



CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN KHÁC NHAU TRONG XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TIỀN CÂY PHÔI

Sofiva Genomics

**Giám đốc phòng xét nghiệm/ Tổng
giám đốc**

Double Hong, Ph.D.



Nội dung

**Xét nghiệm di truyền
tiền cấy phôi
(PGT)**

Thụ tinh trong ống nghiệm(IVF)

Sàng lọc di truyền tiền cấy phôi (PGS)

Chẩn đoán di truyền tiền cấy phôi
(PGD)

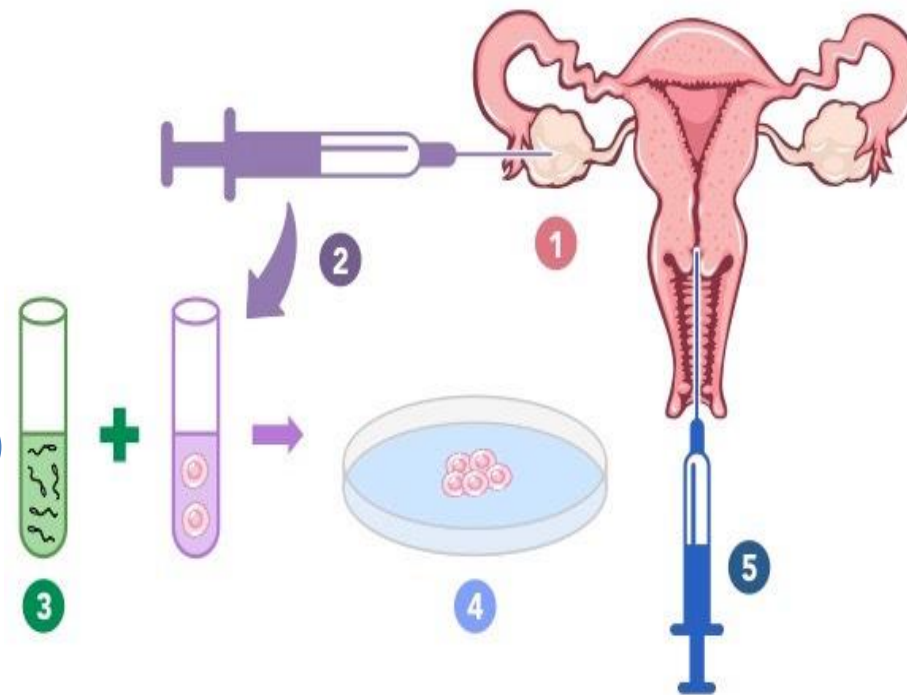
Phương pháp (PCR, FISH, CGH,
SNP, NGS)

Thảo luận

Quy trình thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)

Quy trình

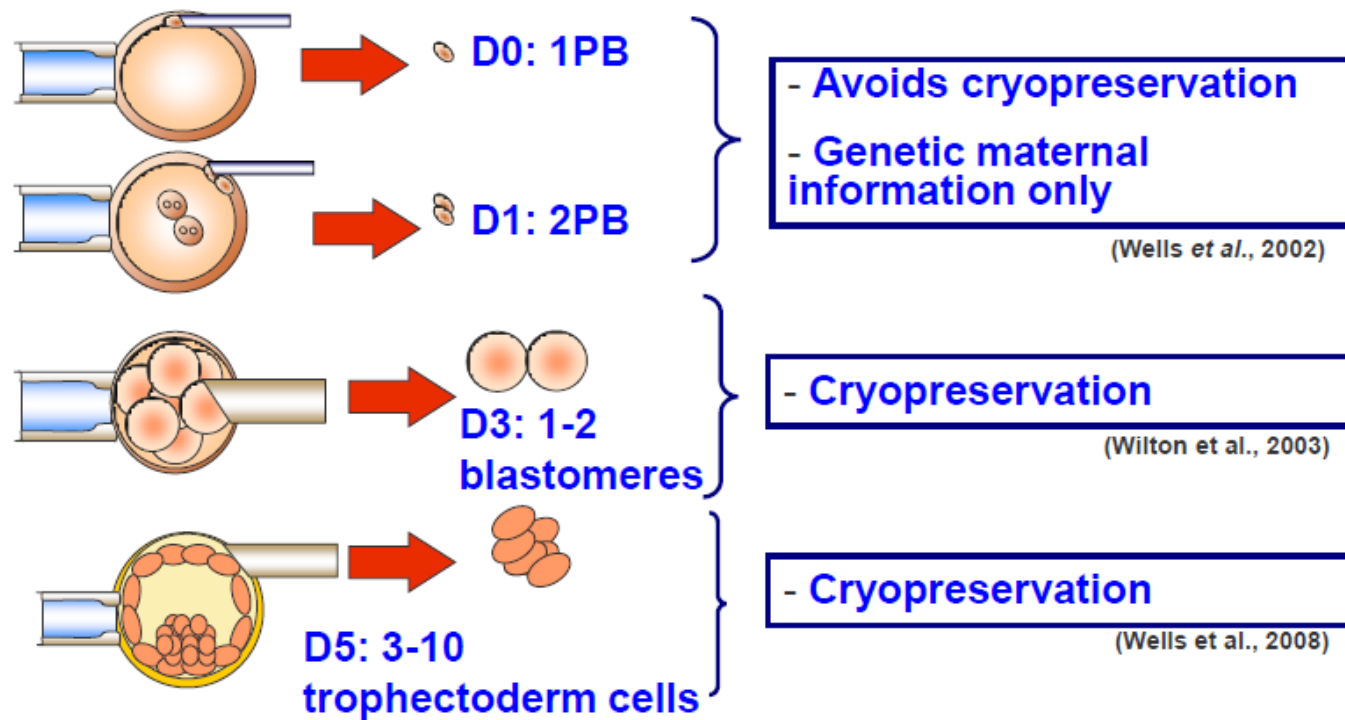
1. Giai đoạn kích thích
2. Thu hồi trứng
3. Thu thập tinh trùng
4. **Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)**
5. Phôi được chuyển hóa
6. Cấy phôi



Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) + Xét nghiệm di truyền

Quy trình

1. Giai đoạn kích thích
2. Thu hồi trứng
3. Thu thập tinh trùng
4. **Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF)**
(Xét nghiệm di truyền)
5. Phôi được chuyển hóa
6. Cấy phôi



Xét nghiệm di truyền trước khi cấy: xét nghiệm di truyền tiền cấy phôi (PGT)

Polar body

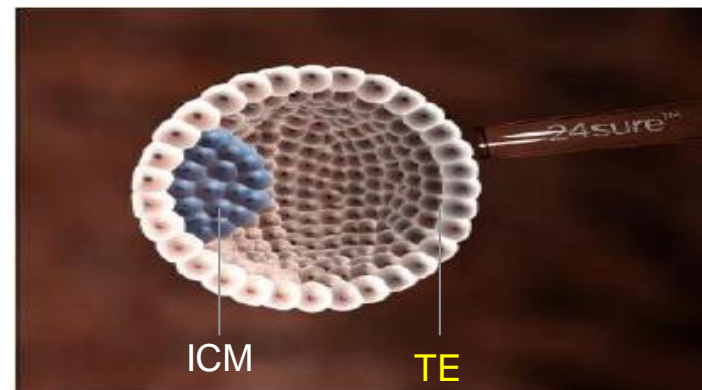


Blastomere



1 cell

Blastocyst (Trophectoderm biopsy)



8-10 cells

	Polar body	Blastomere	Blastocyst
Ưu điểm	<ul style="list-style-type: none"> Không xâm lấn 	<ul style="list-style-type: none"> Phát hiện lỗi của cả mẹ và bố Quá trình sinh thiết được thực hiện tốt 	<ul style="list-style-type: none"> Không xâm lấn Phát hiện lỗi của cả mẹ và bố Dạng thể khảm có thể được phát hiện
Hạn chế	<ul style="list-style-type: none"> Số lượng tế bào lớn để kiểm tra Chỉ có thể phát hiện lỗi của người mẹ 	<ul style="list-style-type: none"> Xâm lấn Dạng thể khảm có thể làm lỗi kết quả 	<ul style="list-style-type: none"> Kỹ năng sinh thiết Quá trình cấy blastomere



Hai phương pháp xét nghiệm di truyền tiền cấy phôi

✓ **Sàng lọc di truyền tiền cấy phôi (PGS)**

- Xét nghiệm di truyền tiền cấy phôi cho số lượng nhiễm sắc thể và sao chép bất thường của nhiễm sắc thể (Viết tắt là **PGT-A**)

✓ **Chẩn đoán di truyền tiền cấy phôi (PGD)**

- Xét nghiệm di truyền tiền cấy phôi cho rối loạn đơn (Viết tắt là **PGT-M**)

PGS vs PGD

Sàng lọc di truyền tiền cấy phôi PGS

Chẩn đoán di truyền tiền cấy phôi PGD

Mục

Số lượng bản sao bất thường của nhiễm sắc thể

Rối loạn gen đơn

Công nghệ

FISH
Array-CGH
NGS

Specific probe (primer)
PCR
Sanger sequencing
STR marker

Chỉ định

- ✓ Phụ nữ lớn tuổi
- ✓ Tiền sử xảy thai nhiều lần
- ✓ Thất bại IVF lặp đi lặp lại
- ✓ Hiếm muộn

- ✓ Rối loạn đơn gen đã biết
- ✓ Xác định HLA



Sàng lọc di truyền tiền cấy phôi, PGS PGT-A

(còn được gọi là sàng lọc dị bội)

PGS phát hiện lệch bội giữa các phôi IVF

Đột biến lệch bội xuất hiện ở mọi lứa tuổi và tăng theo tuổi của người mẹ

Nhiệm sắc thể lệch bội cho biết nguyên nhân chính gây thất bại IVF

Chỉ định làm PGS

- ✓ Phụ nữ lớn tuổi (>34 tuổi)
- ✓ Tiền sử sảy thai nhiều lần
- ✓ Thất bại IVF lặp đi lặp lại
- ✓ Vô sinh nam nặng
- ✓ Lựa chọn giới tính

Nhiễm sắc thể bất thường

Sinh thiết phôi

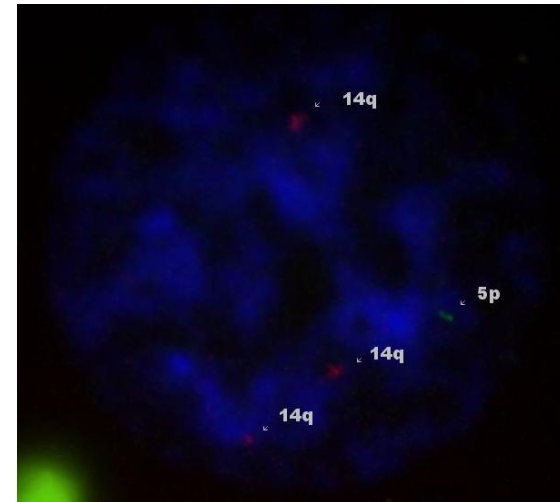


FISH



Xét nghiệm di truyền
cho vùng cụ thể

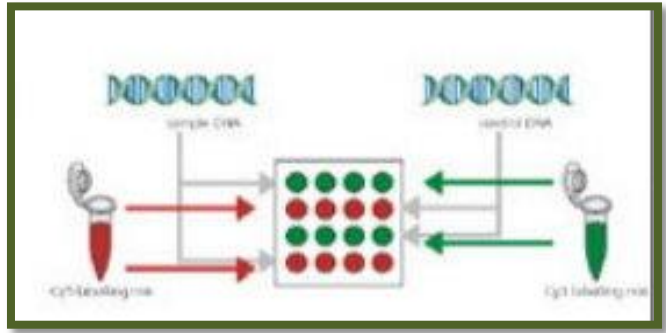
Polar body
Single blastomere
Blastocyst



chỉ có một vài nhiễm sắc thể có thể được phát hiện đồng thời bởi FISH

**Array-based PGS
NGS-based PGS**

● day 3 or day 5
Phôi thai(s)



