

Xác định người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật microsatellite - DNA

Lê Thị Phương, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh*

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 17/7/2019; ngày chuyển phản biện 25/7/2019; ngày nhận phản biện 28/8/2019; ngày chấp nhận đăng 20/9/2019

Tóm tắt:

Loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne muscular dystrophy - DMD) là một trong những bệnh lý di truyền lặn liên kết với nhiễm sắc thể (NST) giới tính X phổ biến nhất. Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, trẻ mắc bệnh có biểu hiện yếu cơ tiến triển, mất dần khả năng đi lại. Phát hiện người lành mang gen bệnh và tư vấn di truyền là giải pháp hiệu quả nhất giúp ngăn ngừa và giảm tỷ lệ mắc bệnh. Việc này có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật trực tiếp như MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) và giải trình tự gen dựa vào đột biến chỉ điểm ở bệnh nhân. Tuy nhiên, những trường hợp khó khăn để phát hiện đột biến do cấu trúc gen lớn thì kỹ thuật gián tiếp như phân tích microsatellite - DNA có thể được áp dụng. Đề tài được thực hiện (2018-2019) với mục tiêu áp dụng kỹ thuật microsatellite phát hiện người lành mang gen bệnh DMD. Nghiên cứu xác định được 5/5 người mẹ và 16/33 thành viên nữ trong phả hệ của 5 gia đình bệnh nhân DMD là người lành mang gen bệnh.

Từ khóa: loạn dưỡng cơ Duchenne, microsatellite - DNA, người lành mang gen bệnh.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

DMD là một bệnh lý rối loạn thần kinh cơ hay gặp nhất, chủ yếu ở trẻ trai với tần suất mắc bệnh cao, tỷ lệ mắc dao động từ 10,71 đến 27,78 trên 100.000 người [1, 2]. Biểu hiện lâm sàng mang tính chất tuần tiến, trẻ mất khả năng đi lại, tàn phế và chết trước tuổi trưởng thành. Bệnh di truyền lặn liên kết với NST giới tính X. Đột biến gen dystrophin dẫn đến sự mất toàn vẹn của protein dystrophin - một protein đóng vai trò quan trọng để bảo vệ cơ trong quá trình co cơ gây nên bệnh [3]. Có ba dạng đột biến gen dystrophin thường gặp: đột biến xóa đoạn gen dystrophin (60÷65%); đột biến điểm (25÷30%) và đột biến lặp đoạn (5÷10%) [4].

Những tiến bộ y học nhằm điều trị bệnh DMD trong hai thập kỷ gần đây đã giúp nâng cao chất lượng cuộc sống cũng như kéo dài thời gian sống của bệnh nhân. Liệu pháp điều trị gen đối với bệnh nhân DMD đem lại hy vọng to lớn cho người bệnh nhưng vẫn đang trong giai đoạn nghiên cứu và thử nghiệm [5, 6], vì vậy sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh bệnh lý DMD vẫn đóng một vai trò quan trọng, là cơ sở khoa học cho công tác tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh và chẩn đoán tiền lâm tở (Pre-implantation genetic diagnosis - PGD) [7], nhằm đưa ra lời khuyên di truyền cho sản phụ và gia đình, giảm tỷ lệ sinh con mắc

bệnh, tăng hiệu quả công tác phòng ngừa bệnh tật và nâng cao chất lượng chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Hiện nay, có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng để phát hiện trực tiếp các đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD và người lành mang gen bệnh như kỹ thuật MLPA với độ chính xác cao, có thể phát hiện được đột biến mất đoạn trên cả 79 exon hay kỹ thuật giải trình tự gen có thể phát hiện được toàn bộ đột biến điểm [8]. Tuy nhiên, gen dystrophin có chiều dài rất lớn nên việc phát hiện được toàn bộ đột biến gen sẽ mất rất nhiều thời gian và kinh phí, ngoài ra, vẫn còn những bệnh nhân DMD/loạn dưỡng cơ Becker (BMD) chưa phát hiện thấy đột biến gen dystrophin [9]. Phân tích microsatellite - DNA là phương pháp gián tiếp (linkage analysis) có thể phát hiện được người lành mang gen dựa vào các đoạn trình tự ngắn lặp lại liên tiếp (Short tandem repeat - STR) để xác định allele đột biến với thời gian phân tích nhanh hơn và giá thành phân tích rẻ hơn. Ở Việt Nam, việc phát hiện người lành mang gen bệnh DMD bằng phương pháp gián tiếp thông qua phân tích microsatellite - DNA vẫn chưa được áp dụng rộng rãi. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu áp dụng kỹ thuật microsatellite - DNA để xác định người lành mang gen bệnh DMD.

