

Валидация систем преимплантационного тестирования моногенных заболеваний на единичных клетках и продуктах полногеномной амплификации

Соловьёва Е.В., Канбекова О.Р., Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Минайчева Л.И.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук»
634050, г. Томск, ул. Набережная Ушайки, 10

В рамках подготовительных этапов преимплантационного тестирования 9 моногенных заболеваний (ПГТ-М) методом гнездовой ПЦР проанализированы 144 локуса (STR и патогенные варианты) 109 единичных клеток и 24 образцов продуктов полногеномной амплификации (ПГА) нескольких клеток.

Ключевые слова: ПГТ-М, амплификация единичных клеток, ПГА.

Для цитирования: Соловьёва Е.В., Канбекова О.Р., Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Минайчева Л.И. Валидация систем преимплантационного тестирования моногенных заболеваний на единичных клетках и продуктах полногеномной амплификации. *Медицинская генетика* 2020; 19(11): 63-64.
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.11.63-64

Автор для корреспонденции: Соловьёва Елена Викторовна; **e-mail:** elena.soloveva@medgenetics.ru

Финансирование Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020.

Single cell and whole genome amplification product validation of preimplantation genetic testing systems for monogenic disorders

Soloveva E.V., Kanbekova O.R., Zhigalina D.I., Minaycheva L.I., Skryabin N.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
Nab. Ushaiki, 10, Tomsk, 634050, Russia

Pre-examination single cell validation was performed for preimplantation genetic testing (PGT-M) for 9 monogenic disorders by nested PCR for STR and pathogenic variants. Totally 109 single cells and 24 WGA products (by MDA) were analyzed.

Keywords: PGT-M, single cell amplification, WGA.

For citation: Soloveva E.V., Kanbekova O.R., Zhigalina D.I., Minaycheva L.I., Skryabin N.A. Single cell and whole genome amplification product validation of preimplantation genetic testing systems for monogenic disorders. *Medical genetics*. 2020; 19(11): 63-64. (In Rus).
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.11.63-64

Corresponding author: Elena Soloveva; **e-mail:** elena.soloveva@medgenetics.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020.

Особенностью ПГТ-М является чрезвычайно малое количество образца для исследования, что определяет особые требования к амплификации ДНК. Широкий спектр моногенной патологии в сочетании с задачами точного выявления моногенного нарушения в конкретном случае, а также частое сочетание ПГТ-М с анализом анеуплоидии (ПГТ-А) определяют специфику тестирования [1]. Разработка новой системы ПГТ-М включает необходимый этап проверки системы анализа мутации и дополнительных ДНК-маркеров на единичных клетках [2]. Для амплификации ДНК единичных клеток могут быть использованы как методы амплификации определенных ло-

кусов, так и полногеномная амплификация (ПГА), а также их сочетание [3]. Каждый подход имеет определенные преимущества и недостатки.

Целью исследования стал анализ результатов отработки систем тестирования ПГТ-М на единичных клетках и продуктах ПГА нескольких клеток.

Материалы и методы

В рамках подготовительных этапов ПГТ-М для 9 моногенных заболеваний (муковисцидоз, мукополисахаридоз I типа, мукополисахаридоз II типа, микроделеция Xq24, липофусциноз 2 типа, несовер-

шенный остеогенез 1 типа, прогрессирующий семейный внутриспеченочный холестаз 2 типа, синдром коротких ребер-полидактилии 3 типа, спинальная амиотрофия), проведенных нами с мая по декабрь 2019 г., проанализировано 109 единичных клеток и 24 образца ПГА в общей сложности на 144 локуса (STR и мутации). От всех пациентов получены информированные согласия.