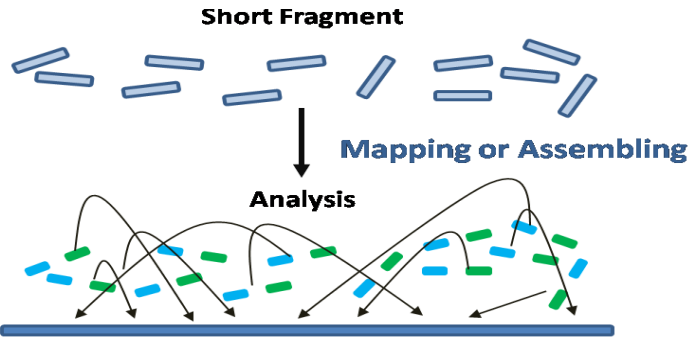
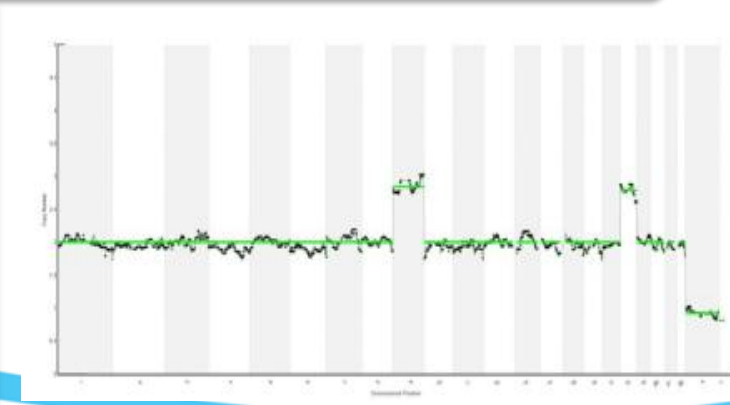
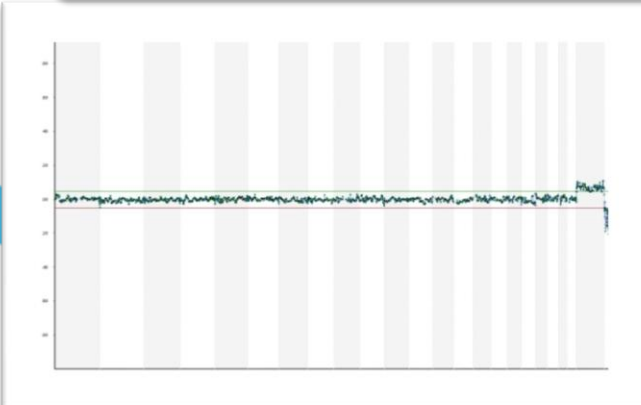
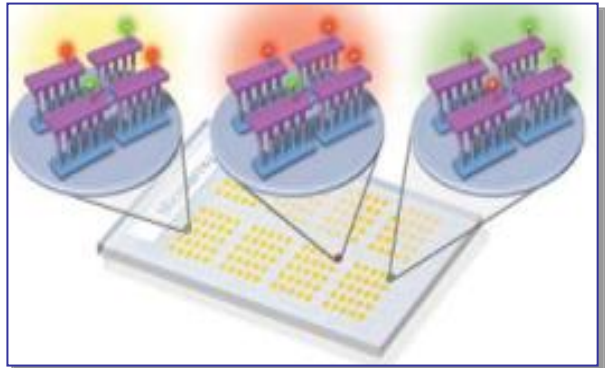
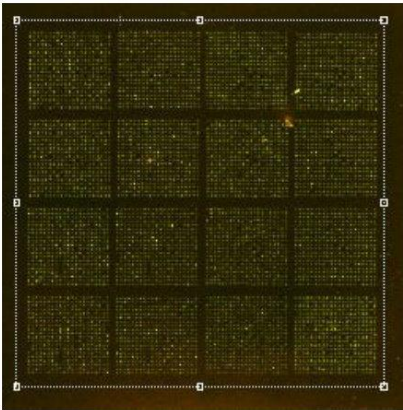
Sinh thiết phôi

Khuếch đại toàn bộ bộ gen (WGA)

OR

phương pháp lai gen có so sánh (array-CGH)

Trình tự di truyền thế hệ sau (NGS)



Phát triển sàng lọc di truyền tiền cấy phôi, PGS



FISH

PGS was originally performed using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Because FISH does not screen all 24 chromosomes, its efficacy and accuracy for detecting euploid embryos is limited.



Arrays

As new technologies were developed and applied to PGS, implantation rates improved. The array-based 24sure™ technology facilitated investigation of all 24 chromosomes in the early embryo, significantly improving PGS success.^{7,8}



NGS

Next-generation sequencing (NGS), the latest technological breakthrough, is setting a new standard in PGS, with reliable PGS results⁹, streamlined workflows, higher throughput capabilities, and customizable assays for easy portfolio expansion.

	PGS
FISH	Nền tảng di truyền truyền thống (chr 13,18,21,X,Y)
Array	Công nghệ phân tích tự động Phát hiện 23 cặp nhiễm sắc thể
NGS	Phát hiện 23 cặp nhiễm sắc thể Công suất cao Dễ vận hành

NGS nền tảng cho PGS

Miseq - Illumina



Ion Proton Sequencer - Thermo Fisher



Ion PGM System - Thermo Fisher



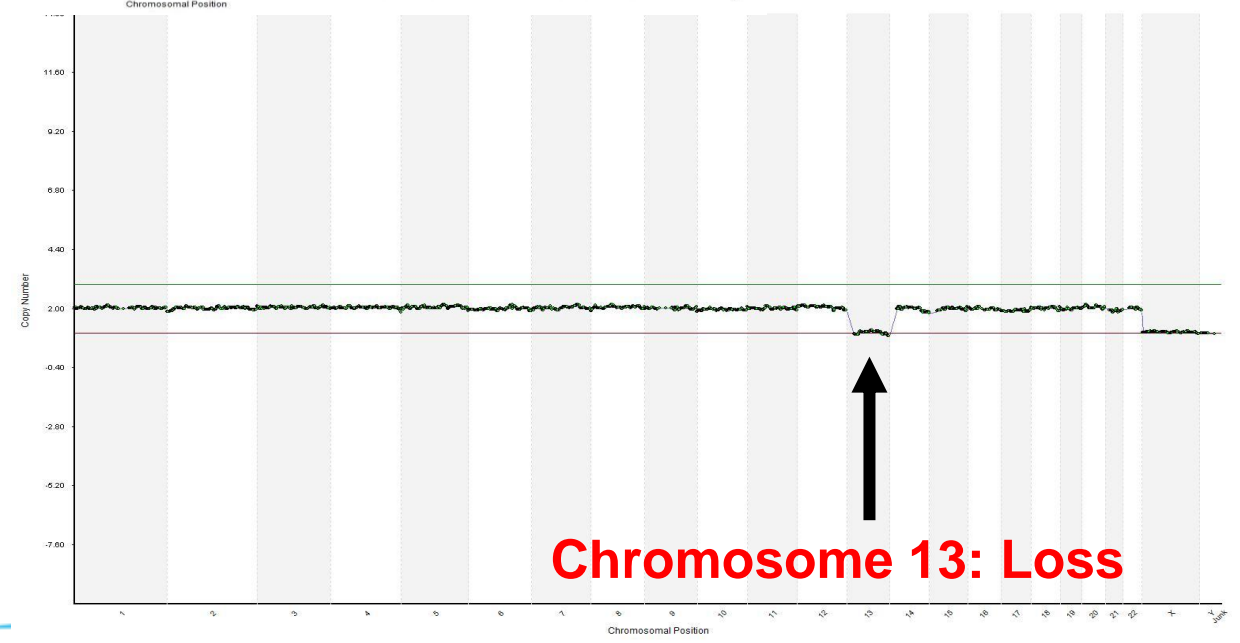
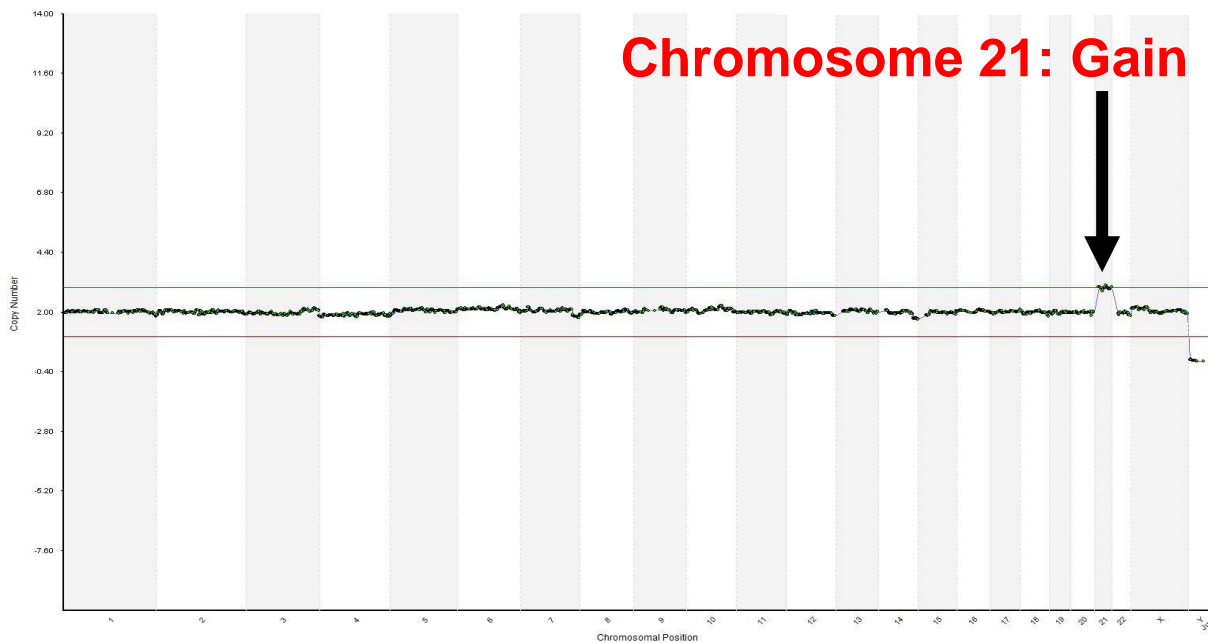
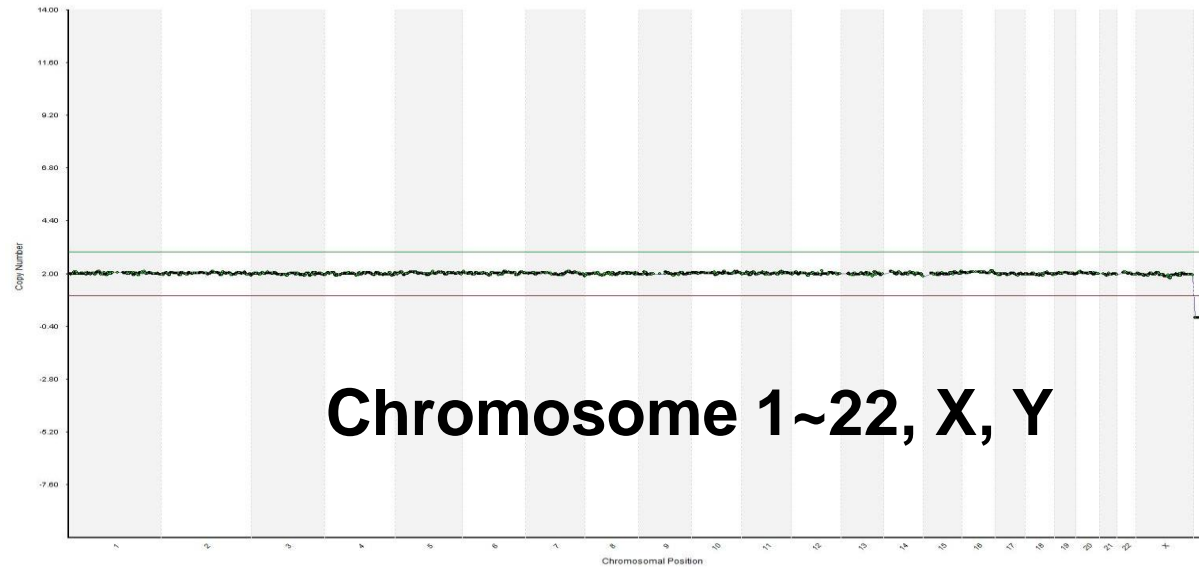
Phân tích dữ liệu

