

不同单细胞全基因组扩增方法的比较及 MALBAC 在辅助生殖中的应用

姚雅馨¹, 喇永富², 狄冉¹, 刘秋月¹, 胡文萍¹, 王翔宇¹, 储明星¹

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193

2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070

摘要: 单细胞全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)是指在单细胞水平对全基因组进行扩增的新技术, 其原理是将分离的单个细胞的微量全基因组 DNA 进行扩增, 获得高覆盖率的完整的基因组后进行高通量测序, 用于揭示细胞异质性。目前, WGA 方法主要包括引物延伸预扩增(primer extension preamplification PCR, PEP-PCR)、简并寡核苷酸引物 PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)等。本文对不同的单细胞 WGA 方法的原理及应用情况分别进行了阐述, 并对其扩增效率进行评价和比较, 包括基因组覆盖度、均一性、重现性、SNV (single-nucleotide variants)和 CNV (copy number variants)检测力等。综合对比不同单细胞 WGA 方法后发现, MALBAC 的扩增均一性最高、等位基因脱扣率最低、重现性最好, 且对于 CNV 和 SNV 的检测效果最好。本文还阐述了 MALBAC 技术在人类单精子减数重组、非整倍体分析以及人类卵细胞基因组研究中的应用。

关键词: 单细胞全基因组扩增; MALBAC; DOP-PCR; MDA; 单细胞

收稿日期: 2018-04-07; 修回日期: 2018-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31772580, 31472078), 国家肉羊产业技术体系专项(编号: CARS-38), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: Y2017JC24), 中国农业科学院科技创新工程(编号: ASTIP-IAS13), 农业科研杰出人才及其创新团队项目和国家万人计划科技创新领军人才项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31772580, 31472078), Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No. CARS-38), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. Y2017JC24), Agricultural Science and Technology Innovation Program of China (No. ASTIP-IAS13), China Agricultural Scientific Research Outstanding Talents and Their Innovative Teams Program, China High-level Talents Special Support Plan Scientific and Technological Innovation Leading Talents Program]

作者简介: 姚雅馨, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: yaoyaxin0602@126.com

喇永富, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: 545042995@qq.com

姚雅馨和喇永富为共同第一作者。

通讯作者: 储明星, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: mxchu@263.net

DOI: 10.16288/j.yczs.18-091

网络出版时间: 2018/7/2 19:06:45

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180702.1906.002.html>

Comparison of different single cell whole genome amplification methods and MALBAC applications in assisted reproduction

Yaxin Yao¹, Yongfu La², Ran Di¹, Qiuyue Liu¹, Wenping Hu¹, Xiangyu Wang¹, Mingxing Chu¹

1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Single-cell whole genome amplification (WGA) is a new technology, which can amplify small amounts of DNA from single cell and obtain the high coverage whole genome DNA template for revealing cell heterogeneity. Single cell WGA methods mainly include primer extension preamplification PCR (PEP-PCR), degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR), multiple displacement amplification (MDA), and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC). In this review, we describe the principles and applications of different single cell genome wide amplification, and we evaluate and compare their amplification efficiency, including the coverage of genome, homogeneity, reproducibility, and detection power of single-nucleotide variants (SNV) and copy number variants (CNV). The results show that MALBAC have the highest amplification homogeneity, the lowest allelic gene knockdown rate, the best reproducibility, and the best detection effect on CNV and SNV. We also describe the applications of MALBAC in human single sperm meiosis, aneuploidy analysis, and human oocyte genome research.

Keywords: single cell whole genome amplification ; MALBAC ; DOP-PCR ; MDA ; single cell

单细胞研究是当前生命科学研究的重要方向之一。许多关键的生命活动都和细胞间的个体差异密切相关,许多重要的生命科学和医学问题所能依赖的样品往往也是极少数细胞。在单细胞的基因组学研究中,由于细胞内 DNA 的含量极少,因此首先需要通过全基因组扩增技术将 DNA 进行扩增。全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)是一种对极低起始量的基因组进行非选择性扩增的技术,其目的是在没有序列倾向性的前提下大幅度增加 DNA 总量,以满足后续分析需求^[1]。近年来,随着二代测序的发展和全基因组分析的不同需求,不同的 WGA 技术得到了相应的开发。本文综述了全基因组扩增技术的研究应用,并且比较了各种 WGA 技术的扩增效果,旨在为相关领域的科研工作提供借鉴参考。

1 不同单细胞全基因组扩增方法的介绍

全基因组扩增技术从 1992 年出现至今已产生了多种方法,主要可以分为 3 类:一类为基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的 WGA 方法,如引物延伸预扩增(primer extension preamplification PCR, PEP-PCR)和简并寡核苷酸引物 PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR);一类为恒温全基因组扩增反应,如多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA);另一类为多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)。随着高通量测序技术的发展,科研人员在细胞分选技术、核酸扩增技术、信噪比提高等方面进行不断优化

和改进,进一步开创了乳液全基因组扩增(emulsion whole-genome amplification, eWGA)、通过转座子插入的线性放大(linear amplification via transposon insertion, LIANTI)、微流体反应器法单链测序(single-stranded sequencing using microfluidic reactors, SIS-SOR)等技术。

1.1 PEP-PCR

在单细胞 WGA 方法中, PEP-PCR 是使用较早的一种方法。Zhang 等^[2]最早应用 PEP-PCR 方法实现了单个单倍体细胞基因组的全扩增。其基本原理是使用 15 个碱基长的随机引物在 37℃ 进行较长时间的退火, 然后缓慢升温至 55℃ 进行长时间的引物延伸, 如此反复多个循环。Anchordoquy 等^[3]对其进行了改良优化, 包括对模板 DNA 的提取方法、反应循环条件的优化以及高保真聚合酶的使用等。但是由于 PEP-PCR 方法使用随机引物以及较为不严格的 PCR 循环参数, 因此可能导致不平衡的扩增^[4, 5]以及较大程度上限制了该方法的应用。目前, 该方法的

研究报道较少。María 等^[6]利用 PEP-PCR 方法检测人类亮氨酸氨肽酶(leucyl aminopeptidase, LNPEP)基因编码的胰岛素氨基肽酶 rs4869317 多态性, 同时利用限制性内切酶消化检测验证该方法, 发现以上两种方法结果一致。

