枚。活检的 143 枚胚胎中未获诊断的胚胎数为 6 枚,获得可移植胚胎的数目为 40 枚,胚胎诊断率为 95.8%。所有单体型分析结果经过一代测序验证,均一致(表 3)。

2.3 胚胎移植临床妊娠结局 这 22 例患者中,有 3 例无可移植胚胎,有 2 例患者尚未移植,移植周期数为 17 例。移植的 17 例周期中,临床妊娠 12 例,共活产 9 例婴儿(其中 1 例患者分娩 2 名婴儿,为单卵双胞胎),随访均健康,4 例患者继续妊娠中,临床妊娠率为 70.6%。妊娠的 12 例患者经羊水穿刺验证,与 PGT 结果均一致。

## 3 讨论

单基因病种类繁多,致死及致残率高,至今尚无有效治疗方法。PGT 可以在胚胎种植前进行,可有效避免遗传病患儿的出生及引产带来的痛苦。

2017 年欧洲人类生殖与胚胎学学会(ESHRE)报道了 71 个中心共 11 637 个 PGT 取卵周期的数据:其中单基因遗传病占 3 445 个周期,所占比例约为 30%,呈逐年上升趋势<sup>[7]</sup>。单基因遗传病的 PGT 方

表 1 22 个家系致病基因、胚胎体外受精及卵裂情况( n )

病例号	致病基因	女方年龄(岁)	获卵数	成熟卵数	受精数	卵裂数	有效 SNP 位点
1	COL1A2	31	32	27	25	25	42
2	SLC26A4	30	14	11	10	10	60
3	PLA2G6	26	40	40	32	32	77
4	FGFR3	23	6	5	5	5	14
5	DMD	36	13	9	9	9	65
6	DMD	33	12	8	8	8	91
7	SMN1	39	12	9	5	5	50
8	PAH	27	6	5	4	4	111
9	ABCD1	32	10	7	5	5	126
10	KDM5C	42	10	7	4	4	35
11	COL1A2	26	31	29	24	24	37
12	EVC2	30	15	11	10	10	133
13	PLA2G6	28	47	30	29	29	100
14	MUT	34	19	18	15	15	103
15	DMD	34	16	15	12	12	160
16	MUT	31	22	19	17	16	102
17	SOD1	28	44	41	36	35	200
18	NHS_RB1	27	12	9	7	7	417
19	RET	31	10	10	9	9	201
20	BTK	36	11	9	9	9	33
21	SMN1	34	18	16	11	11	311
22	PKD1	24	21	20	19	19	200
合计			421	355	305	301	2 668

表 2 22 例患者胚胎单体型/染色体拷贝数正常比较( n )

病历号	是否行 PGS	单体型正常	单体型和染色体
		胚胎数目	拷贝数均正常胚胎
1	否		
2	否		
3	是	3	2
4	是	1	1
5	是	1	1
6	是	2	1
7	是	1	1
8	是	3	3
9	是	3	2
10	是	0	0
11	是	5	3
12	是	0	0
13	是	6	2
14	是	6	2
15	是	3	1
16	是	3	3
17	是	5	3
18	是	1	1
19	是	3	1
20	是	3	0
21	是	4	4
22	是	1	1
合计		54	32

法包括直接诊断和间接诊断。直接诊断即直接检测突变基因,间接诊断指利用基因内部或周围的多态性标记间接推断胚胎是否携带致病突变。这些多态性标记通常是一些短串联重复序列(short tandem repeats, STR)或 SNP 位点,这些位点常与目标突变位点紧密相连,被称为单体型,在遗传时可作为一个整体传递给子代,这种间接诊断的连锁分析方法又称为植入前遗传学单体型分析(preimplantation genetic haplotyping, PGH)。采用间接性的植入前遗传学单体型分析可使等位基因脱扣的影响最小化<sup>[8]</sup>。STR-PGH 一般选取 3~5 个相邻的 STR 位点,而 SNP 所能用于连锁分析的位点通常为 400~500 个,因此可提供更准确、更全面的信息<sup>[9]</sup>。

目前较常用的单基因病 PGT 方法常采用核型定位分析技术,即 Karyomapping 技术。该技术通过对先证者和家系成员 DNA 进行全基因组范围的 SNP 分型,根据 SNP 提供的信息确定每个胚胎染色体的亲本来源<sup>[10]</sup>。该方法主要优点在于无需对某种特定单基因病个体化设计有效 SNP 位点<sup>[10]</sup>,其主要缺点是无法直接对目标突变位点进行分析,也无法诊断新发突变,如果先证者 DNA 缺乏,将限制 Karyomapping 方法的应用<sup>[9]</sup>。近年来,二代测序技

表 3 22 例患者活检、PGT 结果和妊娠结局( n )