Số bản sao

Đường xanh : 3 bản

sao

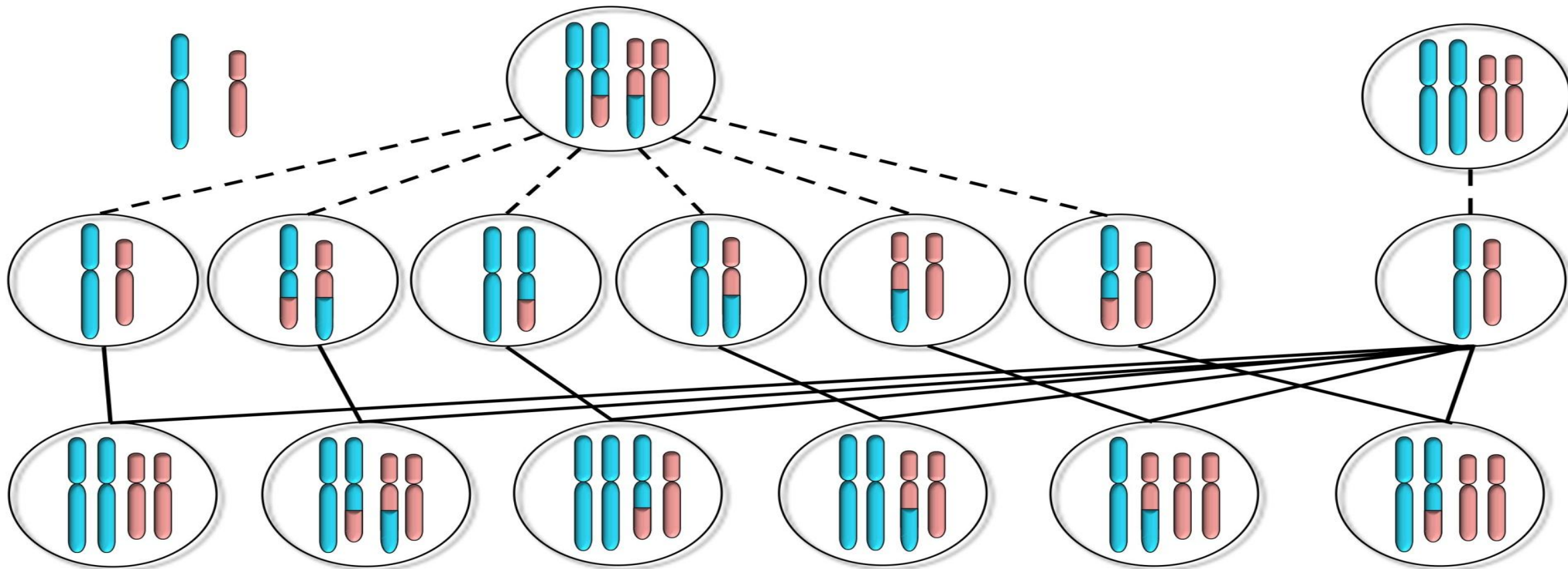
Đường đỏ: 1 bản sao



Ví dụ về dịch chuyển đối ứng cho PGS

Tế bào phân chia cân bằng

Tế bào thường



Euploidy
embryo

Euploidy
Embryo

Aneuploidy
embryo

Aneuploidy
embryo

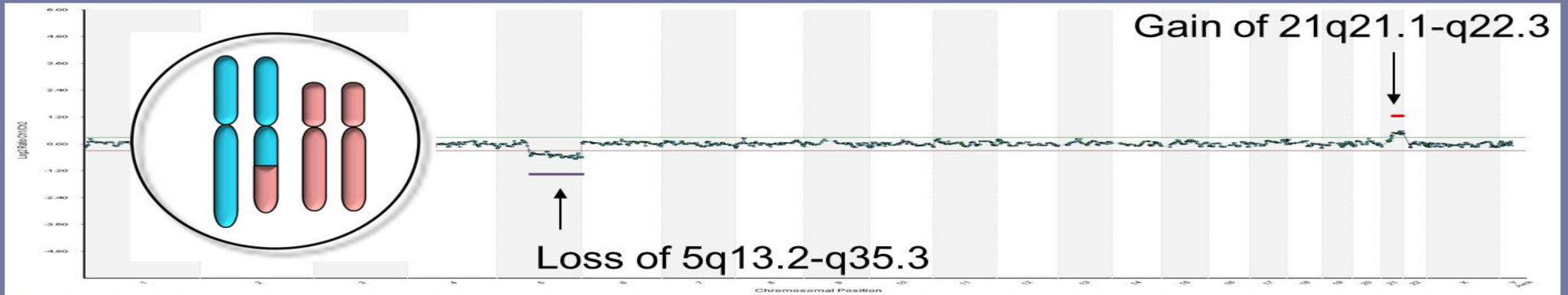
Aneuploidy
embryo

Aneuploidy
embryo

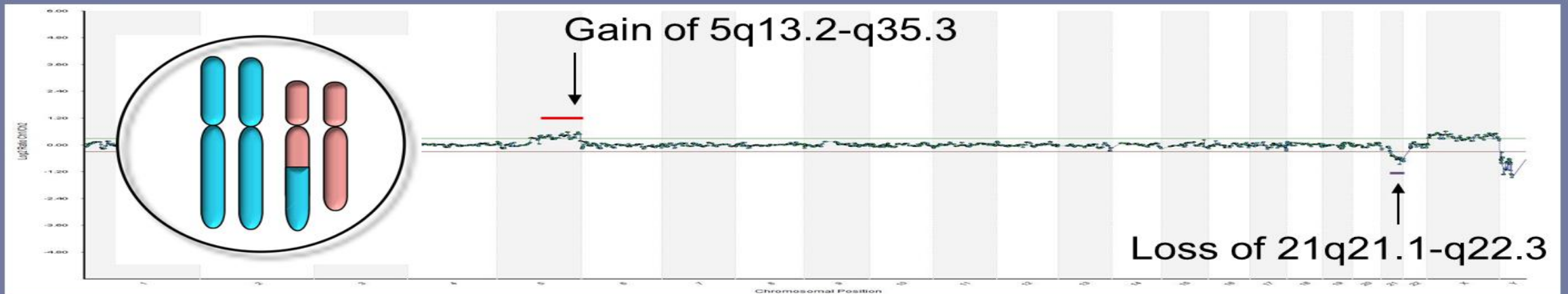
balanced translocation

Kết quả PGS cho trường hợp 46XY,t(5;21)(q11.2;q11.2)

Embryo 1



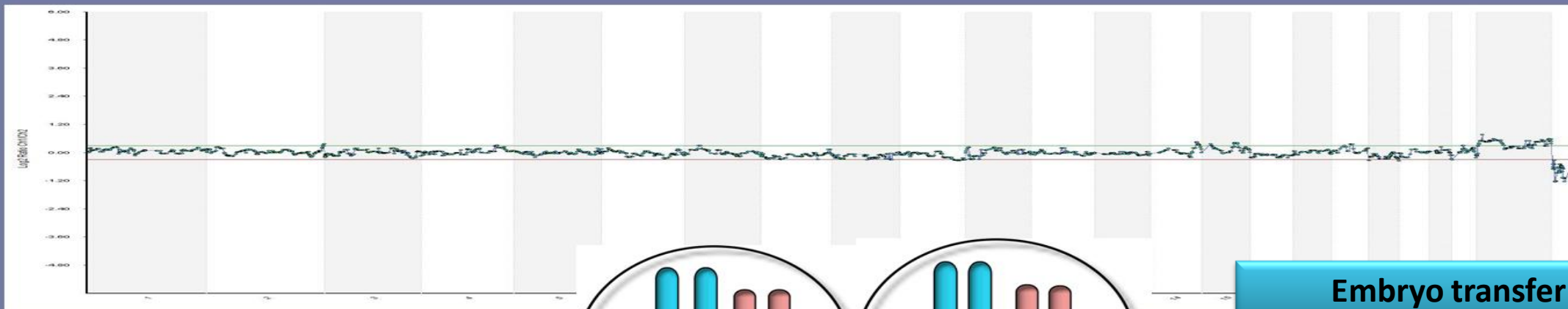
Embryo 24



Aneuploidy Embryo · Not transfer

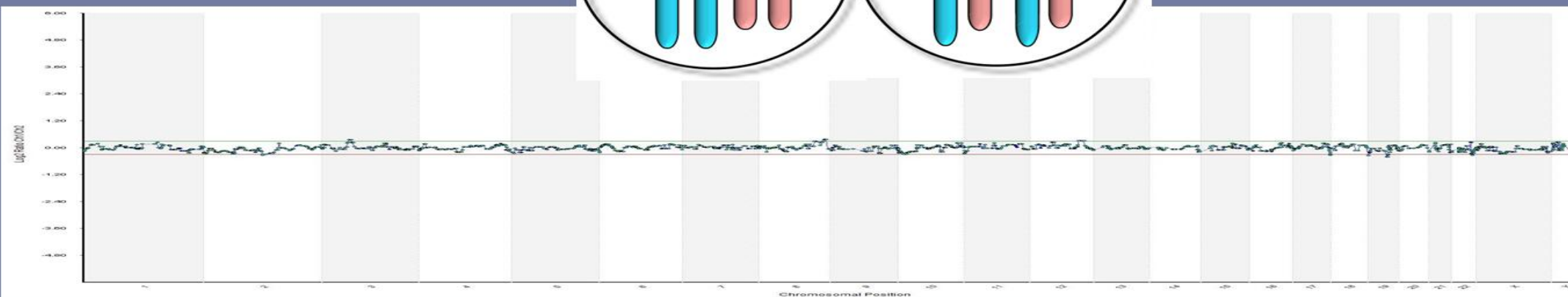
Kết quả PGS cho trường hợp 46XY,t(5;21)(q11.2;q11.2)

Embryo 6



Embryo transfer

Embryo 16



Euploidy Embryo, can transfer

Kết quả PGS cho trường hợp

Tổng: 12 phôi thai
Bất thường: 10 phôi thai
Bình thường: 2 phôi thai

Embryo transfer

(No 6 · 16)



pregnancy

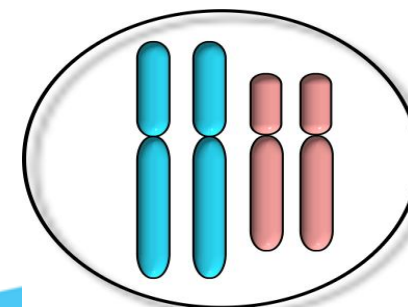
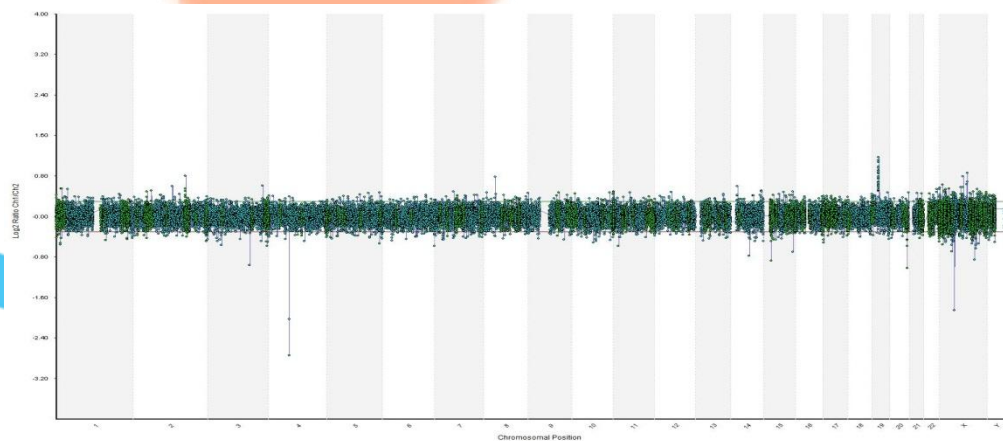
Confirmed by AF



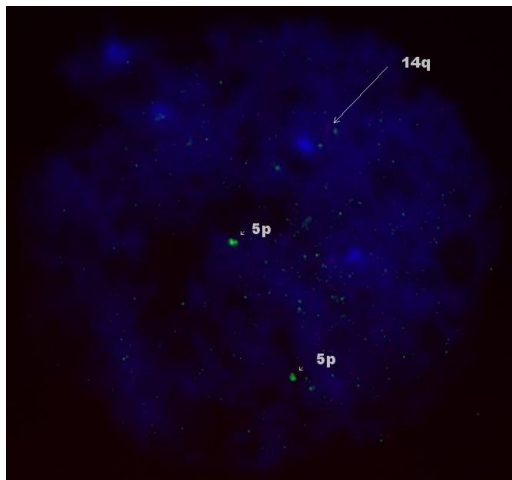
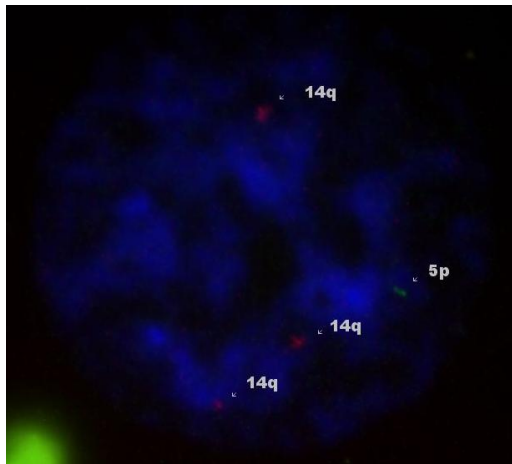
16wks

