

XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN GLOBIN

Dương Quốc Chính, Trần Tuấn Anh, Nguyễn Thu Hà,
Nguyễn Hà Thanh, Bạch Quốc Khánh(*)

I. ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN TRONG THALASSEMIA VÀ BỆNH LÝ HUYẾT SẮC TỐ

1.1. Đặc điểm đột biến gen trong alpha thalassemia và bệnh lý huyết sắc tố

Nguyên nhân bệnh alpha thalassemia là do các đột biến trên gen họ gen α -globin, với hơn 95% là các đột biến mất đoạn ADN chứa một phần của gen cho đến mất toàn bộ cụm gen và một tỷ lệ nhỏ là các đột biến điểm. Ở người bình thường chuỗi protein α -globin được mã hóa bởi hai gen là HBA1 và HBA2. Đột biến mất đoạn phổ biến nhất trong alpha thalassemia là mất đoạn $-a3.7$, mất đoạn này tạo nên trình tự gen dung hợp HBA2-HBA1 được quy ước là α^+ -thalassemia. Một vài mất đoạn α^+ -thalassemia thường gặp khác ở khu vực Đông Nam Á (ĐNA) gồm: $-a4.2$, $-a2.4$. Trong khi đó, nhóm đột biến mất đoạn α^0 -thalassemia là những mất đoạn chứa hai gen HBA1 và HBA2 trên cùng nhiễm sắc thể hoặc mất hoàn toàn cụm gen α -globin. Nhóm mất đoạn α^0 -thalassemia là một trong những nguyên nhân phổ biến gây ra tình trạng phù thai khi ở dạng đồng hợp tử đột biến - được biết đến với tên gọi là thể phù thai Hb Bart. Đột biến α^0 -thalassemia phổ biến nhất là $--SEA$, còn $--THAI$ và $--FIL$ là

hai đột biến ít gặp hơn ở khu vực ĐNA.

Đột biến điểm trong alpha thalassemia tuy không phổ biến nhưng khá đa dạng với hơn 100 đột biến điểm đã được xác định trên gen HBA1 và HBA2 liên quan đến thalassemia đã được cập nhật trong cơ sở dữ liệu, mà điển hình nhất ở Việt Nam có thể kể đến như: $c.2delT$, HbCS, HbQS. Cơ sở dữ liệu globin cũng ghi nhận hơn 500 đột biến trên gen HBA1 và HBA2 liên quan đến các biến thể huyết sắc tố khác, ở Việt Nam thường gặp đột biến Hb Westmead.

1.2. Đặc điểm đột biến gen trong beta thalassemia và bệnh lý huyết sắc tố

Trái ngược với alpha thalassemia, hơn 95% bệnh nhân beta thalassemia mang các đột biến điểm trên gen HBB, chỉ một tỷ lệ nhỏ là có đột biến mất đoạn. Đột biến điểm trong beta thalassemia thường liên quan đến hoạt động phiên mã, quá trình hoàn thiện ARN thông tin hoặc làm dừng quá trình dịch mã với hai nhóm đột biến là β^+ -thalassemia làm giảm hoạt động sản xuất chuỗi β -globin và β^0 -thalassemia làm mất khả năng sản xuất chuỗi β -globin của gen HBB. Cơ sở phân tử của bệnh nhân beta thalassemia là do sự kết hợp của một hoặc hai kiểu đột biến β^+ -thalassemia và β^0 -thalassemia. Cho đến nay, cơ sở dữ liệu globin đã ghi nhận khoảng 290 đột biến điểm trên gen HBB liên quan đến bệnh beta thalassemia. Ở Việt Nam có thể kể đến một số đột biến phổ biến như: kiểu gen β^0 -thalassemia có $cd17$, $cd41/42$, $cd71/72$,

(*)Viện Huyết học Truyền máu TW

Chịu trách nhiệm chính: Dương Quốc Chính

Email: chinh.nihbtsmp@gmail.com

Ngày nhận bài: 08/4/2021

Ngày phản biện khoa học: 08/4/2021

Ngày duyệt bài: 19/4/2021

IVSI-1 phổ biến và cd95, IVSI-5, IVSII-654 ít gặp; kiểu gen β^+ -thalassemia có -28 phổ biến và -88, -90 ít gặp. Đối với bệnh lý huyết sắc tố thì phổ biến nhất là Hb E, ngoài ra là các huyết sắc tố ít gặp khác như Hb Pakse và Hb Q-Thailand.

