

Phát hiện một trường hợp mang đột biến A3243G thuộc hội chứng MELAS

Phùng Bảo Khánh¹, Nguyễn Minh Hoàng¹, Phạm Vân 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: Gen *MTTL1* của hệ gen ty thể và mã hóa cho phân tử RNA vận chuyển axit amin leucine (tRNA^{-Leu(UUR)}). Đột biến A3243G nằm trên gen *MTTL1* là nguyên nhân chính gây hội chứng não giât cơ, tăng acid lactic máu và giả đột quy (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, được gọi tắt là MELAS). Trong nghiên cứu này, bằng việc kết hợp kỹ thuật PCR-RFLP và real-time PCR chúng tôi đã phát hiện được một bệnh nhân nhi (8 tuổi, nữ) mang đột biến A3243G với tỷ lệ 77,6%. Kết quả phân tích sự có mặt và tỷ lệ đột biến của các thành viên gia đình bệnh nhân cho thấy mẹ bệnh nhân cũng mang đột biến A3243G với tỷ lệ 9,7% nhưng không có biểu hiện hội chứng MELAS, trong khi đó, bố và em gái của bệnh nhân không mang đột biến này và hoàn toàn khỏe mạnh. Kết quả này khẳng định đột biến A3243G đã được truyền từ mẹ cho bệnh nhân và sự biểu hiện của bệnh liên quan đến tỷ lệ của đột biến.

Từ khóa: Đột biến A3243G, Hội chứng MELAS, PCR-RFLP, Real-time PCR.

1. Mở đầu

Đột biến gen A3243G nằm trên gen *MTTL1* trong hệ gen ty thể, mã hóa cho tRNA^{-Leu(UUR)} là đột biến gen ty thể tồn tại ở dạng không đồng nhất và là một trong số các đột biến gen ty thể có tần suất xuất hiện cao nhất [1]. Nghiên cứu về chức năng của tRNA trong ty thể ở *in vitro* chứng tỏ rằng đột biến A3243G đã làm giảm khả năng aminoacyl hóa đối với leucine (gắn leucine tRNA-Leu) trong điều kiện *in vitro* tới 25 lần so với tRNA-Leu được tổng

hợp từ gen không đột biến [2]. Người bị đột biến A3243G có thể không biểu hiện triệu chứng hoặc có nhiều triệu chứng lâm sàng khác nhau như tiểu đường, điếc, nhược cơ, tâm thần phân liệt, co giât, chậm phát triển..., trong đó biểu hiện lâm sàng phổ biến nhất của đột biến này là não giât cơ tăng acid lactic máu và giả đột quy (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, được gọi tắt là MELAS) [3, 4].

Tần suất xuất hiện của hội chứng MELAS là 1:15.000, là một trong các bệnh thần kinh di truyền phổ biến nhất [5]. Mức độ biểu hiện của bệnh thường liên quan đến tỷ lệ (%) số ty thể mang đột biến. Vì vậy, phát hiện đột biến ty

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-903247424.

Email: phantn16@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4570>

thể, trong đó có đột biến A3243G chỉ có giá trị cao khi ngoài việc khẳng định sự có mặt của đột biến thì phải định lượng được tỷ lệ đột biến. Khi phân tích đột biến gen ty thể, các mẫu máu, nước tiểu và cơ thường được sử dụng để phân tích đột biến [6]. Tuy nhiên sinh thiết cơ là một phương pháp gây thương tổn cho bệnh nhân, không thể thực hiện một cách thông dụng trong chẩn đoán bệnh ty thể. Vì vậy, các mẫu máu vẫn được sử dụng phổ biến cho việc phát hiện đột biến gen ty thể, trong đó có đột biến A3243G [4, 7].

