

Nghiên cứu hoàn thiện quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing

Nguyễn Thị Thanh Nga^{1,*}, Trần Văn Khoa¹,
Nguyễn Thị Hồng Vân², Ngô Trường Giang¹

¹Học viện Quân Y, 160 Phùng Hưng, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, 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: Bệnh teo cơ tủy là bệnh thần kinh cơ do bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt trên nhiễm sắc thể số 5. Trẻ bị bệnh teo cơ tủy thường chết sớm ở lứa tuổi đi học. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là hoàn thiện quy trình phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy trước chuyển phôi bằng kỹ thuật minisequencing. Nghiên cứu được tiến hành trên 30 mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư, 04 cặp mang gen có nguyện vọng sinh con khỏe mạnh. Nhân toàn bộ gen trên 30 mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư, sau đó nhân exon 7 gen SMNt phát hiện đột biến gây bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing để chuẩn hóa quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy. Ứng dụng quy trình với 4 gia đình tham gia nghiên cứu, kết quả 02 cặp thành công với 2 trẻ khỏe mạnh ra đời. Chúng tôi đã hoàn thiện và ứng dụng thành công kỹ thuật minisequencing trong chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy.

Từ khóa: Teo cơ tủy, gen SMN, SMA, PCR-RFLP.

1. Đặt vấn đề

Bệnh teo cơ tủy (*Spinal Muscular Atrophy – SMA*) là bệnh thần kinh cơ đặc trưng bởi sự thoái hóa tuần tiên của các tế bào sừng trước tủy sống, dẫn đến yếu cơ đối xứng gốc chi, trương lực cơ và phản xạ gân xương bị giảm hoặc mất. Tỷ lệ bệnh SMA chung trên toàn thế

giới là 1/10.000 trẻ đẻ sống và tỷ lệ người mang gen bệnh dao động từ 1/40-1/60 [1]. Nguyên nhân gây bệnh SMA là do đột biến gen SMNt (survival monitor neurone) trên nhiễm sắc thể số 5. Gen SMN bao gồm 9 exon mã hóa cho phân tử protein SMN dài 294 acid amin. Gen SMN có hai bản sao giống nhau là gen SMNt (SMN1) và gen SMNc (SMN2). Trong đó, 95% bệnh nhân bị bệnh teo cơ tủy do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt. Do đó, để chẩn đoán gen bệnh SMA thường phân tích sự có mặt hay vắng mặt exon 7 gen SMNt. Có một số phương pháp

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1689186638.

Email: thanhngabongbong81@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4560>

phát hiện đột biến gen gây bệnh SMA, song việc sử dụng phương pháp phù hợp nào là rất quan trọng do chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi có những đặc điểm và khó khăn khác với chẩn đoán trên các bệnh phẩm thông thường. Một đặc điểm phân tử quan trọng là exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc chỉ khác nhau 1 cặp nucleotid ở vị trí 214 nên khi nhân exon 7 gen SMNt sẽ nhân luôn cả exon 7 gen SMNc. Vì vậy, cặp nucleotid khác nhau ở exon 7 được sử dụng để phân biệt gen SMNt với SMNc trong chẩn đoán SMA [1]. Thực tế, trẻ mắc bệnh SMA ra đời thường dẫn tới tử vong sớm. Do đó, việc chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi (preimplantation genetic diagnosis- PGD) bệnh SMA với những gia đình tiêu sử có người mắc bệnh SMA nhằm chọn ra những phôi lành để cấy chuyển vào tử cung mẹ, từ đó sinh ra những em bé khỏe mạnh là cần thiết và có ý nghĩa quan trọng. Để thực hiện được điều đó, bước đầu chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài:

“Nghiên cứu hoàn thiện quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing”