1.2 DOP-PCR

与 PEP-PCR 类似, DOP-PCR 也是一种基于 PCR 技术的全基因组扩增方法, 最早由 Telenius 等^[7]提出。其基本原理是使用部分简并的引物进行 PCR 反应(引物中间部分含有 6 个随机碱基), 在最初的几个循环过程中使用较低的温度(25℃)进行退火以确保引物与模板结合, 并缓慢升温至引物延伸温度进行引物延伸, 完成最初几个循环后使用相对较高的退火温度(55℃)进行多循环常规 PCR 反应^[8](图 1)。美国 Sigma-Aldrich 公司的 GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit 就是基于 DOP-PCR 技术研发出来的。尽管 DOP-PCR 技术具有简单、快速和廉价的优势, 但是该技术具有灵敏度低和错误率高

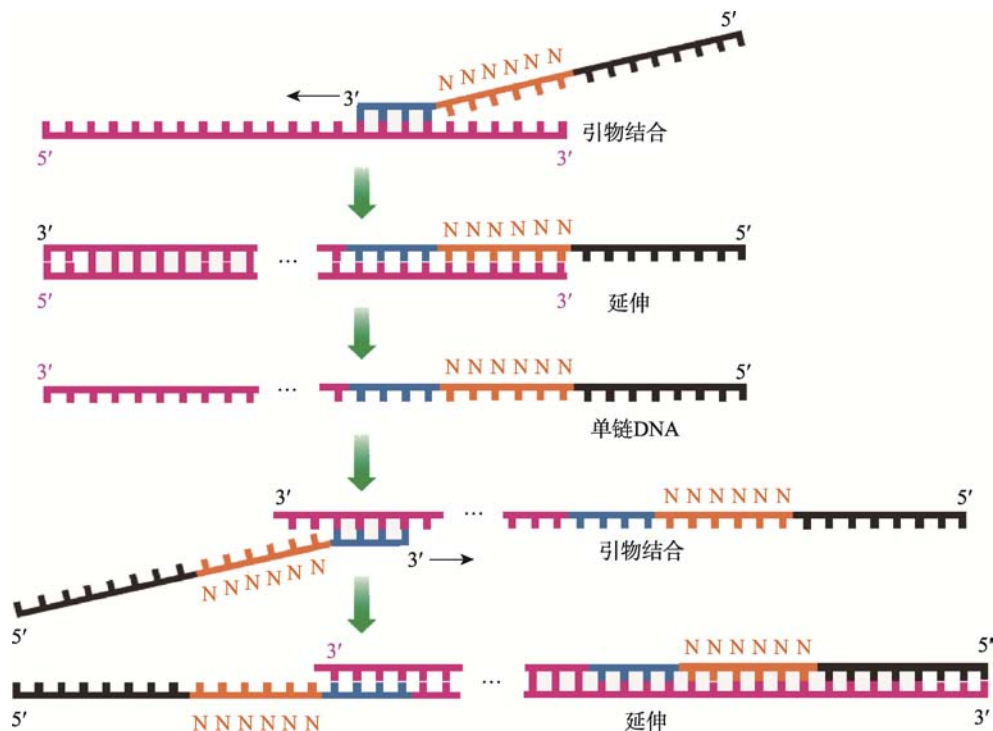


图 1 简并寡核苷酸引物 PCR 原理示意图

Fig. 1 Schematic of the degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction

含有 6 个随机碱基(N)的引物首先与模板结合, 然后在适当的温度下从 5'端向 3'端延伸形成单链 DNA, 之后引物从单链 3'端结合进行延伸最终形成双链 DNA。参考文献^[8]修改绘制。

等不足^[8]。因此, Konstantin 等^[9]在 DOP-PCR 技术的基础上通过调整引物设计以及热稳定 DNA 聚合酶对该技术进行改进, 从而发明了一种改进的 DOP-PCR (improved degenerate oligonucleotide-primed PCR, iDOP-PCR) 技术, 该技术与传统的 DOP-PCR 技术相比具有更高的扩增质量和效率。

1.3 MDA

MDA 出现较晚, 最早由 Dean 等^[10]以传统的 WGA 技术为基础改进而成。该方法首先由随机 6 碱基引物在多个位点与模板 DNA 退火, 然后 phi29 DNA 聚合酶在 DNA 的多个位点同时开始复制; 复制合成的 DNA 取代模板的互补链, 同时被置换的互补链又成为新的模板来进行扩增(图 2)。因此, 利用该技术可以获得大量高分子量的 DNA。由于 MDA 是恒温扩增, 所以存在一定的非特异性扩增问题。此外, 该方法对模板质量的要求相对较高, 在非最佳实验条件下亦可导致非均衡扩增^[11]。Gilbert 等^[12]基于 MDA 技术发明了一种用于进行多重置换扩增

反应的方法试剂盒和系统, 该试剂盒中包括几种聚合酶、引物和纯化试剂, 在进行扩增时将核酸与反应液(寡核苷酸引物与几种聚合酶以及纯化试剂按比例混合)混合之后按照扩增产物所需条件进行扩增, 从而使得该方法更为简单快捷。

1.4 MALBAC

2012 年底, 谢晓亮等在 *Science* 杂志上连续发表两篇应用其新发明的 WGA 方法进行单细胞测序研究的文章, 引出“多次退火环状循环扩增技术”(MALBAC)这一全新的 WGA 方法^[11]。MALBAC 结合了 MDA 与 PCR 方法的特点, 使用 35 nt 长的引物由一段固定的 27 nt 通用引物序列和 8 nt 随机碱基序列(N8)组成。在 0 时, 8 nt 随机碱基序列与模板随机结合, 梯度升温至 65 后在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下发生链置换聚合反应, 得到一系列长度不一的(0.2~2.0 kb)半扩增子(semi amplicons); 在 94 变性、0 退火以及 65 延伸循环后, 以上一循环中的半扩增子为模板形成了两端具有互补结