Đột biến A3243G đã được nghiên cứu ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới [5, 8-12]. Trong các nghiên cứu trước đây, nhóm nghiên cứu chúng tôi cũng đã phát hiện thấy một số trường hợp bệnh nhân mang đột biến A3243G trong số các bệnh nhân nghi bị bệnh thần kinh cơ [7]. Công trình này báo cáo kết quả phát hiện và định lượng tỷ lệ đột biến A3243G ở một trường hợp bệnh nhân nhi mới và các thành viên gia đình của bệnh nhân.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân và các mẫu máu của người nhà bệnh nhân (có đơn tự nguyện tham gia nghiên cứu) được lấy theo các quy chuẩn của Bệnh viện Nhi Trung ương. Kit tách chiết DNA được mua của hãng Qiagen, cặp mồi đặc hiệu và mẫu dò được mua từ Integrated DNA Technologies (IDT, Hoa Kỳ). Mastermix cho real-time PCR mua từ Enzynomics (Hàn Quốc). Enzyme giới hạn mua từ hãng Thermoscientific (Hoa Kỳ). Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết cần thiết trong sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phát hiện đột biến A3243G bằng PCR-RFLP

DNA tổng số được tách chiết theo kit của Qiagen. Phát hiện sự có mặt của đột biến A3243G trên hệ gen ty thể được thực hiện theo các điều kiện mô tả trong nghiên cứu trước đây

[7]. Cụ thể đoạn gen 198 bp (3134-3310) được nhân bản bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với cặp mồi đặc hiệu MAGFw và MAGRv có trình tự như ghi ở bảng 1. Trong đó mồi xuôi (MAGFw) chứa 1 nucleotide không bắt cặp tại 3149 (C được thay bằng T) và mồi ngược (MAGRv) chứa 1 nucleotide không bắt cặp tại 3318 (G được thay bằng A) để loại bỏ bớt 2 điểm cắt của *Hae*III thuận lợi khi điện di. Thành phần PCR bao gồm: 2,5 µl đệm Taq DNA polymerase 10X; 0,5 µl Taq DNA polymerase (5 đơn vị/µl); 2,5 µl dNTPs 2 mM; 1 µl mồi xuôi 10 pmol; 1 µl mồi ngược 10 pmol; 1 µl DNA khuôn (40-50 ng/µl) và 16,5 µl dd H₂O cho tổng thể tích 25 µl. PCR được thực hiện qua 35 chu kỳ với 3 bước chính: biến tính DNA ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 giây. Mẫu đối chứng âm tính (không chứa DNA) được đặt cùng thí nghiệm để kiểm tra khả năng nhân bản không đặc hiệu.

Sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn *Hae*III bằng cách ủ ở 37°C trong 10-12 giờ, sản phẩm cắt được điện di trên gel polyacrylamide 12% trong đệm Tris-acetate, pH 8,0 chứa 1 EDTA 1 mM (TAE 1X) và được nhuộm bằng ethidium bromide và chụp ảnh dưới hệ thống soi gel của Biorad. Đột biến A3243G làm xuất hiện điểm cắt của *Hae*III trên đoạn gen nhân bản, do đó khi đoạn DNA nhân bản mang đột biến được cắt bằng *Hae*III sẽ tạo ra 2 đoạn có kích thước lần lượt là 111 bp và 87 bp, trong khi đó, những đoạn gen nhân bản không mang đột biến sẽ không bị cắt bởi *Hae*III, vì vậy vẫn giữ nguyên kích thước ban đầu là 198 bp. Các mẫu phân tích mang gen mang đột biến ở dạng không đồng nhất (heteroplasmy), phổ băng PCR-RFLP sẽ có 3 băng 198 bp, 111 bp, 87 bp. Độ đậm nhạt của băng 198 bp so với băng 111 và 87 bp liên quan đến tỷ lệ số bản sao mang đột biến và không mang đột biến.

2.2.2. Định lượng đột biến A3243G bằng real-time PCR

Việc định lượng đột biến A3243G bằng real-time PCR sử dụng mẫu dò huỳnh quang

dạng có nucleotide cầu khóa (LNA) được thực hiện theo phương pháp của Truong và tập thể [13]. Cụ thể, đoạn DNA chứa vị trí đột biến A3243G dài 90 bp từ vị trí 3206-3295 trên hệ gen ty thể được nhân bản với cặp mồi xuôi mtMEL-F2/mtMEL-R2 và nucleotide đột biến được phát hiện bằng mẫu dò huỳnh quang đặc hiệu cho nucleotide không đột biến và có đột biến Wt-MEL-HEX-1/Mt-MEL-FAM-1 có trình tự như trong Bảng 1. Thành phần của phản ứng real-time PCR gồm qPCR master mix, 0,5 $\mu\text{mol/L}$ mỗi loại mồi, 0,1 $\mu\text{mol/L}$ mỗi loại mẫu dò (Wt-MEL-HEX và Mt-MEL-FAM-1) và 20-