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

30 mẫu tế bào phôi sinh thiết từ những mẫu phôi dư; 4 gia đình gồm bố, mẹ mang gen và con bị bệnh teo cơ tủy (con bị bệnh teo cơ tủy đã được Viện Nhi Trung ương chẩn đoán do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt) có nguyện vọng làm PGD.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất nhân toàn bộ gen theo bộ kit GenomePlex® single cell whole genome amplification (Sigma). Hóa chất tinh sạch: SAP, EXO1. Hóa chất điện di: Hidi-formamid; GeneScan-120 LIZ. Hóa chất cho PCR: hỗn hợp phản ứng PCR, enzym DNA Polymerase,

mỗi minisequencing, SNaPshot Multiplex Kit. Thiết bị: máy ly tâm văng, buồng thao tác PCR, máy PCR ABI 9700, hốt ủ hóa chất, máy điện di tự động 3130xl Genetic analyzer, hệ thống điện di trên gel.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy trên mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư

Tiến hành nhân toàn bộ bộ gen (Whole Genome Amplification- WGA) từ các mẫu tế bào phôi sinh thiết theo các bước hướng dẫn của bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification; lấy sản phẩm sau khi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen làm mẫu để thực hiện kỹ thuật minisequencing phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy với các bước:

+ Nhân exon 7 gen SMNt với trình tự mỗi thiết kế theo Fiorentino F. Và cs. [2] có cải biên:

F-5' - agactatcaacttaatttctgatca-3'

R-5' - caccttccttcttttgattttgt-3'

+ Kích thước sản phẩm nhân: 189bp

+ Thành phần phản ứng PCR cho exon 7 - SMNt: master mix 12.5 µl; mỗi 0.5 µl; nước đệm ion 7µl; mẫu 5µl.

+ Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 96°C trong 5 phút; [94°C trong 45 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút] x 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút.

Phản ứng Minisequencing được tiến hành: Sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt được tinh sạch bằng 2 enzym SAP và EXO1, chạy minisequencing theo quy trình của bộ kit ABI PRISM SNaPshot Multiplex với 0,2 µM mỗi minisequencing:

+ Trình tự mỗi minisequencing:

5' - ccttttttttcttaccagggttt-3'

Hỗn hợp phản ứng được chạy trên máy PCR 9700 với chu trình nhiệt như sau: [96°C

trong 10 giây, 50°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây] x 25 chu kỳ; 72°C trong 7 phút.

Sản phẩm thu được thêm vào 1 đơn vị enzym SAP, ủ theo chu trình nhiệt: 37°C trong 1 giờ và 75°C trong 15 phút. Sản phẩm minisequencing được điện di huỳnh quang trên máy 3130xl Genetic analyzer trong 45 phút, phân tích bằng phần mềm GeneMapper ID v 3.2. Đánh giá kết quả phát hiện đột biến dựa vào số lượng, màu sắc và độ lớn của các đỉnh thu được trên điện di huỳnh quang. Ở vị trí nucleotid 214 trên exon 7 SMNt là C, còn exon 7 SMNc là T. Vì vậy, với kỹ thuật minisequencing, người không bị bệnh teo cơ tủy sẽ xuất hiện hai đỉnh: màu đen tương ứng nucleotit C của exon 7 SMNt và màu đỏ tương ứng nucleotit T của exon 7 SMNc hoặc chỉ xuất hiện một đỉnh màu đen tương ứng nucleotit C của exon 7 gen SMNt (vì chỉ khi mất exon 7 gen SMNt mới gây bệnh teo cơ tủy), người bị bệnh teo cơ tủy do mất đồng hợp exon 7 SMNt chỉ xuất hiện một đỉnh màu đỏ tương ứng nucleotit T của exon 7 gen SMNc.

2.3.2. Các bước ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy cho các gia đình

Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy từ mẫu máu toàn phần của bố mẹ: Thu mẫu máu toàn phần của 4 gia đình bệnh nhân tham gia nghiên cứu, tách ADN theo kit FavorPrep™ Genomic DNA Mini của hãng Favorgen. Sau đó, tiến hành kỹ thuật minisequencing như ở bước thực hiện trên tế bào phôi để phát hiện đột biến.

