

Phát hiện và định lượng đột biến ty thể G11778A của Hội chứng LHON ở bệnh nhân nghi bị bệnh ty thể

Nguyễn Văn Minh¹, Phùng Bảo Khánh¹, Nguyễn Thị Hồng Loan¹,
Phạm Văn Anh², Lê Ngọc Anh², Cao Vũ Hùng², Phan Tuấn Nghĩa^{1,*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Đột biến G11778A nằm trên gen *ND4* của hệ gen ty thể người chiếm 50-70% trường hợp của hội chứng LHON. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết lập phương pháp phát hiện và định lượng đột biến G11778A bằng real-time PCR sử dụng mẫu dò huỳnh quang Taqman có nucleotide dạng cầu khóa (LNA). Phương pháp cho thấy sự tương quan tỷ lệ nghịch giữa số bản copy của gen đích và giá trị chu kỳ ngưỡng cao với hệ số hồi quy $R^2 = 0,999$. Phương pháp cho phép phát hiện đột biến ở tỷ lệ 0,1% trở lên. Bằng việc sử dụng kết hợp kỹ thuật PCR-RFLP và kỹ thuật real-time PCR chúng tôi đã phát hiện một bệnh nhân nhi gái, 7,5 tháng tuổi mang đột biến G11778A. Đột biến tồn tại ở dạng không đồng nhất và có tỷ lệ đột biến là $2,71 \pm 0.12\%$. Trong khi bố và mẹ bệnh nhân đều không mang đột biến. Đây là bệnh nhân mang đột biến G11778A đầu tiên được phát hiện tại Việt Nam.

Từ khóa: Đột biến G1178A, Hội chứng LHON, PCR-RFLP, Real-time PCR, Mẫu dò LNA.

1. Mở đầu

Hội chứng liệt thần kinh thị giác di truyền theo Leber (Leber hereditary optic neuropathy), viết tắt là LHON, tác động chủ yếu đến võng mạc, gây teo dây thần kinh thị giác, làm mất khả năng nhìn thấy ở cả hai mắt [1-4]. Khoảng 95% trường hợp bị hội chứng LHON được gây ra bởi các đột biến gen ty thể liên quan đến các tiểu đơn vị của phức hệ I, bao gồm đột biến G11778A trên gen *ND4* (50-70%

trường hợp), đột biến G3460A trên gen *ND1* (15% trường hợp) và đột biến T14484C trên gen *ND6* (10% trường hợp) [5-8].

Nhiều nghiên cứu cho rằng dạng không đồng nhất của đột biến có thể ảnh hưởng một phần đến sự biểu hiện và di truyền của bệnh LHON [9-10]. Vì vậy việc xác định các nhân tố góp phần làm thay đổi kiểu hình của đột biến và những hiểu biết về cơ chế phát sinh bệnh do đột biến G11778A là cần thiết. Trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã điều tra sự có mặt của đột biến G11778A ở 163 bệnh nhân thần kinh, cơ người Việt Nam bằng kỹ thuật PCR-RFLP, tuy vậy, chưa một trường hợp nào mang đột biến G11778A được phát hiện [11].

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-903247424.

Email: phantn16@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4547>

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu phát hiện và định lượng đột biến G11778A ở một bệnh nhân nữ, 7,5 tháng tuổi bằng việc sử dụng kết hợp phương pháp PCR-RFLP và real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan mang nucleotide dạng cầu khóa acid nucleic.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Mẫu máu ngoại vi của các bệnh nhân nhi được chẩn đoán lâm sàng là bị bệnh thần kinh, cơ, có hàm lượng acid lactic trong máu tăng và được Bệnh viện Nhi Trung ương cung cấp.

Bộ kit tách chiết ADN máu được mua từ hãng Qiagen (Đức). Các cặp mồi và mẫu dò đặc hiệu được tổng hợp bởi hãng Integrated DNA Technology (IDT, Mỹ). Bộ kit nhân dòng và bộ kit tạo đột biến định vị được mua từ hãng ThermoFisher Scientific (Mỹ). Dung dịch gốc phản ứng real-time PCR được mua của hãng Enzymomics (Hàn Quốc). Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Các plasmid tái tổ hợp mang đoạn ADN ty thể 318 bp (11.683-12.000) có và không mang đột biến G11778A được tạo ra trong nghiên cứu trước đây [11] và là sản phẩm của đề tài KC.04-10/11-15, được sử dụng làm mẫu đối chứng dương và âm.

