

# Bước đầu nghiên cứu ứng dụng DNA tự do của thai trong máu mẹ (cffDNA) trong xét nghiệm trước sinh không xâm lấn đối với bệnh $\beta$ -thalassemia

Trịnh Văn Bờ Em<sup>1</sup>, Nguyễn Vạn Thông<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Thanh Kiều<sup>3</sup>, Đỗ Thị Thu Hằng<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Bệnh viện Huyện Bình Chánh, E9/5 Nguyễn Hữu Trí, Bình Chánh, TP.HCM, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Di truyền, Bệnh viện Hùng Vương, 28 Hồng Bàng, Quận 5, TP.HCM, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Y, ĐHQG-HCM, Phường Linh Trung, Thủ Đức, TP.HCM, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 04 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

**Tóm tắt:**  $\beta$ -thalassemia là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, gây ra do các đột biến trên gen  $\beta$ -globin. Bệnh gây ảnh hưởng nặng nề đến sự phát triển về thể chất và tâm thần trẻ nhỏ, cũng như tăng gánh nặng chăm sóc và điều trị cho gia đình và xã hội. Chính vì thế, việc tầm soát sớm bệnh  $\beta$ -thalassemia nhằm kiểm soát sự gia tăng trong cộng đồng rất được chú trọng. Hiện nay, để phát hiện sớm căn bệnh này trên thai nhi thì ngoài các phương pháp xâm lấn truyền thống là chọc ối và sinh thiết gai nhau, ứng dụng DNA tự do của thai trong máu mẹ (cffDNA) để chẩn đoán tiền sản không xâm lấn đang là một hướng đi mới, an toàn và hiệu quả hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tách chiết và làm giàu tỉ lệ cffDNA trong máu mẹ, đồng thời tối ưu hóa quy trình AS-PCR phát hiện 3 đột biến phổ biến CD17, CD26 và CD41/42. Bước đầu áp dụng lên 10 mẫu cffDNA để chẩn đoán sự di truyền đột biến từ bố sang thai nhi và cho kết quả đúng 10/10 mẫu so với kết quả chọc ối.

**Từ khóa:**  $\beta$ -thalassemia, chẩn đoán trước sinh không xâm lấn, DNA tự do của thai, Allele-specific PCR.

## 1. Đặt vấn đề

Thalassemia là một trong những bệnh di truyền đơn gen phổ biến nhất và phân bố rộng khắp các khu vực trên thế giới. Dựa trên loại gen globin bị ảnh hưởng mà bệnh thalassemia được phân thành 2 loại chính là  $\alpha$ -thalassemia nếu gen globin alpha bị đột biến và  $\beta$ -thalassemia nếu gen globin beta bị đột biến [1]. Trẻ mắc  $\beta$ -thalassemia ở thể nặng sẽ gây ra hậu quả nghiêm trọng về phát triển cơ thể, tuổi

thọ bởi sự tan máu và các biến chứng của nó. Đặc biệt việc điều trị rất khó khăn và tốn kém, ít hiệu quả, tỉ lệ tử vong cao trong những năm đầu của cuộc sống. Vì vậy, việc phòng bệnh được đặt ra như một giải pháp nhằm ngăn chặn sự lan tràn của bệnh di truyền này.

Từ trước những năm 1990, chẩn đoán trước sinh sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử thường cần các tế bào của thai nhi được lấy bằng chọc ối, sinh thiết gai nhau,... Nhưng các kỹ thuật xâm lấn này có nguy cơ rủi ro cho cả mẹ và thai như nhiễm trùng ối, chảy máu tử cung và nặng hơn sẽ gây sảy thai,... Trong một số trường hợp, các cặp vợ chồng được chẩn đoán mang gen bệnh  $\beta$ -thalassemia sẽ được khuyến cáo thực

\*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1634009659.

Email: hangdo009@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4546>

hiện các kỹ thuật xâm lấn nhằm kiểm tra di truyền cho thai. Rõ ràng 75% các thai kỳ không có nguy cơ bị bệnh nhưng vẫn phải trải qua thủ thuật xâm lấn với những nguy cơ biến chứng nguy hiểm [2]. Do đó, rất cần có kỹ thuật chẩn đoán trước sinh không xâm lấn, đơn giản và an toàn để tầm soát các trường hợp thai kỳ có nguy cơ mắc bệnh  $\beta$ -thalassemia.