Bên cạnh việc nhân gen phát hiện đột biến thì việc đánh giá nhiễm ADN ngoại lai của mẫu tế bào phôi sinh thiết được cũng rất quan trọng, vì bệnh teo cơ tủy là bệnh di truyền lặn nên nếu trong quá trình sinh thiết phôi hoặc thao tác kỹ thuật không tốt có thể bị nhiễm ADN ngoại lai nên sẽ chẩn đoán phôi bệnh thành phôi thường, dẫn đến cấy chuyển nhầm phôi bệnh. Do đó, trong nghiên cứu chúng tôi nhân 3 polymorphic

marker D5S1977, D5S629, D5S641, chọn ra loại polymorphic marker dị hợp ở bố, mẹ để đánh giá nhiễm ADN ngoại lai, bởi lẽ chúng có tính đa hình và đặc trưng cho cá thể cao nên có thể dễ dàng phát hiện được tế bào phôi sinh thiết được có di truyền từ bố và mẹ hay không.

- Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy từ mẫu tế bào phôi sinh thiết của các gia đình: Nuôi phôi ngày 3 hoặc 5, tiến hành sinh thiết tế bào; Sau đó nhân toàn bộ bộ gen từ các mẫu tế bào phôi sinh thiết theo các bước hướng dẫn của bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification; Lấy sản phẩm sau khi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen làm mẫu để thực hiện hai bước sau:

+ Thực hiện kỹ thuật minisequencing phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy.

+ Nhân polymorphic marker đã chọn (đã biết dị hợp ở bố, mẹ) để đánh giá khả năng nhiễm ADN ngoại lai của các tế bào phôi sinh thiết.

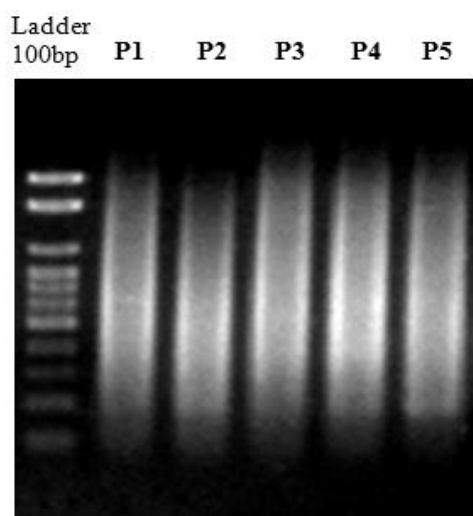
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy trên mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư

3.1.1. Kết quả nhân toàn bộ bộ gen trên các mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư

Chúng tôi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen từ 30 mẫu tế bào phôi đã sinh thiết. Điện di kiểm tra sản phẩm nhân bằng gel agarose 2%, kết quả thể hiện trên hình 1 và bảng 1.

Kết quả điện di bằng gel agarose 2% cho thấy cả 5 mẫu Phôi 1, 2, 3, 4, 5 (P1, P2, P3, P4, P5) đều có sản phẩm nhân toàn bộ bộ gen với kích thước khoảng 100bp-1.500bp. Tiến hành tương tự với các mẫu tế bào phôi còn lại, thu được kết quả thể hiện trong bảng 1.



Hình 1. Kết quả điện di bằng gel agarose 2% sản phẩm nhân toàn bộ gen từ tế bào phôi: P1: Phôi 1; P2: Phôi 2; P3: Phôi 3; P4: Phôi 4; P5: Phôi 5.

Bảng 1. Kết quả nhân toàn bộ bộ gen từ tế bào phôi

Kết quả	Số lượng tế bào phôi	Tỷ lệ
Có sản phẩm nhân WGA	30	100%
Không có sản phẩm nhân WGA	1	3,33%

Như vậy, kỹ thuật nhân toàn bộ bộ gen từ tế bào phôi đã thành công với sản phẩm ADN thu được có kích thước dao động trong khoảng 100bp – 1.500bp với hiệu quả phản ứng cao (96.67%), đủ điều kiện để thực hiện các bước thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Kết quả nhân exon 7 gen SMNt từ sản phẩm nhân toàn bộ bộ gen trên mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư

