

针对染色体易位携带者的微阵列比较基因组杂交-植入前遗传学诊断技术的建立与应用

江美燕^{1,2}, 偶 健¹, 李 红^{1*}

(¹南京医科大学附属苏州医院生殖与遗传中心, 江苏 苏州 215002; ²杭州市妇产科医院妇产科, 浙江 杭州 310008)

[摘要] **目的:**应用微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)对染色体平衡易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断,探讨其临床应用价值。**方法:**应用荧光原位杂交技术(FISH)对染色体易位携带者 D3 胚胎进行检测,对结果为异常且发育到囊胚的 15 枚胚胎应用 array-CGH 再次检测,建立 array-CGH 技术平台,再将 array-CGH 技术应用于染色体平衡易位携带者胚胎植入前遗传学诊断。**结果:**对经过 FISH 检测为异常且发育到囊胚的 15 枚胚胎进行全基因组扩增(WGA)后采用 array-CGH 技术进行检测,发现 array-CGH 技术不仅能够检测到 FISH 结果对应的数目异常和结构异常,还可以发现除 FISH 诊断的染色体异常外其他染色体异常。其对于相互易位病例不平衡易位断裂点检测的结果与对易位携带者的核型分析结果一致。应用 array-CGH 技术对 5 对染色体易位携带者夫妇的 31 枚胚胎进行胚胎植入前遗传学诊断,30 枚获得检测结果,1 对夫妇移植 1 枚整倍体胚胎后获得妊娠,羊水染色体分析提示胎儿染色体核型正常。**结论:**通过全基因组扩增以及 array-CGH 技术,对染色体平衡易位携带者胚胎进行植入前遗传学诊断,能够全面评估胚胎染色体的情况,具有良好的临床应用前景。

[关键词] 染色体易位;植入前遗传学诊断;荧光原位杂交技术;微阵列比较基因组杂交技术

[中图分类号] R446.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-113-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150130

Establishment and application of array comparative genomic hybridization in preimplantation genetic diagnosis for translocation carriers

Jiang Meiyang^{1,2}, Ou Jian¹, Li Hong^{1*}

(¹Center for Reproduction and Genetics, Suzhou Hospital Affiliated to NJMU, Suzhou 215002; ²Department of Obstetrics and Gynaecology, Hangzhou Obstetrics and Gynaecology Hospital, Hangzhou 310008, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the clinical applying value of microarray comparative genomic hybridization(array-CGH) technology for the preimplantation genetic diagnosis(PGD) of chromosomal translocation carriers. **Methods:** Using the array-CGH technology to reanalyze 15 blastocysts of chromosomal translocation carriers, which was diagnosed abnormality by the fluorescence in situ hybridization (FISH) technology, then establish and clinically apply the array-CGH PGD for chromosomal balanced translocation carriers. **Results:** A total of 15 blastocysts diagnosed abnormality by FISH technology was amplified by whole genome amplification (WGA), and then was detected by array-CGH technology. Array-CGH could not only detect numerical and structural chromosomal abnormalities in accordance with FISH results, but also found other chromosomal abnormalities outside translocation chromosomes. The breakpoint position between translocation chromosomes detected by array-CGH technology was the same with its peripheral blood chromosomal karyotype results. Five cycles of PGD were carried out for chromosomal translocation carriers with array-CGH technology. One euploid embryo was transferred back to the woman's uterus, which resulted in successful implantation and pregnancy, whose karyotype of fetal amniotic fluid chromosomal was normal. **Conclusion:** WGA combined with array-CGH could comprehensively access the embryo's chromosomes of chromosomal translocation carriers, so it has good clinical applying prospects.

[Key words] chromosomal translocation; preimplantation genetic diagnosis (PGD); fluorescence *in situ* hybridization (FISH); microarray comparative genomic hybridization(array-CGH)

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01): 113-118]

[基金项目] 江苏省妇幼保健科研项目(F210317);苏州市科技发展计划(SYS201359);江苏省妇幼保健科研项目(F201443)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: honglizivf@163.com

染色体平衡易位包括相互易位和罗氏易位,大多无异常表型。然而在减数分裂过程中,易位的染色体和正常的染色体之间按照不同的分裂方式产生不平衡分离或者交叉互换产生各种比例的不平衡配子,从而导致反复流产、胚胎停止发育、生育智力低下或畸形的胎儿。胚胎植入前遗传学诊断(PGD)是染色体易位携带者获得正常妊娠最理想的方式。

