

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI BỆNH β -THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT MINISEQUENCING

**Ngô Trường Giang*^{*}; Nguyễn Đình Tảo*^{*}; Trần Văn Khoa*^{*}
Quản Hoàng Lâm*^{*}; Triệu Tiến Sang*^{*}; Nguyễn Thanh Tùng*^{*}**

TÓM TẮT

Hai vợ chồng mang gen bệnh di truyền đơn gen luôn tiềm ẩn nguy cơ sinh con mắc bệnh, việc nghiên cứu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi là hết sức cần thiết và có ý nghĩa nhân văn. *Đối tượng và phương pháp:* nghiên cứu thực hiện trên 6 cặp gia đình mang gen đột biến gây bệnh β -thalassemia tại Học viện Quân y từ tháng 2 - 2015 đến 12 - 2015. Máu ngoại vi bố, mẹ được tách ADN, sinh thiết 1 - 2 tế bào từ phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 hoặc ngày 5 của các cặp gia đình này, nhân toàn bộ gen các mẫu phôi sinh thiết, phát hiện đột biến gây bệnh trên máu bố mẹ và phôi đồng thời bằng 2 phương pháp minisequencing và StripAssay. *Kết quả:* sản phẩm nhân WGA rõ, ADN tập trung tạo vạch rõ ở vùng 30 kb. Trên hình ảnh Tripassay, căn cứ các vạch xuất hiện có thể xác định phôi bình thường hay biểu hiện bệnh. *Kết luận:* bằng kỹ thuật minisequencing and StripAssay đã chọn được các phôi không bị bệnh để chuyển vào tử cung người mẹ.

* Từ khóa: Bệnh β -thalassemia; Tế bào phôi; Chẩn đoán trước chuyển phôi; Kỹ thuật minisequencing.

Initial Results of Using Preimplantation Genetic Diagnosis for β -Thalassemia by Minisequencing Technique

Summary

A couple carrying single gene disorder had baby with birth defect. The research and application of genetic diagnostic procedures before embryo transfer is essential and meaningful humanities. Subjects and methods: Study on application of preimplantation genetic diagnosis method for β -thalassemia disease in Military Medical University from 2 - 2015 to 12 - 2015. The study was carried out on 6 couples who were β -thalassemia carriers. DNA of β -thalassemia carriers were isolated from whole blood. One blastomere or trophectoderm was biopsied from day 3 or day 5 embryos after IVF-ICSI, then embryo whole genome was amplified. Results: The product of WGA is clear, DNA outlined in the 30 kb region. On the photographs of Tripassay that appear normal embryo or disease manifestation. Conclusion: Minisequencing and StripAssay, which were parallely performed can detect unaffected mutations embryos for uterus transfer.

* Key words: Beta-thalassemia; Blastomere; Preimplantation genetic diagnosis; Minisequencing technique.

* Học viện Quân y

Người phản hồi (Corresponding): Ngô Trường Giang (dungtu86@yahoo.com)

Ngày nhận bài: 03/06/2016; Ngày phản biện đánh giá bài báo: 17/07/2016

Ngày bài báo được đăng: 22/07/2016

ĐẶT VẤN ĐỀ

β -thalassemia là một trong những bệnh di truyền đơn gen phổ biến nhất trên thế giới [1, 9]. Ở Việt Nam, ước tính có khoảng 5 triệu người mang gen và bị bệnh. Hàng năm có khoảng 2.000 trẻ sinh ra mắc bệnh thalassemia.

Các đột biến gen beta-globin gây bệnh β -thalassemia thường là đột biến điểm. Nghiên cứu gần đây nhất của Lý Thị Thanh Hà và CS (2008) khi áp dụng kỹ thuật ARMS - PCR trong chẩn đoán trước và sau sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương cho kết quả:

Tên đột biến	CD17	CD41/42	-28M	IVS1-1	IVS1-5	CD71/72	IVS2654	HBE
L.T.Hà và CS	41,6	34,7	2,8	1,4	2,8	5,6	0	12,5
Saovaros và CS	20,5	35,3	7,3	6	0	7,3	7,3	31

Điều trị cho những BN này tạo một gánh nặng cả về kinh tế cũng như tinh thần cho gia đình và toàn xã hội. Chính vì vậy, việc phòng bệnh và khống chế phát tán bệnh ra cộng đồng là rất cấp thiết.

