

đồng tử giãn liệt. Các đánh giá về độ mở góc không thấy khác biệt giữa các hình thái đóng góc NĐT và MMP. Dấu hiệu quan trọng có giá trị chẩn đoán hình thái là dấu hiệu lạc đà 2 bước với độ đặc hiệu trên 90%.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hiền (2012). Ứng dụng máy siêu âm sinh hiển vi đánh giá sự thay đổi bán phần trước nhãn cầu sau laser cắt mỏng mắt chu biên điều trị dự phòng Glôcôm góc đóng nguyên phát, Luận Văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú.
2. Nguyễn Văn Độ, Phạm Thị Thu Thủy (2016). Kết quả lâu dài phương pháp tạo hình góc tiền phòng bằng laser trong điều trị glôcôm góc đóng nguyên phát, Luận Văn Thạc Sĩ, Trường Đại Học Y Hà Nội
3. Chelvin C.A, Sng MBBChir, FRCS(Ed), et al. (2014). Pretreatment Anterior Segment Imaging During Acute Primary Angle Closure: Insights into Angle Closure Mechanisms in the Acute Phase. American Academy of Ophthalmology. 21:119-125.
4. Paul J Foster.FRCSEd, Jamyanjav Baasanhu. MD, Poul Helge Alsbirk. MD, et al. (1996). Glaucoma in Mongolia: a population-based survey in Hövsgöl Province, northern Mongolia. Archives of ophthalmology. 114(10):1235-1241.
5. Yi-an You. MD, Le-ru Zhu. MD, Ji-quan Wen. MD, et al. (2015). Ultrasound Biomicroscopic Evaluation of Uveal Effusion in Acute Primary Angle Closure. J Glaucoma. 24:656-661.
6. Jian-Gang Yang, Jian-Jun Li, Hua Tian, et al. (2017). Uveal effusion following acute primary angle-closure: aretrospective case series. Int J Ophthalmol .10(3):406-412.
7. Gazzard G, Friedman DS, Devereux JG, et al. (2003). A prospective ultrasound biomicroscopy evaluation of changes in anterior segment morphology after laser iridotomy in Asian eyes. Ophthalmology. 110(3): 630-8.
8. Kiuchi Y, Kanamoto T, Nakamura T (2009). Double hump sign in indentation gonioscopy is correlated with presence of plateau iris configuration regardless of patent iridotomy. J Glaucoma.18(2):161-4.

## XÂY DỰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR KHUẾCH ĐẠI 14 CHỈ THỊ STR ỨNG DỤNG TRONG PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI BỆNH HEMOPHILIA A

Đặng Tiên Trường\*, Nguyễn Trường Giang\*, Nguyễn Duy Bắc\*

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Xây dựng kỹ thuật Multiplex-PCR, ứng dụng trong PGT-M bệnh Hemophilia A. **Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng phần mềm tin sinh xác định  $T_m$ ; Tối ưu hóa nhiệt độ gắn môi bằng phản ứng PCR đơn; Tối ưu nồng độ primer của phản ứng Multiplex PCR dựa trên tín hiệu trên kết quả điện di mao quản. **Kết quả và kết luận:** Xây dựng và tối ưu hóa được kỹ thuật Multiplex PCR khuếch đại đồng thời 14 cặp chỉ thị STR với nồng độ các cặp primer từ 0,15-0,7 $\mu$ M, ở  $T_a$  là 60°C. Quy trình được thiết lập đáp ứng yêu cầu phân tích di truyền trước chuyển phôi bệnh Hemophilia A.

**Từ khóa:** Multiplex PCR, chỉ thị STR, Hemophilia A.

### SUMMARY

#### ESTABLISHMENT OF MULTIPLEX-PCR OF 14 STR MARKERS FOR PGT-M HEMOPHILIA A

**Objective:** Establish Multiplex PCR reaction which is applied for preimplantation genetic testing for the monogenic disorder (PGT-M) in Hemophilia A. **Method:** Using bioinformatics software to determine  $T_m$ ; Optimize  $T_a$  by single PCR reaction; Optimize the primer concentration of Multiplex-PCR based on the

signal of capillary electrophoresis results. **Result and Conclusion:** A Multiplex-PCR of 14 STR markers with primer concentration from 0.15-0.7 $\mu$ M, at 60°C was set up successfully. This procedure can be applied in pre-implantation genetic testing for PGT-M for Hemophilia A.