病例号	活检胚胎数	可移植胚胎数	重组胚胎数	Sanger 测序结果	未获诊断胚胎数	是否妊娠
1	10	6	1	一致	1	活产
2	7	2	1	一致	2	活产
3	15	2	0	一致	0	活产
4	4	1	0	一致	0	未孕
5	3	1	0	一致	0	未移植
6	4	1	0	一致	0	未孕
7	1	1	0	一致	0	未孕
8	3	3	0	一致	0	活产
9	4	2	0	一致	0	活产
10	2	0	0	一致	0	无可移植胚胎
11	12	3	0	一致	1	胚胎停育
12	4	0	1	一致	0	无可移植胚胎
13	11	2	0	一致	0	活产(双胎)
14	8	2	0	一致	1	继续妊娠
15	7	1	0	一致	0	未移植
16	8	3	0	一致	1	未孕
17	14	3	0	一致	0	继续妊娠
18	5	1	0	一致	0	活产
19	7	1	0	一致	0	继续妊娠
20	5	0	0	一致	0	无可移植胚胎
21	4	4	0	一致	0	继续妊娠
22	5	1	0	一致	0	活产
合计	143	40	3		6	

术(next generation sequencing, NGS) 又称高通量测序技术迅速发展,NGS 的测序成本大大降低。该方

法可以分析几乎所有类型的遗传变异<sup>[11]</sup>,同时可提供高通量的遗传分析信息。PGT-M中,基于NGS的PGH方法可实现胚胎基因型和单体型的同时分析。该方法在先证者缺乏的情况下仍可以进行诊断。Treff et al<sup>[12]</sup>首次将NGS方法应用于囊性纤维化、Walker-Warburg综合征和神经纤维瘤病的PGT中。本研究采用该方法也获得了较高的成功率。由于植入前胚胎较高比例非整倍体的存在,本研究对54枚单体型分析正常的胚胎行染色体拷贝数分析,正常的胚胎仅为32枚,所占比例为59.2%,说明了行非整倍体筛查的必要性。病例11中女方为成骨发育不全患者,女方母亲亦有类似症状。女方为COL1A基因杂合突变携带者,男方患有先天性白化病,为OCA2基因纯和突变,成骨发育不全在女方家系属于显性遗传模式,而白化病是隐性遗传模式,因此COL1A必须进行基因诊断,而女方并未携带白化病的致病基因突变,子代发生纯合或复合杂合的概率极低,因此不必进行OCA2基因的诊断。病例18夫妻双方均为先天性视力障碍,其中男方为家族性视力障碍,女方无家族史。男方基因检测提示NHS基因半合子突变,女方为RB1基因杂合突变,女方父母正常并且均不携带该突变。本研究采用植入前单体型分析的方法针对胚胎的NHS和RB1基因突变进行了排除,结合染色体拷贝数分析的结果,仅1枚单体型分析正常但染色体为嵌合体的囊胚适合移植,告知相关风险后,夫妻双方均同意移植该枚胚胎,最终获得成功妊娠并出生1名健康女婴。本病例中虽然女方无家族史,但她携带的RB1基因突变有可能通过常染色体显性遗传的方式遗传给子代,单体型分析无法通过女方父母和先证者女方构建连锁关系,所以采用先证者女方和她的胚胎构建SNP单体型,羊水穿刺的结果和单体型分型结果一致,获得健康婴儿。病例3为一罕见的神经系统疾病——婴儿神经轴索营养不良,该病例中女方首次移植1枚染色体和基因单体型均正常的胚胎未获得成功妊娠,在随后第2次解冻移植周期中,与患者沟通后,患者同意移植1枚染色体嵌合体、单体型分析正常的胚胎,最终获得健康婴儿。嵌合体胚胎指胚胎的组成细胞中存在两种甚至两种以上染色体组成不同的细胞系,是早期胚胎发育中常见的现象。相关研究<sup>[13]</sup>认同分裂后期迟滞和染色体不分离是嵌合体形成的主要机制。囊胚期的嵌合体比例要低于卵裂

期,在产前诊断中嵌合现象发生率仅为1%~2%<sup>[14]</sup>,说明随着孕周的逐渐增加,嵌合发生的概率也在逐渐下降。相关研究<sup>[14]</sup>表明约40%的嵌合体可以转归为正常胚胎,本研究病例18和病例3移植的染色体嵌合体胚胎获得成功妊娠,说明嵌合体胚胎有“自我纠正”的能力。

本研究均为单囊胚移植,妊娠的病例除1例(病例13)发生单卵双胎外,其余均为单胎。常规PGT治疗后要进行孕中期产前诊断,单囊胚移植可避免多胎妊娠造成的产前诊断困难并且在降低多胎妊娠率的同时仍能保持较高的临床妊娠率。本研究PGT患者均选择单囊胚解冻移植,其临床妊娠结局亦证实这点。