Một tỷ lệ nhỏ bệnh nhân beta thalaseemia liên quan đến các đột biến đột biến mất đoạn từ mất một phần gen HBB, đến mất cả gen HBD và gen HBB hoặc chỉ mất vùng kiểm soát cụm gen LCR. Những bệnh nhân mang dạng đột biến này thì Hb F thường tăng và Hb A2 không tăng. Với những trường hợp Hb F không tăng rất khó để định hướng chẩn đoán bằng điện di huyết sắc tố mà chỉ có thể chẩn đoán được khi làm xét nghiệm sinh học phân tử.

II. XÉT NGHIỆM SINH HỌC PHÂN TỬ TRONG XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN GLOBIN

2.1. Một số loại mẫu bệnh phẩm thường dùng cho xét nghiệm đột biến gen globin

Máu ngoại vi: Vật liệu di truyền thường dùng cho xét nghiệm đột biến gen bệnh thalassemia là ADN. Thông thường ADN được tách chiết từ 2 ml máu ngoại vi chống đông EDTA. ADN trong máu ngoại vi có thể được tách chiết thủ công bằng phenol-chloroform, cột silica, hạt từ hoặc thậm chí có thể sử dụng trực tiếp một lượng nhỏ máu toàn phần cho vào thành phần phản ứng PCR. Đối với sản phụ mang gen thalassemia có thể lấy 5 – 10 ml máu ngoại vi để thu ADN tự do lưu hành phục vụ cho chẩn đoán trước sinh không xâm lấn.

Dịch chọc hút ối: ADN có thể thu trực tiếp từ tế bào trong nước ối hoặc sau khi nuôi

cây. Mất khoảng 2 - 3 tuần nuôi cấy trong bình hợp lưu 25 ml sẽ thu được 15 - 45 μ g ADN đủ cho tất cả các loại phân tích. Tuy nhiên không phải phòng thí nghiệm nào cũng có khả năng nuôi cấy tế bào bởi vậy phải dùng trực tiếp tế bào nước ối. Với 15 ml nước ối thu được xấp xỉ 5 μ g ADN đủ cho bất kỳ phương pháp phân tích nào dựa trên PCR. Tuy nhiên để phân tích bằng Southern blot, nó chỉ đủ để thử một lần, nên nuôi cấy tế bào để tránh thất bại. Phương pháp tách ADN từ tế bào nước ối nuôi cấy và không nuôi cấy cơ bản giống với tách từ tế bào lông nhung màng đệm^{3,4}.

Lông nhung màng đệm: Hai phương pháp chính để lấy mẫu lông nhung màng đệm là lấy xuyên qua cổ tử cung và lấy xuyên qua ổ bụng với sự trợ giúp của siêu âm, cả hai đều thu được lông nhung màng đệm chất lượng tốt cho chẩn đoán ADN thai nhi. Khó khăn của phương pháp này là lẫn tế bào từ mẹ, màng rụng của mẹ đôi khi thu được cùng với lông nhung màng đệm. Tuy nhiên, bằng cách bóc tách cẩn thận loại bỏ hết màng rụng của mẹ dưới kính hiển vi đảo ngược vẫn thu được ADN thai nhi tinh sạch. Theo báo cáo của Rosatelli và cộng sự không có lỗi chẩn đoán β -thalassemia của 457 người bệnh mang thai 3 tháng đầu tại Ý. ADN nhiễm từ mẹ có thể được phát hiện bằng việc khuếch đại một alen lặp lại đa hình từ mẹ và một từ cha. Nguy cơ nhiễm giảm khi thu ADN từ một gai lông nhung duy nhất⁵.

2.2. Một số phương pháp phát hiện đột biến gen globin

2.2.1. Kỹ thuật ASO

ASO là kỹ thuật đầu tiên được phát triển

dựa trên PCR, khuếch đại đoạn ADN đặc hiệu sau đó gắn vào màng nylon. Trong kỹ thuật này với mỗi đột biến thiết kế hai đầu dò oligonucleotit: một sợi bổ sung với trình tự đột biến, một sợi bổ sung với trình tự gen β -globin bình thường. Các đầu dò thường đánh dấu đầu 5' với đồng vị ^{32}P hoặc biotin. Tín hiệu lai phát ra cho biết sự có mặt của alen đột biến, kỹ thuật này được ứng dụng thành công trong nhiều phòng thí nghiệm^{6,7}.