Hiện nay, một số biện pháp can thiệp chẩn đoán trước sinh được áp dụng như chọc hút nước ối hay sinh thiết gai rau đã phần nào hạn chế sinh ra những trẻ bị bệnh. Tuy nhiên, những phương pháp này tiến hành khá muộn, nếu dừng thai kỳ sẽ ảnh hưởng rất lớn tới sức khỏe thai phụ.

Chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi (Preimplantation Genetic Diagnosis-PGD) là phương pháp sàng lọc phôi bất thường về mặt di truyền được thực hiện trước khi cấy phôi vào tử cung người mẹ. Đây là một phương pháp dự phòng hiệu quả cho các bệnh di truyền, trong đó có β -thalassemia [4, 5, 7, 8].

Sau khi xây dựng được quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh β -thalassemia, chúng tôi bước đầu ứng dụng vào chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi cho các gia đình có bố mẹ mang gen

đột biến gen gây bệnh β -thalassemia đã sinh con bị bệnh và có nguyện vọng sinh con khỏe mạnh tại Học viện Quân y nhằm đánh giá kết quả ban đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh β -thalassemia.

ĐỐI TƯỢNG, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

12 mẫu máu của 6 gia đình gồm bố, mẹ mang gen β -thalassemia, có con bị bệnh β -thalassemia, có kết quả sàng lọc đột biến β -thalassemia từ ADN máu toàn phần (sử dụng làm đối chứng), 26 mẫu phôi sinh thiết từ các phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 của 6 gia đình này. Lấy 5 ml máu bố, mẹ cho vào ống chống đông bằng EDTA, phôi ngày 3 sinh thiết 1 - 2 tế bào, rửa nhiều lần bằng PBS1X đặt trong ống 0,2 ml.

2. Hóa chất và thiết bị.

* *Hóa chất:* WGA REPLI-g Single Cell Kit, β -Globin StripAssay SEA kit (Vienna Lab), SAP, EXO1, Hidi-formamid; Gene-Scan-120 LIZ, PCR Reaction mix, DNA

Polymerase, primers, minisequencing primers, SNaPshot Multiplex Kit.

* *Thiết bị*: máy ly tâm văng, kính hiển vi soi nổi 32X, buồng thao tác PCR (Mỹ), máy PCR ABI 9700 (Applied biosystem), hốt ủ hóa chất (Hàn Quốc), máy điện di tự động 3130xl Genetic analyzer, hệ thống điện di trên gel.

3. Phương pháp nghiên cứu.

Tách ADN từ máu toàn phần của bố mẹ. Nhân toàn bộ gen các mẫu phôi sinh thiết, kiểm tra sản phẩm bằng điện di, pha loãng

20 lần. Tiến hành phản ứng nested-PCR theo Wang và CS (2003) có cải biên [3]. Cụ thể: nhân gen β -globin với thể tích 50 μ l chứa sản phẩm nhân toàn bộ gen pha loãng; 0,2 μ M mỗi primer vòng 1; 0,2 mM mỗi loại deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) và 2,5 đơn vị HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) trong 1X PCR buffer chứa 1,5 mM MgCl₂, tiến hành minisequencing với SNaPshotTM multiplex ready reaction mix (Applied Biosystems) và 0,2 μ M mỗi minisequencing primer theo quy trình của nhà sản xuất.

Bảng 1: Trình tự mỗi gen β -globin.

Tên mỗi	Trình tự mỗi 5'-3'	Vị trí gắn trên gen đích	Kích thước sản phẩm
BGLO-F	GTCATCACTTAGACCTCACC	HUMHBB: 62.016 - 62.035	1.409 bp
BGLO-R	CAGAATAATCCAGCCTTATCC	HUMHBB: 63.424 - 63.404	

Bảng 2: Chu trình nhiệt phản ứng PCR nested-PCR.

95 ^o C	15 phút	1 chu kỳ
95 ^o C	45 giây	30 chu kỳ
56 ^o C	45 giây	
72 ^o C	2 phút	
72 ^o C	5 phút	1 chu kỳ

Sản phẩm nhân vòng 2 được tinh sạch bằng 2 enzym SAP và EXO1, chạy multiplex minisequencing theo quy trình kit ABI PRIMERSNaPshot Multiplex (Applied Biosystems) với các mỗi minisequencing.

Bảng 3: Trình tự các mỗi sử dụng cho minisequencing.

