

# Xây dựng quy trình phân tích gen *NPHS2* ở bệnh nhân mắc hội chứng thận hư tiên phát

Phạm Thị Hồng Nhung, Vũ Vân Nga, Nguyễn Thị Thùy Linh,  
Đỗ Thế Hoàn, Phạm Văn Đэм, Đinh Đoàn Long, Vũ Thị Thơm\*

*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 03 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 10 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 01 tháng 12 năm 2017

**Tóm tắt:** Protein podocin được mã hóa bởi gen *NPHS2* có vai trò quan trọng trong hiện tượng kháng corticoid trong điều trị hội chứng thận hư. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quy trình phân tích các đa hình di truyền thuộc gen *NPHS2* trên 149 bệnh nhi mắc hội chứng thận hư tiên phát. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng bao gồm tách DNA tổng số từ mẫu ngoại vi, khuếch đại bằng PCR, xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định được 251 SNP nằm trong 6 exon đầu của gen *NPHS2*, trong đó có 2 đột biến mới được phát hiện. Các kết quả này sẽ cung cấp công cụ và số liệu cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định vai trò của các đa hình di truyền *NPHS2* đối với đáp ứng thuốc corticoid trong điều trị hội chứng thận hư.

*Từ khóa:* *NPHS2*, podocin, hội chứng thận hư tiên phát.

## 1. Đặt vấn đề

Hội chứng thận hư tiên phát (HCTHTP) là nguyên nhân thường gặp nhất gây protein niệu ở trẻ em, yếu tố nguy cơ chính dẫn đến suy giảm chức năng thận [1, 2]. HCTHTP thường rất cảm thụ với liệu pháp steroid, tuy nhiên việc điều trị kéo dài bằng corticoid gây ra nhiều tác dụng phụ. Bên cạnh đó, một tỉ lệ không nhỏ (10-20% trường hợp) bệnh nhân mắc HCTHTP kháng corticoid có nguy cơ cao tiến triển thành suy thận giai đoạn cuối [3].

Trong vài năm gần đây, nhiều gen đã được chứng minh có liên quan đến HCTHTP kháng corticoid, đặc biệt là các đột biến thuộc gen *NPHS2* mã hóa cho protein podocin [4, 5]. Trong 89 đột biến điểm phát hiện trên 8 exon

của gen *NPHS2*, 56 đột biến tập trung từ exon 1 đến exon 6 được chứng minh có liên quan chặt chẽ tới HCTHTP [6]. Xác định các đột biến trong gen *NPHS2* có thể cho phép các bác sĩ lâm sàng tránh các điều trị không cần thiết bằng corticoid, hạn chế nhiều biến chứng do thuốc và giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân [7].

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về đa hình gen *NPHS2* cũng như quy trình phân tích gen này. Từ nhu cầu lâm sàng, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu nhằm xây dựng quy trình phân tích các đột biến nằm trong 6 exon đầu của gen *NPHS2* trên mẫu máu bệnh nhân mắc HCTHTP.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

**Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm:** 149 mẫu máu toàn phần lấy từ tĩnh mạch của bệnh nhân nhi mắc hội chứng thận hư thu tại

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1677968818.

Email: thomtbk5@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4066>

Bệnh viện Nhi trung ương. Các mẫu máu chống đông bằng EDTA, bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$  đến khi phân tích gen.

**Tách chiết DNA tổng số:** sử dụng E.Z.N.A blood DNA Mini Kit(Omega, Mỹ) theo quy trình khuyến cáo của hãng. DNA tổng số được kiểm tra và đánh giá thông qua điện di trên gel agarose và đo OD tại bước sóng 260 nm và 280 nm.

**Thiết kế mỗi đặc hiệu cho 6 exon của gen NPHS2:** sử dụng phần mềm PerlPrimer version 1.1.1, chúng tôi tự thiết kế các mỗi nhân dòng exon 2, 3 và 4 và đặt tổng hợp tại hãng IDT (Mỹ). Các cặp mỗi dùng cho nhân dòng exon 1, 5 và 6 sử dụng trình tự công bố bởi Basiratnia năm 2013 [8]. Trình tự mỗi được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mỗi nhân dòng gen NPHS2