荧光原位杂交技术(FISH)是染色体易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断最常用的技术,它能够将染色体正常或易位携带的胚胎筛选出来,植入子宫,从而获得比较理想的妊娠结局,但是仍有较高的早期胚胎丢失率。FISH技术检测染色体的数目有限,且不能同时对每条染色体进行检测,然而胚胎发育过程中,除了易位的2条染色体之外,其余染色体都有可能发生异常,从而导致异常的妊娠结局^[1]。微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)是建立在传统比较基因组杂交技术的基础上,以基因芯片代替中期染色体进行对比的技术,它能够在单细胞水平对胚胎的24条染色体同时进行检测。本研究旨在建立微阵列比较基因组杂交-植入前遗传学诊断技术平台,并将该技术应用于染色体易位携带者胚胎植入前遗传学诊断以获得持续妊娠。

1 对象和方法

1.1 对象

2011年6月~2012年7月应用FISH技术对4例男方染色体为易位携带者的夫妇进行了4个周期的PGD,后应用array-CGH技术对第3天诊断为异常且发育到囊胚的胚胎进行再次检测。将array-CGH技术应用于5对染色体易位携带者夫妇进行PGD。9对夫妇均签署了体外受精(IVF)和PGD知情同意书,医院生殖伦理委员会对此研究项目通过伦理审查。所用胚胎均由患者签订知情同意用于科研。

1.2 方法

1.2.1 胚胎培养及活检

采用本中心常规长方案控制性超排,取卵后5h行卵胞浆内单精子注射(ICSI),18h后观察受精状况,正常受精胚胎卵裂期用G-1培养液(Vitrolife公司,瑞典)微滴法培养。取卵后第3天上午选择发育至5~12个细胞、碎片少于25%的胚胎进行活检。将活检胚胎置于无Ca²⁺、Mg²⁺的HEPES(irvinescientificgon公司,美国)液滴,活检针进入透明带活检卵裂球,活检后胚胎移入G-2培养液(Vitrolife公司,

瑞典)微滴法培养至囊胚,选择FISH结果为正常或平衡易位的囊胚予以新鲜移植或冷冻后择期解冻移植。

1.2.2 细胞固定及FISH检测

均采用本中心常规方案^[2]进行。探针均购于美国Vysis公司。FISH评定参照Munne的标准^[3]。

1.2.3 囊胚玻璃化冷冻和解冻

冷冻保护剂为二甲基亚砷(DMSO)、乙二醇(EG)和蔗糖,冷冻胚胎载体为Cryotop,玻璃化冷冻后直接投入液氮保存。解冻时将冷冻载体从液氮中取出后迅速插入预温解冻液中,经解冻液顺序漂洗后,移入过夜平衡的培养液中孵育至胚胎移植。

1.2.4 全基因组扩增(WGA)

采用英国BlueGnome公司针对单细胞的SurePlex WGA Kit。包括细胞裂解DNA片段化、扩增前处理和扩增3个步骤。为避免污染,此过程需全部在专用通风橱内进行。WGA的DNA质量检测采用Agilent 2100 bioanalyzer检测。

1.2.5 array-CGH

采用美国Agilent公司的8×60k的芯片。流程参考针对单细胞分析的Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH。杂交完成后取出array玻片清洗后放入Agilent Microarray Scanner中进行扫描,扫描完成后用Agilent Feature Extraction软件进行数据解读。分析数据采用Agilent Genomic Workbench 7.0.4.0。