Array CGH: arr(1-22)x2, (X)x1, (Y)x1

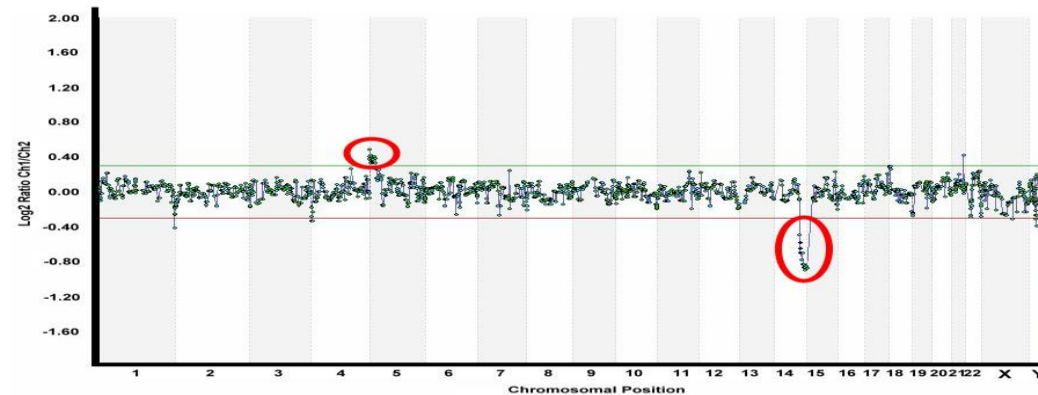
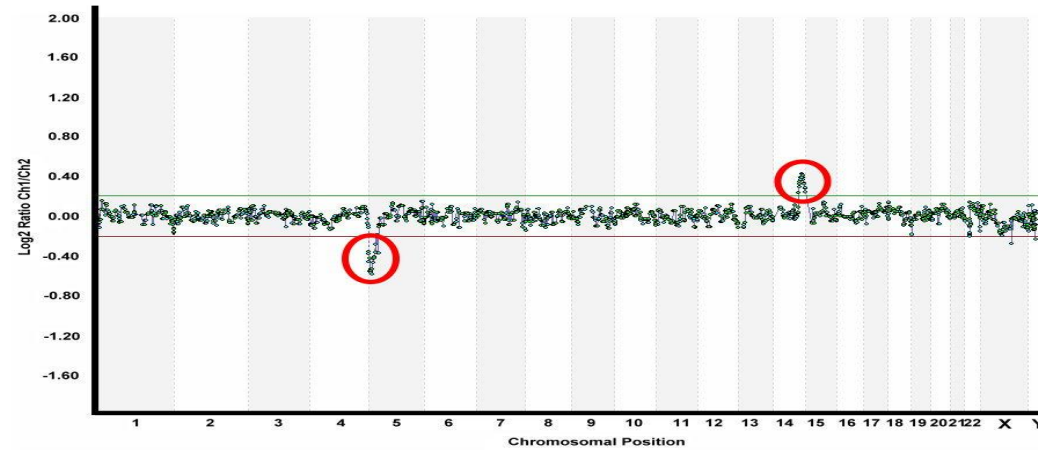
Chromosome: 46,XY



FISH

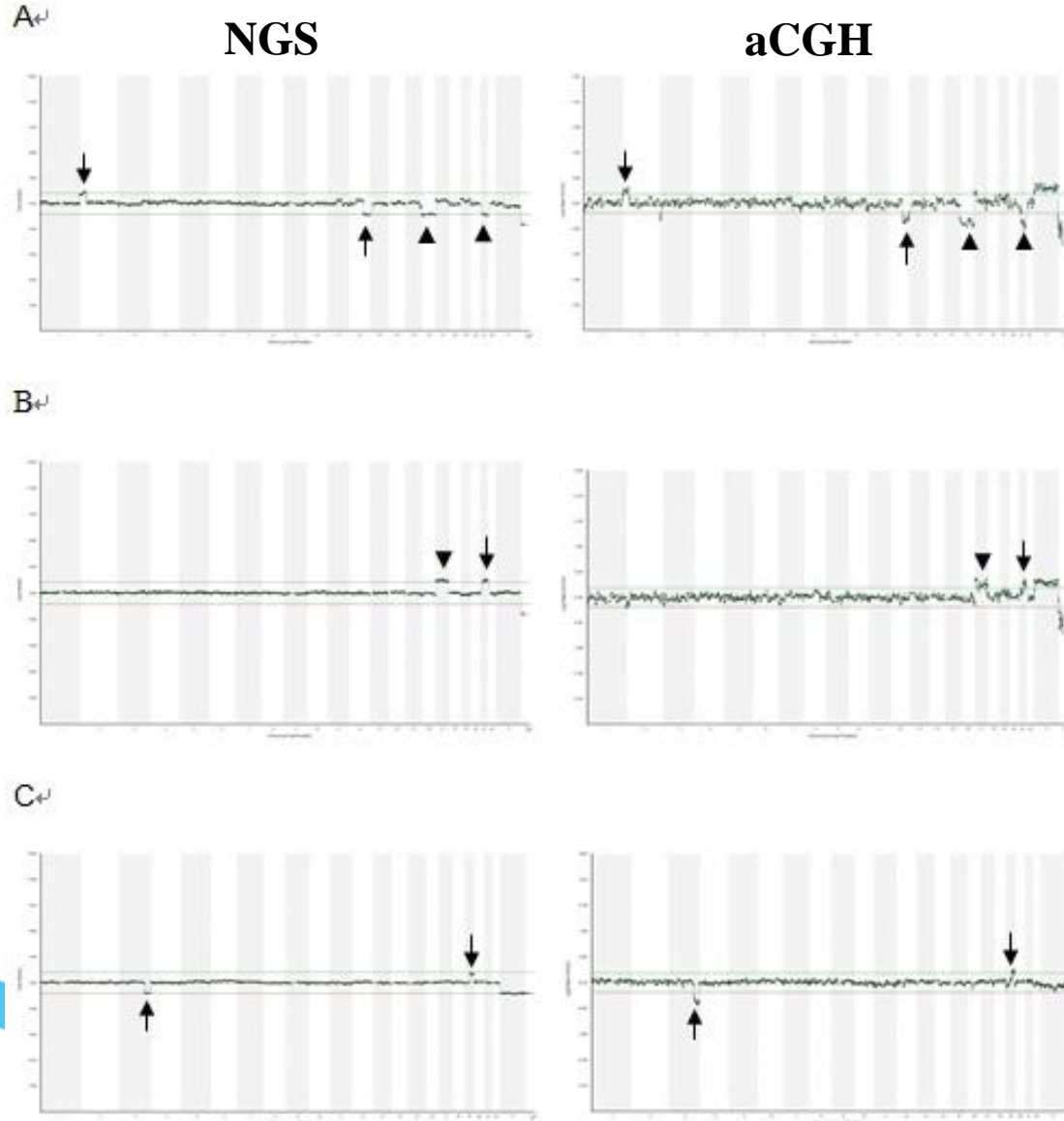


aCGH



G: Cytocell 5p telomere probe
R: Cytocell 14q telomere probe

(5p,14q) balanced translocation



1. NGS vs aCGH : 100% độ chính xác
2. Độ phân giải: giống nhau
3. Thời gian xử lý cho kỹ thuật viên: NGS dễ hơn

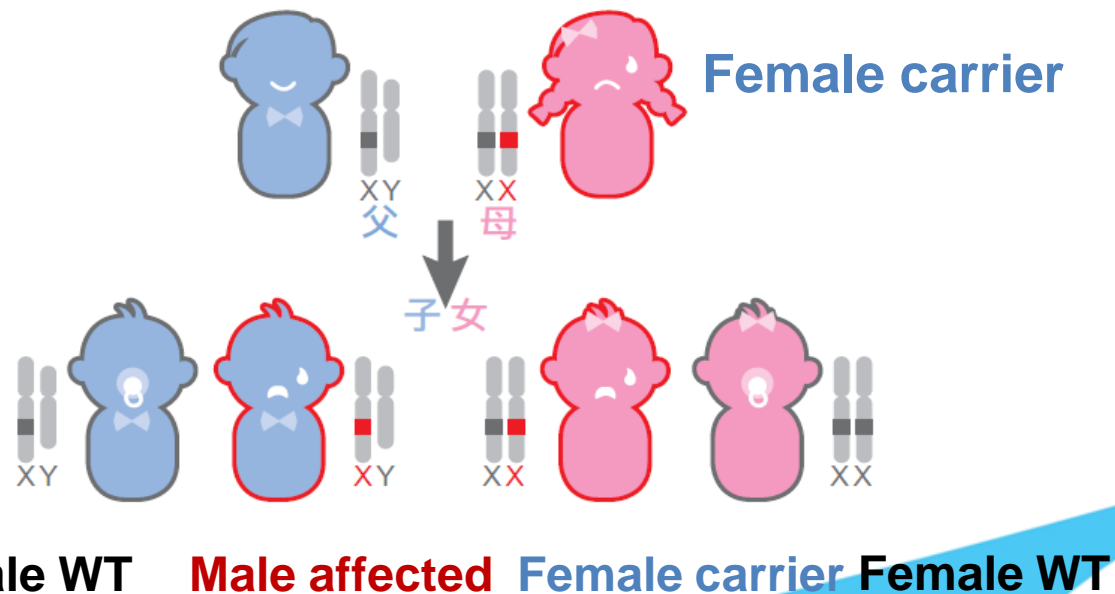


Chẩn đoán di truyền tiền cấy phôi, PGD PGT-M

- Một hoặc cả hai bố mẹ mang gen đột biến
- Xét nghiệm được thực hiện để xác định đột biến cụ thể
- **Chỉ định làm PGD**
 - ✓ Với các rối loạn đơn gen đã biết
 - tính trạng trội
 - Tính trạng do gen lặn
 - Rối loạn liên kết X
 - ✓ Rào cản đột biến
 - ✓ Kết hợp kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA)

Ứng dụng lâm sàng của chẩn đoán di truyền tiền cấy phôi, PGD

- Lần đầu tiên diễn ra vào tháng 10 năm 1989
- Haemophilia (rối loạn liên kết X)
- Xác định giới tính