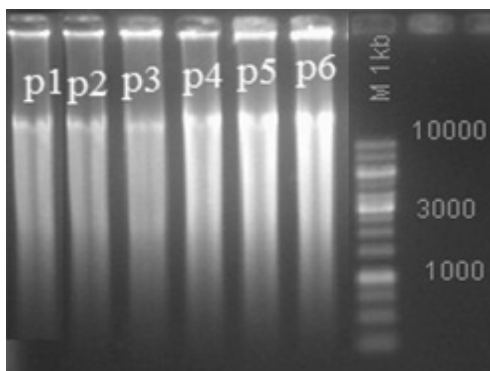
SNP-41/42	CCTTGGACCCAGAGGTT
SNP-654	TGATAATTTCTGGGTTAAGG
SNP-28	(gact) ₇ GATGGCTCTGCCCTGACTT
Cd 26	(gact) ₃ CAACCTGCCAGGGCCT
Cd 17R	act (gact) ₇ CAACTTCATCCACGTTACCT
Cd 28R	(gact) ₆ GATGGCTCTGCCCTGACTT
Cd 71/72F	ct (gact) ₈ AGAAAGTGCTCGGTGCCTTTA
IVSI-1R	TCTTGTAACCTTGATACCAA

Sản phẩm minisequencing được điện di huỳnh quang trên máy 3130xl Genetic analyzer, phân tích bằng phần mềm GeneMapper ID v 3.2. Đánh giá kết quả phát hiện đột biến dựa vào kích thước, màu sắc và độ lớn của pic thu được trên điện di huỳnh quang. Tiến hành sàng lọc bố, mẹ và các mẫu phôi bằng cả minisequencing và StripAssay.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả nhân toàn bộ gen.

Nguyên lý của phương pháp này là primer mở rộng trước khi khuếch đại bằng cách sử dụng một hỗn hợp ngẫu nhiên của oligonucleotides 15 bp khuếch đại toàn bộ gen của một tế bào tạo ra các đoạn ADN có kích thước 2 - 70 kb.



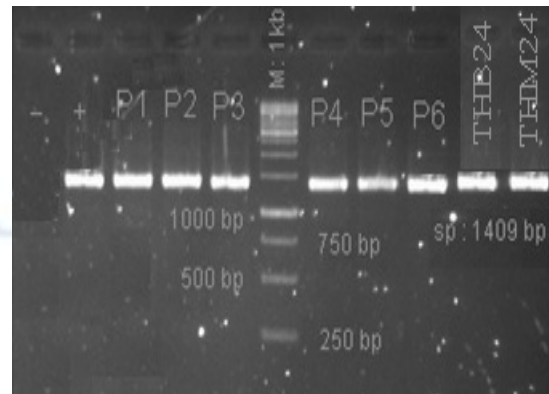
Hình 1: Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm sau nhân WGA.

(Marker ADN 1 kp; P1-6: 6 phôi của gia đình 24).

Hình 1 cho thấy sản phẩm nhân WGA rõ, ADN tập trung tạo vạch rõ ở vùng 30 kb, phù hợp với khuyến cáo của nhà sản xuất. Sau khi kiểm tra sản phẩm bằng điện di agarose, tiến hành pha loãng sản phẩm 20 lần bằng nước deion. Như vậy, kỹ thuật nhân toàn bộ gen đã giúp có

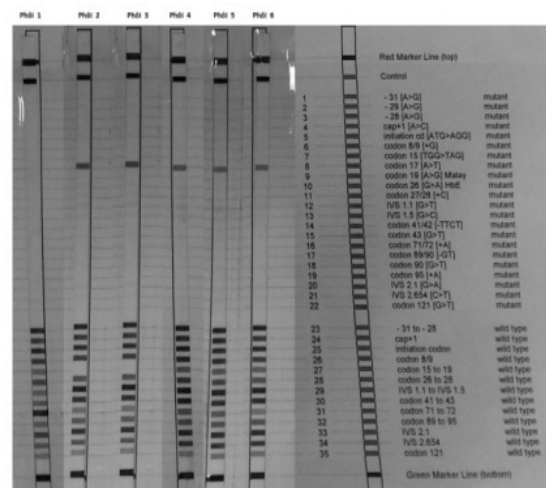
nhiều vật liệu di truyền để phối hợp các phương pháp chẩn đoán khác, từ đó làm tăng độ chính xác và tính ổn định của chẩn đoán.

2. Kết quả nhân gen β -globin và kiểm tra đột biến bằng bộ kit TripAssay.



Hình 2: Hình ảnh điện di trên gel agarose sản phẩm khuếch đại gen β -globin.