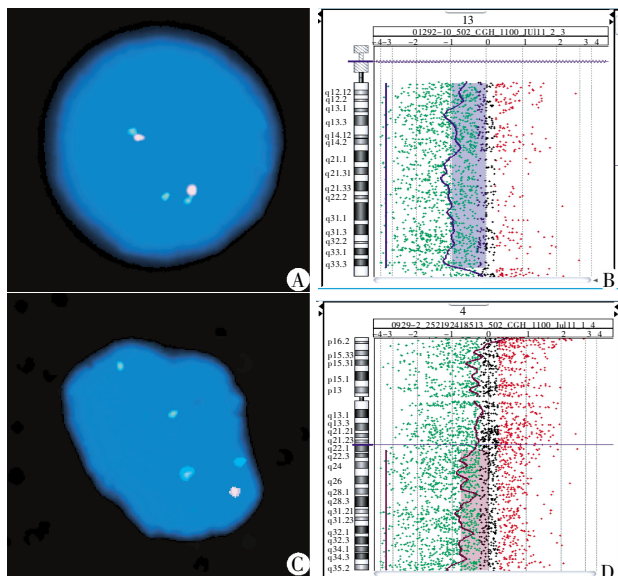
2 结果

2.1 array-CGH技术的建立

PGD-1中的易位携带者核型是46,XY,t(1;4)(q42;q21),FISH采用CEP4、Tel 1p和Tel 4q探针进行检测,诊断为不平衡胚胎9枚,发育到囊胚4枚;PGD-2[45,XY,der(14;21)(q10;q10)]、PGD-3[45,XY,der(13;14)(q10;q10)]和PGD-4[45,XY,der(13;14)(q10;q10)]中的易位携带者均为罗伯逊易位,FISH检测各选LSI 13、LSI IGH Dual Color14和LSI21中相关的两种探针,PGD-2中诊断不平衡胚胎4枚,发育到囊胚2枚;PGD-3中诊断为不平衡胚胎6枚,发育到囊胚5枚;PGD-4中诊断为不平衡胚胎6枚,其中4枚发育到囊胚。对于这些染色体异常囊胚均采用玻璃化冷冻保存。

将这些染色体异常囊胚15枚解冻后进行显微切割,取部分切割后样本进行WGA,成功扩增15枚,扩增成功率为100%,对WGA-DNA采用array-CGH技术进行检测。发现array-CGH技术不仅能够检

测到 FISH 结果对应的数目异常(图 1A)和结构异常(图 1B), 而且还可以发现除 FISH 诊断的染色体异常外其他多条染色体异常(图 2); 本研究涉及的 array-CGH 精确度很高, 其对于像 PGD-1 一样的相互易位病例易位断裂点检测的结果与对易位携带者的核型分析结果高度一致(图 3)。另外还发现随着 WGA 检测材料增多, array-CGH 的精确度会更高(图 4)。



A: FISH 结果: ish(13q14x1) 红绿双色信号代表 LSI14, 绿色信号代表 LSI13; B: array-CGH 结果: arr(13)x1。两种结果匹配; C: FISH 结果: ish(4qterx1) 红绿信号代表 1pter, 蓝色信号代表 4cen, 红色信号代表 4qter; D: array-CGH 结果 arr(4q22qter)x1。两种结果匹配。

图 1 array-CGH 与 FISH 检查结果比较

Figure 1 Comparison of array-CGH and FISH results

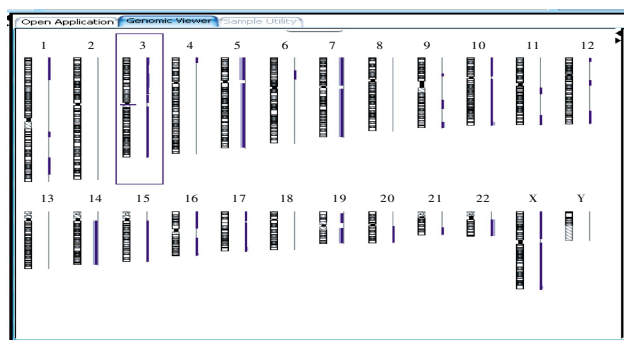
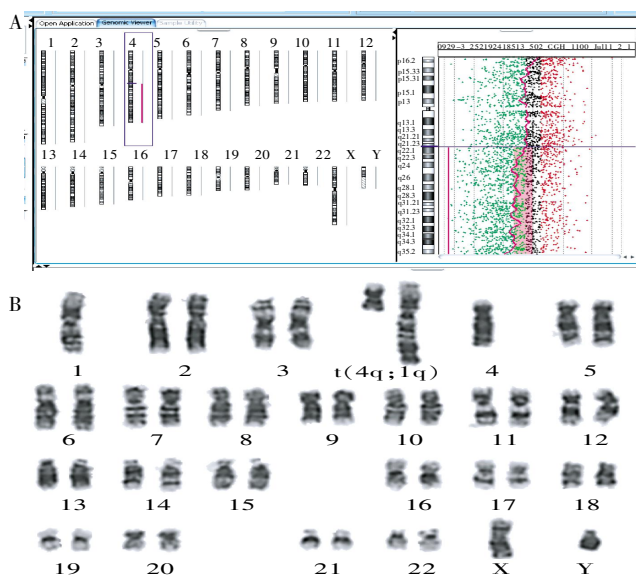