**Key words:** Multiplex PCR, STR marker, Hemophilia A.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hemophilia A là bệnh rối loạn đông máu di truyền. Nguyên nhân do tổn thương gen F8 trên nhiễm sắc X (Xq28), giảm sản xuất yếu tố VIII, gây chảy máu không cầm. Tỷ lệ mắc bệnh khoảng 1/5000 người nam<sup>[1]</sup>. Điều trị hemophilia A tốn kém nhưng không giải quyết được nguyên nhân bị bệnh. Vì vậy, dự phòng không sinh con bị bệnh hoặc không mang gen bệnh là rất cần thiết.

Gen gây bệnh Hemophilia A rất lớn. Đến nay, có hơn 2.000 đột biến của gen F8 được xác định. Trong đó, đột biến đảo đoạn intron 22 và intron 1 chiếm 50% số ca bệnh nặng. Kỹ thuật phân tích di truyền trước chuyển phôi đơn gen (Preimplantation Genetic Testing for monogenic Disease, PGT-M) dựa trên việc xác định trực tiếp đột biến không thể áp dụng cho các đột biến đảo đoạn này. Bên cạnh đó, hiện tượng khuếch đại hỏng alen (Allele DropOut-ADO) ở mẫu tế bào phôi, được xác định trên 40% các ca chẩn

\*Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Duy Bắc

Email: bac\_hvqy@yahoo.com

Ngày nhận bài: 3.01.2020

Ngày phản biện khoa học: 20.2.2020

Ngày duyệt bài: 28.2.2020

đoán trước chuyển phôi [2], có thể dẫn tới chẩn đoán sai. Ngoài ra, ngoại nhiễm cũng là nguyên nhân phổ biến thứ hai gây chẩn đoán sai trong PGT. Do vậy, kỹ thuật phân tích liên kết gen sử dụng nhiều trình tự lặp ngắn (Short Tandem Repeat – STR) giúp phân tích di truyền trước chuyển phôi hemophilia A được ưu tiên lựa chọn vì giúp kiểm soát ADO và ngoại nhiễm.

Các STR phục vụ PGT-M phải có tính đa hình cao và nằm gần gen tổn thương để đảm bảo tính liên kết. Trên thế giới, một số nghiên cứu đã đánh giá tính đa hình trên quần thể người Brazil [3, 4], New Zealand [5], Trung Quốc [6, 7], nhằm lựa chọn các STR phục vụ chẩn đoán trước chuyển phôi hemophilia A. Sàng lọc được bộ chỉ thị có tính đa hình cao trong PGT-M giúp xác định được tổn thương, kiểm soát nhiễm và hiện tượng ADO là rất quan trọng. Tuy nhiên, PGT-M là qui trình có tính cá thể hóa cao, lựa chọn được chỉ thị có thông tin cho từng gia đình. Việc này thường phải tiến hành phản ứng đơn mỗi của tất cả các chỉ thị và ở tất cả các mẫu. Tiến hành việc này trên hàng chục chỉ thị và toàn bộ mẫu trong gia đình gây tốn nhiều thời gian, công sức và hóa chất. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến

hành thiết kế phản ứng multiplex PCR khuếch đại đồng thời 13 chỉ thị để phục vụ cho qui trình PGT-M bệnh Hemophilia A.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu.** Sử dụng mẫu ADN tách từ máu của người bố không bị bệnh Hemophilia A và người mẹ mang gen bệnh trong 02 gia đình mang gen, có con bị bệnh.

**2.2. Địa điểm nghiên cứu.** Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng phân tích ADN, Bộ môn Giải phẫu – Học viện Quân Y.

### 2.3. Primer của phản ứng Multiplex PCR

Sau khi lựa chọn được các STR đáp ứng tiêu chí sàng lọc, tiến hành thiết kế mỗi khuếch đại dựa trên trình tự vùng flanking bằng phần mềm thiết kế Primer3. Cuối cùng, sử dụng công cụ In-silico PCR tại <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> với hệ gen tham chiếu là GRCh38/hg38 kết hợp phần mềm so sánh trình tự BLAST trên NCBI nhằm xác định sơ bộ các allele của loci để loại bỏ các marker có trình tự mỗi bắt cặp với các đoạn lặp Alu và các trình tự không đặc hiệu trên NST khác, sau đó thiết kế gắn huỳnh quang cho 1 mỗi trong mỗi cặp.