2.2. Xác định đột biến G11778A bằng phương pháp PCR-RFLP

Đột biến G11778A được xác định bằng PCR-RFLP như đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây [9]. Cụ thể, đoạn gen 318 bp từ hệ gen ty (11.683-12.000) chứa đột biến G11778A được khuếch đại bởi PCR sử dụng cặp mồi 11778-Fw: 5' CTTCACCGGCGCAGTCATTC 3' và 11778-Rv: 5' GTTGTGGTA AATA TG TAGAG 3'. Sản phẩm PCR sau đó được cắt nhanh bởi enzyme giới hạn *Sfa*NI ở 37°C khoảng 15 phút. Sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12%. Mẫu không đột biến có 2 băng DNA là 213 bp và 105 bp, mẫu đột biến

dạng đồng nhất chỉ có một băng 318 bp (do trình tự nhận biết và phân cắt của *Sfa*NI bị biến đổi khi có đột biến). Mẫu đột biến dạng không đồng nhất, ngoài băng 318 bp, còn có các băng 213 bp và 105 bp (do có chứa một tỷ lệ ty thể không bị đột biến).

2.3. Định lượng đột biến G11778A bằng kỹ thuật real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan dạng cầu khóa acid nucleic (locked nucleic acid-LNA)

Đột biến G11778A được định lượng bằng kỹ thuật real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan dạng cầu khóa acid nucleic (LNA) tương tự như với đột biến A3243G trong nghiên cứu trước đây của Truong và tập thể [12]. Cụ thể, đoạn ADN dài 80 bp (11.740-11.819) được nhân bản với cặp mồi RT11778Fw: 5'-CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC-3' và RT11778Rv: 5'-GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC-3', cặp mẫu dò đặc hiệu Wt-11778G: 5'HEX-ATGATG+C+GA+C+TGTG-IBFQ-3' và Mt-11778A: 5'-6-FAM-AT+G+AT+G+T+GA+C TG-IBFQ-3' được sử dụng để phát hiện đột biến (dấu + chỉ nucleotide LNA ngay trước đó). Thành phần phản ứng real-time PCR gồm 10 µl Master mix (2x), 0,5 µl mỗi loại mồi (10 µM), 0,2 µl mỗi loại mẫu dò (5 µM) và 10 ng ADN khuôn và H₂O cho tổng thể tích 20 µl. Real-time PCR được thực hiện với chế độ nhiệt 95°C: 10 phút; 40 chu kỳ 95°C: 15 giây, 60°C:30 giây. Tỷ lệ đột biến được tính dựa trên giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của mẫu và căn cứ vào đường chuẩn thể hiện tương quan tỷ lệ nghịch giữa logarit số bản copy của khuôn (chứa đoạn gen đích) và giá trị chu kỳ ngưỡng, sử dụng các plasmid chứa đoạn gen ty thể mang và không mang đột biến G11778A làm chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

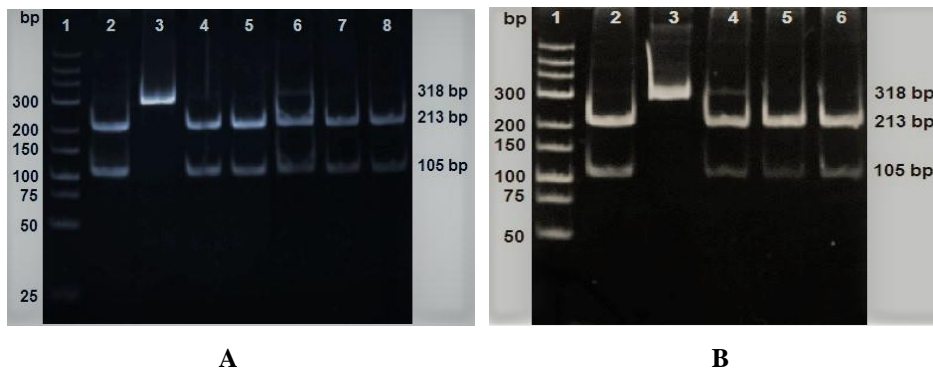
3.1. Phát hiện bệnh nhân mang đột biến G11778A bằng PCR-RFLP

Sử dụng phương pháp PCR-RFLP đã được mô tả trước đây [11] để sàng lọc sự có mặt của

đột biến G11778A của 149 mẫu ADN bệnh nhân nhi nghi bệnh ty thể (thần kinh, cơ) điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương, chúng tôi phát hiện 01 bệnh nhân, ký hiệu BN235 (Hình 1A, giếng 4) có mang đột biến G11778A ở dạng không đồng nhất, cụ thể phổ băng PCR-RFLP có 3 băng 318 bp, 213 bp và 105 bp, trong khi đó phổ băng PCR-RFLP của các bệnh

nhân còn lại chỉ có 2 băng là 213 bp và 105 bp, chứng tỏ các mẫu này không mang đột biến G11778A.