图 2 array-CGH 发现的其他染色异常

Figure 2 Other chromosomal abnormalities detected by array-CGH

2.2 array-CGH 的应用

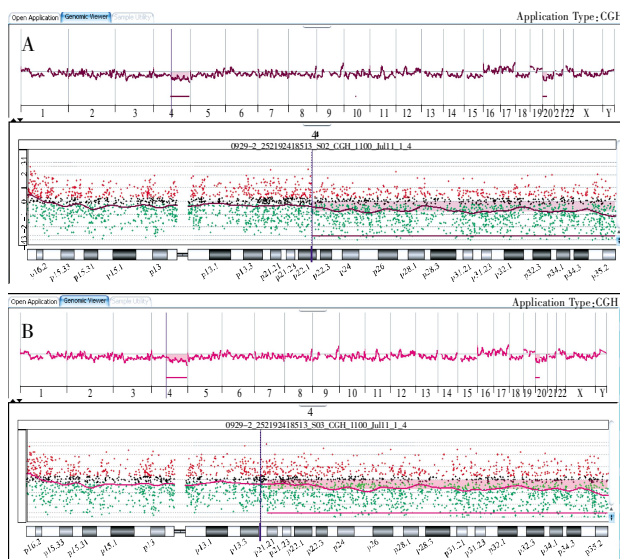
PGD-5 染色体易位核型为 46,XX,t(8;10)(p11.2;q26) 活检 16 枚胚胎, 成功检测 15 枚, 其中 1 枚扩增失败, 无结果; 15 例中染色体正常的胚胎 6 枚, 其余均为染色体异常的胚胎, 冷冻周期移植 1



A: array-CGH 显示 4 号染色体的断裂位置在 q21; B: 核型分析结果与 array-CGH 结果高度一致。

图 3 array-CGH 检测染色体断裂

Figure 3 Chromosomal breakage detected by array-CGH

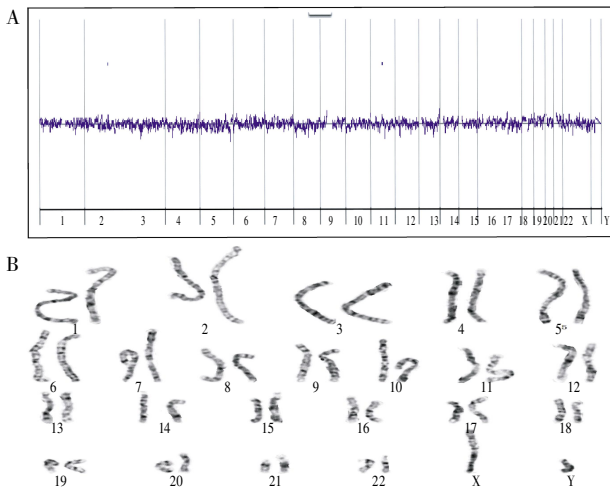


A: 单细胞 WGA 后 array-CGH 显示, 断裂位置为 4q22; B: 多个细胞 WGA 后 array-CGH 显示, 断裂位置为 4q21, 与核型断裂点一致。随着 WGA 检测材料增多, array-CGH 的精确度更高。

图 4 单个细胞和多个细胞 WGA 后 array-CGH 结果比较

Figure 4 Comparison of array-CGH results amplified from one cell and several cells by whole genome amplification (WGA)

枚囊胚, 现妊娠中, 羊水染色体检查提示核型正常(图 5); PGD-6 染色体易位核型为 46,XY,t(1;2)(p34;p25), 活检 5 枚胚胎, 成功检测 5 枚, 均为染色体异常, 无可移植胚胎; PGD-7 染色体易位核型为 45,XX,der(13;15)(q10;q10) 活检 3 枚胚胎, 成功检测 3 枚, 3 枚均为染色体异常的胚胎, 无可移植胚胎;