Với việc phát hiện sự tồn tại của DNA thai nhi lưu hành tự do trong máu mẹ hay cffDNA (cell-free fetal DNA) có nguồn gốc từ lá nuôi phôi (trophoblasts), các nghiên cứu chỉ ra rằng cffDNA có thể khảo sát lần đầu sớm nhất là ở tuần thứ 7 và một số là tuần thứ 5. Lượng cffDNA tăng theo thai kỳ, giảm nhanh sau sinh và hầu như không thể phát hiện được khoảng 2 giờ sau sinh. Người ta ước tính rằng cffDNA chiếm khoảng 2-20% DNA tự do tổng số trong máu mẹ (cell-free DNA hay cfDNA) [2, 3]. Theo một số bài nghiên cứu, kích thước trung bình của cffDNA <300 bp, nhỏ hơn rất nhiều so với các mảnh DNA tự do của mẹ [4].

Hiện nay, cffDNA đã được ứng dụng trong chẩn đoán tiền sản không xâm lấn các lệch bội nhiễm sắc thể (Trisomy 21, 13, 18,...), một số bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (Angelman syndrome, Prader-Willi syndrome, Cri du Chat syndrome,...) và một số bệnh đơn gen như các bệnh liên kết với nhiễm sắc thể giới tính, tăng sản thượng thận bẩm sinh, thiếu sản sụn teo cơ Duchenne, bệnh Huntington, bất đồng nhóm máu Rh, xác định giới tính thai nhi [5].

Từ năm 2005, Ying Li đã cho thấy tiềm năng của việc áp dụng cffDNA vào chẩn đoán không xâm lấn bệnh  $\beta$ -thalassemia [6]. Từ đó đến nay, nhiều nhà nghiên cứu đã thử nghiệm các phương pháp khác nhau như allele-specific PCR (AS-PCR) hoặc realtime AS-PCR kết hợp làm giàu tỉ lệ cffDNA qua gel agarose [6-8], COLD-PCR, microarray [9] và giải trình tự thế hệ mới (next-generation sequencing) [10] để nghiên cứu ứng dụng cffDNA vào chẩn đoán không xâm lấn bệnh  $\beta$ -thalassemia và bước đầu cho các kết quả khả quan. Trong các phương pháp kể trên, phương pháp AS-PCR hoặc realtime AS-PCR kết hợp làm giàu tỉ lệ cffDNA

qua gel agarose là một phương pháp đơn giản và dễ tiếp cận hơn so với các phương pháp khác.

Tại Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng cffDNA trong chẩn đoán tiền sản không xâm lấn còn rất hạn chế, đặc biệt là đối với nhóm bệnh đơn gen như thalassemia. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu nghiên cứu ứng dụng cffDNA trong xét nghiệm trước sinh không xâm lấn sự di truyền một số đột biến phổ biến gây bệnh  $\beta$ -thalassemia từ bố sang thai nhi áp dụng đối với trường hợp cặp vợ chồng đều là thể dị hợp  $\beta$ -thalassemia và đột biến trên thai phụ khác với đột biến trên người chồng. Chúng tôi sử dụng phương pháp AS-PCR kết hợp với loại bỏ bớt DNA tự do của mẹ để làm giàu tỉ lệ cffDNA bằng điện di qua gel agarose để giúp cho phản ứng AS-PCR đặc hiệu hơn.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Cỡ mẫu và xử lý mẫu huyết tương

Đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng Khoa Y-ĐHQG TPHCM thông qua. Mẫu được thu tại bệnh viện Hùng Vương từ 05/2016 đến 05/2017, đối tượng được chọn nghiên cứu dựa trên sự tự nguyện và họ có quyền từ chối tham gia nghiên cứu bất cứ khi nào. Mười cặp vợ chồng có mang gen đột biến  $\beta$ -thalassemia (đột biến trên vợ và chồng là khác nhau) được tiến hành thu mẫu máu trước khi thực hiện thủ thuật chọc ối để tiến hành nghiên cứu. Các đột biến của bố được quan tâm là CD17, CD26 (gây thể bệnh HbE/ $\beta$ -thalassemia khi kết hợp với các đột biến  $\beta$  khác) và CD41/42.