Khi phân tích phổ băng PCR-RFLP của bố và mẹ bệnh nhân, kết quả thu được (Hình 1B) cũng cho thấy các trường hợp này đều chỉ có 2 băng 213 bp và 105 bp, chứng tỏ bố và mẹ bệnh nhân BN235 không mang đột biến G11778A.

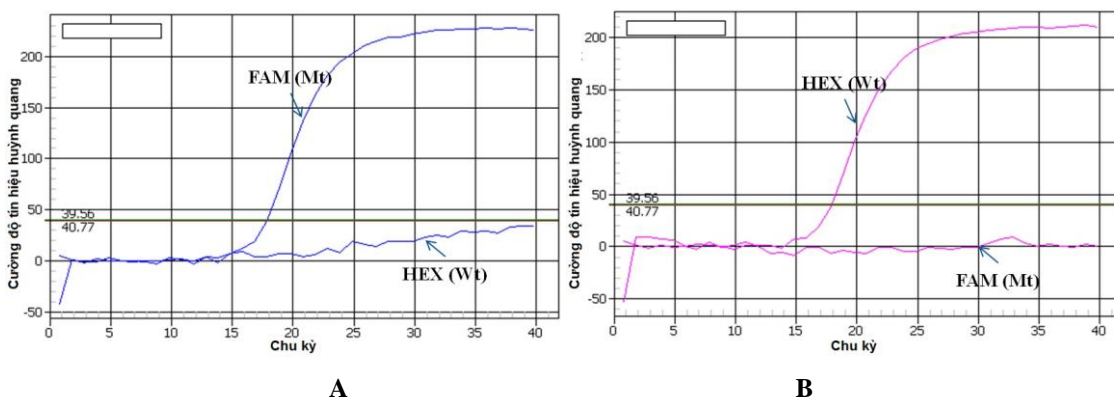


Hình 1. Phổ điện di sản phẩm PCR-RFLP các mẫu bệnh nhân (A) và gia đình bệnh nhân BN235 (B). 1(A,B): Thang chuẩn ADN; 2(A,B): Đối chứng âm; 3(A,B): Đối chứng dương nhân tạo; 4A-8A: Mẫu bệnh nhân; 6A,4B: Mẫu bệnh nhân BN235; 5B: Mẹ bệnh nhân BN235; 6B: Bố bệnh nhân BN235.

3.2. Định lượng đột biến G11778A bằng real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan LNA

Để thiết lập điều kiện cho phản ứng PCR định lượng sử dụng mẫu dò Taqman LNA, các

mẫu đối chứng hỗn hợp ADN plasmid mang đoạn gen ty thể (từ vị trí 11.683 đến 12.000) có chứa đột biến và không đột biến G11778A với nồng độ $5 \cdot 10^6$ bản sao/ μl . Nồng độ mỗi mẫu dò tối ưu cho phản ứng real-time PCR là 40 nM.

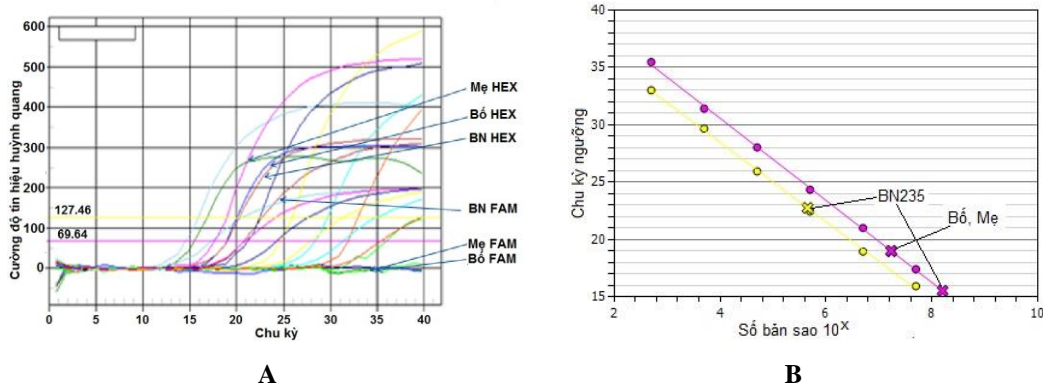


Hình 2. Tín hiệu của FAM và HEX trong định lượng mẫu mang đột biến G11778A và mẫu bình thường. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu FAM ở mẫu mang đột biến (A) và mẫu không mang đột biến (B).