Exon	Trình tự mỗi	Độ dài sản phẩm
1	GCA GCG ACT CCA CAG GGA CT TCC ACC TTA TCT GAC GCC CC	414 bp
2	CTCTGACTACTCTGATTTGACTT CTCAAATGTGAACAGGAAGCC	438 bp
3	CTA GGA TCA TTC TTA TGC CA GAGGTCCATATTACA AAT CTG C	238 bp
4	TCC CTG TTT ATA CCTATT GTC C	475 bp
5	CCC ATT CCC TAG ATT GCC AAA GGA GCC CAA GAA TCA AG AAA TAT TTC AGC ATA TTG GCC	292 bp
6	GTT TAG GCA TGC TCT CCT C GATATGGCTATAGTA CTC AGT G	228 bp

**Nhân dòng 6 exon của gen NPHS2 bằng PCR:** Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn mỗi, nồng độ DNA hoạt động tối ưu trong phản ứng PCR sử dụng 0.2 mM dNTP Mix, 0,05 u/μl Pfu DNA polymerase (Thermo Scientific). Chu trình nhiệt gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu  $95^{\circ}\text{C}$  trong 3 phút; 35 chu kì:  $95^{\circ}\text{C}$  trong 30

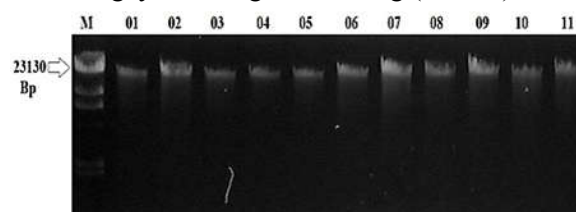
giây, gắn mỗi trong 30 giây,  $72^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút; thời gian kéo dài cuối  $72^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút. Sản phẩm PCR được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%.

**Xác định kiểu gen 6 exon của gen NPHS2 bằng giải trình tự:** 20 μl sản phẩm được gửi giải trình tự tại hãng IDT (Malaysia). Kết quả giải trình tự được đọc bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9 để xác định kiểu gen của mỗi bệnh nhân.

Thí nghiệm được thực hiện trên các thiết bị đạt tiêu chuẩn tại Phòng thí nghiệm của Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### 3. Kết quả

**Tách chiết DNA tổng số:** Nồng độ DNA thu từ 149 mẫu máu dao động từ 31 - 350 ng/μl, có độ tinh sạch cao với chỉ số  $\text{OD}_{260/280}$  thu được từ 1,7 - 2,1. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy đã thu được lượng DNA tổng số đáng kể, ít bị đứt gãy với băng khá rõ ràng (Hình 1).



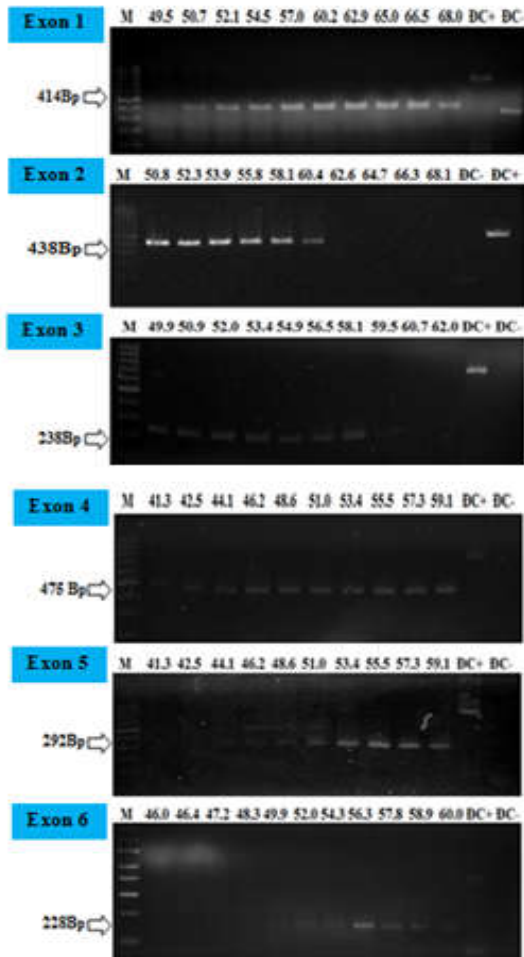
Hình 1. Ảnh điện di DNA tổng số trên gel agarose 0,7%. Làn M: Lamda DNA/HindIII marker. Làn 01-11: mẫu DNA tổng số thu của bệnh nhân có mã số tương ứng.