10 ml máu tĩnh mạch được thu nhận ngay trước khi chọc ối và trữ trong ống chứa EDTA. Mẫu được bảo quản ở điều kiện 4°C và vận chuyển trong vòng 4 giờ sau khi thu nhận máu đến phòng thí nghiệm. Tại đây, mẫu máu được ly tâm ở 4°C ở 1600g trong 10 phút nhằm tách lớp huyết tương ra khỏi các tế bào máu. Huyết tương tiếp tục được ly tâm thêm 16000g trong 10 phút nhằm loại bỏ hoàn toàn các mảnh vỡ tế bào quản ở -80°C.

Bảng 1. Trình tự các mồi, nhiệt độ bắt cặp và kích thước sản phẩm sử dụng trong nghiên cứu

STT	Mồi	Trình tự	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)
1	CD17F	ATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGT	67	138
2	CD17R-M	CTCACCACCAACTTCATCCACGTTTCAGCTA		
3	CD26F	CTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACAC	70	132
4	CD26R-M	GATACCAACCTGCCAGGGCGTT		
5	CD41F	GGCATGTGGAGACAGAGAAGACTC	65	140
6	CD41R-M	GAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCT		
7	HBB-F	CTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC	61	115
8	HBB-R	CTTTCTTGCCATGAGCCTTC		
9	SRY-F	CGCATTCATCGTGTGGTCTC	61	147
10	SRY-R	TGTGCCTCCTGGAAGAATGG		

## 2.2. Tách chiết DNA tự do (cfDNA) và làm giàu tỉ lệ cffDNA qua gel agarose

800µl huyết tương được sử dụng để tách DNA tự do tổng số (cell-free DNA hay cfDNA) bằng bộ Kit QIAamp MinElute Virus Spin của QIAGEN-Đức theo hướng dẫn của nhà sản xuất với một số thay đổi trong quy trình. Ở bước cuối, DNA được thu lại trong 30µl buffer AVE nhằm tăng nồng độ cfDNA trong dung dịch cuối cùng.

Để làm tăng tỉ lệ cffDNA trong dung dịch tách chiết được và loại bỏ càng nhiều DNA tự do của mẹ càng tốt, 20µl DNA tách chiết được điện di qua gel agarose 1.5% cùng với thang 100bp. Sử dụng bộ dụng cụ cắt gel sạch, cắt vùng gel từ 100-300bp và thu lại DNA bằng bộ Kit QIAquick Gel Extraction của QIAGEN-Đức theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Để tránh ngoại nhiễm và nhiễm chéo, quy trình điện di được thiết kế rất nghiêm ngặt từ việc xử lý dụng cụ, hóa chất, v.v... cho đến các thao tác thực hiện. Ví dụ như dụng cụ được rửa javel 2%, sau đó rửa lại sạch với nước cất và chiếu UV; chỉ chạy mỗi lần một mẫu trên một bảng gel, mỗi lần chạy đều dùng dung dịch đệm TBE 1X mới đã được hấp tiệt trùng và chiếu UV... Ngoài ra, mỗi quá trình điện di và làm giàu tỉ lệ cffDNA qua gel chúng tôi đều chạy song song với một mẫu control (mẫu chứng âm (chạy với nước cất)) để kiểm chứng và loại trừ sự nhiễm.