Kết quả chạy real-time PCR (Hình 2) với mẫu dò Mt-11778A (5'-6-FAM-AT+G+AT+G+T+GA+C TG-IBFQ-3') để định lượng dạng đột biến và mẫu dò Wt-11778G (5'-HEX-ATGATG+C+GA+C+TGTG-IBFQ-3') để định lượng dạng không đột biến cho thấy chỉ có tín hiệu nhân bản FAM đối với mẫu mang đột biến G11778A (Hình 2A) và chỉ có tín hiệu nhân bản HEX ở mẫu không mang đột biến (Hình 2B). Kết quả này chứng tỏ mẫu dò mà chúng tôi thiết kế hoàn toàn đặc hiệu để phân biệt sự sai khác ở một nucleotide (hoặc là G hoặc A) và đáp ứng được điều kiện khắt khe của phản ứng real-time PCR.

Kết quả xây dựng đường chuẩn của real-time PCR thể hiện tương quan giữa giá trị chu

kỳ ngưỡng và logarit số bản sao gen (sử dụng plasmid chứa đoạn gen ty thể mang đột biến G11778A và không mang đột biến ở các tỷ lệ nồng độ khác nhau) cho thấy độ tuyến tính cao, giá trị của hệ số tương quan R^2 đạt 0,999 (Hình 3), số liệu trên máy ghi nhận hiệu suất PCR tương ứng với dạng đột biến là 98,3% và 98,8%. Kết quả này cũng phù hợp với các thông số phân tích real-time PCR sử dụng mẫu dò LNA để định lượng đột biến A3243G trong nghiên cứu cứu của Trương và tập thể [12] cũng như tương đương với kết quả phân tích đột biến G11778A bằng real-time PCR sử dụng mẫu dò gắn protein liên kết khe nhỏ của chuỗi DNA gọi tắt là MGB của nhóm tác giả Wang và tập thể [10].



Hình 3. Phổ real-time PCR với mẫu gia đình BN235 (A) và đường chuẩn real-time PCR (B) với khuôn mang đột biến G11778A (đường dưới) và khuôn không đột biến (đường trên).

Kết quả phân tích sự có mặt của đột biến G11778A ở các mẫu ADN của bệnh nhân BN235 và thành viên gia đình bệnh nhân bằng real-time PCR với cặp mồi RT11778Fw và RT11778Rv cùng với mẫu dò đặc hiệu Wt-11778G và Mt-11778A (Hình 3A) cho thấy đường cong nhân bản real-time PCR của mẫu bệnh nhân BN235 đạt giá trị ngưỡng ở 22,5 chu kỳ ($C_t = 22,5$) tương đương với 5×10^5 bản sao. Trên cơ sở đồ thị chuẩn thiết lập được (Hình 3B), chúng tôi đã xác định được phần trăm đột biến G11778A của bệnh nhân là $2,71 \pm 0,12\%$. Các mẫu ADN của mẹ và bố bệnh nhân đều không mang đột biến này. Kết quả này hoàn

toàn tương đồng với kết quả RFLP-PCR nêu ở trên.

Các dẫn liệu khám tại bệnh viện cho thấy bệnh nhân nhi 7,5 tháng tuổi này có những biểu hiện phổ biến của bệnh ty thể như rối loạn trương lực cơ, bị tổn thương não, hình ảnh cộng hưởng từ não không bình thường, chậm phát triển tinh thần vận động, nồng độ axit lactic trong máu cao, trung bình 4,6 mmol/l (mức bình thường $\leq 2,2$ mmol/l). Tuy nhiên, bệnh nhân chưa có biểu hiện các bệnh lý về thị giác. Đột biến G11778A là một trong những nguyên nhân gây nên hội chứng LHON, tuy vậy hội chứng này thường gặp ở nam giới hơn là nữ

giới [9] và đặc biệt, với tỷ lệ đột biến dưới 75% thì bệnh nhân thường chưa có những triệu chứng của bệnh [13]. Điều này cho phép giải thích vì sao bệnh nhân nhi trong nghiên cứu này chưa có các triệu chứng bệnh LHON. Hơn nữa, các rối loạn trương lực cơ, tổn thương não, chậm phát triển tinh thần vận động, nồng độ axit lactic trong máu cao của bệnh nhân có thể do các nguyên nhân khác, không phải do đột biến G11778A.