Marker ADN 1 kp (dải giữa); chứng âm (-); chứng dương (+); P1, P2, P3, P4, P5, P6: mẫu phôi, THB 24; THC: mẫu bố và mẫu mẹ gia đình 24.



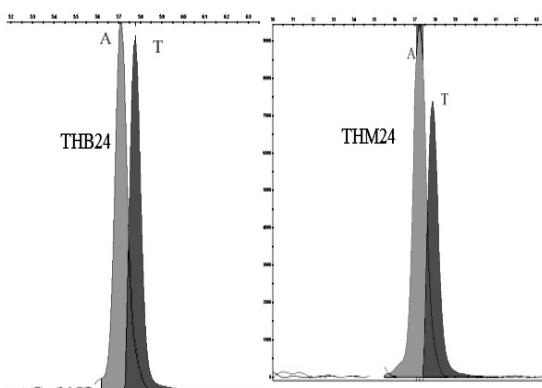
Hình 3: Hình ảnh chẩn đoán 6 phôi sinh thiết bằng kit TripAssay gia đình 24.

Hình 2 cho thấy sản phẩm nhân gen có chất lượng tốt, kích thước phù hợp với dự kiến theo thiết kế, băng điện di rõ, nét, đẹp, không thấy sản phẩm phụ.

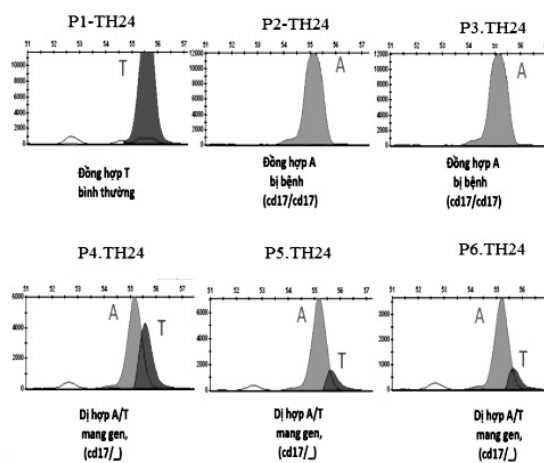
Hình 3 là ảnh TripAssay chẩn đoán 6 phôi sinh thiết ngày 5 của gia đình số 24. Trong 6 phôi này, 2 phôi mang gen đồng hợp tử Cd17, đó là phôi số 2 và số 3. Các phôi này khi lai TripAssay thấy xuất hiện vạch tại vị trí đột biến Cd17 và mất cả vạch tại vị trí bình thường của Cd17. Phôi số 1 không xuất hiện vạch đột biến (bình thường). Phôi số 4, 5, 6 xuất hiện vạch đột biến, nhưng chưa mất vạch ở vị trí bình thường nên các phôi này chỉ mang gen dị hợp tử Cd17, sau này sẽ không biểu hiện bệnh.

3. Kết quả phát hiện đột biến trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Chúng tôi tiến hành đồng thời hai phương pháp phân tích minisequencing và StripAssay để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh β -thalassemia cho các phôi thụ tinh trong ống nghiệm của 6 cặp gia đình mang gen thalassemia tham gia nghiên cứu và thu được kết quả sau:



Hình 4: Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing mẫu trường hợp bố 24, trường hợp mẹ của gia đình 24.



Hình 5: Hình ảnh điện di minisequencing 6 phôi của gia đình 24.

Ở hình 4, mẫu trường hợp bố 24, trường hợp mẹ 24 mang kiểu gen dị hợp tử Cd17, đỉnh trái xanh lá cây là nucleotid A (đột biến), đỉnh dưới đỏ là nucleotid T (bình thường).

Hình 5: gia đình này có 6 phôi được sinh thiết ngày 5 để chẩn đoán xác định đột biến cho kết quả: 1 phôi bình thường không mang gen đột biến (phôi số 1), 2 phôi đồng hợp tử Cd17 (phôi 2 và phôi 3) và 3 phôi mang gen dị hợp tử Cd17 (phôi số 4, 5, 6).

Từ hình ảnh trên cho thấy mẫu số 1 có xuất hiện đỉnh huỳnh quang của nucleotid T, đây là vị trí nucleotid bình thường. Do vậy, phôi số 1 là phôi không mang gen đột biến gây bệnh. Phôi số 2 và phôi số 3 đều xuất hiện đỉnh huỳnh quang của nucleotid A (đột biến). Như vậy, phôi số 2 và phôi số 3 mang gen đồng hợp tử Cd17 (phôi bị bệnh). Các phôi số 4, 5, 6 xuất hiện cả 2 đỉnh huỳnh quang của nucleotide A và T, là các phôi mang gen dị hợp tử Cd17, nhưng sẽ không biểu hiện bệnh.