## 2.3. Kiểm tra sự hiện diện của cfDNA và cffDNA sau tách chiết và sau khi làm giàu qua gel

DNA tự do tổng số (cfDNA) trong sản phẩm sau tách chiết (TLG) và sau làm giàu qua gel (SLG) được kiểm tra bằng phương pháp

PCR khuếch đại 1 đoạn gen  $\beta$ -globin (HBB). Sự hiện diện của DNA tự do có nguồn gốc từ thai (cffDNA) trong sản phẩm tách chiết từ huyết tương của thai phụ mang thai giới tính nam trước và sau khi làm giàu qua gel được phát hiện bằng phương pháp PCR khuếch đại 1 đoạn gen SRY (là gen nằm trên nhiễm sắc thể Y). Trình tự các đoạn mồi, nhiệt độ bắt cặp và kích thước sản phẩm được trình bày trong bảng 1. Thành phần và chu trình nhiệt của các phản ứng được trình bày trong bảng 2. Kit PCR sử dụng là kit HotStar Taq *Plus* DNA Polymerase của QIAGEN-Đức. Ngoài mẫu control (mẫu chứng âm cho quá trình điện di và làm giàu qua gel (chạy với nước cất)), các phản ứng PCR luôn có kèm các mẫu chứng dương (Positive) là mẫu chạy với DNA bộ gen (gDNA) người nam và mẫu chứng âm (Negative) là mẫu chạy với milliQ H<sub>2</sub>O.

## 2.4. Phát hiện sự di truyền đột biến từ bố sang thai nhi bằng cffDNA kết hợp AS-PCR

DNA sau khi tách chiết (TLG) và sau khi làm giàu qua gel (SLG) được sử dụng để chạy phản ứng AS-PCR. Các cặp mồi được sử dụng trong AS-PCR bao gồm: cặp mồi CD17F và CD17R-M được thiết kế để khuếch đại DNA mang đột biến CD17 mà không khuếch đại DNA không mang đột biến CD17; cặp mồi CD26F và CD26R-M khuếch đại DNA mang đột biến CD26 mà không khuếch đại DNA không mang đột biến CD26; cặp mồi CD41F và CD41R-M khuếch đại DNA mang đột biến CD41/42 mà không khuếch đại DNA không mang đột biến CD41/42 (Bảng 1). Nguyên lý thiết kế mồi cho AS-PCR được tham khảo bởi

Stephen Little năm 2001 [11]. Trong quá trình chạy phản ứng AS-PCR, chúng tôi luôn chạy kèm các mẫu chứng dương 17+, 26+ và 41/42+ (là mẫu gDNA có mang đột biến tương ứng với CD17, CD26 và CD41/42) và chứng âm 17-, 26- và 41/42- (là các mẫu gDNA không mang đột biến tương ứng cho CD17, CD26 và CD41/42) nhằm chứng tỏ phản ứng AS-PCR là đặc hiệu và có độ nhạy cao. Mẫu chứng dương được pha để đạt nồng độ 1 và 5 bản sao gDNA (1cp và 5cp) trên 1 phản ứng và mẫu chứng âm được pha để đạt nồng độ 50 bản sao gDNA (50cp) trên 1 phản ứng, tỉ lệ này mô phỏng tỉ lệ cfDNA:cfDNA trên lý thuyết.

Bảng 2. Thành phần và chu trình nhiệt của các phản ứng PCR và AS-PCR

Thành phần	Thể tích (µl)	
	PCR (HBB và SRY)	AS-PCR (CD17, CD26 và CD41/42)
PCR Buffer (10X)	2	2
Môi xuôi (10µM)	1	1
Môi ngược (10µM)	1	1
dNPT (10mM)	0.2	0.2
Taq polymerase	0.1	0.1
DNA	2	3 (TLG) hoặc 5 (SLG)
MilliQ H <sub>2</sub> O	13.7	12.7 (TLG) hoặc 10.7 (SLG)
<b>Tổng</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Chu trình nhiệt			
Giai đoạn	Nhiệt độ °C	Thời gian	Số chu kì
Biến tính ban đầu	95	5'	1
Biến tính	95	30"	
Bắt cặp môi	Ta <sup>0</sup> C	30"	45
Kéo dài	72	1'	
Kéo dài bổ sung	72	10'	1

### 2.5. Phân tích kết quả

Kết quả chẩn đoán không xâm lấn dựa trên cfDNA bằng phương pháp AS-PCR sẽ được so sánh với kết quả chẩn đoán xâm lấn bằng thủ thuật chọc ối tại bệnh viện Hùng

Vương. Kết quả so sánh là có hay không có sự di truyền đột biến CD17, CD26 và CD41/42 từ bố qua thai nhi.