Rối loạn gen đơn

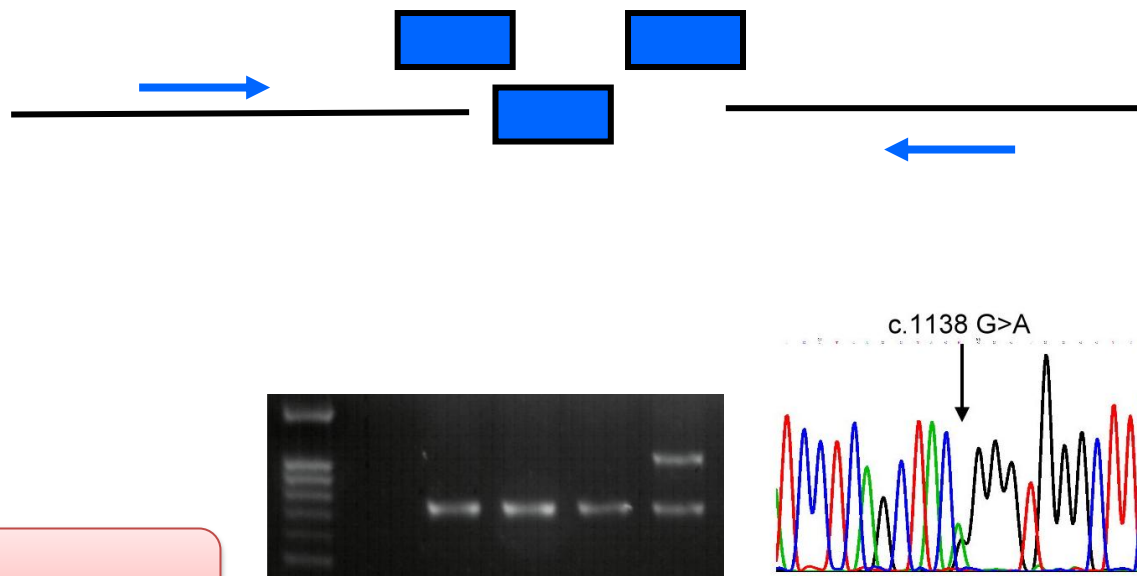
Sinh thiết phôi

PCR

Gel electrophoresis

Sequencing

PGD cho vùng cụ thể



rối loạn di truyền cụ thể - dị tật gen đơn
defects

lựa chọn phôi bình thường để chuyển 22

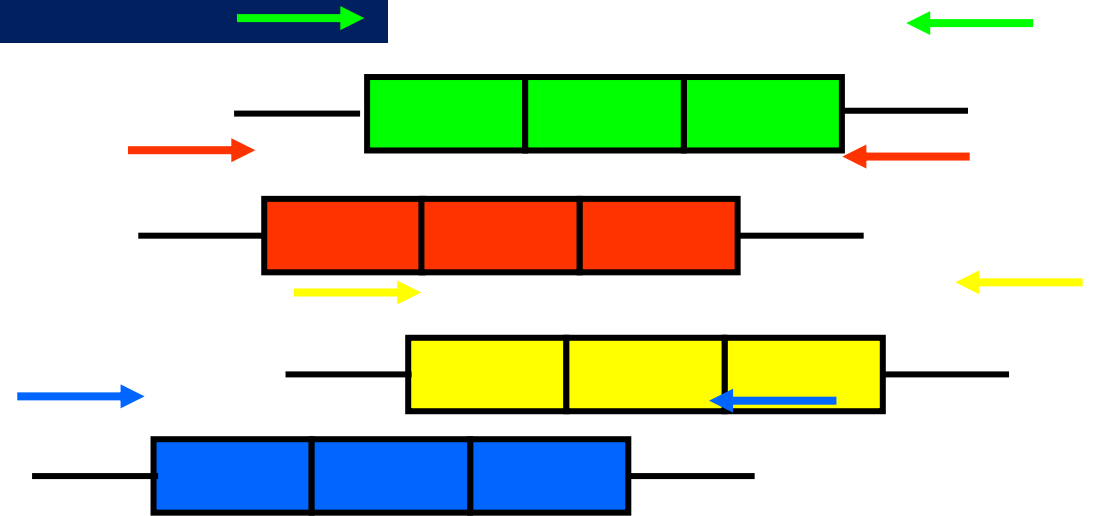
Modified PCR-based research

Optimized PGD-PCR protocols

Nested PCR

Multiplex PCR

Fluorescent PCR



Multiple genes

Cải thiện để nhắm mục tiêu nhiều vùng

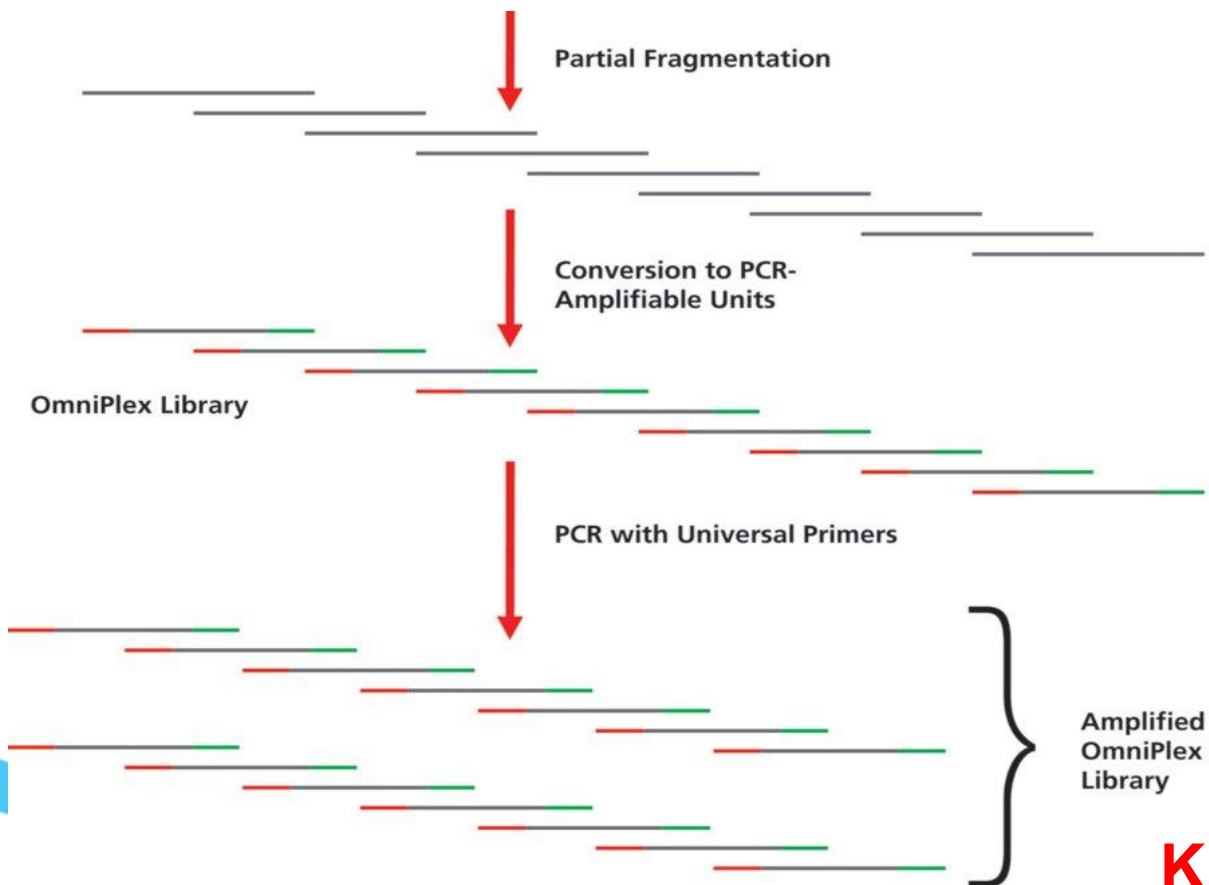
Vẫn giới hạn ở các vùng cụ thể



Sự khuếch đại toàn bộ bộ gen (WGA)