Tuy nhiên khi sàng lọc một số lượng lớn các đột biến khác nhau, phương pháp bị giới hạn bởi cần lai độc lập và bước rửa cho mỗi đột biến. Để khắc phục vấn đề trong sàng lọc nhiều đột biến, phương pháp dot blot đảo ngược được phát triển, trong đó vai trò của đầu dò oligonucleotit và ADN khuếch đại được đảo ngược. Đầu dò oligonucleotit không đánh dấu bổ sung với đột biến và trình tự ADN bình thường và được gắn trên màng nylon ở dạng dot hoặc slot. Khuếch đại ADN, hoặc sử dụng môi đánh dấu hoặc đánh dấu bằng biotin dUTP, sau đó lai màng. Thủ thuật này cho phép kiểm tra nhiều đột biến trong một phản ứng lai. Nó đã được áp dụng để chẩn đoán đột biến β -thalassemia cho người Địa Trung Hải, người Mỹ gốc Phi và Thái Lan, sử dụng qui trình hai bước với một màng nylon cho đột biến phổ biến và màng khác cho đột biến ít phổ biến hơn.

2.2.2. Khuếch đại môi đặc hiệu

ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reactions) là kỹ thuật thông dụng nhất để phát hiện các đột biến điểm. Phương pháp này sử dụng 2 môi đặc hiệu một môi bổ sung với alen đột biến, một môi bổ sung với alen bình thường và một môi chung ngược chiều.

Ngoài ra có thêm một cặp môi khác nhân đoạn ADN làm đối chứng cho phản ứng PCR. Ưu điểm của phương pháp ARMS là sàng lọc nhanh, không cần đánh dấu, sản phẩm khuếch đại được phát hiện đơn giản bằng điện di gel agarose và nhuộm ethidium bromide. Đồng thời trong một phản ứng PCR có thể sàng lọc cùng lúc nhiều đột biến, chỉ cần bổ sung thêm môi ARMS ghép cặp được với môi chung ngược chiều, kỹ thuật này được gọi là C-ARMS-PCR (Combine Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reactions). Môi chung có thể được gắn huỳnh quang cho phép xác định kích thước sản phẩm khuếch đại trên máy phân tích ADN tự động⁶.

2.2.3. Phân tích bằng enzym giới hạn

Hơn 40 đột biến β -thalassemia được biết là có thêm hay mất đi một vị trí cắt giới hạn. Phần lớn trong số đó có thể được phát hiện nhanh bằng cắt giới hạn sản phẩm PCR. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose hoặc acrylamid, số lượng các đoạn ADN cho biết đột biến thêm hay mất một vị trí cắt. Phương pháp sàng lọc này bị giới hạn bởi có những đột biến điểm β -thalassemia không ảnh hưởng đến vị trí cắt và một vài enzyme giới hạn giá thành cao^{3,6,7}.

Với những đột biến điểm không có enzyme giới hạn nhận biết, sẽ được phát hiện bởi kỹ thuật ACRS (Amplification-Created Restriction Sites). Phương pháp này sử dụng primer được thiết kế để chèn thêm bazơ mới vào sản phẩm khuếch đại để tạo ra vị trí cắt giới hạn sát trình tự đột biến. Nếu có đột biến xảy ra sẽ làm thay đổi vị trí nhận biết của enzyme giới hạn. Kỹ thuật ACRS được áp dụng phát hiện đột biến β -thalassemia của

người Địa Trung Hải^{7,8}.

2.2.4. Gap PCR

Đột biến mất đoạn trong trình tự gen α -globin có thể được phát hiện bằng PCR sử dụng hai primer bổ sung với sợi sense và antisense ở hai vùng biên đoạn ADN bị đứt. Đối với đột biến mất đoạn lớn, mỗi thiết kế ở hai vùng biên chỉ nhận được alen đột biến mất đoạn, bởi vì khoảng cách giữa hai mỗi quá lớn không thể khuếch đại alen bình thường. Trường hợp alen không đột biến có thể phát hiện bằng cách thiết kế một mỗi bổ sung với trình tự trong vùng mất đoạn, một mỗi bổ sung với trình tự ADN vùng biên. Giống như đột biến mất đoạn α -thalassemia, các đột biến mất đoạn trong cụm gen β -globin cũng được chẩn đoán bằng phương pháp này như Hb Lepore, $\delta\beta$ -thalassemia, HPFH^{3,6,7}.