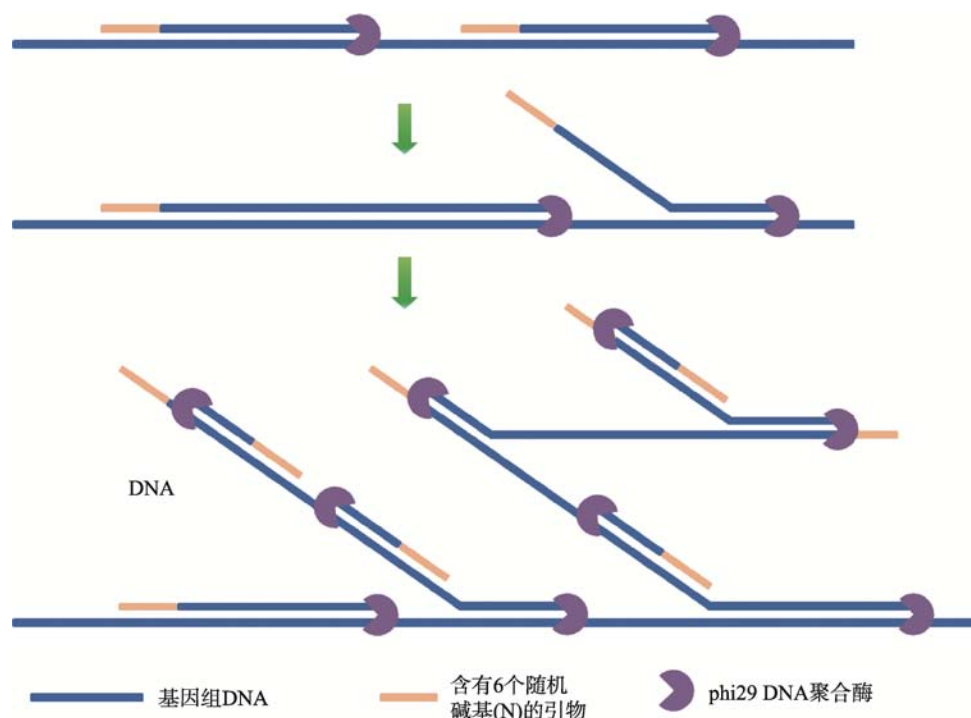


图 2 多重置换扩增原理示意图

Fig. 2 Schematic of multiple displacement amplification

首先含有 6 个随机碱基(N)的引物在恒温条件下与基因组随机退火, 并在具有强链置换活性的 phi29 DNA 聚合酶的作用下发生链置换扩增反应, 置换产生的单链序列又可与随机引物任意退火延伸, 形成超分支扩增结构。参考文献^[8]修改绘制。

构(27 nt)的全扩增子(amplicons) 随后降低温度至 58 使得到的扩增子两端互补形成环状结构,从而可以避免引物与其进行结合导致指数扩增,因此可以很大程度上保证该循环发生的是线性扩增。在经过线性扩增循环后可得到大量全扩增子并作为指数扩增反应的模板,并使用该 27 nt 通用引物进行指数 PCR 反应,因此只有全扩增子才能得到有效扩增,从而实现对整个基因组的高效而又均衡的全扩增(图 3)。应用该方法成功实现了单细胞水平的单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs)以及拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的研究^[13]。由于 MALBAC 克服了对微量初始模板进行 PCR 放大过程中产生的偏倚,对单细胞全基因组扩增具有很高的覆盖率(93%)和均衡性,所以一经问世便在业内引起巨大轰动。

1.5 eWGA

eWGA 利用微流控技术,将一个细胞的基因组片段分散在包含有几十万个皮升量级微型反应液滴的乳液中,其中每个液滴中含有约一个待扩增的 DNA 片段和用于等温 MDA 的其他原料。对整个乳液体系进行等温扩增时,每个分隔的液滴内都在进行独立的扩增反应。这些独立的反应之间虽然在动力学上存在显著差异,但是在这一受限体系内可以相继达到饱和。这样,每个片段的扩增比起传统的 MDA 反应,在均匀性上得到了显著改善,同时由于使用了高保真的聚合酶还可以保证扩增结果的高度准确性。实验结果表明,eWGA 方法超越了以往的单细胞扩增方法,提供了更好的扩增均匀性、更完整的基因组覆盖率和最好水平的复制准确率,无需