50 ng DNA khuôn cho tổng thể tích 20 μl . Real-time PCR được thực hiện với chế độ nhiệt 95°C, 10 phút tiếp nối 40 chu kỳ với 95°C, 15 giây để biến tính và 60°C, 30 giây để bắt cặp và kéo dài chuỗi. Mẫu định lượng được chạy kèm mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn được xây dựng bằng cách trộn theo tỷ lệ 1:1 plasmid mang DNA có và không có đột biến A3243G ở các nồng độ từ 5.10^6 - 5.10^3 bản sao/ μl (hệ số pha loãng 10). Lượng đột biến trong mỗi mẫu được đo 3 lần ($n = 3$) và được xử lý theo phương pháp thống kê. Cường độ tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận và phân tích bởi hệ thống iQ5 cyclser (Biorad).

Bảng 1. Trình tự của mồi và mẫu dò dùng cho phát hiện và định lượng đột biến A3243G

Mồi/Mẫu dò	Trình tự	Vị trí trên DNA ty thể
MAGFw	5' CAAGAGAAATAAGGCTTACTTC 3'	3134-3155
MAGRv	5' GGAGTAGGAGGTTAGCCA TGGG 3'	3310-3331
mtMEL-F2	5'-CCA CAC CCACCC AAG AAC AG-3'	3206 - 3225
mtMEL-R2	5'-AGG AATTGAACCTCTGACTGTAAAGTT TT-3'	3267 - 3295
Wt-MEL-HEX-1(mẫu dò cho dạng không đột biến)	HEX- CCG GGC+T+CT GCC AT-IBFQ	3237 - 3250
Mt-MEL-FAM-1(mẫu dò cho dạng đột biến)	6FAM-CCG GGC+CCT GCC AT-IBFQ	3237 - 3250

Ghi chú: dấu + chỉ nucleotide LNA ngay trước đó.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phát hiện đột biến A3243G bằng PCR-RFLP

Trong nghiên cứu này, đoạn gen 198 bp chứa đột biến A3243G từ 3134-3331 được nhân bản bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cắt và bằng *Hae*III để tạo ra phổ băng PCR-RFLP như đã mô tả trước đây [7]. Kết quả điện di sản phẩm PCR-RFLP của bệnh nhân nhi và các thành viên trong gia đình bệnh nhân (Hình 1) cho thấy bệnh nhân có 3 băng 198 bp, 111 bp và 87 bp (đường chạy số 4), chứng tỏ bệnh nhân có mang đột biến A3243G. Trong số các thành viên gia đình gồm bố, mẹ và em gái của bệnh nhân, chỉ có mẹ bệnh nhân có phổ băng tương tự bệnh nhân với 3 băng là 198 bp, 111 bp và 87 bp (đường chạy số 6), còn bố và em gái của bệnh nhân chỉ có một băng DNA 198 bp. Kết quả này chứng tỏ mẹ bệnh nhân có mang đột biến A3243G, còn bố và em gái không mang

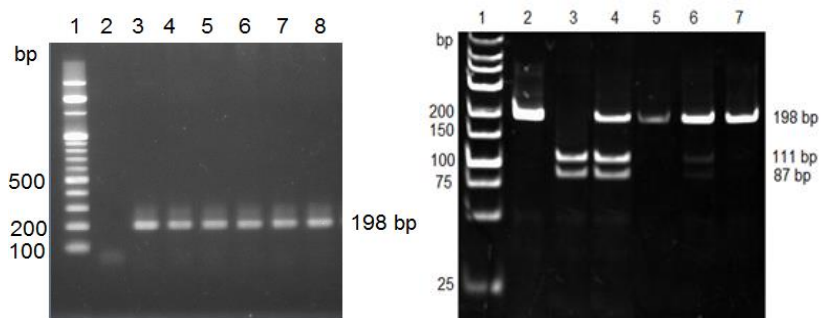
đột biến này. Phổ băng PCR-RFLP của bệnh nhân và các thành viên gia đình cũng còn cho thấy, băng 111 bp và 87 bp rất rõ nét ở mẫu bệnh nhân, trong khi đó 2 băng này ở mẫu mẹ bệnh nhân chỉ ở mức đủ phát hiện, chứng tỏ tỷ lệ đột biến ở mẹ rất thấp. Kết quả phân tích chứng tỏ đột biến A3243G được di truyền từ mẹ sang cho bệnh nhân và tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân là cao hơn so với tỷ lệ này ở mẹ bệnh nhân.