Единичными клетками служили лимфоциты и сперматозоиды (одну клетку помещали в 5 мкл лизирующего буфера; в общей сложности выделены единичные клетки от 7 человек). Образцы ДНК после ПГА представляли собой продукты полногеномной амплификации фрагментов трофэктодермы эмбрионов 5-6 суток развития (по 2,5 мкл ПГА-продуктов, оставшихся после клинических ПГТ-А в общей сложности от 9 эмбрионов). ПГА проводили методом амплификации по технологии множественного замещения цепи (MDA) с использованием набора «QIAGEN REPLI-g MDA WGA», входящего в состав «GenetiSure PreScreen Complete kit with MDA WGA» (Agilent). Амплификацию STR-маркеров и патогенных генетических вариантов проводили в два раунда методом гнездовой ПЦР как для единичных клеток, так и для ПГА-продуктов. Каждую серию амплификации проводили с контрольными образцами ДНК, а также отрицательными контролями. Результаты ПЦР анализировали методом полиакриламидного и капиллярного электрофореза.

Результаты

Валидация на единичных клетках и образцах ПГА проводилась после проверки созданных нами тест-систем на образцах ДНК и выбора STR-маркеров, информативных для семей, обратившихся за ПГТ-М. В настоящее исследование были включены только положительные в отношении амплификации на ДНК в двухраундной системе маркеры. В среднем на одну серию исследований (что соответствовало отработке тест-системы на одно заболевание) исследовали 8–13 клеток и 2 образца ПГА на 8–21 локус.

По данным всех исследований, отсутствие амплификации по всем маркерам было характерно для 16,5% клеток; среди ПГА-образцов таких не наблюдалось. Данная разница не вполне показательна, поскольку в исследование включены только положительные в отношении ПГА образцы, кроме того, они обычно получены не из одной, а из нескольких клеток трофэктодермы. Среди единичных клеток отрицательная амплификации обнаружена для 7 маркеров (4,9% от всех

изученных), в то время как в образцах, подвергшихся ПГА, все изученные локусы амплифицировались так же, как и в контрольных ДНК. В большинстве случаев улучшения амплификации для единичных клеток удалось достичь изменением дизайна праймеров первого раунда. Отсутствие амплификации отдельных локусов в отдельных образцах обнаруживалось в 10,9% среди единичных клеток и 0,3% среди ПГА-образцов. Характерные для малого количества ДНК проблемы, такие как отсутствие амплификации одного из аллелей (ADO) и преимущественная амплификация одного аллеля, в большей степени проявлялись для единичных клеток, однако провести объективный сравнительный анализ по данным параметрам не представилось возможным ввиду ограниченности данных о родительских генотипах для продуктов ПГА.

Метод двух-раундной ПЦР позволяет добиваться необходимой для ПГТ-М амплификации как на единичных клетках с ПГА, так и без ПГА. Использование единичных клеток дает возможность избежать затратного этапа ПГА с получением достаточного объема информации в отношении моногенного нарушения. Кроме того, такой подход позволяет провести гаплотипирование по единичным сперматозоидам, что важно для отдельных случаев. В то же время, такой подход может потребовать больше затрат в связи с худшими показателями амплификации как по отдельным клеткам, так и по отдельным локусам (повтор дизайна и анализа, увеличение числа клеток и маркеров). Применение ПГА (амплификация ДНК нескольких клеток методом MDA) в комбинации с гнездовой ПЦР позволяет получить результат на меньшем количестве образцов с лучшими параметрами амплификации. В случае валидации систем только на продуктах ПГА необходимо рассчитывать на соответствующий этап при ПГТ-М. К преимуществам применения ПГА можно отнести универсальность начального этапа всех ПГТ-М, возможность повторить или проверить анализ, исследовать дополнительные маркеры, а также возможность сочетать с ПГТ-А.

Литература/ References

1. Simpson J.L., Rechitsky S., Kuliev A. Before the beginning: the genetic risk of a couple aiming to conceive. *Fertil Steril.* 2019;112(4):622-630. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.08.002.
2. Harton G.L., De Rycke M, Fiorentino F. et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction.* 2011,1: 33–40. doi:10.1093/humrep/deq231.
3. Deans Z., Fiorentino F., Biricik A. et al. The experience of 3 years of external quality assessment of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *European Journal of Human Genetics.* 2013;21:800–806. doi: 10.1038/ejhg.2012.244.