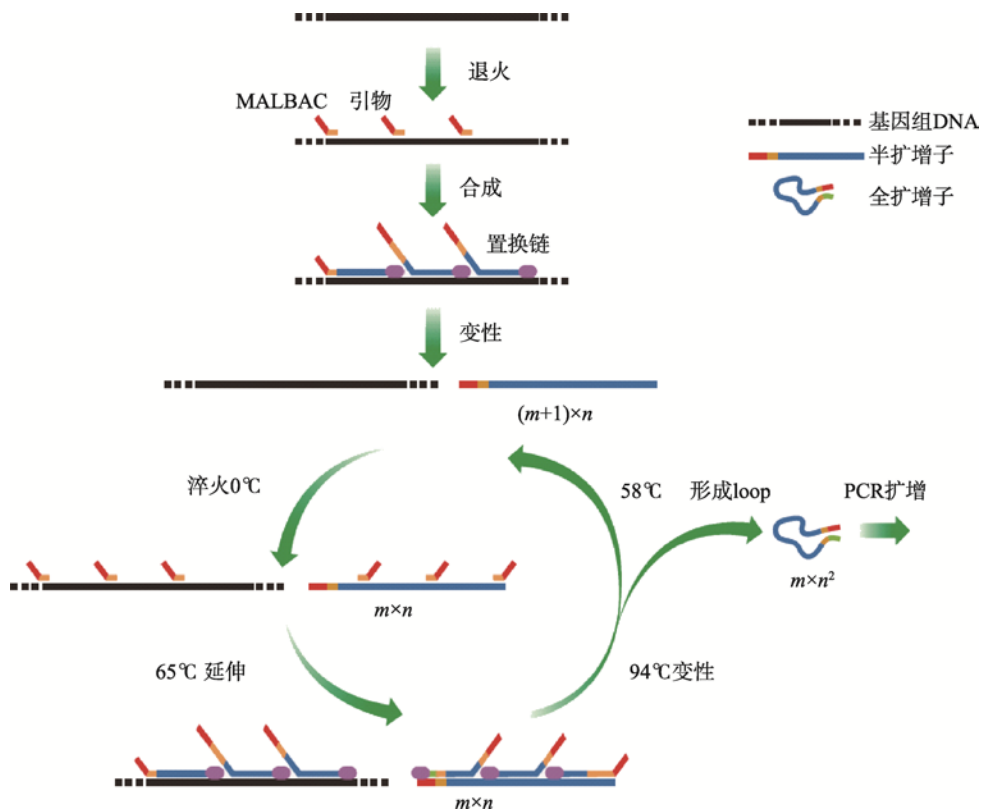


图 3 多次退火环状循环扩增技术原理示意图

Fig. 3 Schematic of multiple annealing and looping-based amplification cycles

首先 35 nt 长的引物与模板随机结合,梯度升温至 65 后在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下发生链置换聚合反应,得到一系列长度不一的(0.2~2.0 kb)半扩增子;在 94 变性、0 退火以及 65 延伸循环后,以上一循环中的半扩增子为模板形成了两端具有互补结构的全扩增子。 m 是温度循环的次数; n 是结合的引物数量; $(m+1) \times n$ 是第 m 个循环中存在的半扩增子的数量; $m \times n^2$ 是第 m 个循环中生成的所有扩增子的数量。参考文献^[8]修改绘制。

矫正即可准确检测单个细胞中尺寸更小的 CNV 并同时实现高精度的 SNV 检测。将该方法应用于单个癌症细胞中的 CNV 检测,最高尺寸分辨率可以达到 250 kb。此外,该方法兼容常见的序列富集方法如外显子富集,具备广阔的医学诊断应用前景。综合考虑,eWGA 使得从一个单细胞出发的精确 CNV 和 SNV 检测成为可能,是目前最好的单细胞全基因组扩增技术^[14]。

1.6 LIANTI

LIANTI 是一项经过改良的单细胞全基因组扩增方法。LIANTI 法首先利用 Tn5 转座子结合 LIANTI 序列,形成 Tn5 转座复合体(含 T7 启动子),之后该复合体随机插入单细胞基因组 DNA,经转座后,将 DNA 随机片段化并连接 T7 启动子。随后 T7 启动子行使体外转录功能,用转录获得大量线性扩增的转录本,转录本再经过逆转录之后得到大量的扩增产物,随后进行正常的建库测序操作。整个过程仅进行线性扩增,没有进行指数扩增,大大增强了扩增稳定性,降低 PCR 干扰。此外,该技术将测量拷贝数的空间分辨率提高了 3 个数量级(能在千碱基分辨率进行微 CNV 检测,基因组覆盖率可达到 97%),助力更有效、更精准地检测出更多遗传疾病^[15]。

1.7 SISSOR

SISSOR 利用微流体处理器将单个细胞染色体 DNA 的正负双链进行分离,并将百万碱基大小的 DNA 片段随机分割成大量的纳升级的组分,用于扩增和构建测序文库,从而实现对同源染色体的互补双链分别进行独立的测序。这样就能够进行 Long-range 单倍体的组装,并且还能利用冗余和单倍体信息纠正测序错误。结果显示,该方法的纠错能力可以将单细胞测序错误率降低至 10^{-8} ,并且单倍体片段平均可组装长度为 500 kb,contig 达到 N50 大于 7 Mb。该方法能够获得精准的单细胞基因组序列以及单倍体信息以满足临床对基因组测序的不同需求。SISSOR 是对单细胞测序技术的一次突破,将测序准确性提高了两个数量级。这项技术潜在的应用包括对患者血液中循环肿瘤细胞进行准确的检测,以及对体外受精的健康胚胎进行筛选和检测经过基因编辑的人体细胞^[16]。

综上所述,PCR 类全基因组扩增方法对样品质量要求相对较低且扩增效率高,但全基因组扩增产物片段较短,指数反应易导致所有片段的非均衡扩增;而 MDA 法成功应用的前提是高质量基因组模板的获得,其扩增产物较为均衡且更有利于全基因组测序;但无论 PCR 类方法或是恒温全扩增方法,目前都存在一定的非特异性扩增现象,即使在较为严格的 PCR 反应条件下这一问题仍无法完全避免。MALBAC 的扩增效率好于其他商业方法,因此适用于单个细胞的分析,特别是生殖细胞的全基因组分析。

2 不同单细胞全基因组扩增方法的比较

WGA 能对整个基因组进行扩增,从而满足后续分析的要求。然而,如何将基因组 DNA 进行均匀和精确的全基因组扩增具有极大的挑战性。扩增均匀性不够,将降低覆盖率和分辨率,并增加等位基因脱扣的几率;扩增精确性不够,则将导致大量假阳性结果。因此,全基因组扩增技术的优劣严重影响极少量 DNA 分析的精确度及准确性。

De Bourcy 等^[17]对不同单细胞全基因组扩增方法进行了定量比较,通过比较均一性、错误率以及模板污染水平等评价了 MDA、MALBAC 和 PEP 3 种单细胞扩增方法的优劣,并且对 3 种方法的 CNV 分析、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)检测以及 *de novo* 全基因组拼接的效果进行了比较。研究发现,MDA 的扩增产率越高,其扩增均匀性越低,MALBAC 和 PEP 的扩增均匀性与扩增产率的关系相对于 MDA 没有那么敏感。另外,当扩增产率高于 10^6 时,MALBAC 和 PEP 的覆盖度都高于 MDA;而当扩增产率高于 2.5×10^3 时,MALBAC 和 PEP 检测 CNV 的效果优于 MDA。但是,当扩增产率小于 5×10^6 时,3 种方法均不能很好地用于 *de novo* 拼接,拼接效果无差异。Nie 等^[18]在进行常规短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分型之前加入全基因组扩增步骤,并从等位基因不平衡、等位基因丢失、伪等位基因、基因座丢失等 4 个方面比较了 MDA 和 PEP 两种全基因组扩增方法对微量 DNA 分型的效果。发现 MDA 扩增效率较高,但