A: array-CGH 结果正常; B: 产前羊水核型结果正常。

图 5 array-CGH 检查与产前诊断结果比较

Figure 5 Comparison of array-CGH and prenatal diagnosis

PGD-8 染色体易位核型为 46,XY,t(1;2)(p34;p25) 活检 5 枚胚胎,成功检测 5 枚,染色体正常的胚胎 2 枚,其余均为染色体异常的胚胎;PGD-9 染色体易位核型为 46,XY,t(1;3)(q25;q27) 活检 2 枚胚胎,成功检测 2 枚,染色体正常的胚胎 1 枚,染色体异常的胚胎 1 枚(表 1)。总之,活检胚胎 31 枚,成功检测 30 枚,检测成功率为 96.8%;染色体正常或易位且整倍体胚胎 9 枚,占 30%;染色体不平衡胚胎 15 枚,占 50%;染色体正常或易位携带但其他染色体非整倍体的胚胎 6 枚,占 20%;非整倍体胚胎 15 枚,占 50%。

3 讨论

3.1 array-CGH 技术的原理

array-CGH 技术利用人胎盘 DNA 进行预杂交

表 1 临床病例胚胎 array-CGH 结果及移植结局

Table 1 array-CGH results of embryos and transplant outcome

PGD 编号	易位核型	活检 胚胎数	array-CGH 检 测成功	array-CGH 结果				ET 数	ET 结局	羊水染色 体核型
				A	B	C	D			
PGD-5	46,XX,t(8;10)(p11.2;q26)	16	15	6	4	3	2	1	继续妊娠	正常
PGD-6	46,XY,t(1;2)(p34;p25)	5	5	0	2	1	2	0	未移植	
PGD-7	45,XX,der(13;15)(q10;q10)	3	3	0	0	0	3	0	未移植	
PGD-8	46,XY,t(1;2)(p34;p25)	5	5	2	0	1	2	0	未移植	
PGD-9	46,XY,t(1;3)(q25;q27)	2	2	1	0	1	0	0	未移植	

A:染色体正常或易位携带且其他染色体整倍体;B:染色体不平衡且其他染色体整倍体;C:染色体正常或易位携带且其他染色体非整倍体;D:染色体不平衡且其他染色体非整倍体。

封闭非特异性重复序列降低信号背景后,将不同荧光标记的待测 DNA 的 WGA 产物与对照 DNA 在已知序列的基因探针所固定的微阵列芯片上竞争杂交,随后利用芯片扫描软件获取图像和荧光信号,运用分析软件进行数据处理并分析微阵列芯片每个靶点信号的荧光比率,反映待测基因组相对 DNA 序列拷贝数的重复或缺失,从而对全基因组进行分析^[4-5]。array-CGH 是将设计好的基因组克隆形成芯片微阵列,使用自动机械装置点样到载玻片上。每个阵列可以包含数百或数千个克隆,对应基因组中 1 个小的区域,可以发现 100~200 kb 的不平衡片段^[6]。

3.2 array-CGH 技术诊断的准确性分析

array-CGH 可以同时检测包括易位染色体在内的所有染色体,并且在单细胞全基因组的水平进行染色体分析(图 3)。2014 年 ESHRE 统计表明 2009 年进周的染色体平衡易位携带者进行 PGD 时,FISH 技术占主导地位。但易位携带者的胚胎会发生易位染色体之外的其他所有染色体异常,从而影响 PGD 的准确性^[7-8]。Huang 等^[9]应用 array-CGH 技术

对染色体易位携带者的 D5 胚胎进行 PGD:其中 10.9%的胚胎是平衡易位胚胎但其余染色体为非整倍体,本文研究结果显示:染色体为平衡易位但其余染色体为非整倍体胚胎的比例为 20%,与 Colls 以及 Fiorentino 等^[10]报道的结果相近。此外,有多篇文章^[4,10-11]统计结果表明染色体易位携带者真正正常或平衡易位的胚胎只有 16.0%~22.3%,而 26.4%~28.9%的胚胎虽没有结构异常但存在数目异常,17.1%~22.9%的胚胎没有数目异常但结构有异常,而其他胚胎这两种异常兼而有之。因此,array-CGH 最大的优势在于能够同时检测染色体数目异常和结构异常。FISH 技术在细胞固定、信号杂交过程中,可能会出现杂交失败、FISH 信号缺失、分离、重叠及固定过程中出现细胞丢失等问题^[5]。有研究报道,FISH 作为染色体易位携带者 PGD 的错误率在 10%以内,平均错误率为 6%^[12-13]。而 array-CGH 应用于染色体平衡易位携带者 PGD 的错误率只有 1.9%^[10],明显低于 FISH 的错误率。