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Identification of carriers of Duchenne muscular dystrophy by microsatellite - DNA technique

Thi Phuong Le, Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran*

Hanoi Medical University

Received 17 July 2019; accepted 20 September 2019

Abstract:

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is one of the most common genetic disorder associated with sex chromosome X. Currently, there is no effective treatment; children with the disease show progressive muscle weakness, gradually losing their ability to walk. Detecting the carriers and giving genetic counseling is the most effective solution to help reduce disease incidents and reduce morbidity. This can be done with direct techniques such as Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and sequencing of genes based on the mutations of patients. However, in some cases that are difficult to detect mutations due to large gene structure, indirect techniques such as microsatellite - DNA analysis can be applied. The study used the microsatellite - DNA technique and identified 5/5 mothers and 16/33 female members in the pedigrees of 5 families which have DMD patients are carriers.

Keywords: carriers of DMD, duchenne muscular dystrophy, microsatellite - DNA.

Classification number: 3.5

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

- 5 bệnh nhân DMD không có quan hệ huyết thống đã xác định được đột biến gen dystrophin.

- 38 thành viên nữ (mẹ, bà ngoại, chị em gái, chị em họ, bác gái, di...) có cùng huyết thống bên ngoại với bệnh nhân.

Các mẫu máu được thu thập và thực hiện nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội (2018-2019).

Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu: thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Tách chiết DNA: DNA được tách chiết từ bạch cầu máu ngoại

vì của bệnh nhân và người nhà bệnh nhân (mẹ, chị gái) bằng kit Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit, quy trình tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phân tích microsatellite - DNA: đây là kỹ thuật PCR sử dụng các cặp mồi có gắn huỳnh quang để khuếch đại những vùng trình tự lặp lại ngắn (Short tandem repeat - STR) và xác định kích thước của chúng thông qua điện di mao quản trên máy giải trình tự gen (automated DNA sequencer).

Để xác định được allele bệnh từ người mẹ truyền cho con trai, nghiên cứu khuếch đại 6 STR có tỷ lệ dị hợp tử cao trên quần thể người Việt Nam bao gồm: DSTR49, DSTR50, DXS1036, DXS1067, DXS890, DXS9907. Xác định kích thước các STR dị hợp tử của mẹ, đối chiếu với kích thước STR của bệnh nhân để tìm ra allele bệnh và allele lành. Đối chiếu kết quả của các thành viên nữ khác trong gia đình bệnh nhân để xác định tình trạng mang gen của từng thành viên.

Dựa vào kích thước và màu sắc chia 6 STR thành 2 set để thực hiện 2 phản ứng multiplex PCR: set 1 gồm các STR: DXS890, DXS9907 và DSTR49; set 2 gồm các STR: DSTR50, DXS1036 và DXS1067.

Thành phần của phản ứng PCR từng set: 10x đệm PCR; 2,5 mM dNTP; 0,2 µl mỗi mồi; 0,5 unit Taq polymerase; 20 ng DNA và H₂O, tổng thể tích 20 µl. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR: 94°C/30 giây; [94°C/30 giây, 59°C/30 giây, 72°C/30 giây] x 35 chu kỳ; 72°C/5 phút. Sản phẩm khuếch đại PCR được điện di trên hệ thống phân tích di truyền GenomeLab™ GeXP Genetic analysis system của Hãng Beckman Coulter. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Fragments analysis trên máy Beckman coulter CEQ 8800.

- Xác định đột biến gen dystrophin: kỹ thuật giải trình tự gen để xác định đột biến xóa đoạn như quy trình đã mô tả trước đây [9]; kỹ thuật MLPA xác định đột biến gen trên bệnh nhân và người lành mang gen bệnh được thực hiện như quy trình đã mô tả trước đây [10].

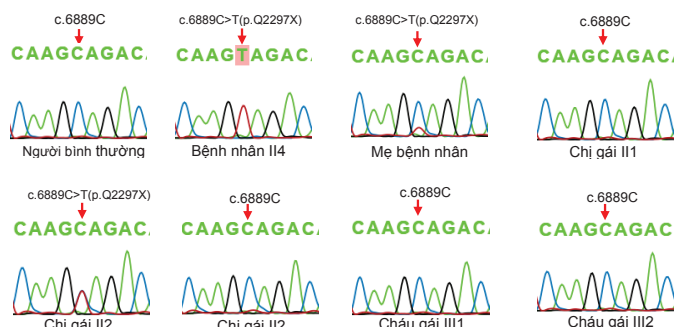
Đạo đức nghiên cứu: bệnh nhân và người nhà hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân hoàn toàn có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân và người nhà bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