本研究结果说明基于NGS的植入前单体型分析方法是切实可行的,可同时进行活检胚胎的突变位点和单体型的检测,二者结果可以相互验证,从而提高结果的准确性。通过植入前遗传学单体型分析方法可帮助具有高遗传风险的家庭获得健康子代,是优生优育的重要手段。

#### 参考文献

- [1] Boycott K M, Vanstone M R, Bulman D E, et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(10): 681-91.
- [2] 徐晨明. 高通量检测技术在植入前胚胎遗传学诊断中的应用[J]. *国际生殖健康计划生育杂志* 2013, 32(6): 427-32.
- [3] Theobald R, SenGupta S, Harper J. The status of preimplantation genetic testing in the UK and USA[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(4): 986-98.
- [4] 王江,朱家红,刘东云,等. SNP单体型分析在单基因遗传病PGD中的应用[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(2): 101-4.
- [5] Zong C, Lu S, Chapman A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. *Science* 2012, 338(6114): 1622-6.
- [6] Gardner D K, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1155-8.
- [7] De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(10): 1974-94.
- [8] Borgulova I, Putzova M, Soldatova I, et al. Preimplantation genetic diagnosis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease by indirect linkage analysis[J]. *Med Clin(Barc)*, 2018, 150(6): 215-9.
- [9] Ren Y, Zhi X, Zhu X, et al. Clinical applications of MARSALA for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy

- [J]. *J Genet Genomics* 2016 ,43(9) : 541 –7.
- [10] Handyside A H ,Harton G L ,Mariani B , et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes [J]. *J Med Genet* ,2010 ,47(10) : 651 –8.
- [11] Liss J ,Chromik I ,Szczyglińska J , et al. Current methods for pre-implantation genetic diagnosis [J]. *Ginekol Pol* ,2016 ,87(7) : 522 –6.
- [12] Treff N R ,Fedick A ,Tao X , et al. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease [J]. *Fertil Steril* ,2013 ,99(5) : 1377 –84.
- [13] Taylor T H ,Gitlin S A ,Patrick J L , et al. The origin , mechanisms , incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans [J]. *Hum Reprod Update* ,2014 ,20(4) : 571 –81.
- [14] Ledbetter D H ,Zachary J M ,Simpson J L , et al. Cytogenetic results from the U. S. collaborative study on CVS [J]. *Prenat Diagn* ,1992 ,12(5) : 317 –45.
- [15] Sundhararaj U M ,Madne M V ,Biliangady R , et al. Single blastocyst transfer: the key to reduce multiple pregnancy rates without compromising the live birth rate [J]. *J Hum Reprod Sci* 2017 ,10(3) : 201 –7.

## Application of SNP haplotype analysis in preimplantation genetic testing of monogenic diseases

Hao Yan<sup>1 2 3</sup> ,Li Xinyuan<sup>1 4 5</sup> ,Chen Dawei<sup>1 4 5</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022; <sup>2</sup>NHC Key Laboratory of Study on Abnormal Gametes and Reproductive Tract Anhui Medical University , Hefei 230032; <sup>3</sup>Key Laboratory of Population Health Across Life Cycle Anhui Medical University Ministry of Education of the People's Republic of China ,Hefei 230032; <sup>4</sup>Anhui Province Key Laboratory of Reproductive Health and Genetics Hefei 230032; <sup>5</sup>Biopreservation and Artificial Organs , Anhui Provincial Engineering Research Center ,Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the application of preimplantation genetic haplotyping based on next generation sequencing in process of preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. **Methods** The whole genome of the biopsied trophoblast cells from blastocysts was amplified by multiple displacement amplification method. The pathogenic gene mutation was selected as the target region , and some SNPs were selected as the genetic markers in the upstream and downstream of the target mutation. Preimplantation genetic haplotyping and aneuploidy screening were carried out for embryos by next generation sequencing. The results were confirmed by Sanger sequencing. **Results** A total of 421 oocytes were obtained from 22 patients ,355 oocytes matured ,305 oocytes fertilized ,301 oocytes cleaved and 143 blastocysts were biopsied. After haplotype analysis ,40 embryos were transplantable , there were 17 transplantation cycles , which lead to 12 clinical pregnancies and 9 live births( 1 patient gave birth to 2 infants , which were monozygotic twins) . All the infants were followed up in good health. The pregnancy rate was 70.6% . All haplotype analysis results were confirmed by Sanger sequencing and the results were consistent. **Conclusion** The preimplantation genetic haplotyping method based on the next generation sequencing is feasible , which can help families with high genetic risk to obtain healthy offspring , so as to achieve the goal of eugenics. **Key words** preimplantation genetic testing; monogenic diseases; next generation sequencing; preimplantation genetic haplotyping; single nucleotide polymorphism