### 3. Kết quả nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên mười thai phụ có nguy cơ sinh con mang gen bệnh β-thalassemia có tuổi thai từ 16 đến 23 tuần tuổi, trong đó có 3 thai giới tính nữ và 7 thai giới tính nam.

800µl mẫu huyết tương sau khi tách chiết DNA bằng Kit QIAamp MinElute Virus Spin được làm giàu tỉ lệ cfDNA qua gel agarose 1.5%. Nhằm kiểm tra sự hiện diện của cfDNA cũng như cfDNA sau khi tách chiết và sau khi làm giàu qua gel, phản ứng PCR với môi HBB và môi SRY được thực hiện trên mẫu DNA sau khi tách chiết và sau khi làm giàu.

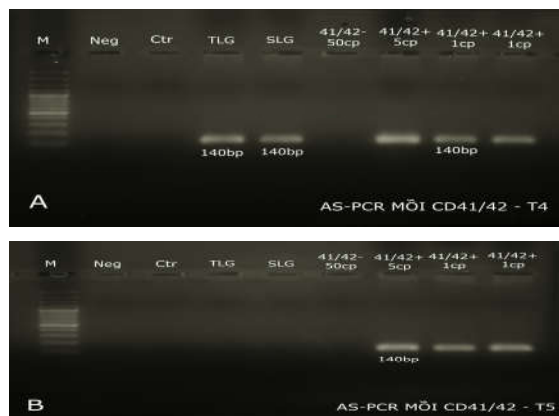


Hình 1. Minh họa kết quả điện di sản phẩm PCR định tính với môi HBB và SRY nhằm kiểm tra sự hiện diện của cfDNA và cfDNA sau tách chiết và sau khi làm giàu qua gel ở mẫu T4.

*Ghi chú:* M: thang 100bp; Ctr (Control): mẫu chứng âm cho quá trình điện di và làm giàu qua gel; SLG: mẫu sau khi làm qua gel agarose; TLG: mẫu trước khi làm giàu qua gel agarose; Pos (Positive): mẫu chứng dương cho PCR (chứa gDNA người nam); Neg (Negative): mẫu chứng âm cho PCR (chứa milliQ H<sub>2</sub>O).

Kết quả thí nghiệm cho thấy sự tách chiết thành công DNA tự do trong huyết tương và quá trình làm giàu qua gel agarose vẫn đảm bảo thu lại được cfDNA cũng như cfDNA ở tất cả các mẫu. Hình 1 minh họa kết quả điện di sản phẩm PCR định tính với môi HBB và SRY thực hiện trên DNA sau tách chiết và sau khi làm giàu qua gel của mẫu T4 (là mẫu từ thai phụ mang thai giới tính nam).

Sản phẩm DNA sau khi tách chiết và sau khi làm giàu qua gel, được sử dụng để thực hiện phản ứng AS-PCR với các cặp môi tương ứng cho các đột biến CD17, CD26 và CD41/42.



Hình 2. Minh họa kết quả chạy điện di sản phẩm AS-PCR với mỗi đột biến CD41/42 trên mẫu T4 và T5.

**Ghi chú:** M: thang 100bp; Neg (Negative): mẫu chứng âm cho AS-PCR (chứa milliQ H<sub>2</sub>O); Control (Ctr): mẫu chứng âm cho quá trình điện di và làm giàu qua gel; SLG: mẫu sau khi làm giàu qua gel agarose; TLG: mẫu trước khi làm giàu qua gel agarose; 41/42- (50cp): mẫu chứng âm cho AS-PCR chứa 50 bản sao gDNA không mang đột biến CD41/42; 41/42+ (5cp): mẫu chứng dương cho AS-PCR chứa 5 bản sao gDNA mang đột biến CD41/42; 41/42+ (1cp): mẫu chứng dương cho AS-PCR chứa 1 bản sao gDNA mang đột biến CD41/42).

