非侵入性胚胎植入前遗传学检测的研究进展

高明^{1,2,3}, 高媛^{1,2,3*}

1. 山东大学生殖医学研究中心, 济南 250001;

2. 国家辅助生殖与优生工程技术研究中心, 济南 250001;

3. 生殖内分泌教育部重点实验室, 济南 250001

* 联系人, E-mail: gaoyuan@sduivf.com

收稿日期: 2019-12-29; 接受日期: 2020-04-19; 网络版发表日期: 2020-05-11

国家重点研发计划(批准号: 2018YFC1003100, 2018YFC1004900)、山东省重点研发计划(批准号: 2017G006035)和山东省自然科学基金(批准号: ZR2018PH006, ZR2018MC014)资助

摘要 胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)是在胚胎植入前对胚胎染色体及遗传致病基因进行检测, 选择正常的胚胎植入到宫腔内, 最终实现减少出生缺陷发生的目的. 目前, 此技术已广泛应用于辅助生殖领域. 胚胎培养液及囊胚腔液中游离DNA的发现, 引起一系列非侵入性胚胎植入前遗传学检测(noninvasive preimplantation genetic testing, NiPGT)的研究. 由于检测方法和检测结果存在一定的差异, 仍然需要大量临床试验研究验证NiPGT的临床有效性. 本文主要分析NiPGT最新的研究进展, 探讨NiPGT存在的优缺点, 并为临床应用提供依据.

关键词 囊胚腔液, 胚胎培养液, 游离DNA, NiPGT

胚胎植入前遗传检测(preimplantation genetic testing, PGT)是在辅助生殖过程中对植入前的胚胎进行基因突变或染色体检测, 选择正常的胚胎植入宫腔, 以降低家族遗传性疾病或染色体异常及反复流产等发生风险的遗传学检测技术^[1]. 1990年, Handyside等人^[2]首次报道了通过特异筛选Y染色体阻断母源性X连锁隐性疾病患儿的出生. 随后, Munné等人^[3]采用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术成功筛选出染色体非整倍体胚胎. 随着测序技术的发展, PGT技术已广泛应用于辅助生殖领域.

胚胎植入前遗传检测主要分为胚胎植入前染色体

非整倍体检测(PGT for aneuploidy, PGT-A)、胚胎植入前染色体结构异常检测(PGT for structure rearrangement, PGT-SR)和胚胎植入前单基因遗传病检测(PGT for monogenetic, PGT-M)三类. 无论哪一种类型PGT, 均需要在胚胎的卵裂期或囊胚期进行有创的活检, 这种侵入性的胚胎活检对子代发育是否产生影响尚无明确的结论^[4]. 2013年, Palini等人^[5]首次发现胚胎囊胚腔液(blastocoele fluid, BF)中存在游离DNA, 并通过对囊胚腔液中游离DNA的检测成功完成胚胎的性别筛选. 同年, Stigliani等人^[6]报道胚胎培养液(embryo culture medium, ECM)中线粒体DNA的含量与胚胎碎片率之

引用格式: 高明, 高媛. 非侵入性胚胎植入前遗传学检测的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50

Gao M, Gao Y. Advances in noninvasive preimplantation genetic testing (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50, doi: [10.1360/SSV-2019-0302](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0302)

间存在显著关联性, 可作为胚胎发育潜能和评级的参考指标. 2016年, 有研究发现, 囊胚腔液中游离DNA的片段长度主要分布为160~220 bp, 与细胞凋亡的胎盘滋养层细胞游离DNA片段长度相似, 提示囊胚腔液游离DNA可能来源于胚胎细胞的凋亡^[7]. 上述研究为非侵入性胚胎植入前遗传学检测(noninvasive preimplantation genetic testing, NiPGT)提供了理论基础.

近年来的研究显示, NiPGT在游离DNA和胚胎滋养外胚层细胞的检测结果一致性存在较大的差异, NiPGT技术的准确性、敏感性和特异性仍然存在不确定性. 本文针对NiPGT技术研究现状及进展进行综述.

