

Phát hiện đột biến gen ty thể A1555G gây bệnh điếc cảm ứng bởi Aminoglycoside ở một bệnh nhân người Việt Nam

Phùng Bảo Khánh¹, Nguyễn Văn Minh¹, Trần Đức Hiệp¹, Trần Kiều Anh¹,
Trương Thị Huệ², Phạm Văn Anh³, Lê Ngọc Anh³, Cao Vũ Hùng³, Phan Tuấn Nghĩa^{1,*}

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

²Trường Đại học Quy Nhơn, 170 An Dương Vương, Quy Nhơn, Bình Định, Việt Nam

³Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 17 tháng 6 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 7 tháng 7 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 17 tháng 8 năm 2015

Tóm tắt: Đột biến gen ty thể A1555G là nguyên nhân của hội chứng điếc cảm ứng bởi kháng sinh nhóm aminoglycoside. Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp PCR-RFLP, 173 mẫu bệnh phẩm bị nghi ngờ mắc bệnh ty thể được kiểm tra sự có mặt của đột biến A1555G. Đoạn gen 282 (từ vị trí 1301 đến 1582 trong hệ gen ty thể) được nhân lên bằng PCR và sau đó được cắt bằng *HaeIII*, phổ băng PCR-RFLP của người bình thường có 2 băng DNA 164 bp và 118 bp trong khi bệnh nhân có băng 164 bp, 91 bp và 27 bp. Kết quả chúng tôi phát hiện 1 trường hợp mang đột biến A1555G ở dạng đồng nhất. Đột biến này cũng xuất hiện ở mẹ và em trai bệnh nhân nhưng không thấy ở bố bệnh nhân. Đồng thời đột biến A1438G cũng được tìm thấy trong khi giải trình tự đoạn gen mang đột biến A1555G. Tuy bệnh nhân mang đồng thời cả hai đột biến A1555G và A1438G nhưng chưa phát hiện được mối liên hệ tin cậy nào giữa hai đột biến này.

Từ khóa: DNA ty thể, đột biến A1555G, đột biến A1438G, Hội chứng điếc cảm ứng bởi aminoglycoside, RFLP-PCR.

1. Mở đầu

Ty thể là bào quan sản xuất năng lượng cho tế bào bằng cách oxy hóa các hợp chất hữu cơ thành H₂O, CO₂ và năng lượng dưới dạng ATP. Hệ gen ty thể có kích thước 16.569 bp gồm 37 gen; mã hóa cho 13 loại protein, 2 loại rRNA và 22 tRNA khác nhau liên quan đến hoạt động và chức năng của ty thể [1]. So với ADN nhân tế

bào thì ADN của ty thể dễ bị tổn thương do môi trường trong ty thể giàu oxy phản ứng và do thiếu cơ chế sửa chữa hiệu quả. Hơn 250 đột biến khác nhau trong hệ gen ty thể đã được xác định kể từ khi đột biến đầu tiên được phát hiện vào năm 1988 [2]. Nghiên cứu các đột biến gen ty thể cho phép phát hiện ra nguyên nhân của nhiều loại bệnh khác nhau.

Đột biến thay thế nucleotide A thành G tại vị trí 1555 trên gen mã hóa cho rRNA 12S là nguyên nhân chính gây mất thính giác khi có

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-903247424.
Email: phantuannghia@vnu.edu.vn