Hình 2A minh họa kết quả chạy điện di sản phẩm AS-PCR với mỗi đột biến CD41/42 trên mẫu T4. Kết quả cho thấy các giếng chạy với DNA sau tách chiết (TLG) và sau làm giàu qua gel (SLG) đều lên vạch sản phẩm với kích thước phù hợp chứng tỏ sự hiện diện của đột biến CD41/42 trong mẫu. Nói cách khác, có sự di truyền đột biến CD41/42 từ bố sang thai nhi. Các giếng chứng dương (41/42+) đều cho vạch sản phẩm và chứng âm (41/42-) đều không cho vạch sản phẩm chứng tỏ phản ứng AS-PCR hoạt động hiệu quả, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Giếng control không ra vạch sản phẩm chứng tỏ quá trình điện di và làm giàu qua gel không bị ngoại nhiễm.

Hình 2B minh họa kết quả chạy điện di sản phẩm AS-PCR với mỗi đột biến CD41/42 trên mẫu T5. Khác với mẫu T4, ở các giếng TLG và SLG đều không lên vạch sản phẩm chứng tỏ không có sự hiện diện của đột biến CD41/42 trong mẫu. Nói cách khác, không có sự di truyền đột biến CD41/42 từ bố sang thai nhi.

Phân tích tương tự được thực hiện cho 8 mẫu còn lại. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ba lần trên mỗi mẫu và đều cho kết quả như nhau. Kết quả AS-PCR từ 10 mẫu cfDNA đều trùng khớp với kết quả chọc ối từ bệnh viện Hùng Vương. Kết quả tổng hợp và so sánh được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. So sánh kết quả phân tích cfDNA và kết quả chọc ối từ Bệnh viện Hùng Vương

STT	Kí hiệu mẫu	Tuổi thai	Giới tính thai	Kiểu gen mẹ	Kiểu gen bố	Kết quả	
						cfDNA	Chọc ối
1	T1	16 tuần	Nữ	CD26	CD17	Không đột biến CD17	Không đột biến CD17
2	T2	20 tuần	Nữ	CD26	CD17	Không đột biến CD17	Không đột biến CD17
3	T3	16 tuần	Nam	CD26	CD41/42	Không đột biến CD41/42	Không đột biến CD41/42
4	T4	23 tuần	Nam	CD26	CD41/42	Đột biến CD41/42	Đột biến CD41/42
5	T5	17 tuần	Nam	CD26	CD41/42	Không đột biến CD41/42	Không đột biến CD41/42
6	T6	19 tuần	Nam	CD26	CD41/42	Không đột biến CD41/42	Không đột biến CD41/42
7	T7	16 tuần	Nam	CD41/42	CD26	Đột biến CD26	Đột biến CD26
8	T8	16 tuần	Nữ	CD41/42	CD26	Đột biến CD26	Đột biến CD26
9	T9	16 tuần	Nam	CD17	CD26	Không đột biến CD26	Không đột biến CD26
10	T10	18 tuần	Nam	CD41/42	CD26	Không đột biến CD26	Không đột biến CD26

## 4. Thảo luận và khuyến nghị

### 4.1. Thảo luận

Sự phát hiện ra cffDNA là bước ngoặt lớn trong quá trình phát triển các phương pháp chẩn đoán tiền sản không xâm lấn. Nhìn chung, cho đến nay, dù đã có những thành công nhất định trong việc áp dụng triển khai cffDNA vào chẩn đoán một số bệnh lý lệch bội nhiễm sắc thể (aneuploidy) hay bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể nhưng việc áp dụng cffDNA vào các bệnh lý di truyền đơn gen thì vẫn còn hạn chế, do đòi hỏi độ chính xác, chuyên biệt, dương tính giả thấp, giá cả hợp lý, ngoài ra còn do tính chất đơn lẻ, rải rác của các bệnh di truyền đơn gen.

Các kết quả đã thu được trong nghiên cứu này cho thấy AS-PCR có khả năng phát hiện đột biến CD17, CD26 và CD41/42 của bệnh  $\beta$ -thalassemia từ DNA tự do của thai nhi với độ chính xác là 10/10 mẫu.