1 囊胚腔液DNA检测在NiPGT中的研究进展

囊胚腔液是在胚胎分化为内细胞团和滋养外胚层时, 离子泵将钠离子主动转运至滋养外胚层上皮的外侧壁, 形成的充满液体的“囊胚腔”, 囊胚腔扩张程度、细胞数量和内细胞团与滋养外胚层细胞的聚集是评价囊胚发育质量的重要指标^[8,9]. 囊胚在玻璃化冷冻时, 会将囊胚腔液排出, 以防止冰晶的形成, 提高冷冻胚胎的存活率. 囊胚腔中通常能排出约10 nL囊胚腔液, 并且囊胚腔液中的游离DNA能够成功被纯化、扩增, 并进行胚胎遗传学的检测^[5,10-13]. 然而, 囊胚腔液游离DNA含量极少, 容易发生全基因组扩增分布不均匀和等位基因脱扣的情况, 从而导致假阳性或假阴性的发生^[14].

2013年, Palini等人^[5]利用荧光定量PCR的方法对囊胚腔液游离DNA进行检测, 成功检测到Y染色体上*TSPY1*基因, 证明囊胚腔液中存在游离DNA, 同时为X连锁隐性遗传病家系胚胎的性别筛选提供了非侵入性检测的方法. 2015年, Galluzzi等人^[15]对9例囊胚腔液进行全基因组扩增后, *MTHFR*基因多态性位点C677T的检出率为44.4%, 提示全基因组扩增后囊胚腔液游离DNA可以进行单基因遗传病相关点突变的定性检测. 但Capalbo等人^[16]开展的分别对同一个胚胎的囊胚腔液游离DNA与滋养外胚层细胞扩增后所做的胚胎单体型分析结果显示, 在69个样本中, 胚胎单体型的一致性结果仅为2.9%, 这可能是由于囊胚腔液游离DNA含量极低, 极易发生全基因组扩增分布不均匀和等位基因脱扣的风险. 因此, 囊胚腔液游离DNA在PGT-M中

的应用还有很长的路要走.

Gianaroli等人^[11]采用比较基因组杂交阵列(array comparative genome hybridization, aCGH)的方法对51个胚胎囊胚腔液DNA进行检测, 其中76.5%的囊胚腔液DNA扩增成功, 并且囊胚腔液DNA与极体、卵裂球和滋养外胚层细胞单条染色体的一致性分别为93.5%, 94.0%和96.6%, 整倍体率一致性为93.3%, 100.0%和97.4%. Magli等人^[10]对70例囊胚腔液DNA进行检测, 该结果与极体、卵裂球和滋养外胚层细胞的结果相比, 单条染色体的一致性分别为97.9%, 97.7%和98.4%, 整倍体率一致性为94.0%, 95.0%和97.1%. 上述这些研究说明, 大部分囊胚腔液DNA可以反映胚胎染色体整倍体状态, 为囊胚腔液DNA临床应用提供重要依据. 然而, 囊胚腔液可能存在的高度片段化DNA或者较低的DNA含量以及囊胚腔液采集方法的差异, 而这些因素都可能导致囊胚腔液中DNA全基因组扩增失败, 从而影响囊胚腔液NiPGT在临床上的应用. Capalbo等人^[16]对囊胚腔液DNA的研究发现, 囊胚腔液DNA与滋养外胚层细胞的检测结果相比, 染色体整倍体率一致性仅为37.5%; Tobler等人^[12]的研究结果显示, 两者在染色体整倍体率方面的一致性也仅为48%, 这提示囊胚腔液DNA的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值均不能满足临床检测的需求. 这些结果表明, 囊胚腔液DNA在PGT-A的检测中也存在较大的差异, 这种差异可能与胚胎质量和采集囊胚腔液的操作等之间存在差异密切相关^[17].

Magli等人^[18]研究发现, 滋养外胚层细胞检测结果为染色体整倍体时, 对应的囊胚腔液扩增成功率($n=32$, 45%)显著低于染色体非整倍体对应的囊胚腔液($n=150$, 81%); 根据滋养外胚层细胞检测结果, 移植53例染色体整倍体胚胎, 其中囊胚腔液扩增失败组中临床妊娠率为77%, 囊胚腔液扩增成功组中临床妊娠率为37%. 因此, 研究者提出囊胚染色体倍性与囊胚腔液扩增的关系模型, 即胚胎自身存在的自我拯救机制, 会将染色体非整倍体细胞淘汰并将DNA排出至囊胚腔中, 导致整倍体胚胎囊胚腔液扩增成功率明显低于非整倍体胚胎; 对于嵌合体胚胎, 也会根据胚胎的嵌合情况进行自我拯救, 导致囊胚腔液扩增成功率存在差异. 这项研究结果为囊胚腔液游离DNA的来源提供了思路.