Lấy sản phẩm nhân toàn bộ bộ gen của các tế bào phôi làm mẫu, tiến hành nhân exon 7 gen SMN bằng kỹ thuật minisequencing, kết quả thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nhân exon 7 gen SMNt từ sản phẩm nhân toàn bộ bộ gen trên tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư

Gen SMNt	Số mẫu tiến hành	Số mẫu có sản phẩm PCR của exon 7	Số mẫu không có sản phẩm PCR của exon 7	Hiệu quả phản ứng PCR
Exon 7	29	29	0	100%

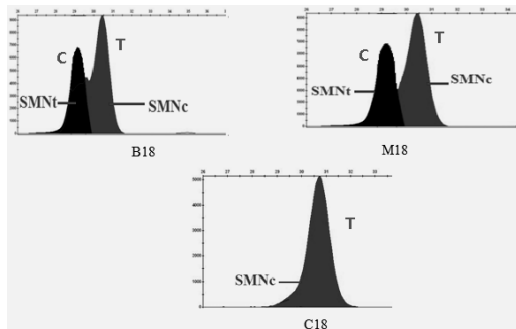
Thống kê trong bảng 2 cho thấy khi thực hiện kỹ thuật minisequencing nhân gen phát hiện đột biến trên 29 mẫu tế bào phôi sinh thiết từ phôi dư đều có sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt, điều này hoàn toàn phù hợp với thực tế vì tất cả các mẫu tế bào phôi đều sinh thiết từ những phôi dư bình thường. Hiệu quả phản ứng nhân exon 7 gen SMNt phát hiện đột biến trong nghiên cứu rất cao và cũng gần tương đương với một số tác giả khác trên thế giới như Dreesen J. C. và cs. [3] (100%), Daniels G. và cs. [4] (91%), Moutou C. và cs. [5] (92,9%), Fiorentino F. và cs. [2] (93,8%), Girardet A. và cs. [6] (88,2) Như vậy, có thể nói chúng tôi đã

thành công trong việc hoàn thiện kỹ thuật minisequencing trong chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

3.2. Kết quả ứng dụng quy trình PGD cho các gia đình

3.2.1. Kết quả phát hiện đột biến gen SMNt từ máu toàn phần của bố, mẹ

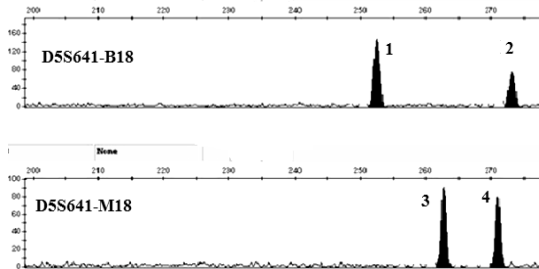
- Kết quả phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing của gia đình SMA18 thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di huỳnh quang sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt bằng kỹ thuật minisequencing từ máu toàn phần gia đình SMA18: B18: bố bệnh nhân SMA18; M18: mẹ bệnh nhân SMA18; C18: bệnh nhân bị bệnh teo cơ tủy số 18.

Cả bố bệnh nhân 18 (B18) và mẹ bệnh nhân 18 (M18) đều xuất hiện hai đỉnh tương ứng với exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc, điều này hoàn toàn hợp lý vì thực tế họ là người bình thường. Bệnh nhân (C18) chỉ có một đỉnh tương ứng exon 7 gen SMNc, nghĩa là C18 bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt (Kết quả này phù hợp với kết luận chẩn đoán gen gây bệnh teo cơ tủy trước đó của Viện nhi Trung ương).

- Kết quả chọn polymorphic marker dị hợp với bố, mẹ gia đình SMA18: Nhân 3 polymorphic marker D5S629, D5S641, D5S1997 từ máu toàn phần của gia đình SMA18. Kết quả B18 và M18 có sản phẩm nhân D5S641 dị hợp, thể hiện trong hình 3.