mặt của kháng sinh aminoglycoside như streptomycin, gentamycin, kanamycin [3]. Nhiều nghiên cứu cho rằng đột biến A1555G có thể tạo ra cặp base mới C-G khiến cấu trúc bậc 2 của gen 12S rRNA ty thể người giống với vùng tương ứng ở gen 16S rRNA của *E. coli* hình thành vị trí hoạt động của aminoglycoside. Khi sử dụng các kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside, kháng sinh này sẽ bám vào 12S rRNA ty thể (dạng đột biến A1555G) ở tế bào lông ốc tai, làm cho việc dịch mã (tổng hợp) phức hệ I (chiếm 56% protein ty thể) bị ảnh hưởng, dẫn đến tích lũy nhiều gốc superoxide gây chết tế bào tai trong và hậu quả là làm mất thính giác [4, 5]. Đột biến A1555G thường ở dạng đồng nhất (homoplasmy) nhưng biểu hiện triệu chứng bệnh của các thành viên trong gia đình là rất khác nhau. Nhiều yếu tố như gen nhân, đa hình gen ty thể, các yếu tố môi trường hoặc các mô đặc hiệu... có thể hoạt động độc lập hoặc tương hỗ lẫn nhau làm thay đổi biểu hiện lâm sàng của bệnh. Yếu tố môi trường duy nhất có liên quan tới biểu hiện bệnh là aminoglycoside [6]. Ngoài ra, tỷ lệ bị bệnh cũng phụ thuộc vào tuổi; tỷ lệ này 50% ở tuổi 30 và 88% ở tuổi 65 [7].

Mục đích của nghiên cứu này điều tra sự có mặt của đột biến A1555G ở các bệnh nhân nghi bị bệnh ty thể, góp phần đưa ra liệu pháp phù hợp cho người bệnh.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

173 mẫu bệnh phẩm nghi bị bệnh ty thể với các biểu hiện bệnh lý ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt là thần kinh và cơ, thường có hàm lượng lactate máu hoặc dịch não tủy cao hơn giới hạn bình thường (trên 2,2 mmol/L). Các mẫu nghiên cứu được lấy theo các quy

chuẩn của Bệnh viện Nhi Trung ương. Kít tách chiết ADN được mua của hãng Qiagen, cặp mỗi đặc hiệu mua từ Integrated DNA Technologies (IDT). Enzyme giới hạn mua từ hãng Thermoscientific. Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết cần thiết trong sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp

ADN tổng số được tách chiết theo kit của Qiagen. Phát hiện sự có mặt của đột biến A1555G trên hệ gen ty thể được thực hiện theo các điều kiện do Trương và tập thể thiết lập [8] có cải tiến. Cụ thể, đoạn gen 1301-1582 (282 bp) được nhân bản bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với cặp mỗi đặc hiệu có trình tự DAGFw: 5' GCG CAA GTA CCC ACG TAA AGA C 3' (1301-1322) và DAGRv: 5' CCA GTA CAC TTA CCA TGT TAC GAC TGG 3' (1582-1556) - Mỗi DAGFw được thiết kế dựa trên trình tự hệ gen chuẩn [1]. Mỗi DAGRv chứa 1 nucleotide không ghép cặp (T được thay bằng G) tạo điểm cắt cho *HaeIII* khi có đột biến. Thành phần PCR bao gồm: 2,5 µl đệm *Taq* ADN polymerase 10X; 0,5 µl *Taq* DNA polymerase (5 đơn vị/ µl); 2,5 µl dNTPs 2mM; 1 µl mỗi xuôi 10 pmol; 1 µl mỗi ngược 10 pmol; 1 µl ADN khuôn (40-45 ng/µl) và 16,5 µl dd H₂O cho tổng thể tích 25 µl. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều, đặt vào máy PCR và tiến hành chạy trong 35 chu kỳ với 3 bước chính: biến tính ADN ở 95°C trong 10 giây, gắn mỗi ở 61°C trong 10 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 giây. Mẫu đối chứng âm tính (không chứa ADN) được đặt cùng thí nghiệm để kiểm tra khả năng nhân bản không đặc hiệu.

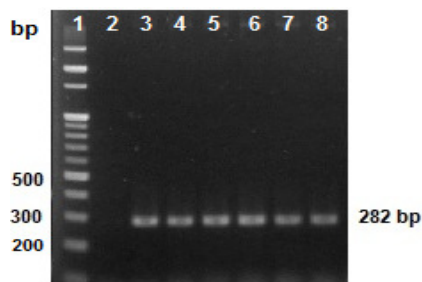
Sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn *HaeIII* ở 37°C trong 10-12 giờ, sản phẩm cắt được điện di trên gel polyacrylamide 12% trong đệm TAE 1X và được chụp ảnh dưới hệ thống soi gel của Biorad.