Nhân dòng 6 exon đầu thuộc gen NPHS2 bằng PCR

Chúng tôi tiến hành PCR với 10 nhiệt độ dao động quanh nhiệt độ gắn mỗi được hãng khuyến cáo. Kết quả điện di ở hình 2 cho thấy  $56^{\circ}\text{C}$  là nhiệt độ cho phép nhân dòng đặc hiệu với một băng DNA hiện hình duy nhất cho cả 6 exon nghiên cứu.

Chúng tôi các thực hiện PCR ở các nồng độ DNA lần lượt là 5,10,50,100 và 500 ng/μl. Kết quả điện di ở hình 3 cho thấy với nồng độ DNA từ 50-100 ng/μl phản ứng nhân dòng đặc hiệu

xảy ra với lượng sản phẩm lớn thể hiện ở các băng DNA sáng rõ.

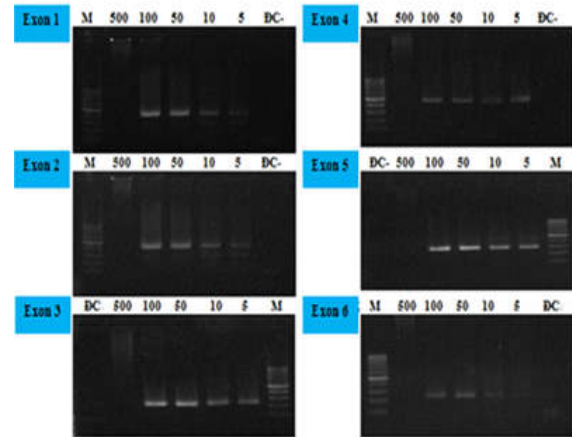


Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR tối ưu nhiệt độ gắn mỗi trên 6 exon NPHS2. Làn M: marker, ĐC +: đối chứng dương, ĐC -: đối chứng âm, kí hiệu trên các giếng: nhiệt độ gắn mỗi sử dụng cho các mẫu (°C).

Xác định kiểu gen 6 exon đầu thuộc gen NPHS2 bằng giải trình tự

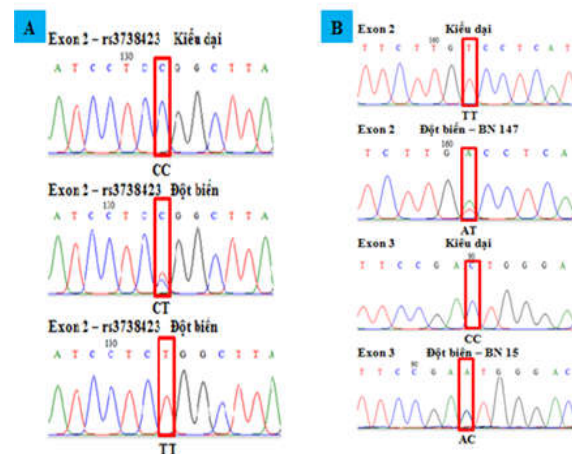
Dựa vào kết quả giải trình tự kết hợp với cơ sở dữ liệu trên NCBI, chúng tôi xác định được 72 SNP trên exon 1 (các SNP nằm giữa rs144425595 và rs568294841), 22 SNP trên exon 2 (các SNP nằm giữa rs574043805 và rs370433996), 32 SNP trên exon 3 (các SNP nằm giữa rs778895897 và rs767605271), 37 SNP trên exon 4 (các SNP nằm giữa rs41267604 và rs577996273), 49 SNP trên exon

5 (các SNP nằm giữa rs370260554 và rs766516719) và 17 SNP trên exon 6 (các SNP nằm giữa rs149786692 và rs773598807).



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR với nồng độ DNA khác nhau trên 6 exon NPHS2. Làn M: marker, ĐC -: đối chứng âm, kí hiệu trên các giếng: nồng độ DNA các mẫu (ng/μl)

Chúng tôi cũng phát hiện 2 đa hình mới chưa được công bố: 1 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp AT ở sau 4 Nu của rs 772151217 trên exon 2 và 1 bệnh nhân có kiểu gen TT ở sau 2 Nu của rs786204708 trên exon 3. Một số kết quả đọc kiểu gen từ giải trình tự của một số mẫu được thể hiện trong Hình 4.