Kết quả

Kết hợp kỹ thuật phân tích trực tiếp và kỹ thuật phân tích microsatellite - DNA để xác định người lành mang gen bệnh DMD

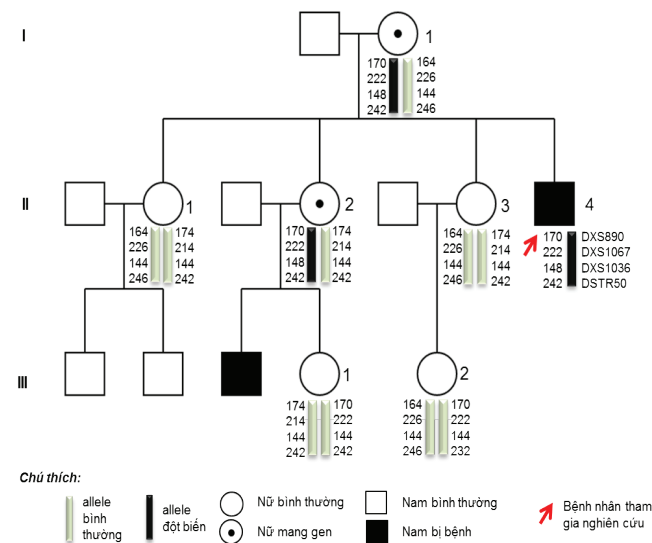
Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số MD1:

Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số MD1 có một con trai và một cháu trai con chị gái thứ 2 bị bệnh DMD, giải trình tự gen xác định được bệnh nhân bị đột biến c.6889C>T(p.Q2297X) trên exon 47 gen dystrophin, mẹ bệnh nhân và chị gái thứ 2 là người lành mang gen bệnh, các thành viên nữ còn lại không có đột biến (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh kết quả giải trình tự gen của phả hệ MD1.

Khi khuếch đại 6 STR có tỷ lệ dị hợp tử cao trên quần thể người Việt Nam với các mẫu của phả hệ MD1 đã xác định được 4 STR dị hợp tử ở người mẹ lần lượt là: DXS890, DXS1067, DXS1036 và DSTR50. Đối chiếu kích thước các STR dị hợp tử ở người mẹ với con trai bị bệnh xác định được allele đột biến ở người mẹ có kích thước các STR trên lần lượt là 170, 222, 148, 242 và allele bình thường có kích thước lần lượt là 164, 226, 144, 246. Như vậy, người con gái nhận allele bệnh X^b (170-222-148-242) từ mẹ thì sẽ là người lành mang gen bệnh, còn con gái nhận allele bình thường X (164-226-144-246) sẽ là người hoàn toàn bình thường. Kết quả xác định được con gái thứ 2 mang gen bệnh, còn con gái đầu, con gái thứ 3 và 2 cháu gái của bệnh nhân là người bình thường (hình 2). Kết quả này hoàn toàn trùng khớp với kết quả của kỹ thuật giải trình tự gen.



Hình 2. Hình ảnh phả hệ gia đình bệnh nhân MD1.

Gia đình bệnh nhân mã số MD2:

Gia đình MD2 có hai người con trai bị bệnh. Kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân bị đột biến mất đoạn exon 8-15 gen dystrophin. Mẹ và bà ngoại là người lành mang gen bệnh, hai di bệnh nhân là người bình thường. Tiến hành phân tích các STR tương tự với gia đình MD1 cũng cho kết quả tương đồng giữa 2 phương pháp MLPA và microsatellite - DNA. Như vậy, kết quả phát hiện người

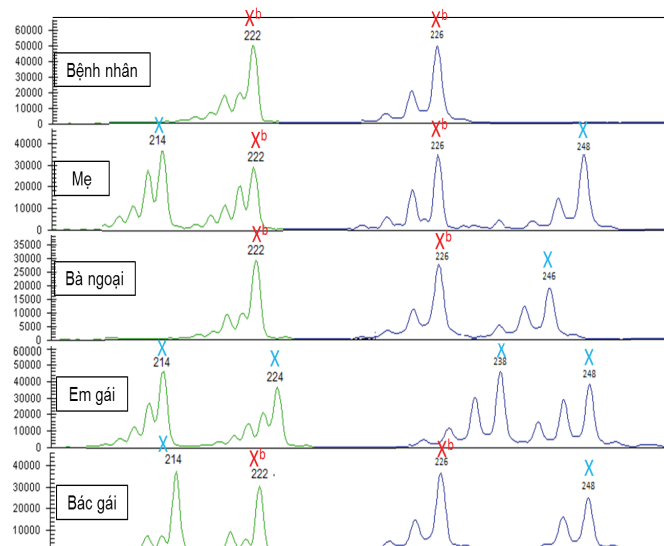
lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật trực tiếp như giải trình tự gen và MLPA hoàn toàn trùng khớp với kết quả của kỹ thuật gián tiếp là phân tích microsatellite - DNA.