3.2. Định lượng đột biến A3243G bằng real-time PCR sử dụng mẫu dò Taqman LNA

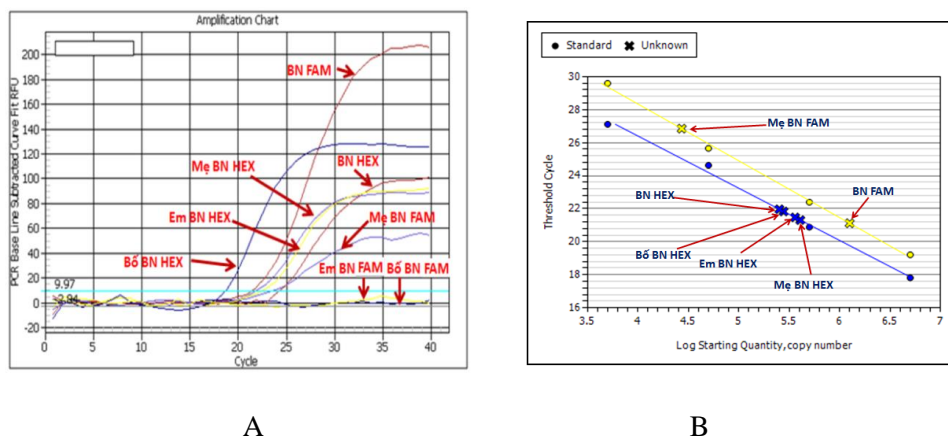
Nhằm định lượng chính xác tỷ lệ đột biến ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân, phương pháp real-time PCR với mẫu dò LNA được sử dụng. Kết quả phân tích cho thấy ở biểu đồ đường cong khuếch đại với mẫu dò Mt-MEL-FAM-1 (mẫu dò cho đột biến) chỉ xuất hiện tín hiệu đột biến của bệnh nhân và mẹ bệnh nhân mà không thấy tín hiệu đột biến của

bố bệnh nhân và em gái bệnh nhân (Hình 2A), và các mẫu này chỉ thấy sự xuất hiện đường cong khuếch đại với mẫu dò Wt-MEL-HEX-1 (mẫu dò cho không đột biến). Giá trị hệ số tương quan tuyến tính (R^2) giữa logarit số bản sao ban đầu và chu kỳ ngưỡng (C_t) của đường chuẩn đột biến (màu vàng) và đường chuẩn không đột biến (màu xanh lam) nằm trong khoảng 0,995- 0,997 (Hình 2B) khẳng định sự tương quan chặt chẽ giữa logarit số bản sao ban đầu và chu kỳ ngưỡng (C_t). Trên cơ sở giá trị chu kỳ ngưỡng của mẫu nghiên cứu và đồ thị chuẩn thiết lập được, tỷ lệ đột biến A3243G của bệnh nhân và mẹ bệnh nhân được xác định

tương ứng là 77,4% và 9,7%. Kết quả phân tích bằng real-time PCR cũng cho thấy không có đột biến A3243G ở bố bệnh nhân và em gái bệnh nhân. Kết quả phân tích real-time PCR này là hoàn toàn phù hợp với phổ băng PCR-RFLP trước đó. Sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ đột biến A3243G ở bệnh nhân và mẹ bệnh nhân cho phép giải thích vì sao bệnh nhân (có tỷ lệ đột biến A3243G là 77,4%) biểu hiện triệu chứng MELAS, trong khi mẹ bệnh nhân (với tỷ lệ đột biến 9,7%) không có biểu hiện của hội chứng này (Bảng 2). Bố và em gái của bệnh nhân không mang đột biến A3243G và cũng phù hợp với dẫn liệu lâm sàng là bình thường.