Bảng 4: Kết quả chẩn đoán bệnh β -thalassemia trên phôi nghiên cứu.

STT	Mã bệnh nhân	Kiểu đột biến	Mã bệnh nhân	Kiểu đột biến
1	THB24	Cd17/ β	THM24	Cd17/ β
	P1.TH24.L1	β/β	P2.TH24.L1	Cd17/Cd17
	P3.TH24.L1	Cd17/Cd17	P4.TH24.L1	Cd17/ β
	P5.TH24.L1	Cd17/ β	P6.TH24.L1	Cd17/ β
	P1.TH24.L2	Cd17	P2.TH24.L2	Cd17/Cd17
2	THB48	Cd41/42/ β	THM48	IVS1-1/ β
	P1-TH48	IVS1.1/ β	P2-TH48	IVS1.1/ β
	P1-TH48-L2	IVS1.1/ β	P2-TH48-L2	β/β
3	THB51	Cd41/42/ β	THM51	IVS1-1/ β
	P1-TH51	β/β		
4	THB57	Cd26/ β	THM57	Cd17/ β
	P1-TH57	Cd26/ β		
5	THB58	Cd26/ β	THM58	Cd17/ β
	P1-TH58	β/β		
6	THB65	Cd41/42/ β	THM65	Cd17/ β
	P1.TH65	Cd41/42/ β	P6.TH65	β/β
	P2.TH65	Cd17/ β	P7.TH65	β/β
	P3.TH65	β/β	P8.TH65	Cd17/ β
	P4.TH65	β/β	P9.TH65	Cd41/42/ β
	P5.TH65	Cd41/42/Cd17	P10.TH65	β/β

Tất cả 25 mẫu phôi của 6 gia đình đều phát hiện đột biến, thấy được di truyền đột biến từ bố mẹ cho con. Qua đó, đã chọn được các phôi lành (hoàn toàn bình thường hoặc chỉ mang gen đột biến) chuyển vào người mẹ để sinh ra trẻ khỏe mạnh.

KẾT LUẬN

Bước đầu đã áp dụng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh β -thalassemia bằng kỹ thuật minisequencing trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm và chọn được các phôi không bị bệnh để chuyển vào tử cung người mẹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kham SK, Quah TC, Loong AM, Tan PL, Fraser A, Chong SS et al. A molecular epidemiologic study of thalassaemia using newborns cord blood in a multiracial Asian population in Singapore: results and recommendations for a population screening program. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004, 26, pp.817-819.

2. Ng IS, Law HY. Challenges in screening and prevention of thalassaemia in Singapore. *Asian-Ocean Journal of Pediatrics and Child Health*. 2003, 2, pp.29-38.
3. Wang W, Kham SK, Yeo GH, Quah TC, Chong SS. Multiplex minisequencing screen for common Southeast Asian and Indian betathalassaemia mutations. *Clin Chem*. 2003, 49, pp.209-218.
4. Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G et al. Preimplantation diagnosis of thalassaemias. *J Assist Reprod Genet*. 1998, 15, pp.219-225.
5. Deng J, Peng WL, Li J, Fang C, Liang XY, Zeng YH et al. Successful preimplantation genetic diagnosis for alpha- and beta-thalassaemia in China. *Prenat Diagn*. 2006, 26, pp.1021-1028.
6. Jiao ZX, Zhuang GL, Zhou CQ, Shu YM, Li J, Liang XY. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of beta-thalassaemia. *Chin MedJ (Engl)*. 2004, 117, pp.483-437.
7. De Rycke M, Van de Velde H, Sermon K, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M et al. Preimplantation genetic diagnosis for sickle-cell anemia and for beta-thalassaemia. *Prenat Diagn*. 2001, 21, pp.214-222.
8. Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, Tzetis M, Mastrominas M, Traeger-Synodinos J. Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting beta-thalassaemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies. *Prenat Diagn*. 1999, 19, pp.1217-2122.
9. Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Giambona A, Siciliano S, Maggio A et al. Successful application of preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia and sickle cell anemia in Italy. *Hum Reprod*. 2002, 17, pp.1158-1165.