Chúng tôi chưa ghi nhận khác biệt giữa kết quả trước và sau khi làm giàu qua gel trên tất cả 7 mẫu âm (mẫu không có sự di truyền đột biến từ bố sang thai nhi). Điều này cho thấy phương pháp AS-PCR chúng tôi tối ưu có độ đặc hiệu cao và cho kết quả tốt kể cả với mẫu chưa qua làm giàu qua gel đối với các đột biến CD17, CD26 và CD41/42. Tuy nhiên, cần khảo sát trên lượng mẫu lớn hơn để có thể kết luận chính xác hiệu quả của việc làm giàu trong phương pháp AS-PCR này.

Các nghiên cứu gần đây về sử dụng các loại PCR cải tiến để phát hiện đột biến trên cffDNA đã báo cáo các tỉ lệ thành công khá cao. Năm 2015, Mahboubeh và cộng sự đã dùng kỹ thuật allele-specific realtime PCR kết hợp làm giàu qua gel để phát hiện đột biến trên cffDNA được di truyền từ bố sang thai nhi, nghiên cứu này làm trên 10 mẫu máu, 4 đột biến IVSI-1(G>A), IVSI-5(G>C), FR8/9(+G), và CD44(-C), với tỉ lệ thành công là 100% [8]. Tương tự, Chen và cộng sự cũng sử dụng AS-PCR cho các SNPs kết hợp làm giàu qua gel để phát hiện sự di truyền các đột biến CD41/42, IVS1-5 và IVSII-654 từ bố hoặc mẹ sang thai nhi và đạt kết quả chính xác 8/8 mẫu [7]. Mới đây, năm 2016, nghiên cứu của Silvia Galbiati và cộng sự

đã công bố sự thành công trong việc áp dụng kỹ thuật full COLD-PCR (coamplification at lower denaturation temperature-PCR) và microarray để phát hiện 7 đột biến  $\beta$ -thalassemia di truyền từ bố sang con của 75 mẫu thai phụ [9]. Bên cạnh đó, NGS là một trong những phương pháp chẩn đoán NIPT được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trên thế giới, nhưng ở Việt Nam vẫn chưa được phát triển. Một nghiên cứu gần đây về áp dụng NGS để phát hiện 4 đột biến -28(A>G), CD17(A>T), CD41/42(-TTCT) và IVSII-654(C>T) được di truyền từ bố ở 83 thai phụ người Đông Nam Á, nghiên cứu này báo cáo độ chính xác là 96.5%, độ nhạy 100% và đặc hiệu là 92.1%, với 3 kết quả dương tính giả [10]. So với các phương pháp khác như NGS hay microarray, phương pháp AS-PCR hay realtime AS-PCR có ưu điểm là ít tốn kém hơn và dễ dàng thiết kế cho các phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Tuy nhiên, việc thực hiện bước làm giàu qua gel khi thực hiện phương pháp này đòi hỏi sự tỉ mỉ cao trong thao tác để tránh nguy cơ ngoại nhiễm.