Hình 1. Nhân bản đoạn gen ty thể mang đột biến A3243G bằng PCR (A) và Phổ băng PCR-RFLP của các mẫu bệnh phẩm của gia đình bệnh nhân nghi bị đột biến A3243G (B). 1.Thang chuẩn DNA, 2. Plasmid mang đoạn gen không chứa đột biến A3243G, 3. Plasmid mang đoạn gen chứa đột biến A3243G, 4. Bệnh nhân, 5. Em gái bệnh nhân, 6. Mẹ bệnh nhân, 7. Bố bệnh nhân.



Hình 2. Đường cong khuếch đại và biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa logarit số bản sao ban đầu và giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t).

Biểu đồ đường cong khuếch đại đoạn gen ty thể không mang đột biến A3243G (thông qua tín hiệu HEX) và mang đột biến A3243G (thông qua tín hiệu FAM).

Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa logarit số bản sao ban đầu và giá trị chu kì ngưỡng (C_t) của bệnh nhân và các thành viên trong gia đình gồm bố, mẹ và em. Đường chuẩn đột biến có màu vàng và không đột biến có màu xanh lam.

Bảng 2. Triệu chứng lâm sàng và tỷ lệ đột biến A3243G ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân BN426

Các thành viên trong gia đình	Giới tính	Tuổi	Tỷ lệ đột biến trong máu	Đặc điểm lâm sàng	Bệnh sử gia đình	
Bệnh nhân	Nữ	8 tuổi	77,6±0,6%	Nhập viện 9 lần, nôn sốt, co giật, lơ mơ, trạng thái động kinh cục bộ, giảm khả năng nghe nhìn, khó thở, sụp mi, rậm lông, men gan cao, toan máu, suy dinh dưỡng, tổn thương ở thùy thái dương, thùy chẩm bên trái, tăng tín hiệu trên phim T2 và FLAR, lactate máu 8,8mmol/L		
Gia đình BN426	Bố	Nam	35 tuổi	Không phát hiện đột biến	Khỏe mạnh	Bình thường
	Mẹ	Nữ	32 tuổi	9,7± 1,77%	Khỏe mạnh	
	Em gái	Nữ	6 tuổi	Không phát hiện đột biến	Khỏe mạnh	

Nhằm giải thích cho hiện tượng tỷ lệ đột biến của mẹ và con khác nhau đồng thời có sự khác nhau giữa các người con trong gia đình, đặc biệt trong nghiên cứu này em gái bệnh nhân không mang đột biến, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng DNA ty thể được di truyền theo cơ chế “nút cổ chai”, nghĩa là chỉ một lượng nhỏ DNA ty thể của mẹ được di truyền và phân phối ngẫu nhiên ở các trứng dẫn tới các trứng có tỷ lệ đột biến khác nhau, thậm chí có trứng không mang bản sao đột biến. Thực tế, Ma và tập thể [4], khi nghiên cứu đột biến A3243G ở các gia đình bệnh nhân Trung Quốc đã phát hiện ra trong số 14 bà mẹ 2 con có 7 bà mẹ mang đột biến và cả 2 con đều mang đột biến, 4 bà mẹ mang đột biến, thì chỉ có 1 con mang đột biến và 1 con không mang đột biến, 3 bà mẹ không mang đột

biến có 1 con mang đột biến và 1 con không mang đột biến [4]. Nghiên cứu của chúng tôi đã bổ sung một bằng chứng về cơ thể phân bố ngẫu nhiên hệ gen ty thể theo thuyết “nút cổ chai” trong sự hình thành tế bào trứng.

Đột biến A3243G là đột biến gen ty thể thường gặp nhất và đặc trưng cho hội chứng MELAS, thường tồn tại ở dạng không đồng nhất trong tế bào. Việc điều tra sự có mặt và tỷ lệ đột biến A3243G với các bệnh nhân nghi bị thần kinh cơ và có hàm lượng lactat máu cao là cần thiết và sẽ góp phần quan trọng vào việc chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, từ đó giúp đưa các phác đồ điều trị bệnh phù hợp, cũng như có các tư vấn di truyền cho các đối tượng mang gen bệnh.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật PCR-RFLP và real-time PCR với mẫu dò Taqman LNA đã cho phép phát hiện và định lượng chính xác tỷ lệ đột biến A3243G ở một bệnh nhân nhi và các thành viên trong gia đình và chỉ ra sự tương quan giữa tỷ lệ đột biến và biểu hiện lâm sàng của bệnh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Đại học Quốc gia Hà Nội với mã số KLEPT.16-03.