Dẫn liệu thu được của chúng tôi cũng khẳng định, đột biến G11778A không được phát hiện thấy ở mẹ bệnh nhân, vì vậy có thể cho rằng đột biến ty thể này đã phát sinh trong quá trình phát triển cá thể.

Tóm lại, chúng tôi đã thiết lập được cách thức phát hiện và định lượng đột biến G11778A của hội chứng LHON bằng real-time PCR sử dụng môi Taqman LNA và bằng việc kết hợp kỹ thuật PCR-RFLP với real-time PCR chúng tôi đã phát hiện và định lượng tỷ lệ đột biến G11778A ở một bệnh nhân nhi nữ 7,5 tháng tuổi. Đây là trường hợp bệnh nhân mang đột biến G11778A được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài mã số KC04.10/11-15 và đề tài KLEPT.16.03

Tài liệu tham khảo

- [1] Horvath R. et al., Molecular basis of infantile reversible *Cyt c* oxidase deficiency myopathy, *Brain* 132 (2009) 3165.
- [2] Howell N., LHON and other optic nerve atrophies: the mitochondrial connection, *Genet Ophthalmol* 37 1 (2003) 94.
- [3] Mashima Y., Leber's hereditary optic neuropathy, *Nippon Rinsho* 60 4 (2002) 282.
- [4] Robinson B., H., Lactic acidemia and mitochondrial disease, *Mol Genet Metab* 89 (2006) 3.
- [5] Jia X et al., Molecular epidemiology of mtDNA mutations in 903 Chinese families suspected with Leber hereditary optic neuropathy, *J Hum Genet* 51 (2006) 851.
- [6] Mackey D. A., et al., Norby S., Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy, *Am J Hum Genet* 59 (1996) 481.
- [7] Mashima Y., et al., Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using the Invader technology, *Clin Biochem* 37 (2003) 268.
- [8] Mashima Y., et al., Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy, *Curr Eye Res* 17 (1998) 403.
- [9] Chinnery P. F., et al., Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *Am J Med Genet* 98 (2001) 235.
- [10] Wang J. Y., et al., MGB probe assay for rapid detection of mtDNA11778 mutation in the Chinese LHON patients by real-time PCR, *J Zhej Univ Sci B* 9 8 (2008) 610.
- [11] Nguyễn Văn Minh và cộng sự (2015) Sàng lọc đột biến G3460A, G11778A và phát hiện đột biến mất đoạn 6 bp mới trên hệ gen ty thể bệnh nhân thần kinh cơ Việt nam, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 13 (2) 213.
- [12] Truong T. H., et al, Sensitive quantification of mitochondrial mutation using new Taqman probes, *Cent Eur J Med* 9 6 (2014) 839.
- [13] Smith K., H., et al., Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy, *Arch Ophthalmol* 111 (1993) 1486.

Detection and Quantitation of Mitochondrial G11778A Mutation of LHON Syndrome in a Vietnamese Patient with Tentatively Diagnosed Mitochondrial Disease

Nguyen Van Minh^{1,2}, Phung Bao Khanh¹, Nguyen Thi Hong Loan¹,
Pham Van Anh³, Le Ngoc Anh³, Cao Vu Hung³, Phan Tuan Nghia¹

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science,
334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

²National Hospital for Pediatrics, 18/879 La Thanh, Dong Da, Hanoi, Vietnam

Abstract: G11778A mutation in the ND4 gene of human mitochondrial genome accounts for 50-70% of LHON syndrome. In this study, we set up real-time PCR using fluorescent Taqman probe with locked nucleic acid nucleotide (LNA) for detection and quantitation of mitochondrial genome mutation G11778A. The real-time PCR showed a linear correlation between logarithm of target gene copy number and threshold value (C_t) with a high regression value $R^2 = 0.999$. By using PCR-RFLP in combination of real-time PCR, we found a 7.5 month girl patient carrying G11778A mutation. The mutation was present at $2.71 \pm 0.12\%$ of heteroplasmy, whereas her parents did not carry this mutation. This is the first case with the mutation G11778A found in Vietnam.

Keywords: G11778A mutation, LHON syndrome, PCR-RFLP, Real-time PCR, LNA probe.