Sản phẩm PCR cũng được đưa vào vector pJET 1.2 và được biến nạp vào tế bào khả biến DH5 α . Plasmid được tách chiết, kiểm tra bằng enzyme giới hạn và giải trình tự bởi Công ty 1st Base (Singapore) và được dùng làm đối chứng dương trong quy trình PCR-RFLP.

3. Kết quả và thảo luận

Phát hiện đột biến A1555G bằng PCR-RFLP

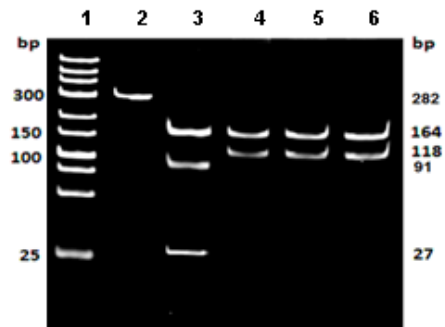
Đầu tiên chúng tôi nhân bản đoạn gen 1301-1582 có kích thước 282 bp chứa vị trí đột biến từ hệ gen của các bệnh nhân nghi bị bệnh ty thể bằng cặp mồi đặc hiệu DAGFw/ DAGRv.



Hình 1. Điện di sản phẩm nhân bản đoạn gen 1301-1582. 1: Thang chuẩn ADN, 2: Đối chứng âm (không có ADN khuôn), 3-8: Sản phẩm PCR các mẫu bệnh phẩm

Kết quả thu được (hình 1) cho thấy sản phẩm PCR có một băng nhân bản ở vị trí phù hợp với kích thước băng theo tính toán lý thuyết là 282 bp (đường chạy 3-8), chứng tỏ chúng tôi đã nhân bản thành công đoạn gen 1301-1582.

Để phát hiện đột biến A1555G, sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn *Hae*III và chạy điện di trên gel polyacrylamide 12%. Theo cách thiết kế thí nghiệm thì đoạn ADN không đột biến sẽ bị cắt làm 2 băng có kích thước là 164 bp và 118 bp. Đoạn ADN bị đột biến sẽ cắt thành 3 băng là 164 bp, 91 bp và 27 bp (băng 118 bp bị cắt thành 91 bp và 27 bp).



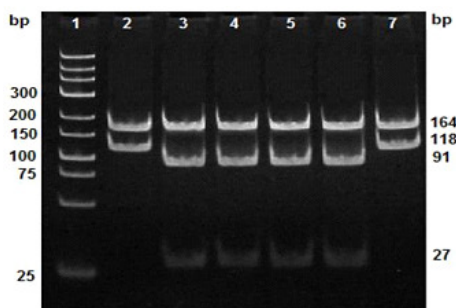
Hình 2. Điện di sản phẩm cắt đoạn gen 1301-1582 bằng *Hae*III. 1: Thang chuẩn ADN, 2: Sản phẩm PCR không cắt bằng *Hae*III. 4-6: Sản phẩm PCR từ DNA bệnh nhân và được cắt *Hae*III

Kết quả điện di cho thấy các mẫu ở đường chạy 4-6 đều bị cắt làm 2 băng là 164 bp và 118 bp chứng tỏ các mẫu này không mang đột biến A1555G. Đường chạy số ba xuất hiện băng 164 bp, băng 91 bp và 27 bp do băng 118 bp cắt hoàn toàn thành; theo tính toán lý thuyết thì mẫu bệnh phẩm này có thể mang đột biến A1555G và đột biến này tồn tại ở dạng đồng nhất. Trong tổng số 173 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi chỉ phát hiện một trường hợp có sai khác với các mẫu còn lại (hình 2, đường chạy 3). Đây là mẫu của một bệnh nhân nữ 11 tuổi (BN 164, mã số 140226).