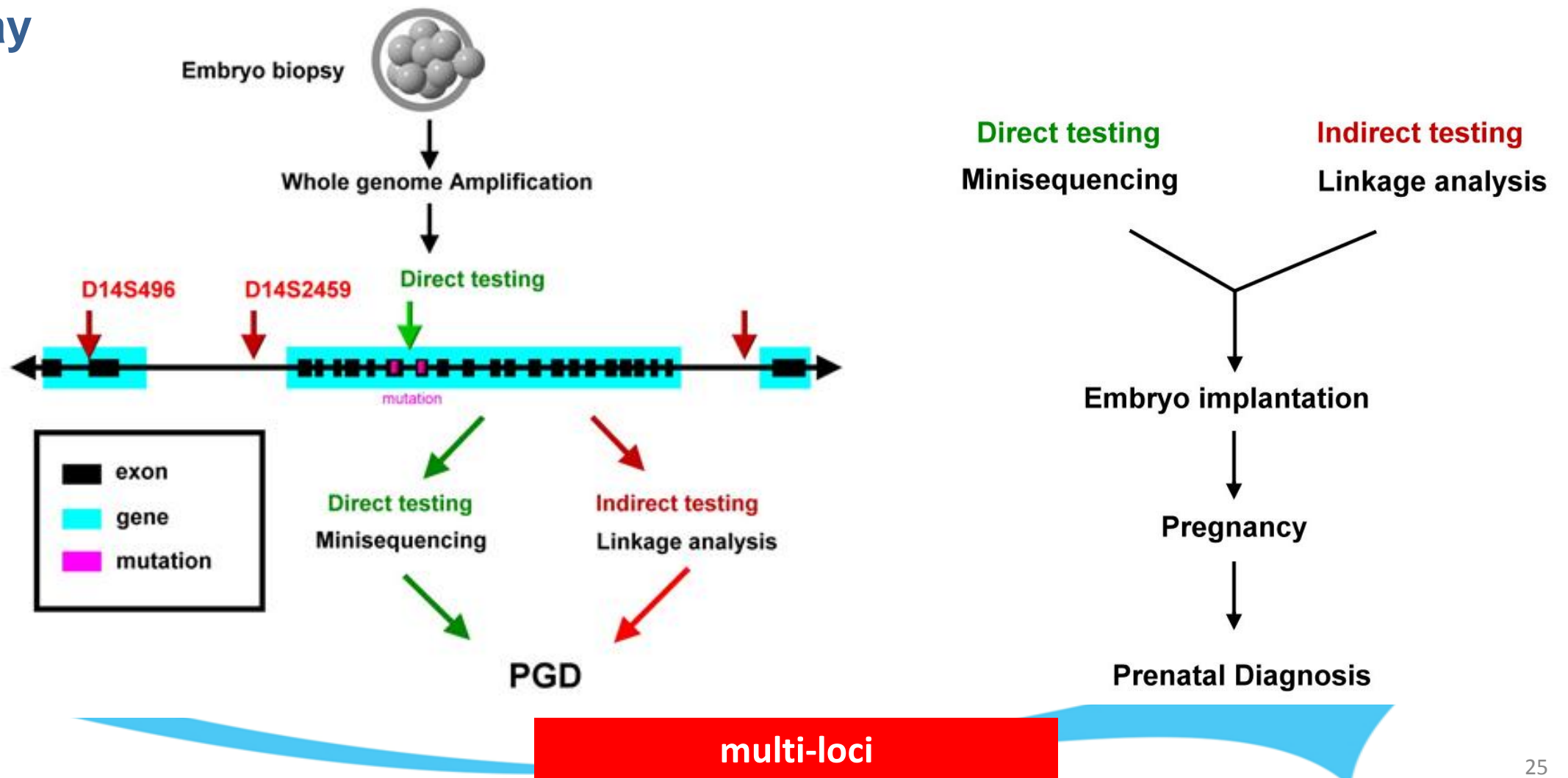
Phôi thai đơn



Khuếch đại toàn bộ bộ gen từ tế bào đơn
Phân tích thêm cho nhiều loci

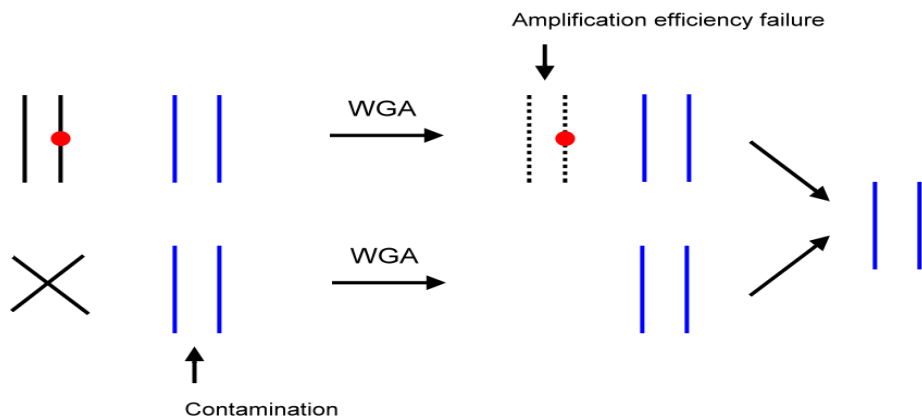
Chẩn đoán trực tiếp và gián tiếp

Hiện nay

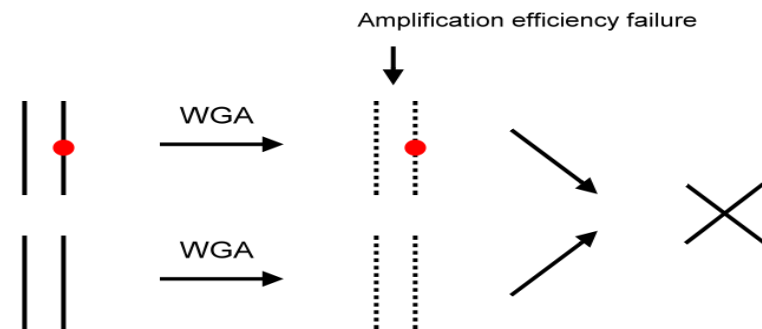


Những ưu điểm của STR

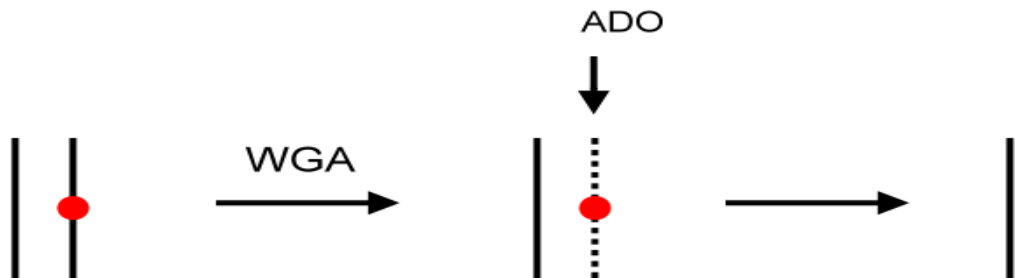
✓ to monitor contamination



✓ to monitor WGA experiment



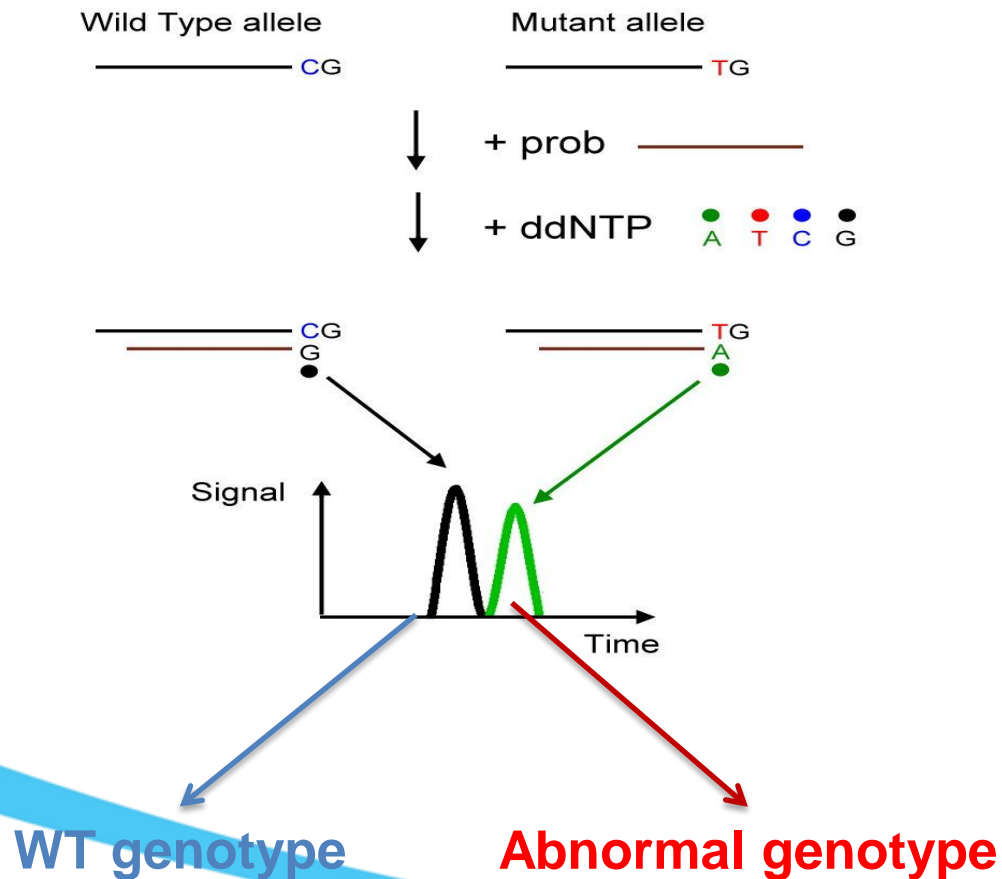
✓ to monitor Allele drop-out (ADO)