**Bảng 1: Thông tin trình tự mỗi khuếch đại hệ thống chỉ thị STR:**

Cặp mỗi	Trình tự mỗi (5'-3')	Sản phẩm (bp)
X1 <sup>a</sup>	GGTTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCGAGTTATTAC	152-172
	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	
X2 <sup>b</sup>	GTA AACGACGCGCCAGTGGAAATTCTCCTCTCTGCTCC	129-143
	CCTTCTTTCTCAAATGATGCTTGG	
X3 <sup>c</sup>	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTCITGGTCTGGC	251-275
	GTTTCTCCCATTCTATTCCCTAAATAAGATAGC	
X4 <sup>b</sup>	GTA AACGACGCGCCAGTGGTGGAGACTTGGCAGACTCC	175-181
	GTTTCTTTAGAATCACTCTTGGTGTG	
X5 <sup>b</sup>	GTA AACGACGCGCCAGTGGAAATGCACAGCCTATCCTCC	207-217
	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	
X6 <sup>b</sup>	GGTTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATCATTGAGCC	116-128
	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	
X8 <sup>a</sup>	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAAATGAACAAGTGAAGG	309-321
	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	
X9 <sup>c</sup>	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCGTACTTTTACCATTGGC	188-198
	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	
X10 <sup>c</sup>	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAGATCACTTCTTTC	226-238
	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC	
X11 <sup>a</sup>	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTCAGCCCC	179-215
	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	
X12 <sup>b</sup>	GTA AACGACGCGCCAGTGGTGTCTGATACAAGTCTGATAC	234-256
	GGTTAGTGGTACTCAAACAC	
X13 <sup>c</sup>	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTGGCAACTGTGCACTG	289-319
	GTTTCCCTACTGTCTTGAATATTGTGGC	
X14 <sup>a</sup>	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGACATTGACTCTATC	235-267
	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	
X15 <sup>c</sup>	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	133/139
	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	

<sup>a</sup>: Cặp mồi gắn màu HEX; <sup>b</sup>: Cặp mồi gắn màu FAM; <sup>c</sup>: Cặp mồi gắn màu NED

**2.4. Tách chiết ADN.** ADN được tách từ 200µl máu hoặc dịch ối bằng bộ kit QIAGEN Blood mini, theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất (QIAGEN, Đức), ADN tách chiết được lưu trữ ở -20°C cho tới khi sử dụng.

**2.5. Khuếch đại hệ thống marker bằng phản ứng PCR và Multiplex PCR**

- *Tối ưu hóa nhiệt độ gắn mồi:* Xác định nhiệt độ nóng chảy  $T_m$  của 14 cặp mồi gồm 13 chỉ thị và 1 cặp primer trên nhiễm sắc thể giới tính, trên <http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>, nhiệt độ gắn mồi trung bình trên lý thuyết của các cặp mồi là 61.3°C. Thực hiện PCR đơn mồi theo dải nhiệt độ 55°C – 60°C – 65°C, sử dụng bộ kit HotTag Master Mix (QIAGEN) với thành phần và nhiệt độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất và phân tích sản phẩm trên gel agarose 2%.

- *Tối ưu hóa nồng độ các mồi.* Sau khi thực hiện tối ưu hóa phản ứng Multiplex PCR nhằm xác định nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi để đạt hiệu quả khuếch đại cao nhất, phản ứng được tiến hành trong tube PCR tổng thể tích 20µl bao gồm 10ng genomic DNA, 2X QIAGEN Multiplex Master Mix (QIAGEN), 0,15 – 0,7µM mồi. Chu trình nhiệt thực hiện trên máy PCR ProFlex 3x32-well (Applied Biosystems), gồm bước hoạt hóa enzyme ban đầu ở 95°C trong 15 phút, 30 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 59°C trong 90 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút và bước kéo dài cuối cùng ở 60°C trong 30 phút.

**2.6. Điện di mao quản.** Sau khi tiến hành tối ưu hóa thể tích sản phẩm PCR được biến tính và điện di mao quản. 10µl tổng thể tích bao gồm 8,5µl đệm điện di Hi-Di Formamide; 0,5µl GeneScan-500 LIZ và 1,0µl sản phẩm PCR. Biến tính ở 95°C trong 5 phút.