Phân tích phổ băng PCR-RFLP của các thành viên gia đình bệnh nhân

Để đi sâu nghiên cứu về khả năng có mặt của đột biến A1555G, chúng tôi đã phân tích phổ băng PCR-RFLP của các thành viên trong gia đình bệnh nhân (được kí hiệu gia đình 164). Kết quả thu được (hình 3) cho thấy ADN khuôn của bố bệnh nhân khi cắt bằng *Hae*III cho hai băng là 164 bp và 118 bp giống như mẫu không mang đột biến. Trong khi mẫu ADN của bệnh nhân, mẹ bệnh nhân và em trai bệnh nhân đều bị cắt thành ba băng 164 bp, 91 bp, 27 bp, chứng tỏ mẹ và em trai bệnh nhân có mang đột biến. Điều này phù hợp với tính chất di truyền

theo dòng mẹ của đột biến gen ty thể đồng thời cũng khẳng định được tính đồng nhất số bản sao trong tế bào của đột biến A1555G.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR được cắt bằng *Hae*III đoạn gen 1301-1582 của gia đình bệnh nhân 164.
1: Thang chuẩn ADN; 2: Đối chứng không mang đột biến; 3: Đối chứng dương mang đột biến; 4-7: Phổ băng PCR-RFLP tương ứng của bệnh nhân, em trai bệnh nhân, mẹ bệnh nhân và bố bệnh nhân

J01415.2	1301	GCGCAAGTAC	CCACGTAAAG	ACGTTAGGTC	AAGGTGTAGC	CCATGAGGTG	GCAAGAAATG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
BN164	1	GCGCAAGTAC	CCACGTAAAG	ACGTTAGGTC	AAGGTGTAGC	CCATGAGGTG	GCAAGAAATG
	1361	GGCTACATTT	TCTACCCCAG	AAAACCTACGA	TAGCCCTTAT	GAAACTTAAG	GGTCGAAGGT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
	61	GGCTACATTT	TCTACCCCAG	AAAACCTACGA	TAGCCCTTAT	GAAACTTAAG	GGTCGAAGGT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
				1438			
	1421	GGATTTAGCA	GTAAACTAAG	AGTAGAGTGC	TTAGTTGAAC	AGGGCCCTGA	AGCGCGTACA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
	121	GGATTTAGCA	GTAAACTGAG	AGTAGAGTGC	TTAGTTGAAC	AGGGCCCTGA	AGCGCGTACA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
	1481	CACCGCCCGT	CACCCCTCCTC	AAGTATACTT	CAAAGGACAT	TTAACTAAAA	CCCCTACGCA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
	181	CACCGCCCGT	CACCCCTCCTC	AAGTATACTT	CAAAGGACAT	TTAACTAAAA	CCCCTACGCA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
				1555			
	1541	TTTATATAGA	GGAGACAAGT	CGTAACATGG	TAAGTGTACT	GG	1582
		*****	*****	*****	*****	**	
	241	TTTATATAGA	GGAGGCCAGT	CGTAACATGG	TAAGTGTACT	GG	282
		*****	*****	*****	*****	**	
				1557			

Hình 4. So sánh trình tự nucleotide đoạn gen 1301-1582 của gen ty thể bệnh nhân 164 với trình tự gen chuẩn (J01415.2) trên GenBank.

Kết quả so sánh đoạn gen quan tâm với trình tự gen chuẩn J01415.2 trên GenBank (hình 4) cho thấy đoạn gen nghiên cứu từ bệnh nhân có 3 vị trí sai khác với trình tự gen chuẩn, trong đó vị trí 1557 có sự thay đổi A thành C

Phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen nhân bản nghi chứa đột biến

Để khẳng định chắc chắn sự tồn tại của đột biến A1555G, chúng tôi tiến hành nhân dòng sản phẩm PCR vào vector pJET 1.2, biến nạp vào tế bào khả biến DH5α. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết và kiểm tra bằng *Hea*III trước khi đọc trình tự (kết quả không nêu ở đây). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự đoạn gen tương ứng trên ngân hàng thế giới với mã số J01415.2 bằng phần mềm Clustal.

hay (T thành G) là do chúng tôi chủ động thay đổi trong thiết kế mỗi ban đầu để tạo điểm cắt của enzyme giới hạn *Hea*III, tại vị trí 1438 và 1555 đều có sự thay đổi từ A (theo trình tự tham chiếu bình thường) thành G. Kết quả này

lần nữa khẳng định việc phát hiện bệnh nhân có mang đột biến A1555G bằng PCR-RFLP là chính xác. Ngoài ra trình tự đoạn gen cho thấy bệnh nhân đồng thời mang đột biến A1438G có liên quan đến hội chứng tiểu đường type 2 [9].