是等位基因丢失和伪等位基因严重；PEP 技术分型正确率高于 MDA 技术，但小片段 DNA 优势扩增现象较严重；最后得出结论 MDA 技术不适用于 STR 分型。

eWGA 相对于其他技术具有更好的扩增均匀性、基因组覆盖率和高精度的 SNV 检测^[14]。LIANTI 法消除了其他单细胞全基因组扩增方法中的非特异性启动和指数扩增，极大地降低了扩增偏差和误差。Chen 等^[15]分别利用 LIANTI、MDA、MALBAC 和 DOP-PCR 方法扩增人类皮肤成纤维细胞并进行系统比较，发现 LIANTI 扩增效率以及均匀性高于其他 WGA 方法，其中基因组覆盖率为 97%，ADO 为 17%。在检测时 LIANTI 达到最低的 CV 值，从而达到最准确的 CNV 检测。常见的方法如 DOP-PCR、MDA、MALBAC 等需要用 DNA 聚合酶对细胞基因组进行大量的体外扩增，然后构建文库进行相对读长较短的高通量测序。这些方法有两个明显的缺点：(1)聚合酶的错误扩增产生假阳性；(2)短的序列读长几乎不包含任何单倍体类型信息。面对以上问题，张鹄教授团队研发了 SISSOR 技术，该技术能够准确进行单细胞基因组测序和单倍型分析^[16]。以上 3 种方法虽然效率高、准确性好，但是由于出现较晚，目前应用较少。

目前，最经典的单细胞扩增方法主要包括 MDA 和 MALBAC，MALBAC 的扩增均一性优于 MDA。以人类 1 号染色体为例，MALBAC 的扩增均一，约 93% 的覆盖度，适合进行染色体分析，而 MDA 的扩

增不均一，只有约 70% 的覆盖度，不适合进行染色体的 CNV 分析。另外，MALBAC 检测到的杂合 SNP 明显多于 MDA。Chen 等^[19]从 NCBI Short Read Archive 数据库中获得 MDA 和 MALBAC 扩增单精子的测序数据，同时获得 MALBAC 扩增的同一个人的血样测序数据，通过比较覆盖度、均一性、特异性和 SNPs 检出率可以客观比较二者的扩增效率。结果显示，MALBAC 的覆盖度约为 75%，而 MDA 的覆盖度仅为 30%，MALBAC 的覆盖度明显优于 MDA，MALBAC 的扩增产物浓度低于 MDA。He 等^[20]利用 MDA 和 MALBAC 技术对 β 地中海贫血基因分型、单核苷酸多态性以及拷贝数变异分析，并统计分析两种方法的扩增效率、敏感性以及等位基因脱扣率，发现 MDA 技术的扩增效率比 MALBAC 高，能更好地检测出 SNPs。然而在单细胞水平进行 CNV 检测时发现 MALBAC 比 MDA 具有更好的稳定性，从而得出结论 MALBAC 更适合 CNV 检测而 MDA 更适合于 SNV 检测。

研究发现 MDA 的扩增产率与扩增偏倚性存在相关性，产率越高偏倚性越高。所以可通过控制 MDA 的扩增产率来降低偏倚性，而 MALBAC 和 PEP 的扩增偏倚性与产率的关系不明显；另外 MALBAC 和 PEP 更适合进行 CNV 分析；在序列拼接方面，3 种方法并没有表现出明显的差异。综上所述，3 种 WGA 技术各有优缺点，研究者应当根据需要选择合适的方法(表 1)。

等位基因脱扣(allele dropout, ADO)是单细胞全

表 1 不同单细胞全基因组扩增方法的优缺点比较

Table 1 The validation of different single cell WGA methods

| WGA 技术 | 原理 | 优点 | 缺点 | 参考文献 |
|---------|---------------------------|---|---|---------|
| MALBAC | 多重退火环状循环扩增技术结合恒温扩增与 PCR 法 | 操作简单，产量高，最低起始模板几个 pg，结果可靠可重复，且灵敏度高，扩增均衡度高 | 起始模板量极低时扩增难度加大；模板拷贝数极低时易扩增偏差，可能出现非特异性扩增 | [12,16] |
| DOP-PCR | 部分随机引物法基于 PCR 法 | 操作简单，最低起始模板量达 50 pg，产物片段大小 0.5~10 kb | 起始模板量低时扩增偏差大 | [6~8] |
| PEP-PCR | 完全随机引物法基于 PCR 法 | 对模板 DNA 质量要求低，操作简单，易改进，50 ng 起始模板可产 0.2~0.5 μ g 产物，最低起始模板量可达 5 pg | 产量低，保真性差；使用随机引物易产生扩增偏差及片段丢失 | [21,22] |
| MDA | 多重置换扩增恒温扩增法 | 产量高，50 ng 起始模板量可产生 10~20 μ g 产物，最低起始模板量可达 10 pg，忠实性好 | 起始模板量低时扩增偏差大，对模板质量要求高，可能产生非特异性产物 | [10,11] |

基因组扩增的特性之一,也是导致单碱基突变漏报的关键诱因。MALBAC 与其他单细胞全基因组扩增方法比较,其 ADO 率较低。MALBAC 的扩增均一性最高、等位基因脱扣率最低,所以对于 CNV 分析和 SNV 检测, MALBAC 的效果最好。Liu 等^[23]利用 MALBAC 和 MDA 方法在单细胞水平上检测成肌纤维细胞样本的 CNV 和 ADO,并用高通量测序结果进行评估比较。发现 MALBAC 和 MDA 对样本 CNV 检测成功率分别为 100% 和 91.67%,总 ADO 分别为 4.55% 和 22.5%。然而当提高起始模板浓度时,ADO 率显著降低,并且这两种方法之间没有显著差异。基于二代测序技术的 CNV 分析结果,通常以变异系数(coefficient of variation, CV)作为评估其扩增均一性的关键参数, CV 值越低, CNV 分析的准确性越高。在同等条件下,利用 MALBAC 技术进行 CNV 分析的效果好于其他 WGA 方法,说明 MALBAC 比其他方法更适合于 CNV 分析。