从以上的研究结果可以看出, 无论是在定性的单

基因遗传病的突变检测方面还是定量的染色体非整倍体检测方面, 囊胚腔液中游离DNA的NiPGT的临床应用都需要经过大量的实验进一步证明其可行性。

2 胚胎培养液DNA在NiPGT中的研究进展

大量研究表明, 胚胎培养液中存在基因组DNA (genomic DNA, gDNA)和线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)^[6,19-21], 但胚胎培养液DNA的来源尚不清楚。研究报道, 正常发育的人类胚胎在囊胚期之前不会发生细胞凋亡, 而胚胎碎片化和胚胎发育停滞会导致细胞的死亡^[22-24]。Stigliani等人^[6,25]提出将2~3天的培养液中gDNA和mtDNA作为胚胎发育质量的标志分子, 第3天胚胎培养液中mtDNA/gDNA的比值与囊胚形成、囊胚质量和移植成功率成正相关。这表明gDNA和mtDNA在胚胎培养液中存在是卵裂期胚胎常见的现象, mtDNA含量可能与分裂水平、囊胚和着床有关。

2014年, Assou等人^[19]提出利用胚胎培养液鉴定男性和女性胚胎, 以减少X连锁疾病的发生。随后, Galuzzi等人^[15]对54例第3~5/6天胚胎的培养液中常染色体基因*TBCID3*和Y染色体基因*TSPY1*进行检测, *TBCID3*和*TSPY1*基因检出率分别为94.4%和41.2%, 提示男性胚胎所占的比例约为41.2%。这进一步证明了胚胎培养液中胚胎游离DNA的存在。2015年, Wu等人^[20]对 α -地中海贫血病人胚胎培养液进行了研究, 并利用Q-PCR方法对胚胎培养液和滋养外胚层细胞进行检测, 结果显示, 胚胎培养液的诊断率为88.6%, 但这并不能确定检测到的遗传物质全部来自于胚胎。上述研究表明, 胚胎培养液中存在一定含量的DNA, 但DNA的含量及来源尚不清楚。

目前已有多个团队的研究表明, 胚胎培养液进行全基因组扩增的成功率为81.8%~100%, 明显高于囊胚腔液扩增成功率^[26-30], 采用SNP连锁分析的方法可以辅助分析致病基因变异的遗传来源。Liu等人^[31]首先采用这种策略对 β -地中海贫血的患者进行PGT-M, 其胚胎培养液全基因组扩增成功率为80%($n=10$), 同时对8例胚胎培养液*HBB*基因及其连锁的10个SNP进行连锁分析, 7例胚胎培养液样本与相应胚胎滋养外胚层细胞的检测结果是一致的, 这证明胚胎培养液中存在来自于胚胎的DNA。Capalbo等人^[16]采用类似的方

法对72例胚胎培养液进行检测, 仅20.8%的胚胎培养液与滋养外胚层的基因分型一致, 并多次在纯合子野生型胚胎培养液中检测到母源性变异, 提示胚胎培养液中可能会存在母源性DNA污染。

与囊胚腔液相比, 虽然胚胎培养液中DNA有更好的完整性, 但是其扩增成功率仍然低于滋养外胚层细胞, 等位基因脱扣率也明显高于滋养外胚层细胞, 同时可能会存在母源性DNA污染。因此, 胚胎培养液在PGT-M中的应用仍然面临很大的挑战^[17]。