Qua điều tra sự có mặt của đột biến A1555G bằng PCR-RFLP cho thấy trong số 173 bệnh nhân nghi bị bệnh ty thể chúng tôi phát hiện 1 mẫu bệnh phẩm có mang đột biến A1555G, chiếm tỷ lệ 0,58%. Trước đó, Trương Thị Huệ và tập thể [8] đã sàng lọc đột biến A1555G trên 106 mẫu bệnh nhân thần kinh cơ nhưng không phát hiện được bệnh nhân nào mang đột biến A1555G. Khi điều tra tỷ lệ đột biến này ở các bệnh nhân mất khả năng nghe với độ ồn lớn hơn 90 dB cho thấy tỷ lệ mang đột biến ở người Đức là 0,7%, người Ba Lan là 2,4%, người Hungary là 1,8% [10], tỷ lệ mang đột biến này ở bệnh nhân mất khả năng nghe không triệu chứng ở người Italy là 5,4% [11], ở người dân tỉnh Otago, New Zealand là 0,48% [12], ở bệnh nhân khiếm thính người Brazil là 2% [13]. Chúng tôi chưa có điều kiện để điều tra sự có mặt của đột biến A1555G trên đối tượng bệnh nhân điếc không triệu chứng, và đây cũng là lý do vì sao tỷ lệ đột biến phát hiện được trong nghiên cứu của chúng tôi là rất thấp.

Trong nghiên cứu này, bệnh nhân mang đột biến A1555G là một cháu gái 11 tuổi, không bị điếc, trẻ bị teo và yếu cơ gốc chi cả hai bên, có nghiệm pháp Gowes dương tính nhưng không có phì đại hai bắp chân, hàm lượng acid lactic cao hơn 4 lần mức bình thường. Ngoài ra, khi tìm hiểu về gia đình được biết, các thành viên của gia đình (bố, mẹ và em trai) không ai bị điếc, duy chỉ có em gái của mẹ bệnh nhân bị điếc nhẹ, co giật và mất ở tuổi 19. Bệnh nhân 164, như đã nêu ở trên, đồng thời mang đột biến A1438G. Tuy vậy, trong khuôn khổ của nghiên cứu này chúng tôi chưa phát hiện được sự liên quan giữa hai đột biến A1555G và A1438G.

Kết quả phát hiện đột biến giúp giải thích một phần nguyên nhân gây bệnh và đồng thời có thể góp phần tư vấn những người mang đột biến A1555G trong việc tránh sử dụng nhóm kháng sinh aminoglycoside.

4. Kết luận

Sử dụng phương pháp PCR-RFLP kết hợp giải trình tự nucleotide chúng tôi đã phát hiện 1/173 bệnh nhân thần kinh cơ mang đột biến A1555G ở dạng đồng nhất. Đột biến A1555G được di truyền từ mẹ sang con. Bệnh nhân cũng được phát hiện đồng thời mang đột biến A1438G, tuy vậy chúng tôi chưa phát hiện được có mối liên hệ nào giữa hai đột biến này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ, Chương trình Công nghệ sinh học, Đề tài mã số KC.04.10/11-15.

Tài liệu tham khảo

- [1] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. deBruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Rose, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, I.G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* (1981) 290: 457-465.
- [2] H.A.L. Tuppen, E.L. Blakely, D.M. Turnbull, R.W. Taylor, Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1797: 113-128.
- [3] T.R. Prezant, J.V. Agopian, M.C. Bohlman, X. Bu, S. Öztas, W.Q. Qiu, K.S. Arnos, G.A. Cortopassi, L. Jaber, J.I. Rotter, M. Shohat, F.G. Nathan, Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* (1993) 4: 289-294.
- [4] T. Huchin, G. Cortopassi, Proposed Molecular and Cellular Mechanism for Aminoglycoside