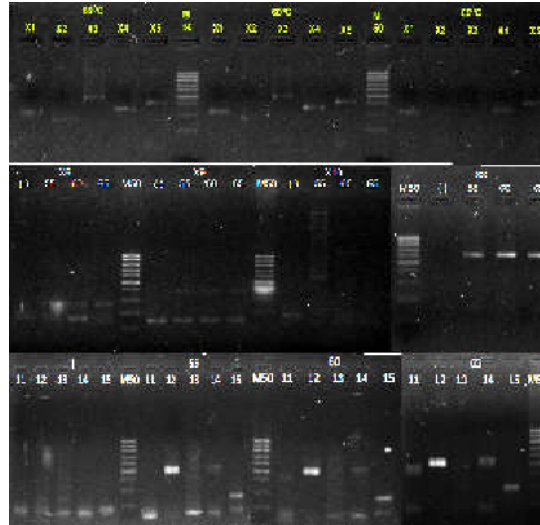
Phân tích kết quả bằng phần mềm GeneMapper 5.0.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

**3.1. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi**

Nhiệt độ gắn mồi trung bình trên lý thuyết của các cặp mồi là 61,3°C. Kết quả phản ứng PCR đơn mồi được thể hiện trên hình 1.

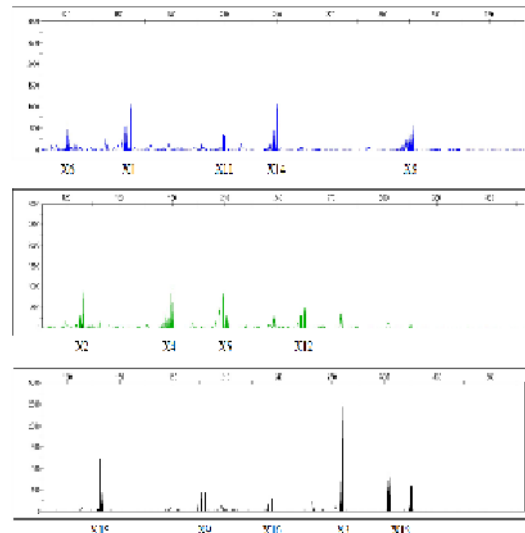
Kết quả điện di các sản phẩm đơn mồi được thể hiện trên Hình 1. Kết quả cho thấy cặp mồi X11 và X14 cho sản phẩm tốt nhất ở 65°C, cặp mồi X12 và X15 đều có tín hiệu sản phẩm đặc hiệu nhiều ở cả 3 dải nhiệt độ, cặp mồi X13 không có tín hiệu sản phẩm hoặc chỉ có tín hiệu sản phẩm không đặc hiệu ở cả 3 dải nhiệt độ.



**Hình 1. Kết quả tối ưu hóa các mồi X1 đến X15 ở dải nhiệt độ 55, 60, 65**

Từ các kết quả tối ưu hóa ở 3 dải nhiệt độ trên, có thể nhận thấy 14 cặp mồi này có nhiệt độ gắn mồi tối ưu không đồng nhất nhau. Để khắc phục điều này, chúng tôi sử dụng QIAGEN Multiplex PCR Mastermix nhằm tối ưu điều kiện phản ứng multiplex về cùng một điều kiện nhiệt độ của các mồi khác nhau theo khuyến cáo của nhà sản xuất (với nhiệt độ gắn mồi là 60°C), không phụ thuộc nhiều vào thông số của từng cặp mồi trong phản ứng.

**3.2. Kết quả tối ưu nồng độ gắn mồi cho phản ứng Multiplex PCR.**



**Hình 2. Kết quả điện di mao quản phản ứng PCR đa mồi cho 14 cặp mồi có cùng nồng độ phản ứng là 0,2 µM**

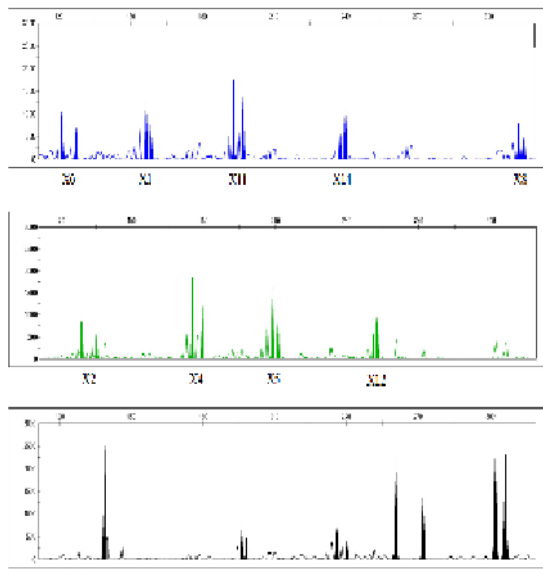
Kết quả cho thấy có sự xuất hiện sản phẩm tương ứng về kích thước và màu huỳnh quang của cả 14 cặp mồi. Tuy nhiên, cường độ tín hiệu của các cặp mồi này không đồng đều nhau và có sản phẩm có cường độ tín hiệu khá thấp (dưới 500). Do đó dựa trên các kết quả này, nồng độ của từng mồi được hiệu chỉnh theo gradient 0.05  $\mu\text{M}$ . Sau nhiều lần hiệu chỉnh, nồng độ phản ứng của từng cặp mồi trong phản ứng PCR đa mồi

được xác định như bảng 2.