对于胚胎非整倍体的胚胎培养液的检测研究也有很多报道, 不同研究之间的结果也存在较大的差异。Shamonki等人^[27]的研究显示, 57例胚胎培养液DNA检出率为96.5%, 但是大部分因质量指标未通过而无法完成染色体拷贝数变异的分析。Liu等人^[31]对7对夫妇的88个胚胎培养液进行类似的研究, 全基因组扩增成功率为90.9%, 但扩增后胚胎培养液DNA含量明显低于滋养外胚层细胞DNA含量(26.2 ng/uL vs. 60.2 ng/uL), 与正常发育的囊胚和发育停滞的囊胚染色体(包括嵌合和片段非整倍体)的一致性分别为64.5%和44%。如此高的不一致性的结果使得胚胎培养液DNA的检测技术不可能在临床应用和推广。但是, Xu等人^[26]对17对夫妇42例胚胎培养液进行检测, 染色体拷贝数变异检测成功率为100%, 与滋养外胚层细胞染色体整倍体结果一致率为85.7%。这种高扩增率和一致性又让胚胎培养液的临床应用看到了希望。Fang等人^[29]最近进行的一项临床试验性研究, 对45对受试者(23对夫妇染色体正常, 22对夫妇存在染色体重排)170例胚胎进行非侵入性染色体筛查(noninvasive chromosome screening, NICS)分析, 两组受试胚胎染色体整倍体率分别为50.7%(38/75, 正常核型夫妇)和43.2%(41/95, 染色体重排核型夫妇), 根据胚胎形态学评分和NICS结果对43例患者52枚胚胎(50个取卵周期)进行移植, 生化妊娠、临床妊娠率、自然流产率分别为72%(36/50)、58%(29/50)和10.3%(3/29, 无染色体非整倍体), 27例婴儿活产。这项研究表明, 无论染色体重排与否, 胚胎培养液游离DNA均可检测胚胎染色体非整倍体异常, 并为胚胎培养液的临床应用提供有利证据。近期一项前瞻性研究中, 46个患者115枚胚胎培养至第4天时, 更换培养液并进行胚胎冲洗, 以去除卵丘细胞等的DNA污染, 后继续培养至第5~7天进行胚胎活检并收集胚胎培养液, 胚胎培养液全基因组扩增成功率达到94.8%,

与滋养外胚层细胞染色体整倍体的检测结果一致性达到78.7%, 敏感性和特异性分别为94.5%和71.7%。这项前瞻性研究表明, 优化后的NiPGT-A能有效提高染色体非整倍体诊断效率, 但应用于临床之前仍然需要进行安全性和有效性的评估^[30]。

除了对胚胎培养液中DNA的检测外, 还有针对胚胎培养液中胚胎的代谢产物进行分析的研究报道。Liang等人^[32]通过对87例已知染色体核型的胚胎培养液代谢产物分析建模, 结果显示, 非整倍体组和整倍体组胚胎培养基的代谢谱存在显著差异, 对123例(61例整倍体和62例非整倍体)胚胎进行分析, 拉曼光谱检测胚胎染色体整倍体和非整倍体的准确率达95.9%。虽然本研究的准确性和有效性仍需要大规模的临床试验来验证, 但这也为NiPGT的研究和应用提供了新的思路。

3 囊胚腔液和胚胎培养液游离DNA的来源

囊胚腔液和胚胎培养液游离DNA的来源对于NiPGT的临床应用有重要的意义。胚胎发育过程中, 细胞凋亡对于调节细胞数量或者消除遗传物质异常的细胞发挥重要作用。已有研究证明, 在囊胚期胚胎的内细胞团和滋养外胚层细胞中均有凋亡细胞被检出, 而这些凋亡细胞会被临近细胞吞噬或者被排至囊胚腔中^[33-36]。因此, 囊胚腔液中游离DNA可能是细胞凋亡产生的片段化DNA。Tobler等人^[12]提出胚胎非整倍体细胞可能优先被排出至囊胚腔液中, 导致囊胚腔液检测结果与滋养外胚层细胞染色体非整倍体结果一致性较差, 并且嵌合胚胎非整倍体胚胎假阳性率升高。另外, 在囊胚腔液采集过程中也可能会造成部分胚胎细胞破裂, 从而将DNA释放至囊胚腔中。

胚胎培养液游离DNA来源尚不清楚。首先, 可能与细胞凋亡和DNA碎片化有关。Handyside等人提出胚胎培养液游离DNA最可能的来源是胚胎发育过程中死亡或者即将死亡的细胞, 利用DNA特异性荧光探针滋养外胚层和内细胞团进行标记, 发现随着囊胚扩张, 可检测到一系列的细胞凋亡, 特别是内细胞团的细胞凋亡^[37-39]。其次, 可能来源于第二极体。Ottolini等人^[40]利用单细胞全基因组SNP基因分型的方法发现, 囊胚发育过程排出至透明带的细胞碎片存在第二极体, 提示胚胎培养液游离DNA中可能存在第二极体的