3 MALBAC 技术在辅助生殖中的应用

3.1 MALBAC 技术在精子与卵细胞中的应用

从卵母细胞的减数分裂开始到与精子融合形成受精卵的过程中,每一个生殖细胞的健康对新生儿的健康都至关重要。在这个过程中,要经历父系和母系染色体交叉以及基因组重组,从而导致人类的进化以及遗传多样性。正常男子的精细胞非整倍体的概率为 3%~4%,这是由于染色体异常导致的,该概率不会随着年龄的增长而改变。精子细胞的这种非整倍体会导致流产或家族遗传病的产生^[24-26]。然而,卵母细胞发生非整倍性的概率显著高于精子细胞,并且会随着女性年龄的增长显著增高。卵母细胞非整倍性是导致婴儿出生率下降的一个主要因素^[27]。每个人的生殖细胞都具有独特的基因组,因此第一例单精子细胞测序技术应运而生^[28, 29]。

Lu 等^[28]使用 MALBAC 技术对一个亚洲男性的体细胞和 99 个精子进行全基因组扩增,并深度测序检测了个人全基因组,绘制了重组图谱。该研究发现随着常染色体非整倍体增加,重组频率降低;个体水平上基因区附近的重组率有降低的现象,证明

了这一现象由分子机制决定而非自然选择的结果。该研究成功使用 MALBAC 在每次核减数分裂的基础上直接进行减数重组和染色体分裂错误检测,构建了迄今为止覆盖度最高的单精子基因图谱,证明了 MALBAC 技术可以用于基因组不稳定性 and 男性不育等研究。Sha 等^[30]利用 MALBAC 和新一代测序技术对罗伯逊易位携带者单精细胞进行全基因组分析,全面描绘出来自两个罗伯逊易位携带者的 88 个单精子的染色体拷贝数,从而在全基因组鉴定染色体畸变,为研究染色体疾病提供了工具。研究表明基于 MALBAC 的测序技术可以用于人单个卵细胞基因组分析^[8]。通过对来自同一个卵母细胞的第一极体、第二极体以及卵细胞进行测序,绘制了卵母细胞的重组图谱。通过第一极体和第二极体的基因组检测成功推测了卵细胞的基因组,包括非整倍体信息以及与疾病相关等位基因的 SNPs,说明了基于 MALBAC 的胚胎植入前遗传学筛查可以准确、低成本筛选正常的卵细胞进行胚胎移植。

3.2 MALBAC 用于胚胎植入前遗传学筛查/诊断

体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)、胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)、胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)可避免以往产前诊断方式可能的治疗性引产给母体带来精神和身体上的创伤,因而受到了生殖和遗传领域专家们的关注。

常染色体显性遗传性多囊肾(autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD)是常染色体显性遗传病,具有家族聚集性,男女均可发病。利用 MALBAC 技术可在胚胎植入前进行基因诊断并筛选胚胎细胞,从而获得染色体正常的健康后代^[31]。也有研究者利用 3 对年龄小于 35 岁的患病夫妇体外受精得到的 23 个处于卵裂期的胚胎,分别使用 MALBAC、比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)和 SNP 3 种方法比较检测染色体非整倍性的效果。结果在 23 个胚胎中,18 个胚胎的 MALBAC 检测结果与 CGH 或 SNP 一致,其中 8 个胚胎的 3 种方法检测结果完全一致。就整倍体而言,这 23 个胚胎中只有 6 个是二倍体。说明了 MALBAC 检测结果的可靠性及一致性优于其他两

种方法, MALBAC 的可靠性与一致性最好^[32]。

PGS 和 PGD 技术可以帮助患者选择无单基因病和染色体异常的胚胎。第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)大大提高了 PGD/PGS 准确度, 其成本也在快速降低。但是 PGD 的准确度受到了 SNV 假阳性和假阴性的限制, 这些假阳性和假阴性的结果对 IVF 的影响是不可接受的。

研究利用 MALBAC 技术对胚胎活检样本进行全基因组扩增后, 为避免 ADO 的产生, 使用连锁分析的方法, 比如短串联重复(STR)或者核型定位^[33], 来避免假阳性和假阴性的产生。现有的技术对同一个胚胎进行 SNV、CNV 检测以及连锁分析需要分开进行。研究者报道了一种新的以 NGS 为基础的 PGD/PGS 的检测方法, 它能同时检测到单基因病和非整倍体, 还能以较低的成本进行连锁分析, 这种检测方法叫测序揭示突变等位基因同时进行染色体异常和连锁分析(mutated allele revealed by sequencing with aneuploidy and linkage analyses, MARSALA), 它融合了 MALBAC 单细胞全基因组扩增技术。通过对 MALBAC 扩增产物进行 PCR 扩增检测单基因疾病相关的 SNV、CNV 来检测非整倍体。SNV 检测中的假阳性和假阴性可以用基于 NGS 的连锁分析规避。使用这种胚胎选择方法, 已有两个不携带父母单基因病的健康孩子出生, 这两种单基因疾病分别是来自父亲的常染色体单碱基突变和来自母亲的 X 染色体单碱基突变引起的。

3.3 MALBAC 技术用于染色体平衡重排携带者的囊胚染色体分析

染色体平衡重排(chromosomal rearrangements, CRs)是人类中最为常见的遗传异常。虽然荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridisation, FISH)被广泛应用于染色体重排携带者^[34], 但极少证据证明它能够有效地预测胚胎在之后的发育过程中的染色体组成。嵌合现象可能更常见于染色体重排携带者的囊胚中, 尤其是携带重排相关的染色体。已有的调查研究表明未知染色体异常的患者, 其囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblast, TE)染色体的组成高度一致, 染色体平衡重排, TE 检测可能会因为胚胎嵌合而被混淆^[35]。所以

基于卵裂期 FISH 的 PGD 不能精确检测重排相关染色体的不平衡, 也不能有效反映相关囊胚的染色体组成。芯片技术的胚胎植入前遗传学诊断(PGD)被广泛应用于染色体重排携带者^[36], 以选择正常或染色体平衡的胚胎进行移植。