Tất cả 14 cặp mồi đều được ghép vào cùng 1 ống phản ứng QIAGEN Multiplex PCR Mastermix với cùng một nồng độ phản ứng là 0.2  $\mu\text{M}$ . Kết quả điện di mao quản được phân tích và điều chỉnh nồng độ mồi bằng cách tăng nồng độ các cặp mồi hoạt động yếu, giảm nồng độ các cặp mồi hoạt động mạnh theo gradient 0,05  $\mu\text{M}$  dựa trên cường độ tín hiệu sản phẩm khuếch đại.

**Bảng 2. Nồng độ mồi trong phản ứng PCR đa mồi**

Primer	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15
Màu	FAM	HEX	NED	HEX	HEX	FAM	FAM	NED	NED	FAM	HEX	NED	FAM	NED
Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	0.25	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.7	0.2	0.6	0.4	0.25	0.3	0.3	0.15



**Hình 3. Kết quả điện di mao quản phản ứng PCR đa mồi cho 14 cặp mồi có nồng độ phản ứng đã hiệu chỉnh**

Kết quả điện di cho thấy cường độ tín hiệu sản phẩm của 14 cặp mồi đã được cải thiện rõ rệt, hầu hết các chỉ thị đều có 2 tín hiệu sản phẩm có kích thước khác nhau tương ứng với 2 allele dị hợp tử với cường độ sản phẩm tương đương nhau. Chu trình nhiệt phản ứng PCR đa mồi có: bước khởi đầu phản ứng ở 95°C trong 15 phút; 30 chu kỳ nhiệt: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 60°C trong 90 giây, kéo dài mạch ở 72°C trong 60 giây. Bước tổng hợp sản phẩm cuối cùng của các cặp mồi ở 60°C trong 30 phút.

#### IV. KẾT LUẬN

Đã thiết lập phản ứng multiplex PCR khuếch

đại các chỉ thị STR phục vụ PGT-M bệnh Hemophilia A.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Steve Keeney, Mike Mitchell, và Anne Goodeve (2010), Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Haemophilia A, UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation: CMGS Website.
2. Giuseppe Castaldo, Valeria D'Argenio, Paola Nardiello, Federica Zarrilli, Veronica Sanna, Angiola Rocino, Antonio Coppola, Giovanni Di Minno, và Francesco Salvatore (2007), Haemophilia A: molecular insights, Clinical Chemical Laboratory Medicine, số 45(4), tr. 450-461.
3. FB Machado và E MEDINA-ACOSTA (2009), High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection, Haemophilia, số 15(1), tr. 297-308.
4. JD Massaro, CEV Wiesel, YCN Muniz, EM Rego, LCO De Oliveira, CT MENDES-JUNIOR, và AL Simões (2011), Analysis of five polymorphic DNA markers for indirect genetic diagnosis of haemophilia A in the Brazilian population, Haemophilia, số 17(5), tr. e936-e943.
5. AD Laurie, AM Hill, JR Harraway, AP Fellowes, GT Phillipson, PS Benny, MP Smith, và PM George (2010), Preimplantation genetic diagnosis for hemophilia A using indirect linkage analysis and direct genotyping approaches, Journal of Thrombosis and Haemostasis, số 8(4), tr. 783-789.
6. QL Ding, YL Lu, J Dai, XD Xi, XF Wang, và HL Wang (2012), Characterisation and validation of a novel panel of the six short tandem repeats for genetic counselling in Chinese haemophilia A pedigrees, Haemophilia, số 18(4), tr. 621-625.
7. Sabina Shrestha, Sufang Dong, Zuhua Li, Zhuliang Huang, và Fang Zheng (2016), Evaluation of factor VIII polymorphic short tandem repeat markers in linkage analysis for carrier diagnosis of hemophilia A, Biomedical Reports, số 5(2), tr. 228-232.