2.2.5. Phương pháp giải trình tự ADN

Phương pháp giải trình tự gen Sanger có khả năng phân tích đoạn ADN trên 1kb, tất cả các đột biến điểm hay đa hình ADN có thể được xác định. Do vậy phương pháp này thường được áp dụng để xác định các đột biến hiếm hoặc trường hợp nghi ngờ mà âm tính với các kỹ thuật khác.

Nguyên lý: Phương pháp này cũng dựa trên nguyên tắc bổ sung và trên nền tảng kỹ thuật PCR. Chuỗi ADN mới được kéo dài bởi ADN polymerase khi có mặt của các dNTP và mỗi. Phản ứng này được làm ngừng bằng cách bổ sung ddNTP. Tùy theo ddNTP là gì mà phản ứng sẽ bị ngừng tại vị trí có ddNTP đưa vào. Hỗn hợp phản ứng thu được sẽ chứa tập hợp tất cả các đoạn ADN kích thước chênh lệch nhau 1 nucleotit.

Ưu điểm của phương pháp này là phát

hiện được tất cả các đột biến điểm, đột biến chèn/mất đoạn nhỏ, bất kể đột biến hiếm hay đột biến mới. Nhược điểm là thời gian dài; chi phí cao; số mẫu một lần xét nghiệm ít và phụ thuộc vào số mao quản trên máy giải trình tự.

2.2.6. Kỹ thuật Strip Assay

Xét nghiệm xác định đột biến thalassemia sử dụng bộ sinh phẩm α globin và β globin stripassay là phương pháp kết hợp của nhiều kỹ thuật bao gồm: Multiplex PCR, lai ngược (reverse hybridization). Kỹ thuật sử dụng thanh test strip có đính nhiều đầu dò để phát hiện đột biến và xác định tính đồng hợp/dị hợp tử của đột biến. Bộ xét nghiệm α globin stripassay cho phép sàng lọc 21 đột biến α thalassemia và bộ xét nghiệm β globin strip assay cho phép sàng lọc 22 đột biến β thalassemia phổ biến trong khu vực Đông Nam Á. Kỹ thuật này được Saiki và cộng sự mô tả lần đầu tiên vào năm 1989, sau đó được phát triển để phục vụ chẩn đoán các bệnh di truyền mang nhiều đột biến, phổ biến nhất là bệnh thalassemia và bệnh xơ nang (Cystic fibrosis).

Ưu điểm của phương pháp này dễ thực hiện, có thể cùng lúc phát hiện được nhiều đột biến. Thời gian ngắn (6-8 giờ). Lượng mẫu cần ít (10-50ng ADN). Phương tiện máy móc đơn giản. Phân tích kết quả đơn giản thông qua các băng vạch hiện màu trên thanh lai. Độ chính xác cao. Có thể phát hiện được đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử.

2.2.7. PCR phát hiện các đột biến chưa biết

Có nhiều kỹ thuật để phát hiện đột biến β -thalassemia chưa được phát hiện. Đơn giản và hiệu quả nhất là điện di gradient biến tính

(DGGE) cho phép phân tách các đoạn ADN khác nhau chỉ với sự thay đổi một bazơ. Có một phương pháp khá hiệu quả để phát hiện đột biến điểm (heteroduplex analysis) được tiến hành như sau: khuếch đại ADN đối chứng và ADN mẫu → biến tính nhiệt ADN → giảm nhiệt từ từ để tạo phân tử lai → điện di không biến tính, nếu có đột biến các phân tử lai heteroduplex sẽ di chuyển chậm hơn. Ngoài ra còn các phương pháp khác như CMC (Mismatch Cleavage), SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism) hoặc cắt protein cũng là kỹ thuật tốt để phát hiện đột biến chưa biết nhưng lại không được áp dụng cho các bệnh rối loạn hemoglobin^{2,3,7}.

2.2.8. Real-time PCR

Phương pháp sử dụng đầu dò huỳnh quang và các thiết bị chuyên dụng để theo dõi lượng sản phẩm tạo thành sau mỗi chu kỳ PCR. Độ nhạy phản ứng PCR tăng lên hàng nghìn lần giúp phát hiện với lượng ADN cực kỳ thấp trong thời gian ngắn, đồng thời định lượng được sản phẩm tạo thành qua đó xác định được số phân tử ADN ban đầu. Có một vài công bố sử dụng hệ thống Lightcycler xác định nhanh chóng và chính xác kiểu gen nhiều đột biến trên gen β -globin.