此外, 非整倍体常见于染色体平衡重排携带者的胚胎甚至常见于正常/平衡的胚胎的重组相关的染色体^[37]。Gui 等^[38]以染色体平衡重排携带者的早期囊胚内细胞团和滋养外胚层为研究对象, 首次对其染色体组成的一致性进行了研究。通过 MALBAC 单细胞全基因组扩增结合低覆盖度的下一代测序技术(NGS)的全基因组拷贝数变异分析, 筛查了 ICM 和 TE 的染色体非整倍体和重组相关染色体的非平衡异常, 结果显示, 染色体平衡重排携带者 ICM 和 TE 的染色体组成高度一致, 而且基于卵裂期 FISH 进行 PGD 并不够准确。所以, 检测染色体平衡重排携带者的胚胎染色体非平衡, 建议以 TE 作为活检细胞进行基于 NGS 的 PGD 检测。

3.4 基于 MALBAC-NGS 的无创胚胎染色体筛查(NICS)技术

单细胞全基因组测序有助于破译基因组异质性, 并有助于分析微量遗传物质, 如人类胚胎细胞中的遗传物质。线粒体虽然是真核细胞遗传物质的重要组成部分, 但是在单细胞基因组分析中经常被忽略。近年来, 基于 MALBAC 开发的单细胞全基因组扩增方法 MALBAC-NGS, 用于在单细胞水平同时分析染色体和线粒体基因组。该技术通过一系列技术和生物学复制得到验证, 并用于来自 81 对夫妇的 399 个体外受精胚胎的染色体和线粒体拷贝数分析。发现母亲的年龄与线粒体数量成正相关。在成功植入的胚胎中检测到线粒体数量较低但差异不显著, 表明该方法可能用于胚胎植入前基因筛选, 同时评估染色体组成和线粒体拷贝数^[39]。也有研究通过 MALBAC 技术结合第二代高通量测序的方法, 检测培养至囊胚期的培养液, 获得 24 条染色体的非整倍体情况, 通过对比培养液与对应整个胚胎(供体胚胎)的染色体非整倍体情况, 对 NICS 技术用于胚胎植入前染色体筛查做出评价, 评价结果显示 NICS 样本与胚胎样本存在高度的相关性, 敏感度和特异性

达 88.2% 和 84%。鉴于这样的评价结果, 经患者同意后, 研究使用 NICS 的方法完成了对平衡易位家庭胚胎的染色体检测, 挑选染色体正常的胚胎移植后, 患者成功怀孕并活产一健康男婴^[40]。由此可见, NICS 是一项操作简便、无创安全的胚胎植入前检测方法, 可有效提高胚胎移植成功率。

4 展 望

“精准医疗”的提出使得基因检测技术快速发展, 而基于全基因组扩增技术的单细胞测序技术作为精准医疗最生动的案例也被大力应用于临床。而单细胞测序在辅助生殖领域的应用需朝着以下方向发展: 首先, 实现无创, 由于 WGA 技术对微量 DNA 的高度敏感性, 利用胚胎培养液中的游离 DNA 这种无创的获取样本的方式代替有创的胚胎活检, 将降低胚胎的安全性风险, 未来对于胚胎的染色体水平甚至单基因水平检测, 势必将朝着无创的方向发展; 其次, 对于胚胎质量的评价除了基因组水平还应朝向转录组水平甚至表观遗传方向发展, 以全面分析胚胎的质量和发育潜能; 再次, WGA 技术如何同时满足扩增准确性和操作便捷性, 将是科研工作者未来努力的方向。随着全基因组扩增技术的不断发展以及检测技术的不断更新, 相信全基因组扩增技术将被应用于越来越多的领域, 为更多的科学研究提供坚实的基础。

参考文献(References):

- [1] Cai HQ, Liu HT, Shi B, Li A, Tang WR, Luo Y. Whole genome amplification and its application in forensic individual identification. *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(11): 1119–1125.
蔡海强, 柳海涛, 史斌, 李安, 唐文如, 罗瑛. 全基因组扩增技术及其在法医个体识别中的应用. *遗传*, 2010, 32(11): 1119–1125. [DOI]
- [2] Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(13): 5847–5851. [DOI]
- [3] Anchordoquy HC, McGeary C, Liu LP, Krauter KS, Smolen A. Genotyping of three candidate genes after whole-genome preamplification of DNA collected from buccal cells. *Behav Genet*, 2003, 33(1): 73–78. [DOI]
- [4] Hanson EK, Ballantyne J. Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA. *Anal Biochem*, 2005, 346(2): 246–257. [DOI]
- [5] Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, Leamon JH. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 2006, 7: 216–218. [DOI]
- [6] Ramirez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Palomeque T, Lorite P. A PCR-RFLP method for detection of the LNPEP encoding human insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) rs4869317 polymorphism. *Indian J Med Res*, 2016, 144(1): 120–123. [DOI]
- [7] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992, 13(3): 718–725. [DOI]
- [8] Hou Y, Fan W, Yan LY, Li R, Lian Y, Huang J, Li JS, Xu LY, Tang FC, Xie XS, Qian J. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 2013, 155(7): 1492–1506. [DOI]
- [9] Blagodatskikh KA, Kramarov VM, Barsova EV, Garkovenko AV, Shcherbo DS, Shelenkov AA, Ustinova VV, Tokarenko MR, Baker SC, Kramarova TV. Improved DOP-PCR (iDOP-PCR): A robust and simple WGA method for efficient amplification of low copy number genomic DNA. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184507. [DOI]
- [10] Dean FB, Hosono S, Fang LH, Wu XH, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun ZY, Zong QL, Du YF, Du J, Driscoll M, Song WM, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5261–5266. [DOI]
- [11] Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338(6114): 1622–1626. [DOI]
- [12] Gilbert JA, Zhang K, Neufeld JD. Multiple displacement amplification. In: Timmis KN. (eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. [DOI]
- [13] Dago AE, Stepansky A, Carlsson A, Luttgen M, Kendall J, Baslan T, Kolatkar A, Wigler M, Bethel K, Gross ME, Hicks J, Kuhn P. Rapid phenotypic and genomic change in response to therapeutic pressure in prostate cancer inferred