遗传物质。另外, 胚胎培养液中还可能还存在卵丘细胞、精子或者其他DNA的污染。

因此, 虽然游离DNA的来源对于NiPGT临床应用具有重要意义, 但是明确游离DNA的来源并阐明其释放机制目前仍然存在很大的挑战。

4 NiPGT应用的局限性

虽然NiPGT可以避免胚胎活检过程对胚胎造成的损伤, 但是NiPGT仍然存在很多局限性。第一, 胚胎囊胚腔液和培养液中DNA的来源不明确, 因此可能会导致对移植胚胎基因型的误判。第二, 胚胎培养液可能it存在外源性的DNA污染, 主要包括培养基的污染、母源性卵丘细胞或极体污染、父源性精子污染、胚胎实验操作人员的污染和其他微生物污染等^[41], 这些不同来源DNA的存在会对NiPGT检测结果的准确性造成很大的干扰。第三, 囊胚腔液及胚胎培养液采集缺少标准化操作, 囊胚玻璃化冷冻技术对于囊胚腔液的采集影响较大, 胚胎培养液体积和采集时期也会影响游离DNA的初始含量, 这些因素都对NiPGT检测试剂盒的检测敏感性提出了很大的挑战。第四, NiPGT数据处理和分析不一致, 采用不同的方法和数据分析软件可能会导致检测结果的差异, 最终可能造成误判的不良后果。第五, 胚胎嵌合现象可引起检测结果的不确定性, 从而影响其在临床的应用。

目前, 对于NiPGT的研究存在较大的争议, 这可能与以下3方面有关: (i) 检测技术和数据分析方法不同。目前各研究所采用的技术都是基于胚胎活检细胞检测的检测技术, 对于NiPGT的检测和分析是否适用尚不明确。(ii) 不同研究所针对的研究样本的入组标准存在差异, 如女性患者的年龄对于胚胎质量影响较大, 这会使囊胚腔液和胚胎培养液中游离DNA含量存在不同, 从而造成最终检测结果的差异。(iii) 不同研究选择的胚胎数量、嵌合胚胎的数量及嵌合比例等的不同也会对NiPGT的应用结论造成差异。

5 总结与展望

目前, 利用囊胚腔液和胚胎培养液游离DNA进行PGT的研究越来越多, NiPGT作为一种非侵入性的检测技术, 能够避免活检对胚胎发育及子代成长过程可

能产生的风险,这也是其临床应用的优势所在。然而,目前NiPGT大规模的临床应用仍然有很长的路要走,还需要更多的研究来明确DNA的来源,需要更严格的

临床试验来验证,需要更规范化的采集和检测技术提高NiPGT检测的准确性、特异性和敏感性,为最终提高PGT的安全性提供可能的途径。

参考文献

- 1 Bick D P, Lau E C. Preimplantation genetic diagnosis. *Pediatr Clin North Am*, 2006, 53: 559–577
- 2 Handyside A H, Kontogianni E H, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 1990, 344: 768–770
- 3 Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, et al. Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 1993, 8: 2185–2191
- 4 Gleicher N, Kushnir V A, Barad D H. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: A systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12: 22
- 5 Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26: 603–610
- 6 Stigliani S, Anserini P, Venturini P L, et al. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod*, 2013, 28: 2652–2660
- 7 Zhang Y, Li N, Wang L, et al. Molecular analysis of DNA in blastocoele fluid using next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 637–645
- 8 Gardner D K, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertility Sterility*, 2000, 73: 1155–1158
- 9 Watson A J, Kidder G M. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of na/k-atpase during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, 1988, 126: 80–90
- 10 Magli M C, Pomante A, Cafueri G, et al. Preimplantation genetic testing: Polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoele fluid? *Fertility Sterility*, 2016, 105: 676–683.e5
- 11 Gianaroli L, Magli M C, Pomante A, et al. Blastocentesis: A source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertility Sterility*, 2014, 102: 1692–1699.e6
- 12 Tobler K J, Zhao Y, Ross R, et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertility Sterility*, 2015, 104: 418–425
- 13 Mukaida T, Oka C, Goto T, et al. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*, 2006, 21: 3246–3252
- 14 Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: Methodology and applications. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2015, 16: 79–102
- 15 Galluzzi L, Palini S, Stefani S D, et al. Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. *Future Sci OA*, 2015, 1: FSO62
- 16 Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, et al. Diagnostic efficacy of blastocoele fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertility Sterility*, 2018, 110: 870–879.e5
- 17 Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): The next revolution in reproductive genetics? *Hum Reprod Update*, 2020, 26: 16–42
- 18 Magli M C, Albanese C, Crippa A, et al. Deoxyribonucleic acid detection in blastocoele fluid: A new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy. *Fertility Sterility*, 2019, 111: 77–85
- 19 Assou S, Ait-Ahmed O, El Messaoudi S, et al. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med Hypotheses*, 2014, 83: 506–508
- 20 Wu H, Ding C, Shen X, et al. Medium-based noninvasive preimplantation genetic diagnosis for human α -thalassemias-SEA. *Medicine*, 2015, 94: e669
- 21 Hammond E R, McGillivray B C, Wicker S M, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic

- contamination identified. [Fertility Sterility](#), 2017, 107: 220–228.e5
- 22 Yang H W, Hwang K J, Kwon H C, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. [Hum Reprod](#), 1998, 13: 998–1002
- 23 Jurisicova A. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: Potential roles for the *Harakiri* gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. [Mol Hum Reprod](#), 2003, 9: 133–141
- 24 Chi H J, Koo J J, Choi S Y, et al. Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. [Fertility Sterility](#), 2011, 96: 187–192
- 25 Stigliani S, Persico L, Lagazio C, et al. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. [Mol Hum Reprod](#), 2014, 20: 1238–1246
- 26 Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for *in vitro* fertilization. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: 11907–11912
- 27 Shamonki M I, Jin H, Haimowitz Z, et al. Proof of concept: Preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. [Fertility Sterility](#), 2016, 106: 1312–1318
- 28 Feichtinger M, Vaccari E, Carli L, et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: A proof-of-concept pilot study. [Reprod Biomed Online](#), 2017, 34: 583–589
- 29 Fang R, Yang W, Zhao X, et al. Chromosome screening using culture medium of embryos fertilised *in vitro*: A pilot clinical study. [J Transl Med](#), 2019, 17: 73
- 30 Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: Concordance rate and clinical implications. [Fertility Sterility](#), 2019, 112: 510–519
- 31 Liu W Q, Liu J Q, Du H Z, et al. Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. [Ann Med](#), 2017, 49: 319–328
- 32 Liang B, Gao Y, Xu J, et al. Raman profiling of embryo culture medium to identify aneuploid and euploid embryos. [Fertility Sterility](#), 2019, 111: 753–762.e1
- 33 Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. [Curr Protocols Cell Biol](#), 2001, 18: 18.3.1–18.3.23
- 34 Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. [Theriogenology](#), 2005, 64: 221–231
- 35 Hardy K. Apoptosis in the human embryo. [Rev Reprod](#), 1999, 4: 125–134
- 36 Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. [Mol Human Reprod](#), 1997, 3: 919–925
- 37 Handyside A H. Noninvasive preimplantation genetic testing: Dream or reality? [Fertility Sterility](#), 2016, 106: 1324–1325
- 38 Handyside A H, Hunter S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. [Roux's Arch Dev Biol](#), 1986, 195: 519–526
- 39 Legge M. Oocyte and zygote zona pellucida permeability to macromolecules. [J Exp Zool](#), 1995, 271: 145–150
- 40 Ottolini C S, Rogers S, Sage K, et al. Karyomapping identifies second polar body DNA persisting to the blastocyst stage: Implications for embryo biopsy. [Reprod Biomed Online](#), 2015, 31: 776–782
- 41 Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of β -thalassaemia: a pilot study. [Hum Reprod](#), 2007, 22: 1443–1449

Advances in noninvasive preimplantation genetic testing

GAO Ming^{1,2,3} & GAO Yuan^{1,2,3}

1 Center for Reproductive Medicine, Shandong University, Jinan 250001, China;

2 National Research Center for Assisted Reproductive Technology and Reproductive Genetics, Jinan 250001, China;

3 The Key Laboratory for Reproductive Endocrinology of Ministry of Education, Jinan 250001, China

Preimplantation genetic testing (PGT) involves embryo screening for chromosome abnormalities or inherited disease genes prior to transfer of embryos into the uterine cavity. At present, PGT has been widely performed in assisted reproduction technology (ART) to improve pregnancy rates, reduce birth defects and decrease miscarriage rates. The discovery of free DNA in embryo culture medium and blastocoele fluid has attracted interest from many researchers into noninvasive preimplantation genetic testing (NiPGT) field. Due to inconsistent results and different analysis methods in different studies, more clinical trials are necessary to verify the clinical availability of NiPGT. This review mainly analyzes the latest research of NiPGT, and discusses the advantages and disadvantages of NiPGT in clinical application.

blastocoele fluid, embryo culture medium, free DNA, NiPGT

doi: [10.1360/SSV-2019-0302](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0302)