Xác định người lành mang gen bệnh DMD bằng kỹ thuật phân tích microsatellite - DNA

Áp dụng quy trình xác định người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật microsatellite - DNA cho các thành viên nữ trong 3 gia đình của các bệnh nhân DMD chưa xác định được đột biến chỉ điểm trên bệnh nhân.

Kết quả phân tích microsatellite - DNA gia đình bệnh nhân mã số MD4:

Phả hệ gia đình bệnh nhân MD4 có một con trai (III1) bị bệnh, bệnh nhân có một bác trai và một cậu đã mất vì bệnh DMD, như vậy mẹ bệnh nhân (II2) và bà ngoại bệnh nhân (II1) là những người dị hợp tử bắt buộc. Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại 6 STR xác định được allele bệnh của phả hệ có kích thước các STR DXS890, DXS1067, DSTR49, DSTR50 tương ứng là 174, 222, 242, 226; trong phả hệ có mẹ, bà ngoại và bác gái bệnh nhân mang allele bệnh X^b (174-222-242-226) là người lành mang gen bệnh, còn em gái bệnh nhân nhận allele lành từ người mẹ X (170, 214, 232, 248) là người bình thường (hình 3).



Hình 3. Hình ảnh điện di STR: DXS1067 và DSTR49 của phả hệ MD4. X là allele lành, X^b là allele bệnh.

Thực hiện tương tự với các phả hệ còn lại thu được kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phát hiện người lành mang gen bệnh DMD bằng kỹ thuật microsatellite - DNA.

Thành viên gia đình	Mang gen bệnh	Không mang gen bệnh	Tổng số
Mẹ bệnh nhân	5	0	5
Thành viên nữ khác	16	17	33
Tổng	21	17	38

Kết quả bảng 1 cho thấy, 5/5 người mẹ đã được phát hiện là người lành mang gen bệnh, 16/33 thành viên nữ khác (gồm bà ngoại, em gái, chị gái, dì, bác gái, chị họ, em gái họ của bệnh nhân) là người lành mang gen bệnh, 17/33 thành viên là người bình thường.

Bàn luận

Bệnh DMD và BMD gây nên bởi đột biến gen dystrophin di truyền lặn liên kết NST giới tính X. Mẹ là người lành mang gen bệnh sẽ có xác suất sinh ra 50% con trai bị bệnh và 50% số con gái sẽ là người lành mang gen bệnh giống mẹ. Đây là bệnh di truyền có tiên lượng nặng, biểu hiện lâm sàng mang tính chất tuần tiến, trẻ bị teo cơ, mất khả năng đi lại và chết trước tuổi trưởng thành do suy tim và rối loạn hô hấp. Hiện nay chưa có phương pháp điều trị bệnh hiệu quả nên việc phát hiện những người lành mang gen bệnh trong gia đình bệnh nhân và tư vấn di truyền vẫn là biện pháp hữu hiệu nhất được các nhà khoa học đặt lên hàng đầu nhằm giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh và phát tán gen bệnh trong cộng đồng [11, 12].

Các xét nghiệm di truyền để xác định đột biến gen không dễ dàng thực hiện được do kích thước rất lớn của gen dystrophin, các dạng đột biến vô cùng đa dạng và phức tạp. Kỹ thuật MLPA cho phép khuếch đại cùng lúc 79 exon với độ chính xác cao nhưng cũng chỉ xác định được 70% bệnh nhân DMD/BMD bị xóa đoạn hoặc lặp đoạn, 30% bệnh nhân còn lại có đột biến nhỏ đòi hỏi phải sử dụng thêm một phương pháp khác như giải trình tự Sanger. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (next-generation sequencing - NGS) là kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại nhất hiện nay cũng chỉ xác định được đột biến ở 92% tổng số bệnh nhân DMD/BMD [13, 14]. Những trường hợp không phát hiện thấy đột biến chỉ điểm trên bệnh nhân là rào cản lớn cho xác định người lành mang gen bệnh do cấu trúc của gen dystrophin quá lớn. Khi đó, kỹ thuật phân tích gián tiếp dựa vào kích thước các STR để việc xác định allele đột biến trở nên hiệu quả.