### 4.2. Khuyến nghị

Nghiên cứu chỉ mới thực hiện trên số lượng mẫu hạn chế (10 mẫu), vì vậy cần mở rộng nghiên cứu trên số lượng mẫu lớn hơn để khẳng định được tính ổn định của quy trình và có thể tính được độ nhạy, độ đặc hiệu. Ngoài ra, chúng tôi chỉ mới tập trung vào 3 đột biến CD17, CD26 và CD41/42 và vào trường hợp đột biến trên thai phụ và chồng là khác nhau. Cần nghiên cứu mở rộng trên các đột biến khác gây bệnh  $\beta$ -thalassemia tại Việt Nam cũng như cần mở rộng nghiên cứu cho trường hợp đột biến trên thai phụ và chồng là giống nhau. Xa hơn nữa, cần đánh giá, so sánh hiệu quả giữa phương pháp AS-PCR với các phương pháp khác cũng như mở rộng nghiên cứu trên các bệnh di truyền đơn gen khác.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2017-44-01.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Khắc Hân Hoan, Nghiên cứu tầm soát và chẩn đoán trước sinh bệnh alpha và beta thalassemia, Luận án tiến sĩ Đại Học Y Dược TPHCM, (2013).
- [2] Stumm M, Wegner R-D, Hofmann W., Cell-free fetal DNA in maternal blood: new possibilities in prenatal diagnostics, *Laboratoriumsmedizin*, (2012), 36(5).
- [3] Sekizawa K., Yokokawa Y., Sugito Y., Iwasaki M., Yukimoto Y., Ichizuka K., Saito H., Okai T., Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta, *Hum Genet*, (2003), 113(4): 307-310.
- [4] Chan K.C., Zhang J., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.W., Huang D.W., Lo Y.M., Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma, *Clin Chem*, (2004), 50(1): 88-92.
- [5] Lun F.M., Tsui N.B., Chan K.C., Leung T.Y., Lau T.K., Charoenkwan P., Chow K.C., Lo W.Y., Wanapirak C., Sanguansermsri T., Cantor C.R., Chiu R.W., Lo Y.M. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci*, (2008); 105(50): 19920-19925.
- [6] Li Y., Di Naro E., Vitucci A., Zimmermann B., Holzgreve W., Hahn S., Detection of paternally inherited fetal point mutations for  $\beta$ -thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma, *JAMA*, (2005), 293(7): 843-849.
- [7] Chen J.J., Tan J.A., Chua K.H., Tan P.C., George E., Non-invasive prenatal diagnosis using fetal DNA in maternal plasma: a preliminary study for identification of paternally-inherited alleles using single nucleotide polymorphisms, *BMJ Open*, (2015), 5(7): e007648.
- [8] Ramezanzadeh M., Salehi M., Farajzadegan Z., Kamali S., Salehi R., Detection of paternally inherited fetal point mutations for  $\beta$ -thalassemia in maternal plasma using simple fetal DNA enrichment protocol with or without whole genome amplification: an accuracy assessment, *J Matern Fetal Neonatal Med*, (2016), 29(16): 2645-2649.
- [9] Galbiati S., Monguzzi A., Damin F., Soriani N., Passiu M., Castellani C., Natacci F., Curcio C., Seia M., Lalatta F., Chiari M., Ferrari M., Cremonesi L., COLD-PCR and microarray: two independent highly sensitive approaches allowing the identification of fetal paternally inherited mutations in maternal plasma, *J Med Genet*, (2016), 53(7): 481-487.
- [10] Xiong L., Barrett A.N., Hua R., Tan T.Z., Ho S.S., Chan J.K., Zhong M., Choolani M. Non-invasive prenatal diagnostic testing for beta-thalassaemia using cell-free fetal DNA and next generation sequencing, *Prenat Diagn*, số (2015), 35(3): 258-265.
- [11] Little S., Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*, (2001), Chapter 9: Unit 9.8.

## Primary Study on Application of Cell-free Fetal DNA (cffDNA) in Non-invasive Prenatal Testing of $\beta$ -thalassemia

Trinh Van Bo Em<sup>1</sup>, Nguyen Van Thong<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thanh Kieu<sup>3</sup>, Do Thi Thu Hang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Binh Chanh Hospital, E9/5 Nguyen Huu Tri Street, Binh Chanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Genetics, Hung Vuong Hospital, 28 Hong Bang Street, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>School of Medicine-VNU-HCMC, Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City, Vietnam

**Abstract:**  $\beta$ -thalassemia is a common autosomal recessive disorders, caused by mutations in the  $\beta$ -globin gene. It severely influences the physical and mental development of affected children and place an immense burden of care and treatment on the family and society. Therefore, the prenatal screening of  $\beta$ -thalassemia to control its increase in the community is an essential part of preventive genetics. Currently, besides traditional prenatal diagnostic tests that requires invasive sampling techniques such as amniocentesis or chorionic villous sampling (CVS), the use of cffDNA for non-invasive prenatal testing of  $\beta$ -thalassemia is a new, safer, and more effective direction. In this study, we extracted and enriched the percent of cffDNA in the maternal peripheral blood as well as optimized AS-PCR to detect three most common  $\beta$ -thalassemia mutations CD17, CD26, and CD41/42. Presence or absence of the paternal mutant allele was then correctly determined in all of 10 cases compared to fetal genotyping that determined with amniocentesis.

**Keywords:**  $\beta$ -thalassemia, non-invasive prenatal diagnosis, cell-free fetal DNA, Allele-specific PCR.