Hình 4. Một số đa hình phát hiện trên NPHS2. A. Các kiểu gen của đa hình rs3738423; B. Đột biến mới trên exon 2 và 3

#### 4. Thảo luận

Hiện nay có rất nhiều các phương pháp xác định các đa hình di truyền trên AND như kỹ thuật đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (Restriction fragment length polymorphism, viết tắt là RFLP), kỹ thuật sử dụng đầu dò ADN (DNA-probe), kỹ thuật đa hình cấu tạo sợi đơn (single strand conformational polymorphism, viết tắt là SSCP), giải trình tự, sắc kí lỏng cao áp biến tính (Denaturing high performance liquid chromatography, viết tắt là DHPLC), chip ADN (SNP microarray). Tuy nhiên, giải trình tự vẫn là phương pháp tốt nhất để xác định chính xác cùng lúc tất cả các đa hình trên phân đoạn cần phân tích, phù hợp cho các nghiên cứu chưa xác định được đa hình liên quan đến bệnh lý quan tâm. Bên cạnh đó, giải trình tự xác định được sự xuất hiện của đột biến, cung cấp dữ liệu kiểu gen đầy đủ của đối tượng tham gia nghiên cứu.

Áp dụng phân tích trên 149 bệnh nhân cho thấy quy trình phân tích gen của chúng tôi có tính ổn định, dễ dàng lặp lại với độ chính xác cao. Phản ứng nhân dòng gen xảy ra với độ nhạy cao chỉ với lượng DNA lớn hơn 10 ng/ $\mu$ l (hình 3).

Nhằm đưa quy trình có thể sử dụng tại các phòng khám và cơ sở nghiên cứu có thiết bị phù hợp, chúng tôi đã cố gắng đơn giản hóa quy trình. DNA được tách từ mẫu máu toàn phần, là dạng mẫu dễ thu thập tại các cơ sở khám chữa bệnh. Chúng tôi cũng đã tự thiết kế một số cặp mồi để phản ứng nhân dòng gen có thể tiến hành với các điều kiện về thành phần, nhiệt độ dùng chung được cho việc nhân dòng cả 6 exon. Việc tối ưu được các điều kiện như vậy có ý nghĩa quan trọng trong ứng dụng thực tế vì tiết kiệm được thời gian và công sức thao tác.

Trong 149 bệnh nhân nghiên cứu, ngoài hai đột biến mới nằm trên exon 2 và exon 3, chúng tôi thấy có 7 SNP có tính đa hình trên exon 1 - 4 là rs1079292, rs758564490, rs3738423, rs200437667, rs12401711, rs12401708 và rs528833893; exon 5,6 có tính đồng hình. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Hasan Otukesh trên 20 bệnh nhân nhi mắc hội

chứng thận hư kháng corticoid tại Bệnh viện Ali Asghar (Iran) và nghiên cứu của Maruyama trên cả 8 exon ở 36 trẻ em Nhật Bản mắc HCTH kháng corticosteroid [9, 10]. Nghiên cứu về HCTH kháng corticosteroid đối với một số nhóm người châu Âu cho thấy tỉ lệ xuất hiện đột biến gen *NPHS2* cũng không cao, từ 12-19% [11-13].

Quy trình được xây dựng trong nghiên cứu này sẽ là công cụ hỗ trợ các nghiên cứu về mối liên quan giữa kiểu gen *NPHS2* và HCTH, một mảng nghiên cứu vẫn cần bổ sung thêm nhiều dẫn liệu và hoàn toàn chưa được đánh giá ở Việt Nam. Nghiên cứu ở trẻ em Ai Cập mắc HCTH kháng corticosteroid không có tiền sử gia đình cho thấy khả năng liên quan giữa một số đột biến gen *NPHS2* đến tiên lượng kém thuận lợi của những bệnh nhân này [14]. Nghiên cứu 484 bệnh nhân mắc hội chứng thận hư ở Nam Ấn Độ phát hiện 4 đột biến *NPHS2* là rs74315345, rs869025495, rs74315342 và rs74315346, chỉ xuất hiện trong nhóm kháng corticoid mà không xuất hiện trong nhóm nhạy cảm với corticoid [15]. Ở Việt Nam, chúng tôi khuyến nghị mở rộng thực hiện các nghiên cứu tiếp theo kết hợp với các dữ liệu cận lâm sàng và lâm sàng về HCTH để đánh giá mối liên quan giữa các đa hình di truyền *NPHS2* đối với đáp ứng thuốc corticoid trong điều trị HCTH.