array-CGH 检出率较高。Alfarawati 等^[4]发现,

染色体易位携带者 PGD 中应用传统的(中期)CGH 和应用 array-CGH 的整体检出率非常相似, 分别为 91.8% 和 91.5%。Gutierrez-Mateo 等^[14]比较了 FISH 和 array-CGH 非整倍体诊断效率, 发现 FISH 的检出率为 89.8%, 而 array-CGH 检出率高达 97.1%, 明显高于 FISH。本研究中 array-CGH 的检出率为 96.8%, 与上述研究结果接近。此外, array-CGH 精确度也很高。Huang 等^[9]的研究中, 精确度为 1.6 Mbp 高于 FISH, 甚至高于传统的 CGH(5~10 Mbp); 本研究中易位携带者经 array-CGH 后易位断裂点的位置与核型结果高度一致(图 4)。

然而, 本研究发现 WGA 检测材料增多, array-CGH 的精确度更高(图 5)。ESHRE 统计发现 90% PGD 周期是在卵裂期进行单细胞活检, 少数 PGD 周期是进行囊胚期滋养层细胞活检或者极体活检。有研究证实卵裂期活检一个单卵裂球对胚胎继续发育的影响不明显, 囊胚形成率与卵母细胞浆内单精子注射(ICSI)对照组差异无统计学意义, 活产率差异也无统计学意义(37.4% vs. 35.0%), 但 2 个卵裂球活检明显降低囊胚的形成率和妊娠率, 活产率仅为 22.4%^[15]。虽然并不是所有的胚胎都能够发育到囊胚期, 但是囊胚期活检可以取出 5~10 个细胞进行分析, 大大提高了诊断的精确度, 而且活检的滋养层细胞不参与形成胎儿部分, 仅形成胎盘部分, 对胎儿的正常发育几乎没有影响。此外胚胎卵裂过程中染色体分配很不稳定^[16], 会出现很多嵌合的情况, 研究发现 66%~87% 的卵裂期胚胎表现为嵌合, 因此第 3 天检测单个卵裂球会导致检测结果无法代表整个胚胎的结果, 从而出现假阳性或者假阴性^[17-18]。随着囊胚培养、胚胎冷冻和解冻技术的提高, 胚胎解冻后移植在临床应用越来越广泛^[19], 这不但可以预防卵巢过度刺激综合征^[20], 还可以给胚胎植入前遗传学诊断提供充分的时间^[21], 此外促排卵可能会影响子宫内膜的容受性以及内分泌功能, 从而可能降低新鲜周期移植后着床率^[19]。胚胎冷冻移植有可能提供一个更加自然的内分泌环境以及良好的内膜容受性^[20]。因此本文倾向于进行囊胚期多个滋养层细胞活检, 这样不仅能够提高诊断的精确度, 还能够降低因嵌合、扩增失败或等位基因脱扣等导致误诊的风险, 这可能也是我们以后努力的方向。

3.3 array-CGH 技术的应用

本研究中应用 array-CGH 技术检测 31 枚胚胎, 30 枚检测成功, 检测成功率为 96.8%, 其中 1 例失

败是因为卵裂球无细胞核所致。30 例中染色体正常或易位携带但其他染色体为非整倍体的胚胎 6 枚, 占 20%。然而通过传统的 FISH 检测, 这 20% 的胚胎将会误诊为正常的胚胎, 这一结果与其他研究的结果一致^[17, 22-23], 将这些胚胎植入子宫后导致异常的妊娠结局, 这也可以解释 FISH-PGD 后仍有较高的早期胚胎丢失率, 这也是 array-CGH 技术代替 FISH 技术应用于临床最主要的优势。5 个 PGD 周期中, 有 3 个周期获得了可移植的胚胎, 目前冷冻移植 1 个周期, 现妊娠中, 羊水染色体诊断结果为核型正常(图 6)。而剩余 2 个周期因无可移植的胚胎而取消周期。在 Huang^[9]的研究中, 因无平衡易位或者正常胚胎而取消周期的比例为 25%。在 Fiorentino^[11]研究中这一比例高达 32%。随着年龄的增长, 卵巢储备功能相应降低, 随之促排卵后获卵数相应减少, 因此可供分析的胚胎数减少。随着年龄的增长, 非整倍体胚胎的概率明显增加^[10], 尤其是年龄大于 35 岁的高龄妇女, 非整倍体胚胎的概率高达 60%~80%^[24-26]。这些都可能造成可供移植的胚胎数减少。John 等^[27]的研究结果表明: 尽管进行胚胎植入前遗传学诊断的胚胎数少于 10 个对妊娠率没有影响, 但是周期取消率明显增加。Ata^[28]的研究数据显示: 可供移植的胚胎数随着年龄的增长而减少, 但是随着 array-CGH 分析胚胎数的增加而增加。因此, 获取一定数量的胚胎后再进行 array-CGH, 这样不但可以降低 array-CGH 的费用, 还能够减少实验员的工作负担。