2.2.9. Một số phương pháp khác phát hiện đột biến gen globin

Như trên đã trình bày các phương pháp phát hiện đột biến hiệu quả nhất đã và đang được áp dụng rộng rãi, với độ tin cậy cao và chi phí phải chăng. Tại thời điểm hiện tại có nhiều kỹ thuật mới chưa được áp dụng rộng rãi hoặc đang trong giai đoạn nghiên cứu và hoàn thiện. Tất cả những phương pháp mới đều phát triển trên cơ sở phân tích sản phẩm

gen được khuếch đại bằng PCR.

Phương pháp DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography): là phương pháp mạnh để phát hiện đột biến điểm với khả năng tự động cao. Phương pháp có thể phân biệt được sai khác chỉ một nucleotit với độ nhạy cao. Độ nhạy trong phát hiện đột biến gen β -globin được xác định là 100% theo báo cáo của Colosimo và cs. năm 2002. DHPLC có tiềm năng ứng dụng trong phát hiện đột biến gen globin, điểm hạn chế là có rất ít kinh nghiệm về phương pháp này.

Gen chip: còn được gọi là ADN chip, biochip hay microarray là công cụ mạnh trong phân tích và chẩn đoán phân tử. Kỹ thuật dựa trên nguyên tắc lai hai sợi đơn ADN, giữa đầu dò (cố định sẵn trên microarray) và mẫu ADN (được đánh dấu huỳnh quang). Tiềm năng ứng dụng trong phát hiện gen, biểu hiện gen, lập bản đồ gen và phát hiện đột biến điểm. Vì khắc phục được khó khăn tối ưu hóa điều kiện lai cùng lúc nhiều đầu dò, cho nên genchip được ứng dụng để xác định cùng lúc nhiều đột biến điểm gây rối loạn tổng hợp globin. Trên cơ sở đó phát triển thành các kit thương mại như Nanochip^R Molecular Workstation có thể phát hiện tám đột biến β -thalassemia phổ biến ở Địa Trung Hải.

PCR một tế bào (Single-cell PCR): gồm chẩn đoán tiền cấy ghép và phân tích tế bào thai nhi thu từ hệ tuần hoàn của mẹ. Trong một tế bào chỉ có khoảng 6.6 pg ADN đã gây nên một số khó khăn như: không khuếch đại được gen đích, alen drop-out (lỗi nhầm dị hợp là đồng hợp), dễ bị nhiễm. Để phát hiện được sản phẩm PCR không gắn huỳnh quang

có thể yêu cầu tới 70 chu kỳ, nhưng hoạt tính của Taq polymerase chỉ được 40 chu kỳ, muốn khắc phục khó khăn này phải sử dụng nested-PCR. Nếu sản phẩm PCR có đánh dấu huỳnh quang độ nhạy tăng lên 1.000 lần và không cần phải dùng nested-PCR. Real-time PCR là giải pháp tốt cho phân tích kiểu gen một tế bào, độ nhạy, tính chính xác, nhanh chóng và đơn giản là những ưu điểm vượt trội.

III. KẾT LUẬN

Các kỹ thuật sinh học tử đã được áp dụng rộng rãi trong xác định đột biến gen globin thường quy có thể kể đến như: ARMS-PCR, GAP-PCR, lai ADN để xác định những đột biến phổ biến đã biết. Những đột biến gen hiếm gặp hoặc đột biến mới thì kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm và kỹ thuật MLPA xác định đột biến mất đoạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đình Đoàn Long.** Cơ Sở Di Truyền Học Phân Tử và Tế Bào. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội
2. **Chu Hoàng Mậu.** CƠ SỞ VÀ PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ. Nhà Xuất Bản
- Sư Phạm
3. **Molecular Diagnostic Challenges of the Thalassemias** - ScienceDirect. Accessed April 16, 2021.
4. **Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ.** Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press; 2009.
5. **Cao A, Rosatelli MC, Monni G, Galanello R.** Screening for thalassemia: a model of success. Obstet Gynecol Clin North Am. 2002;29(2):305-328, vi-vii. doi:10.1016/s0889-8545(01)00006-7
6. **Charles Ming-Lok Chan EP-TL.** Clinical Applications of Molecular Technologies in Hematology. J Med Diagn Methods. 2013;02(04). doi:10.4172/2168-9784.1000130
7. **Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders (2013)** - English by Thalassaemia International Federation (TIF) - issuu. Accessed April 16, 2021.
8. **Nguyễn Khắc Hân Hoan.** LA_NGHIÊN CỨU TẦM SOÁT VÀ CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH ALPHA VÀ BÊTA THALASSEMIA.