Ví dụ về kết quả PGD

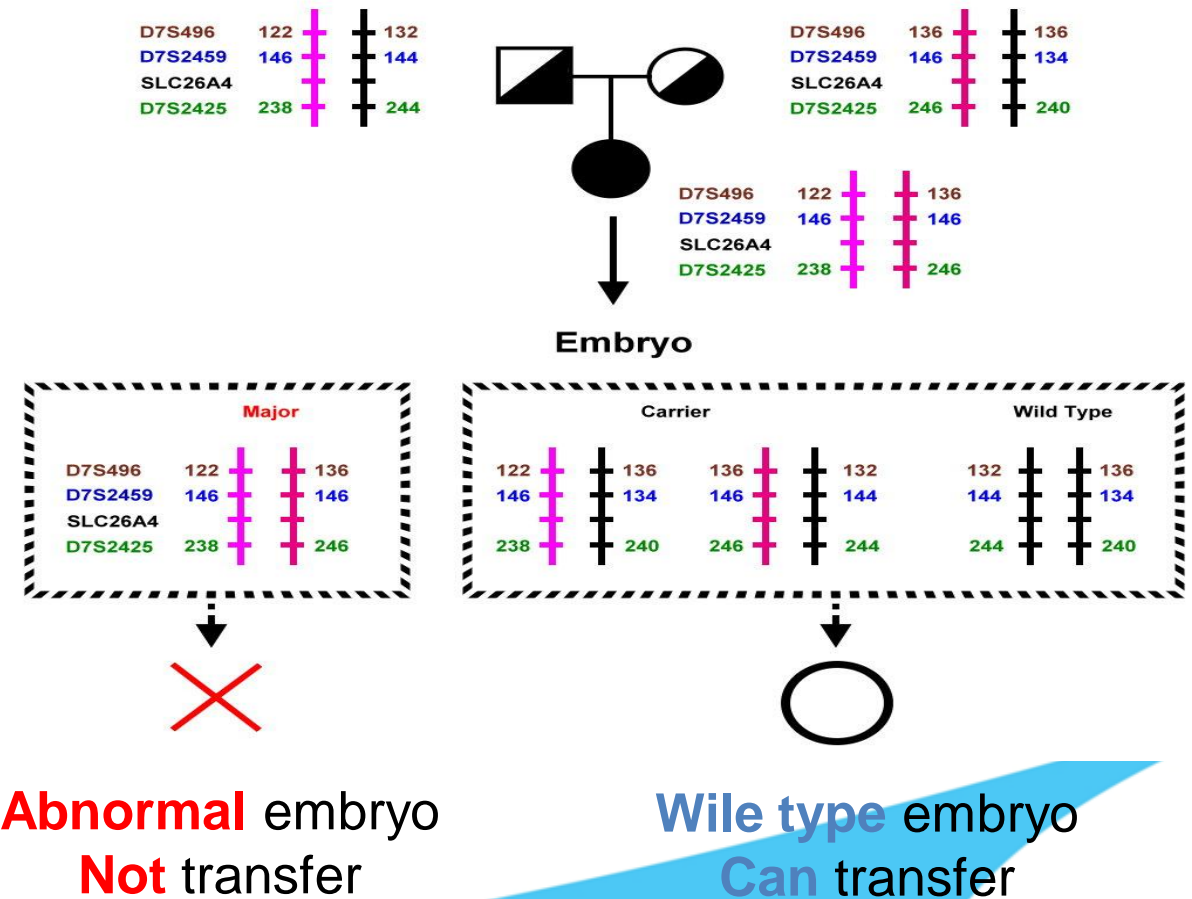
Direct genotyping

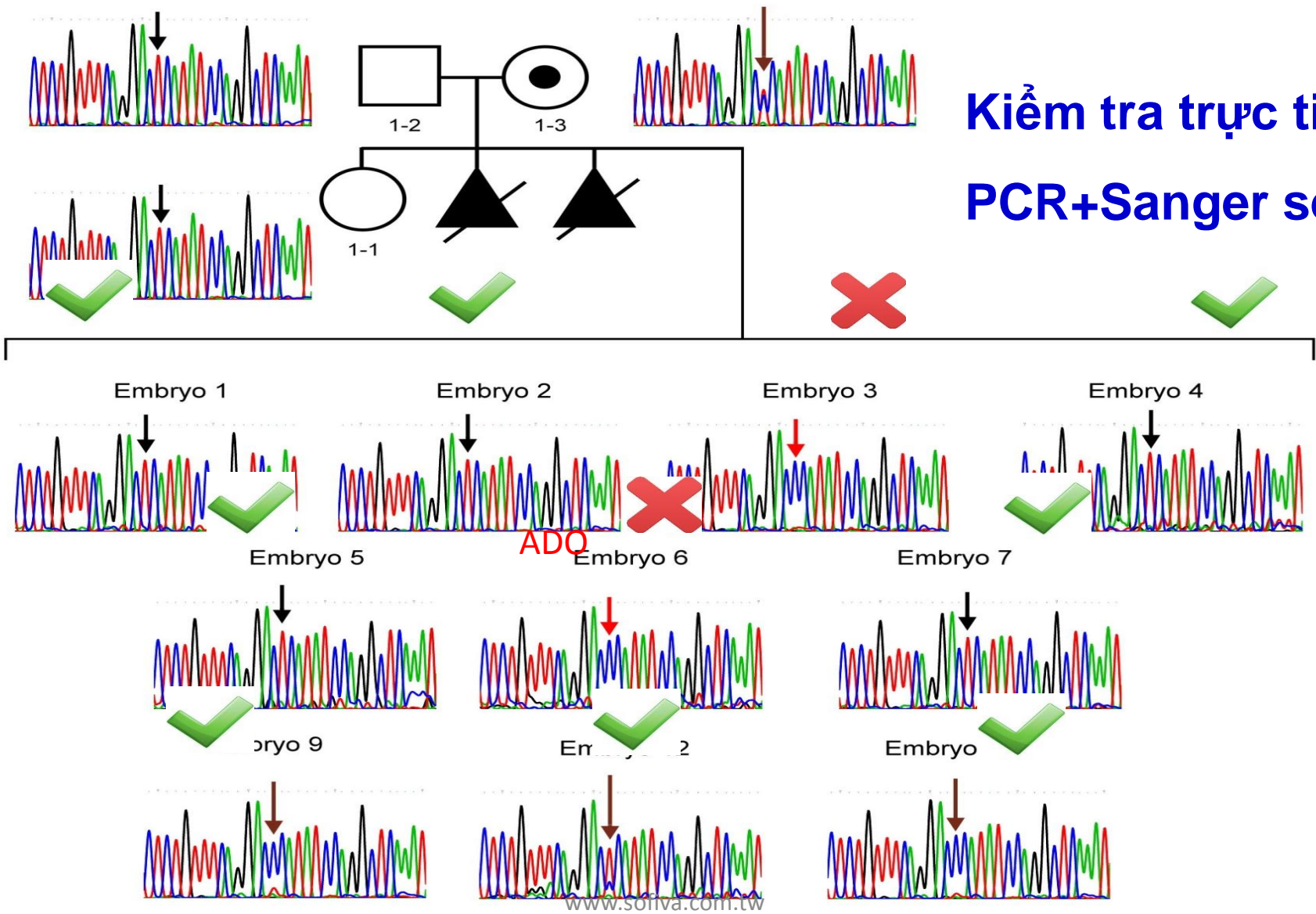
Minisequencing



Linkage analysis

Linkage analysis

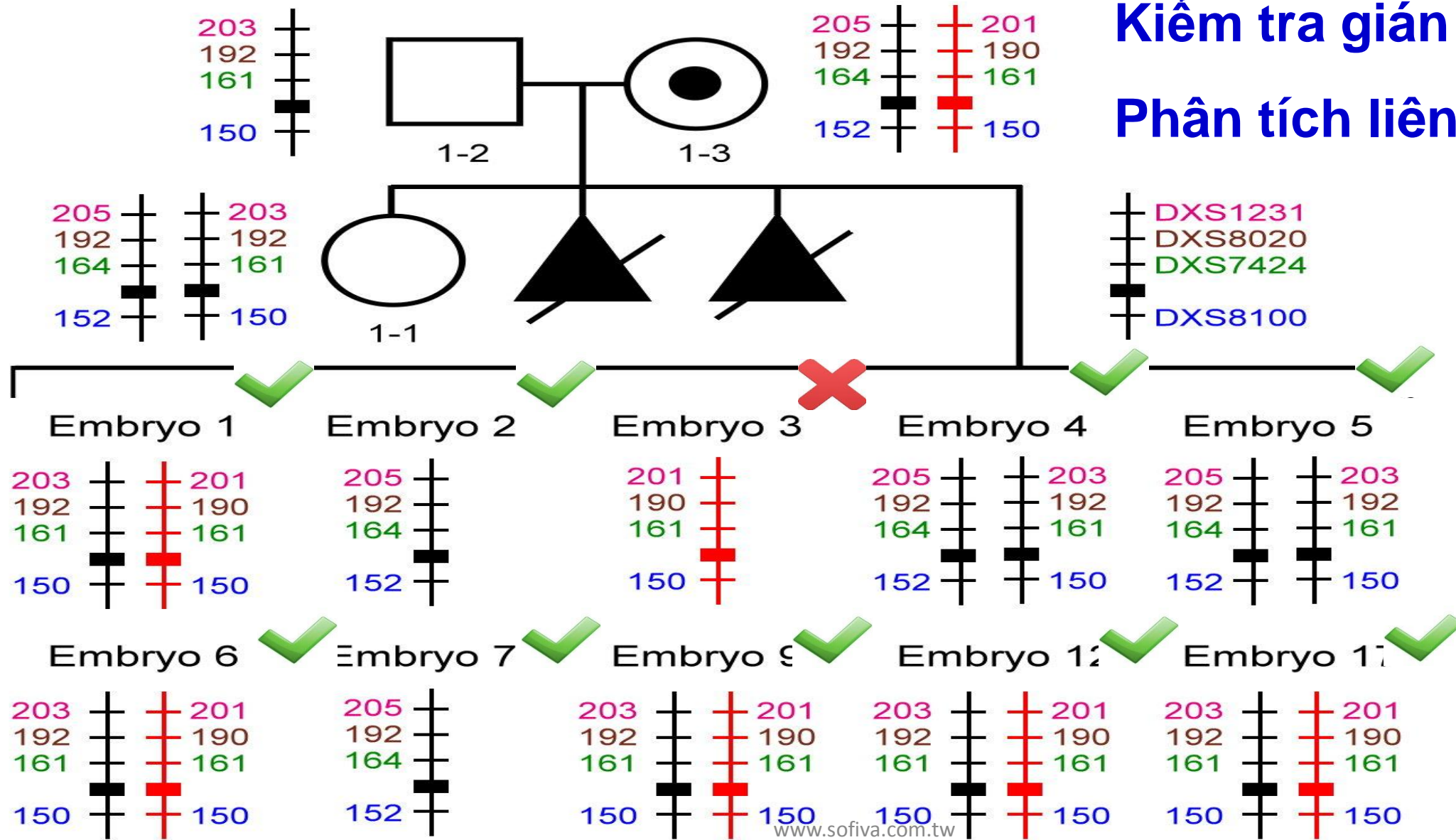




**Kiểm tra trực tiếp
PCR+Sanger sequencing**



Kiểm tra gián tiếp Phân tích liên kết





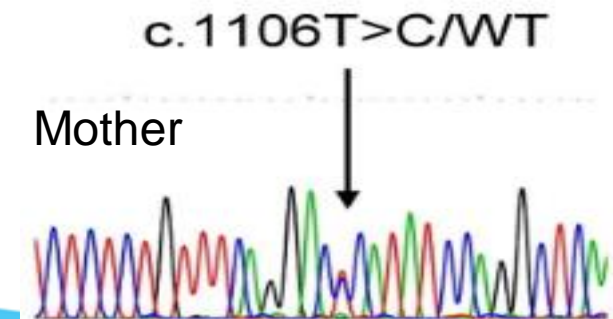
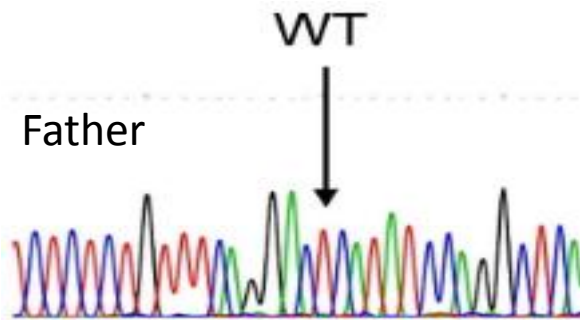
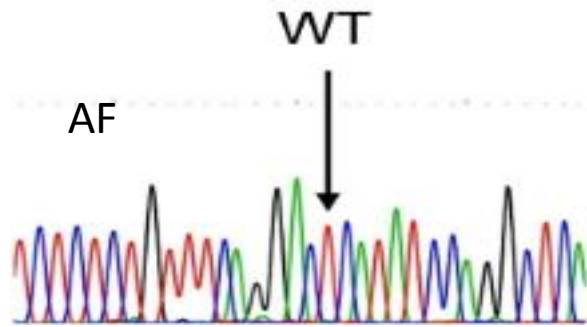
Kết quả PGD cho trường hợp
Tổng : 11 phôi thai

Major: 1 embryo
Wild Type : 4 embryos
Carrier: 5 embryos
No signal : 1 embryo

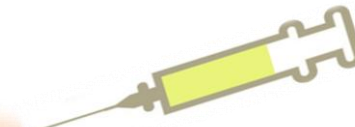
Embryo transfer



pregnancy



16wks



Confirmed by AF

Trường hợp lâm sàng ở Đài Loan – Mất thính lực

Original Paper

Audiology & Neurotology

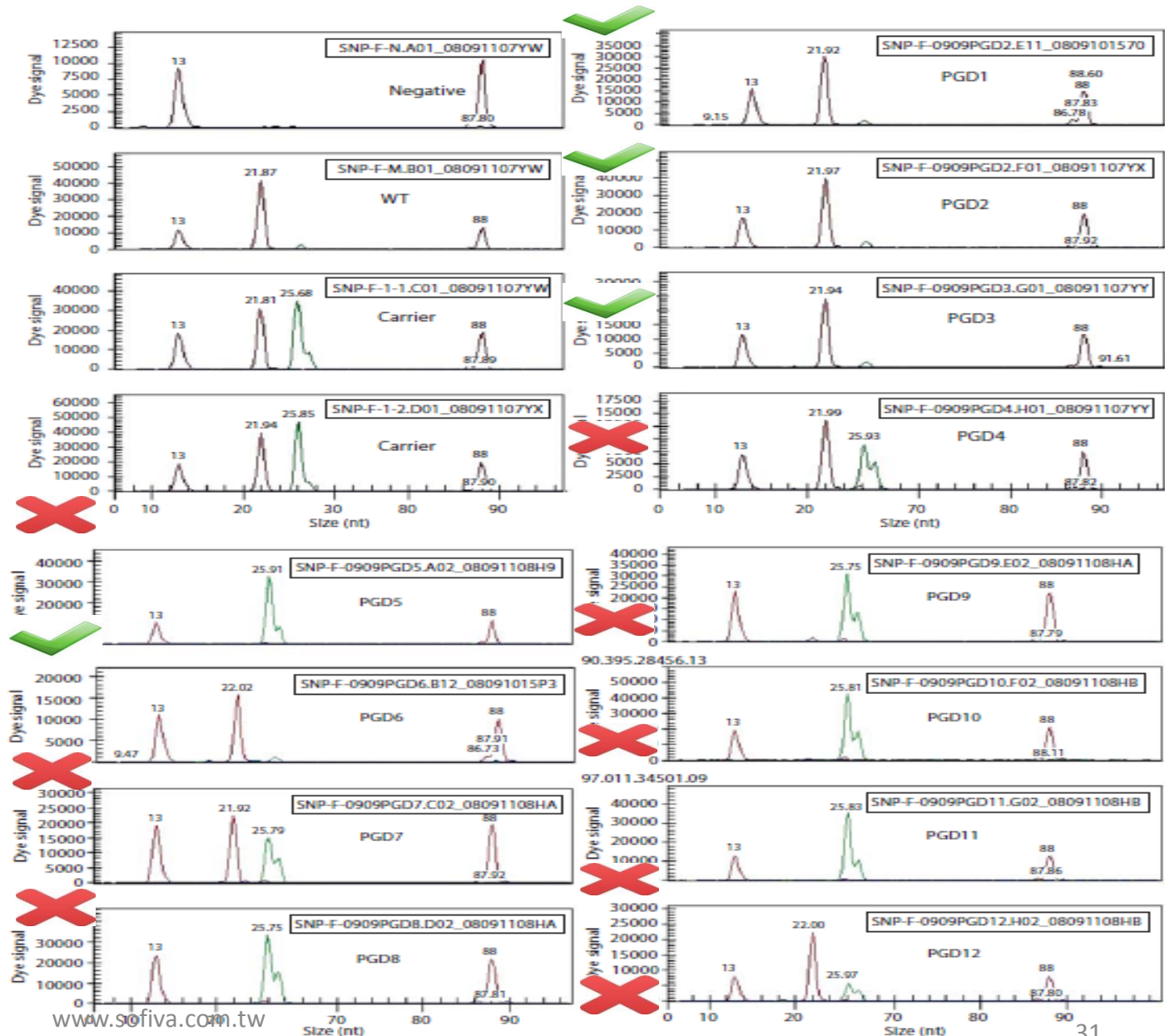
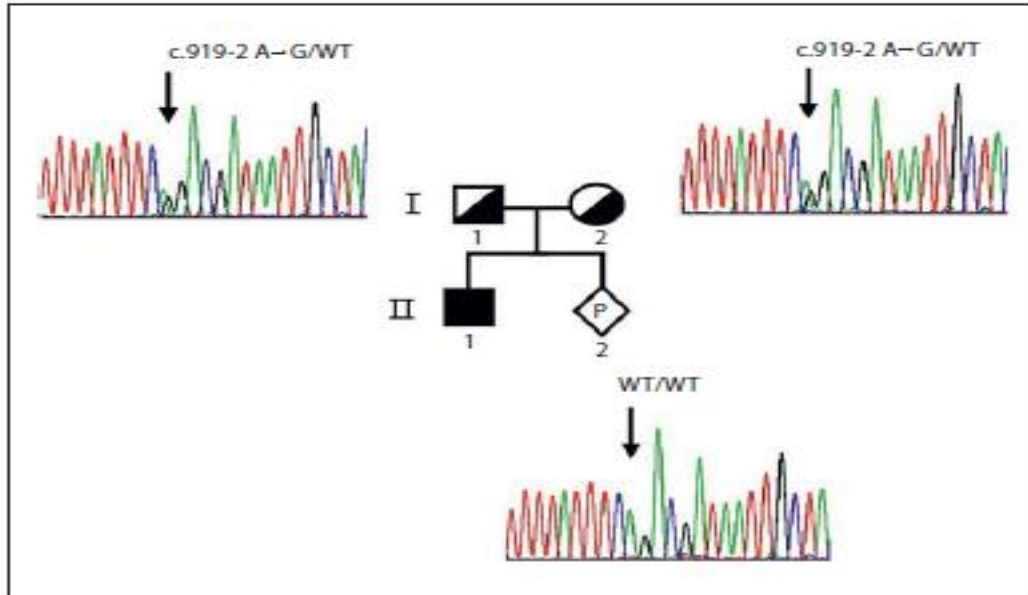
Audiol Neurotol 2010;15:311–317
DOI: [10.1159/000284349](https://doi.org/10.1159/000284349)

Received: August 7, 2009
Accepted after revision: Decem
Published online: February 17, 201

Preimplantation Genetic Diagnosis (Embryo Screening) for Enlarged Vestibular Aqueduct due to *SLC26A4* Mutation

Chen-Chi Wu^{a,b} Shin-Yu Lin^{b,c} Yi-Nin Su^{b,c} Mei-Ya Fang^b Shee-Uan Chen^c
Chuan-Jen Hsu^a

Departments of ^aOtolaryngology, ^bMedical Genetics and ^cObstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, ROC



Trường hợp lâm sàng – Xác định HLA và beta thalassemia

inc - Vol 17 No 5. 2008 699-705 Reproductive BioMedicine Online; www.rbmonline.com/Article/3440 on web 1 October 2008

Case report

PGD of β -thalassaemia and HLA haplotypes using OmniPlex whole genome amplification



Dr Shee-Uan Chen was a graduate of the College of Medicine, National Taiwan University. He completed his residency training in Obstetrics and Gynecology and his research fellowship in reproductive medicine at the National Taiwan University Hospital. His major research interests include clinical and basic reproductive medicine, cryopreservation of oocytes, embryos and ovarian tissue and micromanipulation of gametes and embryos. He is currently associate professor and Director of the Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital.

Dr Shee-Uan Chen

Shee-Uan Chen^{1,3}, Yi-Ning Su^{2,3}, Mei-Ya Fang², Li-Jung Chang¹, Yi-Yi Tsai¹, Li-Ting Lin¹, Chien-Nan Lee^{1,4}, Yu-Shih Yang^{1,4}

¹Department of Obstetrics and Gynecology; ²Department of Medical Genetics, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan.

³The first and second authors contributed equally to this work.