- Ototoxicity. *Antimicrobial Agents Chemother* (1994) 38: 2517-2520.
- [5] K. Hamasaki, R.R. Rando, Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside induced deafness. *Biochemistry* (1997) 36: 12323-12328.
- [6] C. Giordano, F. Pallotti, W.F. Walker, N. Checcarelli, O. Musumeci, F. Santorelli, G. d'Amati, E.A. Schon, S. DiMauro, M. Hirano, M.M. Davidson, Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 293: 521-529.
- [7] F.J.D. Castillo, M. Rodríguez-Ballesteros, Y. Martín, B. Arellano, J. Gallo-Terán, C. Morales-Angulo, R. Ramírez-Camacho, M.C. Tapia, J. Solanellas, A. Martínez-Conde, M. Villamar, M.A. Moreno-Pelayo, F. Moreno, I. delCastillo, Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* (2003) 40: 632-636.
- [8] T.H. Truong, T.V.A. Nguyen, V.L. Nguyen, V.A. Pham, T.N. Phan, Screening of common point-mutations and discovery of new T14727C change in mitochondrial genome of Vietnamese. *Mitochondr DNA Online*: (2014) DOI: 10.3109/19401736.2014.900665.
- [9] M. Tawata, M. Ohtaka, E. Iwase, Y. Ikegishi, K. Aida, T. Onaya, New mitochondrial DNA homoplasmic mutations associated with Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes* (1998) 47: 276-277.
- [10] S. Kupka, T. Tóth, M. Wróbel, U. Zeissler, W. Szyfter, K. Szyfter, G. Niedzielska, J. Bal, H.P. Zenner, I. Sziklai, N. Blin, M. Pfister, Mutation A1555G in the 12S rRNA Gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients. *Hum Mutat* (2002) 19: 308-314.
- [11] S. Berrettini, F. Forli, S. Passetti, A. Rocchi, L. Pollina, D. Cecchetti, M. Mancuso, G. Siciliano, Mitochondrial non-syndromic sensorineural hearing loss: a clinical, audiological and pathological study from Italy, and revision of the literature. *Biosci Rep* (2008) 28: 49-59.
- [12] B.J. Scrimshaw, J.M. Faed, W.P. Tate, K. Yun, Rapid identification of an A1555G mutation in human mitochondrial DNA implicated in aminoglycoside induced. *J Hum Genet* (1999) 44: 388-390.
- [13] R.S. Abreu-Silva, K. Lezirovitz, M.C. Braga, M. Spinelli, S. Pirana, V.A. Della-Rosa, P.A. Otto, R.C. Mingroni-Netto, Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer (UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Brazil J Med Biol Res* (2006) 39: 219-226.

Detection of Mitochondrial Genome A1555G Mutation of Aminoglycoside-induced Deafness in a Vietnamese Patient

Phùng Bảo Khánh¹, Nguyễn Văn Minh¹, Trần Đức Hiệp¹, Trần Kiều Anh¹, Trương Thị Huệ², Phạm Vân Anh³, Lê Ngọc Anh³, Cao Vũ Hùng³, Phan Tuấn Nghĩa¹

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

²Quy Nhon University, 170 An Dương Vương, Quy Nhon, Bình Định, Vietnam

³National Hospital of Pediatrics, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hanoi, Vietnam

Abstract: The mitochondrial A1555G mutation was detected to be associated with deafness syndrome in humans treated with aminoglycoside antibiotics.

In this study, 173 samples of suspected encephalomyopathy patients were screened for the presence of A1555G mutation by PCR-RFLP and DNA sequencing. The DNA fragment of 282 bp (from 1301 to 1582 positions in the human mitochondrial genome) was amplified by PCR and then

digested with *Hae* III. PCR-RFLP banding patterns of the normal or wildtype subjects had two DNA bands of 164 bp and 118 bp and the A1555G mutation-carrying subjects had three bands of 164 bp, 91 bp and 27 bp. One 11 years old female patient was found to carry A1555G mutation in homoplasmy. This mutation was also found in the mother and brother of the patient but not in her father. We also detected A1438G mutation in the same patient, but no relationship between A1555G and A1438G mutations was found in this study.

Keywords: Mitochondrial DNA, A1555G mutation, A1438G mutation, Aminoglycoside-induced deafness, RFLP-PCR.