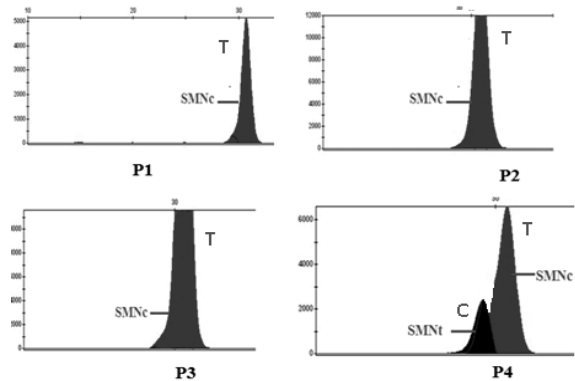


Hình 3. Kết quả nhân D5S641 của gia đình SMA18: B18: Bố bệnh nhân 18; M18: Mẹ bệnh nhân 18.

Như vậy, Bố B18 có sản phẩm nhân D5S641 dị hợp với hai alen 1 và 2, mẹ M18 có sản phẩm nhân D5S641 dị hợp với hai alen 3 và 4. Do vậy, chọn D5S641 để đánh giá nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu phôi sinh thiết đối với gia đình SMA18.

3.2.2. Kết quả tiến hành trên tế bào phôi sinh thiết

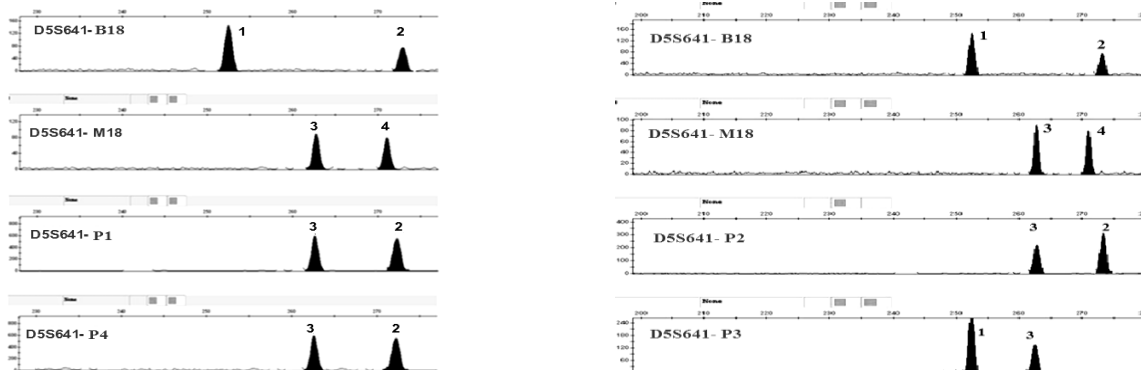
Kết quả nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy. Gia đình SMA18 đã sinh thiết được 4 mẫu tế bào phôi. Tiến hành nhân toàn bộ bộ gen theo bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification. Sau đó, tiến hành nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt bằng kỹ thuật minisequencing, kết quả thể hiện trong hình 4..



Hình 4. Kết quả phát hiện đột biến gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy từ các mẫu tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA18 dùng kỹ thuật minisequencing: P1: Phôi 1; P2: Phôi 2; P3: Phôi 3; P4: Phôi 4. Sau khi tiến hành chẩn đoán PGD bệnh SMA bằng kỹ thuật minisequencing đối với gia đình SMA18 cho thấy, trong 4 phôi sinh thiết được, chỉ có phôi 4 (P4) xuất hiện hai đỉnh tương ứng với exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc nên là phôi bình thường, 3 phôi còn lại (Phôi 1- P1; phôi 2- P2; phôi 3- P3) chỉ có một đỉnh tương ứng exon 7 gen SMNc nên là phôi bị bệnh teo cơ tủy.

- Đánh giá nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu tế bào phôi sinh thiết

Nhân D5S641 từ mẫu các tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA18, kết quả thể hiện trong hình 5.