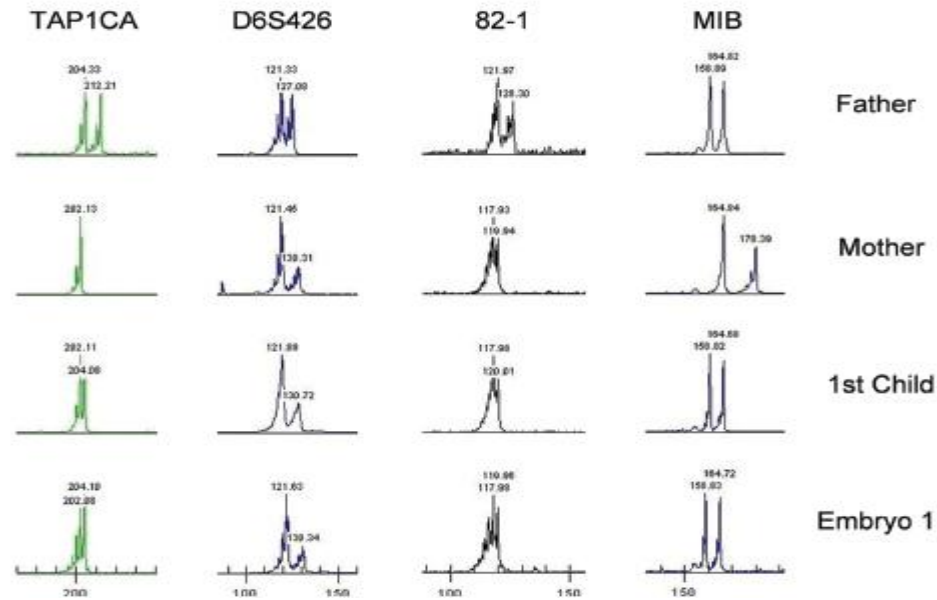
⁴Correspondence: Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital, No. 7 Chung-Shan South Road, Taipei, Taiwan. Tel: +886 2 23123456, ext. 5166; Fax: +886 2 23934197; e-mail: leecn@ha.mc.ntu.edu.tw; ysyang@ha.mc.ntu.edu.tw

Abstract

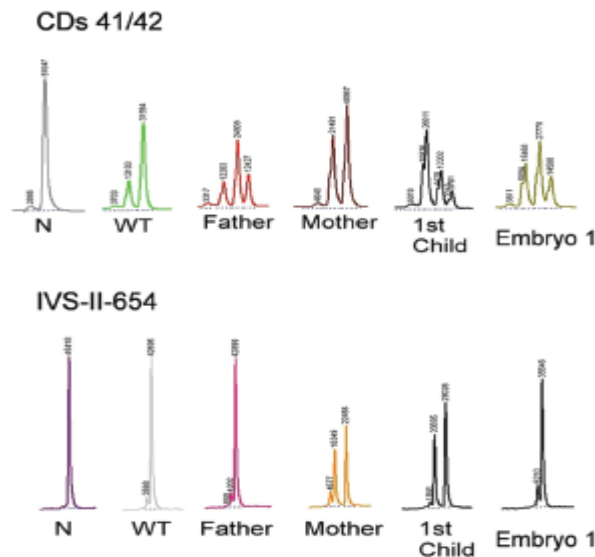
A strategy was developed using the OmniPlex technology of whole genome amplification for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of single gene diseases and human leukocyte antigen (HLA) haplotypes. The amplified genomic DNA library was subsequently examined separately for mutation analysis with mini-sequence and for short tandem repeat (STR) markers within the HLA loci. To evaluate the reliability of the protocol prior to PGD, tests of 50 single lymphocytes revealed an amplification efficiency of 92–96% and allele drop-out (ADO) rate of 6–16%. The strategy was validated in one β -thalassaemia family having an affected boy. The couple underwent three cycles of ovarian stimulation and intracytoplasmic sperm injection for PGD. On 16 embryos tested, the amplification efficiency was 88–94% and ADO was 6–19%. Two cycles of embryo transfer were performed, and one pregnancy was achieved. The genotypes of the fetus were shown to be unaffected and HLA-identical, in agreement with PGD, by chorionic villus sampling. The cord blood stem cells from the newborn can be used to treat the affected sibling. This study demonstrates the first successful application of OmniPlex whole genome amplification in PGD of a single gene disorder for selecting unaffected and HLA-compatible embryos.

Keywords: HLA, preimplantation genetic diagnosis, β -thalassaemia, whole genome amplification

HLA typing



HBB genotyping



PGD cho rối loạn gen đơn trong phòng thí nghiệm Sofiva

Table 1 The hereditary modes, mutation sites of monogenic diseases, OPU treatment cycles, genotyping results of lymphocyte pretests and PGD of blastocysts of 33 couples.

Case	Diseases	Modes	Husband	Wife	OPU cycles	Lymphocyte test		PGD of blastocysts			
						AF	ADO	Unaffected	Affected	AF	ADO
1	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA	1	1	2	6	2	1	0
2	Neurofibromatosis type 1	AD	Normal	NF1 c.6709 C>T	1	3	7	9	3	0	1
3	Spinal muscular atrophy	AR	SMN1:SMN2 = 1:3	SMN1:SMN2 = 1:3	1	1	2	10	5	0	2
4	Duchenne muscular dystrophy	XR	Normal	DMD deletion exon 48-52	2	2	3	11	3	0	1
5	β -Thalassemia	AR	654	654	1	2	2	4	2	1	0
6	Osteogenesis Imperfecta	AD	COL1A1 c.1064_1068 del CTGGT	Normal							
7	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA							
8	Congenital deafness	AR	SLC26A4 c.916_917 ins G	SLC26A4 c.919-2 A>G							
9	Congenital deafness	AR	SLC26A4 c.919-2 A>G	SLC26A4 c.1579 A>G							
10	Spinocerebellar ataxia type 3	AD	AXTN3 (CAG)n: 14/69	Normal							
11	Duchenne muscular dystrophy	XR	Normal	DMD deletion exon 4							
12	α -thalassemia	AR	SEA	SEA							
13	Hemophilia A	XR	Normal	FB intron 22 inversion							
14	Spinocerebellar ataxia type 6	AD	Normal	CACNA1A (CAG)n: 5							
15	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA							
16	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA							
17	Osteopetrosis	AR	TCIRG1 c.1213 G>A	TCIRG1 c.196 + 5 G>A							
18	Bardet-Biedl syndrome	AR	BBS2 c.534 + 1 G>T	BBS2 c.534 + 1 G>T							
19	Spinocerebellar ataxia type 3	AD	ATXN3 (CAG)n: 14/62	Normal							
20	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA							
21	Neurofibromatosis type 1	AD	Normal	NF1 c.889-1 G>T							
22	Marfan's syndrome	AD	FBN1 c.2 T>A	Normal							
23	Hemophilia A	XR	Normal	FB intron 22 inversion							
24	Ornithine transcarbamylase deficiency	XR	Normal	OTC c.805G>A							
25	Retinoblastoma	AD	Normal	RBI c.1960 G>T							
26	α -Thalassemia	AR	FIL	SEA	1	1	3	4	0	0	1
27	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA	1	2	3	4	3	1	0
28	Retinoblastoma	AD	Normal	RBI c.862-2 A>G	1	2	2	1	1	0	1
29	Spinocerebellar ataxia type 3	AD	ATXN3 (CAG)n: 14/73	Normal	1	2	1	6	1	1	0
30	Alzheimer's disease	AD	Normal	PSEN1 c.438 G>A	1	3	0	3	2	0	0
31	Duchenne muscular dystrophy	XR	Normal	DMD duplication 19-44	1	3	3	7	1	1	1
32	α -Thalassemia	AR	SEA	SEA	1	1	3	0	1	1	0
33	Spinocerebellar ataxia type 3	AD	Normal	ATXN3 (CAG)n: 14/74	1	1	2	2	7	0	0

Human Reproduction, Vol.28, No.5 pp. 1435-1444, 2013
Advanced Access publication on March 12, 2013 doi:10.1093/humrep/det048

human reproduction ORIGINAL ARTICLE *Reproductive genetics*

Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases

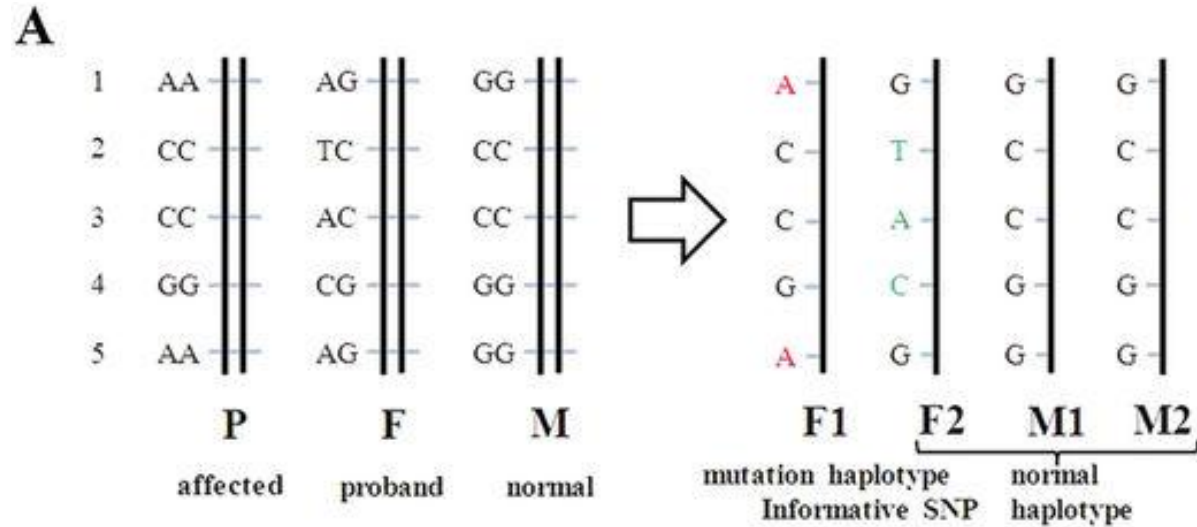
Li-Jung Chang¹, Chu-Chun Huang¹, Yi-Yi Tsai¹, Chia-Cheng Hung², Mei-Ya Fang², Yi-Chun Lin², Yi-Ning Su^{1,2}, Shee-Uan Chen^{1,3,*}, and Yu-Shih Yang¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, 8 Chung-Shan South Road, Taipei, Taiwan ²Department of Medical Genetics, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, Taipei, Taiwan ³Research Center for Developmental Biology and Regenerative Medicine, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, Taipei, Taiwan

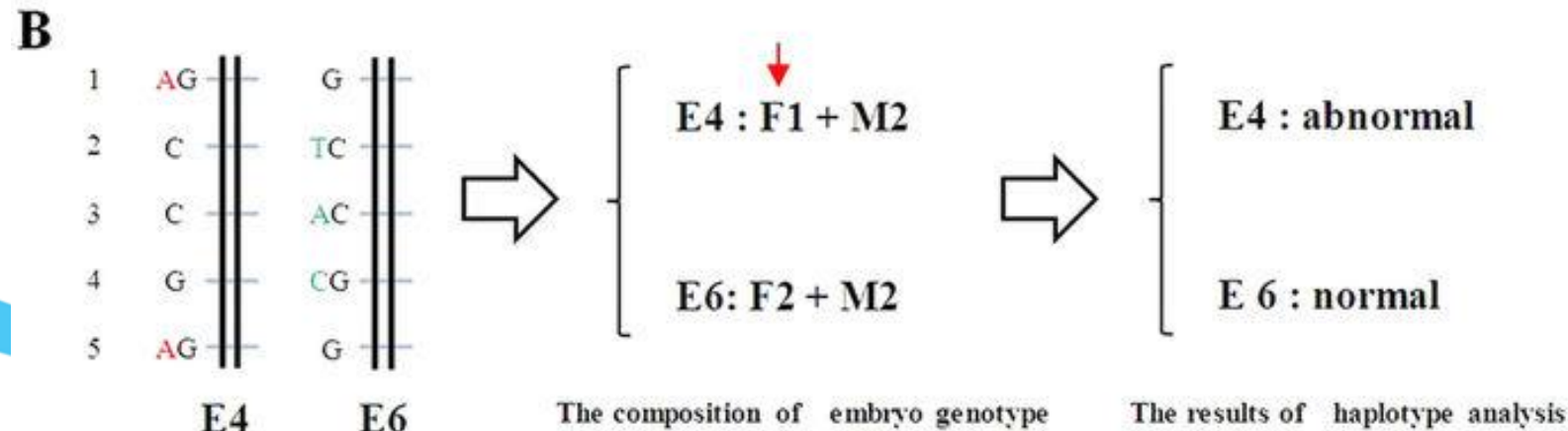
*Correspondence address. Tel: +886-2-23123456 ext. 70950; Fax: +886-2-23116056; E-mail: sheeuan@ntu.edu.tw

Submitted on October 4, 2012; resubmitted on January 26, 2013; accepted on February 8, 2013

Genome-wide karyomapping for PGD



**SNP-array based
haplotype analysis**



Scientific Reports volume6, Article number: 25488 (2016)



PGD truyền thống vs SNP-based PGD

PGD truyền thống

SNP-based PGD

Công nghệ

Specific probe (primer)
PCR
Sanger sequencing
STR marker

SNP array

Vùng đột biến

Cần phải biết trước

✓ Không cần biết trước

Coverage

Specific gene / locus

✓ Any sites coverage by SNP probes

Bất lợi

Mất thời gian để thiết kế đầu dò
Thiết kế riêng biệt khi nhiều loci

~ 90 độ chính xác
Tỷ lệ sai 1 ~ 10% tùy thuộc vào bệnh khác nhau



Chân thành cảm ơn!