- by high content analysis of single circulating tumor cells. *PLoS One*, 2014, 9(8): e101777. [DOI]
- [14] Fu Y, Li C, Lu S, Zhou W, Tang F, Xie XS, Huang Y. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(38): 11923–11928. [DOI]
- [15] Chen C, Xing D, Tan L, Li H, Zhou G, Huang L, Xie XS. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*, 2017, 356(6334): 189–194. [DOI]
- [16] Chu WK, Edge P, Lee HS, Bansal V, Bafna V, Huang X, Zhang K. Ultraaccurate genome sequencing and haplotyping of single human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(47): 12512–12517. [DOI]
- [17] de Bourcy CF, De Vlaminck I, Kanbar JN, Wang J, Gawad C, Quake SR. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105585. [DOI]
- [18] Nie TG, Ma Y, Xu XN, Wang B, Song BK, Kuang JZ. The application of whole genome amplification in DNA typing of trace samples. *Chin J Foren Med*, 2017, 32(2): 175–178, 181.
聂同钢, 马妍, 徐晓宁, 王斌, 宋炳轲, 匡金枝. 全基因组扩增在微量检材 DNA 分型中的应用. *中国法医学杂志*, 2017, 32(2): 175–178, 181. [DOI]
- [19] Chen M, Song P, Zou D, Hu X, Zhao S, Gao S, Ling F. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114520. [DOI]
- [20] He F, Zhou W, Cai R, Yan T, Xu X. Systematic assessment of the performance of whole-genome amplification for SNP/CNV detection and beta-thalassemia genotyping. *J Hum Genet*, 2018, 63(4): 407–416. [DOI]
- [21] Pan XM, Liang XG. Principle of whole genome amplification technology and its progress. *Biotechnol Bull*, 2014, (12): 47–54.
潘孝明, 梁兴国. 全基因组扩增技术原理及研究进展. *生物技术通报*, 2014, (12): 47–54. [DOI]
- [22] Tenaglia E, Imaizumi Y, Miyahara Y, Guiducci C. Isothermal multiple displacement amplification of DNA templates in minimally buffered conditions using phi29 polymerase. *Chem Comm*, 2018, 54(17): 2158–2161. [DOI]
- [23] Liu W, Zhang H, Hu D, Lu S, Sun X. The performance of MALBAC and MDA methods in the identification of concurrent mutations and aneuploidy screening to diagnose beta-thalassaemia disorders at the single and multiple-cell levels. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(2): 1–8. [DOI]
- [24] Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(23): 2870–2879. [DOI]
- [25] Fonseca KG, Griffin DK. Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenet Genome Res*, 2011, 133(2–4): 280–291. [DOI]
- [26] Hunt PA, Hassold TJ. Sex matters in meiosis. *Science*, 2002, 296(5576): 2181–2183. [DOI]
- [27] Qiao J, Wang ZB, Feng HL, Miao YL, Wang Q, Yu Y, Wei YC, Yan J, Wang WH, Shen W, Sun SC, Schatten H, Sun QY. The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: Current status and future prospects. *Mol Aspec Med*, 2013, 38: 54–85. [DOI]
- [28] Lu S, Zong C, Fan W, Yang M, Li J, Chapman AR, Zhu P, Hu X, Xu L, Yan L, Bai F, Qiao J, Tang F, Li R, Xie XS. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science*, 2012, 338(6114): 1627–1630. [DOI]
- [29] Wang J, Fan HC, Behr B, Quake SR. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell*, 2012, 150(2): 402–412. [DOI]
- [30] Sha Y, Sha Y, Ji Z, Ding L, Zhang Q, Ouyang H, Lin S, Wang X, Shao L, Shi C, Li P, Song Y. Comprehensive genome profiling of single sperm cells by multiple annealing and looping-based amplification cycles and next-generation sequencing from carriers of Robertsonian translocation. *Ann Hum Genet*, 2017, 81(2): 91–97. [DOI]
- [31] Li W, Ma Y, Yu S, Sun N, Wang L, Chen D, Yang G, Lu S, Li Y, Yang B, Mei C. The mutation-free embryo for in vitro fertilization selected by MALBAC-PGD resulted in a healthy live birth from a family carrying PKD1 mutation. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(12): 1653–1658. [DOI]
- [32] Huang J, Yan L, Fan W, Zhao N, Zhang Y, Tang F, Xie XS, Qiao J. Validation of multiple annealing and looping-based amplification cycle sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of cleavage-stage embryos. *Fertil Steril*, 2014, 102(6): 1685–1691. [DOI]
- [33] Yan L, Huang L, Xu L, Huang J, Ma F, Zhu X, Tang Y, Liu M, Lian Y, Liu P, Li R, Lu S, Tang F, Qiao J, Xie XS. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(52): 15964–15969. [DOI]
- [34] Van Uum CM, Stevens SJ, Dreesen JC, Drusedau M,

- Smeets HJ, Hollanders-Crombach B, Die-Smulders CE, Geraedts JP, Engelen JJ, Coonen E. SNP array-based copy number and genotype analyses for preimplantation genetic diagnosis of human unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(9): 938–944. [DOI]
- [35] Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, Ubaldi FM, Rienzi L, Fiorentino F. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*, 2013, 28(2): 509–518. [DOI]
- [36] Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1560–1574. [DOI]
- [37] Huang CC, Chang LJ, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, Chen HF, Chen SU. A feasible strategy of preimplantation genetic diagnosis for carriers with chromosomal translocation: Using blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization. *J Formos Med Assoc*, 2013, 112(9): 537–544. [DOI]
- [38] Gui B, Yao Z, Li Y, Liu D, Liu N, Xia Y, Huang Y, Mei L, Ma R, Lu S, Liang D, Wu L. Chromosomal analysis of blastocysts from balanced chromosomal rearrangement carriers. *Reproduction*, 2016, 151(4): 455–464. [DOI]
- [39] Shang W, Zhang Y, Shu M, Wang W, Ren L, Chen F, Shao L, Lu S, Bo S, Ma S, Gao Y. Comprehensive chromosomal and mitochondrial copy number profiling in human IVF embryos. *Reprod Biomed Online*, 2018, 36(1): 67–74. [DOI]
- [40] Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, Wang H, Song X, Ma T, Bo S, Shi C, Ren J, Huang L, Cai LY, Yao B, Xie XS, Lu S. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(42): 11907–11912. [DOI]

(责任编辑: 方向东)