#### 5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình phân tích gen cho exon 1 đến 6 thuộc gen *NPHS2* sử dụng mẫu máu toàn phần. Quy trình đã được áp dụng thành công trên 149 bệnh nhân nhi mắc hội chứng thận hư tiên phát.

#### Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Đại học Quốc gia Hà Nội cho đề tài mã số QG.16.23 để thực hiện nghiên cứu này.

**Tài liệu tham khảo**

- [1] Weber S, Gribouval O, Esquivel EL et al, "NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence", *Kidney Int* 2004; 66 : 571- 579.
- [2] Arbeitsgemeinschaft für Padiatrische Nephrologie. *Lancet*. 1988;1(8582):380–383.
- [3] Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM et al, "Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome", *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 : 722 -732.
- [4] Severine Roselli, Imane Moutkine, Olivier Gribouval, Alexandre Brenmerah, Corinne Antignac, "Plasma membrane targeting of Podocin through the classical exocytic pathway: Effect of NPHS2 mutations", *TRafic* 2004; 5:37-44.
- [5] Maddalena Gigante, Matteo Piemontese, Loreto Gesualdo, Achille Iolasscon, Filippo Acucella, "Molecular and Genetic Basic of Inherited nephrotic syndrome", *International Journal of Nephrology*. 2011; vol(2011):1-15.
- [6] Kalman Tory, Dora K Menyhard, Stephanie Woerner, Fabien Nevo, Olivier Gribouval, Andrea Kerti, Pal Straner, Christelle Arrondel, Evelyne Huynh Cong, Tivadar Tulassay, Geraldine Mollet, Andras Perczel, Corinne Antignac, "Mutation dependent recessive inheritance of NPHS2 associated steroid resistant nephritic syndrome", *Nature Genetics*. 2013; 46(3): 299-304.
- [7] Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A, "Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome", *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 388 -393.
- [8] M. Basiratnia, M. Yavarian, S. Torabinezhad, and A. Erjaee: "NPHS2 gene in steroid-resistant nephrotic syndrome: prevalence, clinical course, and mutational spectrum in South-West Iranian children." *Iran. J. Kidney Dis.* vol. 7, no. 5, pp. 357-62, 2013.
- [9] Hasan Otukesh Behzad Ghazanfari, Seyed-Mohammad Fereshtehnejad et al (2009), "NPHS2 Mutations in Children with Steroid-Resistant Nephrotic syndrome", *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 3, tr. 99-102.
- [10] Maruyama K. Iuima K., Ikeda M et al (2003), "NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children", *Pediatr Nephrol*, 18, tr. 412-6.
- [11] Weber S Gribouval O, Esquivel EL et al (2004), "NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid resistant nephritic syndrome and low post transplant recurrence", *Kidney International Supplements* 66(2), tr. 571-579.
- [12] Ruf RG Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, et al. (2004), "Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome", *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15, tr. 722-732.
- [13] Caridi G. Bertelli R., Di Duca M et al (2003), "Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations", *J Am Soc Nephrol*, 14, tr. 1278-86.
- [14] Bakr A Yehia S, El-Ghannam D, et al (2008), "NPHS2 mutations", *Indian J Pediatr.*, 75, tr. 135-8.
- [15] Jaffer A, Unnisa W, Raju DS, Jahan P., "NPHS2 mutation analysis and primary nephrotic syndrome in southern Indians", *Nephrology* 2014 Jul;19(7): 398-403.

## Establishing the Genotyping of *NPHS2* Polymorphisms in Patients with Primary Nephrotic Syndrome

Pham Thi Hong Nhung, Vu Van Nga, Nguyen Thi Thuy Linh,  
Do The Hoanh, Pham Van Dem, Dinh Doan Long, Vu Thi Thom

*VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** Podocin protein is encoded by the *NPHS2* gene is largely responsible for resistance to corticosteroid in pharmacological treatment of nephrotic syndrome. Therefore, we have constructed the genotyping test of *NPHS2* polymorphisms on 149 pediatric patients with primary nephrotic syndrome. Main methods consisted of DNA extraction from peripheral blood samples, polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing. In my study, 251 SNPs from 6 exons and 2 new mutations have detected by genotyping test. These results will provide helpful tool and data for further research to determine the role of *NPHS2* polymorphisms with corticosteroid response in the treatment of nephrotic syndrome.

*Keywords:* *NPHS2*, podocin, primary nephrotic syndrome.