Nghiên cứu này đã tiến hành kỹ thuật phân tích microsatellite - DNA để xác định người lành mang gen bệnh thông qua việc khuếch đại 6 vùng trình tự lặp lại STR có tính đa hình cao trên quần thể người Việt Nam bao gồm: DSTR49, DSTR50, DXS1036, DXS1067, DXS890, DXS9907. Việc khuếch đại các STR này dựa trên nguyên tắc của phản ứng PCR với các môi được gắn huỳnh quang. Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di trên hệ thống điện di mao quản có độ phân giải cao, có thể nhận diện được các màu huỳnh quang của sản phẩm PCR, do đó có thể xác định được độ dài (kích thước) của từng STR. Dựa vào Quy luật phân ly độc lập của Mendel và Quy luật di truyền liên kết với NST giới tính X, nghiên cứu phân tích kích thước các STR dị hợp tử của mẹ, đối chiếu với kích thước các STR của bệnh nhân để tìm ra allele bệnh và allele lành. Khi đã xác định được allele bệnh, đối chiếu kết quả của từng thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân sẽ xác định được tình trạng mang gen hay không mang gen của thành viên đó. Kết quả nghiên cứu xác định được 5/5 người mẹ là người lành mang gen bệnh, 16/33 thành viên nữ trong gia đình bệnh nhân là người lành mang gen bệnh. Kỹ thuật phân tích microsatellite - DNA hứa

hẹn là một phương pháp hữu hiệu để phát hiện người lành mang gen bệnh DMD ở Việt Nam.

Kết luận

Bằng kỹ thuật phân tích microsatellite - DNA, nghiên cứu đã phát hiện 5/5 người mẹ và 16/33 thành viên nữ trong phả hệ 5 gia đình là người lành mang gen bệnh DMD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.K. Mah, L. Korngut, J. Dykeman, et al. (2014), "A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy", *Neuromuscul. Disord.*, **24**(6), pp.482-491.
- [2] C. Barakat-Haddad, S. Shin, H. Candundo, et al. (2017), "A systematic review of risk factors associated with muscular dystrophies", *NeuroToxicology*, **61**, pp.55-62.
- [3] J.M. Ervasti (2013), *Structure and Function of the Dystrophin-Glycoprotein Complex*, Landes Bioscience.
- [4] L. Imbornoni, E.T. Price, J. Andrews, et al. (2014), "Diagnostic and clinical characteristics of early-manifesting females with Duchenne or Becker muscular dystrophy", *Am. J. Med. Genet. A*, **164A**(11), pp.2769-2774.
- [5] D. Duan (2015), "Duchenne muscular dystrophy gene therapy in the canine model", *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, **26**(1), pp.57-69.
- [6] J.G. Andrews, R.A. Wahl (2018), "Duchenne and Becker muscular dystrophy in adolescents: current perspectives", *Adolesc. Health Med. Ther.*, **9**, pp.53-63.
- [7] K.M. Flanigan, D. Dunn, A. von Niederhausen, et al. (2009), "Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort", *Hum. Mutat.*, **30**(12), pp.1657-1666.
- [8] K. Bushby, R. Finkel, D.J. Birnkrant, et al. (2010), "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management", *Lancet Neurol.*, **9**(1), pp.77-93.
- [9] Trần Văn Khánh, Trần Huy Thịnh, Đỗ Ngọc Hải (2016), "Xác định đột biến điểm trên bệnh nhân DMD bằng kỹ thuật giải trình tự gen", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **99**(1), tr.1-7.
- [10] Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh, Phạm Lê Anh Tuấn và cộng sự (2015), "Ứng dụng kỹ thuật MLPA xác định đột biến gen dystrophin gây bệnh DMD/Becker", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **96**(4), tr.7.
- [11] L. Bogue, H. Peay, A. Martin, et al. (2016), "Knowledge of carrier status and barriers to testing among mothers of sons with Duchenne or Becker muscular dystrophy", *Neuromuscul. Disord.*, **26**(12), pp.860-864.
- [12] M.A. Anaya-Segura, H. Rangel-Villalobos, G. Martínez-Cortés, et al. (2016), "Serum levels of microRNA-206 and novel mini-STR assays for carrier detection in Duchenne muscular dystrophy", *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(8), Doi:10.3390/ijms17081334.
- [13] M. Okubo, N. Minami, K. Goto, et al. (2016), "Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations", *J. Hum. Genet.*, **61**(6), pp.483-489.
- [14] X. Wei, Y. Dai, P. Yu, et al. (2014), "Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study", *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**(1), pp.110-118.