Hình 5. Kết quả nhân D5S641 của gia đình 18. B18: Bố 18 dị hợp với hai alen 1 và 2; M18: Mẹ 18 dị hợp với hai alen 3 và 4; P1: Phôi 1; P2: Phôi 2; P3: Phôi 3; P4: Phôi 4.

Như vậy, cả 4 phôi đều có sự di truyền nhận alen tương ứng từ bố và mẹ, nghĩa là tất cả các mẫu phôi sinh thiết đều không bị nhiễm ADN ngoại lai. Do đó, lựa chọn phôi 4 không bị bệnh

teo cơ tủy, không nhiễm ADN ngoại lai để cấy chuyển phôi. Với các bước tiến hành tương tự với 3 gia đình còn lại, thu được kết quả thống kê trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi của các gia đình tham gia nghiên cứu

STT	Số tế bào phôi sinh thiết được	Phôi bình thường	Số tế bào phôi chuyển	Kết quả
SMA1	5	4	2	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA2	Phôi không phát triển			
SMA18	4	1	1	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA19	3	2	2	Đang theo dõi

4. Kết luận và khuyến nghị

4.1. Kết luận

1. Đã hoàn thiện được quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing.

2. Bước đầu đã áp dụng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi

bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật minisequencing cho 04 gia đình: đã có 2 em bé khỏe mạnh ra đời, 1 cặp đang theo dõi, từ đó làm giảm gánh nặng cho gia đình và xã hội, góp phần tăng chất lượng dân số.

4.2. Khuyến nghị

1. Tiếp tục áp dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy bằng

kỹ thuật minisequencing cho các cặp vợ chồng mang gen có nguy cơ chủ động sinh con khỏe mạnh.

2. Khảo sát thêm các polymorphic marker nằm gần gen SMNt để chọn ra những loại có tỷ lệ dị hợp cao ở người Việt nam, từ đó làm tăng hiệu quả đánh giá nhiễm ADN ngoại lai.

Tài liệu tham khảo

- [1] Burglen L., Lefebvre S., Clermont O., *et al*, Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene, *Genomics*, 32 (1996), 497-482.
- [2] Fiorentino F. *et al* (2003) The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol.Hum. Reprod.*, Vol. 9, No. 7 pp. 399 – 410. 2
- [3] Dreesen J.C., Bras M., Die- Smulders C. *et al*, Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Mol.Hum. Reprod.*, Vol. 4 (1998), No.9 pp. 881-885.3
- [4] Daniels G., Rachel Pettigrew, Alan Thornhill *et al*, Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy. *Mol.Hum. Reprod.*, Vol.7 (2001), No.10 pp.995-1000.4
- [5] Moutou C. *et al*, Duplex PCR for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy, *Prenatal diagnosis*, 23 (2003), 685-689.5
- [6] Girardet A. *et al*, Efficient strategies for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy, *Fertility and Sterility*, Vol.90 (2008), No.2. 6.

Study on Protocol Improvement for Spinal Muscular Atrophy Preimplantation Genetic Diagnosis by Using the Minisequencing Technique

Nguyen Thi Thanh Nga¹, Tran Van Khoa¹,
Nguyen Thi Hong Van², Ngo Truong Giang¹

¹Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Abstract: Spinal muscular atrophy (SMA) is a severe neurodegenerative autosomal recessive disorder. Most of patients are caused by the homozygous absence of exon 7 of the telomeric copy of the SMN gene (SMNt) on chromosome. Children with SMA often died prematurely at school age. Therefore, the aim of the study was to improve protocol for spinal muscular atrophy preimplantation genetic diagnosis by using the minisequencing technique. The study was conducted on 30 embryonic cell templates byopsied plus embryos, and four couples were treated using this method. Five unaffected embryos were transferred which resulted in two clinical pregnancy. We have successfully applied the technique of minisequencing for the Preimplantation Genetic Diagnosis of spinal muscular atrophy.

Keywords: Spinal muscular atrophy, SMN gene, Preimplantation Genetic Diagnosis, minisequencing.