3.4 array-CGH 技术的局限性

array-CGH 技术的局限性包括: ①不能区分染色体正常与染色体平衡易位的胚胎; ②不能检测点突变导致的基因病, 也不能检测出所有的单倍体、多倍体异常; ③由于胚胎存在嵌合的现象, array-CGH 诊断也可能出现假阳性或假阴性结果; ④array-CGH 检测之前, 活检的胚胎要进行全基因组扩增, 然而用于扩增的 DNA 量也会影响 WGA 的结果。首先是 WGA 成功率的差别, Fiorentino 等^[11]针对 Day3 活检的胚胎采用 Blue-Gnome 的 SurePlex 单细胞扩增试剂盒扩增, 扩增失败率为 6.5% (13/200)。Colls 等^[10]同样采用 Blue-Gnome 的扩增试剂盒, 针对 Day 3 活检的单细胞扩增失败率为 5.6% (20/354), 而针对 Day 5~6 活检的外滋养层细胞扩增失败率为 3.8% (3/78)。此外 WGA 存在扩增的不均一性, 比如等位基因脱扣、优先扩增等也会影响检测的效率^[29]; ⑤array-CGH 价格昂贵, 限制了它的

进一步推广。

[参考文献]

- [1] Fiorentino F. Array comparative genomic hybridization; its role in preimplantation genetic diagnosis[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2012, 24(4): 203-209
- [2] 偶健, 王玮, 丁洁, 等. 人类低评分早期胚胎与低评分囊胚的性染色体嵌合性分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(6): 675-678
- [3] Munne S, Dailey T, Finkelstein M, et al. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis[J]. *J Assis Reprod Genet*, 1996, 13(2): 149-156
- [4] Alfarawati S, Fragouli E, Coils P, et al. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1560-1574
- [5] Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment; microarrays and CGH[J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(12): 703-710
- [6] Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, et al. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(1): 47-60
- [7] Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(12): 3201-3207
- [8] Munne S, Escudero T, Fischer J, et al. Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(3): 363-369
- [9] Huang CC, Chang LJ, Tsai YY, et al. A feasible strategy of preimplantation genetic diagnosis for carriers with chromosomal translocation; Using blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization[J]. *J Formosan Medical Association*, 2013, 112(9): 537-544
- [10] Colls P, Escudero T, Fischer J, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human Embryos [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(6): 621-629
- [11] Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7): 1925-1935
- [12] Munne S, Sandalinas M, Escudero T, et al. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1209-1218
- [13] Goossens V, De Rycke M, De Vos A, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(3): 481-492
- [14] Gutierrez-Mateo C, Colk P, Sanchez-Garcia J, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of Embryos [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 953-958
- [15] De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfer [J]. *Human Reprod*, 2009, 24(12): 2988-2996
- [16] Evelyne V, Thierry V, Cedric LC, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos [J]. *Nat Med*, 2009, 15(5): 577-583
- [17] Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(1): 33-41
- [18] Johnson DS, Gemelos G, Baner J, et al. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24 h protocol [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(4): 1066-1075
- [19] Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(5): 1700-1706
- [20] Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(10): 2593-2597
- [21] Chang LJ, Chen SU, Tsai YY, et al. An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy Screening [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2011, 38(3): 126-134
- [22] Ciotti PM, Lagalla C, Ricco AS, et al. Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micro-manipulated embryos in PGD [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(1-2): 63-67
- [23] Fragouli E, Lenzi M, Ross R, et al. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(11): 2596-2608
- [24] Munne S, Chen S, Colls P, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 14(5): 628-634
- [25] Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J, et al. In