Tài liệu tham khảo

- [1] Finsterer J, Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu} (UUR) mutation, *Acta Neurol Scand*, 116, (2007), 1.
- [2] Park H., Davidson E., King MP, The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) decreases the efficiency of aminoacylation, *Biochemistry*, 42, (2003). 958.
- [3] Naviaux RK, Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease, *Mitochondrion*,4, (2004) 351.
- [4] Ma Y., Fang F., Cao Y., Yang Y., Zou L., Zhang Y., Wang S., Zhu S., Xu Y., Pei P., Qi Y Clinical features of mitochondrial DNA m.3243A>G mutation in 47 Chinese families, *J Neurol Sci*, 291, (2010) 17.
- [5] Majamaa K., Moilanen JS., Uimonen S., Remes AM., Salmela PI., Kärppä M, Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population, *Am J Hum Genet*, 63, (1998) 447.
- [6] Ma Y., Fang F., Yang Y., Zou L., Zhang Y., Wang S., Xu Y., Pei P., Qi Y, The study of mitochondrial A3243G mutation in different samples, *Mitochondrion*, 9, (2009) 139.
- [7] Truong TH., Nguyen TVA., Nguyen VL., Pham VA., Phan TN, Screening of common point-mutations and discovery of new T14727C change in mitochondrial genome of Vietnamese encephalomyopathy patients, *Mit DNA*, 27, (2016) 441.
- [8] Cao Y. et al., Detection of eight frequently encountered point mutations in mitochondria in Chinese patients suggestive of mitochondrial encephalomyopathies, *Mitochondrion*, 10, (2010) 330.
- [9] Chae JH., et al., Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation. *Brain Dev*, 26, (2004) 459.
- [10] Gal A., Komlosi K., Maasz A., Pentelenyi P., Remenyi V., Ovary C., Valikovics A., Dioszeghy P., Bereczki D., Melegh B., Molnár MJ, Analysis of mtDNA A3243G mutation frequency in Hungary, *Cent Eur J Med*, 5, (2010) 322.
- [11] Nagata H., Kumahara K., Tomemori T., Arimoto Y., Isoyama K., Yoshida K., Konno A, Frequency and clinical features of patients with sensorineural hearing loss associated with the A3243G mutation of the mitochondrial DNA in otorhinolaryngic clinics, *J Hum Genet*, 46, (2001) 595.
- [12] Qi Y., Zhang Y., Wang Z., Yang Y., Yuan Y., Niu S., Pei P., Wang S., Ma Y., Bu D., Zou L., Fang F., Xiao J., Sun F., Zhang Y., Wu Y., Wang S., Xiong H., Wu X, Screening of common mitochondrial mutations in Chinese patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Mitochondrion*, 7, (2007) 147.
- [13] Truong TH., Nguyen TVA., Nguyen THL., Pham VA., Phan TN, Sensitive quantitation of mitochondrial mutation using new Taqman probes, *Cent Eur J Med*, 9, (2014) 839.

Detection of a Case Harboring Mitochondrial A3243G Mutation of MELAS Syndrome

Phung Bao Khanh¹, Nguyen Minh Hoang¹,
Pham Van Anh², Le Ngoc Anh², Cao Vu Hung², Phan Tuan Nghia¹

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

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

Abstract: Mitochondrial genome A3243G mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} encoding gene (*MTTL*) is the main cause of mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). This mutation exists in heteroplasmic form and severity of the disease is affected by many factors including heteroplasmy level.

In this study, a pediatric proband (female, 8 years old) was found to carry A3243G mutation at 77.6% of heteroplasmy by using PCR-RFLP in combination with real-time PCR. The results of the A3243G mutation analysis of the proband's family showed that her mother without any symptoms of encephalopathy also carried the mutation at 7.9% of heteroplasmy whereas the mutation was not found in the proband's healthy father and healthy sister, indicating that the proband received the A3243G mutation from her mother and the expression of MELAS syndromes depended on the level of heteroplasmy.

Keywords: A3243G Mutation, MELAS Syndrome, PCR-RFLP, Real-time PCR.