

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG QUY TRÌNH SINH THIẾT PHÔI, TÁCH ADN CỦA PHÔI ĐỂ CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI

TRIỆU TIẾN SANG, NGUYỄN THỊ THU HÀ

Học viện Quân y

Trên thế giới hiện nay có khoảng 300 gen liên quan đến bệnh di truyền có thể được phát hiện bằng chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi (Preimplantation Genetic Diagnosis - PGD). Trong nhóm chỉ định này, có gần 200 bệnh lý di truyền khác nhau như: thalassemia, bệnh thiếu máu ác tính, xơ nang, bệnh ưa chảy máu, loạn dưỡng cơ Duchenne, teo cơ tủy, điếc bẩm sinh... Từ khoảng 2 thập niên trở lại đây, nhờ sự phát triển mạnh mẽ của khoa học và công nghệ, sinh học phân tử đã trở thành một công cụ hỗ trợ đắc lực cho chẩn đoán và điều trị các bệnh di truyền. Tuy nhiên, việc nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử phục vụ chẩn đoán bệnh di truyền bằng phương pháp tách ADN của phôi chưa được quan tâm nhiều ở Việt Nam. Vì vậy, đề tài “*Nghiên cứu áp dụng quy trình sinh thiết phôi, tách ADN của phôi để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi*” được thực hiện với mục tiêu áp dụng các quy trình sinh thiết phôi, tách ADN của phôi để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi.

Từ khóa: *sinh thiết phôi, tách ADN, chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi, chuyển phôi.*

A RESEARCH OF APPLYING EMBRYO BIOPSY PROCEDURE, SEPRATING DNA OF EMBRYO FOR PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS

Summary

In the world today, there are about 300 genes involved in genetic diseases which can be detected by PGD. In this specific group, there exist nearly 200 different genetic disorders such as thalassemia, pernicious anemia, cystic fibrosis, hemophilia, Duchenne muscular dystrophy, amyotrophic marrow, congenital deafness... Since about two decades ago, thanks to the strong growth of science and technology, molecular biology has become an invaluable support tool for the diagnosis and treatment of genetic diseases. However, research in molecular biology applications serving genetic diagnosis by DNA extraction method of embryo splitting has not been paid much attention in Vietnam. So the project named “Research on applying embryo biopsy procedure, separating the DNA of embryo for Preimplantation Genetic Diagnosis” has been done for the purpose of applying embryo biopsy procedure, seprating DNA of embryo for Preimplantation Genetic Diagnosis.

Keywords: *embryo biopsy, seprating DNA, PGD, embryo transfer.*

Đặt vấn đề

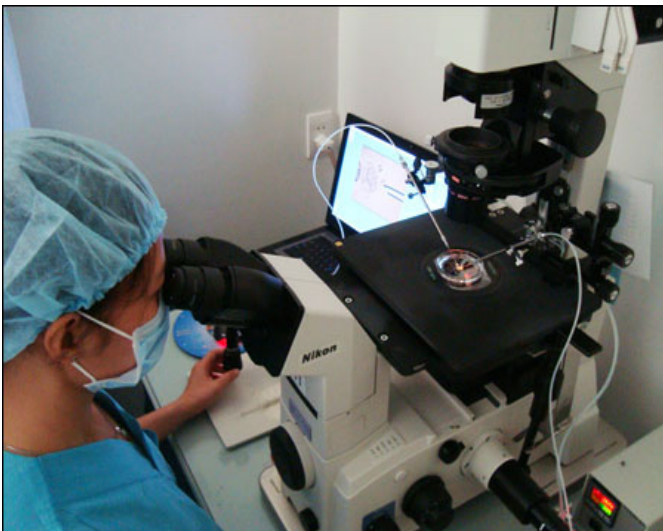
PGD là kỹ thuật phân tích di truyền của tế bào được lấy ra từ phôi nhằm xác định phôi bình thường hay bất thường về nhiễm sắc thể hay gen trước khi cấy vào tử cung và làm tổ tại niêm mạc tử cung. Trường hợp PGD (sau này được gọi là sàng lọc di truyền trước chuyển phôi - Preimplantation Genetic Screening - PGS) được báo cáo lần đầu tiên trên thế giới vào năm 1990 tại Mỹ. Đây là một chỉ định mới so với các chỉ định trước đây của chẩn đoán tiền sản, cho phép bố mẹ có mang gen tiềm ẩn một bệnh lý được biết trước có thể sinh ra một trẻ hoàn

toàn không mang gen bệnh. Điều này mang đến khả năng ứng dụng rất lớn của PGD khi các nhà khoa học ngày càng phát hiện nhiều bệnh lý ở người có liên quan đến di truyền. Trên thế giới hiện nay có khoảng 300 gen liên quan đến bệnh di truyền có thể được phát hiện bằng PGD. Trong nhóm chỉ định này, có gần 200 bệnh lý di truyền khác nhau như: thalassemia, bệnh thiếu máu ác tính, xơ nang, bệnh ưa chảy máu, loạn dưỡng cơ Duchenne, teo cơ tủy, điếc bẩm sinh... Từ khoảng 2 thập niên trở lại đây, nhờ sự phát triển mạnh mẽ của khoa học và công nghệ, sinh học phân tử đã trở thành một công cụ hỗ trợ đắc lực cho chẩn đoán và điều trị các bệnh di truyền. Tuy nhiên, việc nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử phục vụ chẩn đoán bệnh di truyền bằng phương pháp tách ADN của phôi chưa được quan tâm nhiều ở Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài “*Nghiên cứu áp dụng quy trình sinh thiết phôi, tách ADN của phôi để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi*” với mục tiêu: áp dụng được các quy trình sinh thiết phôi, tách ADN của phôi để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

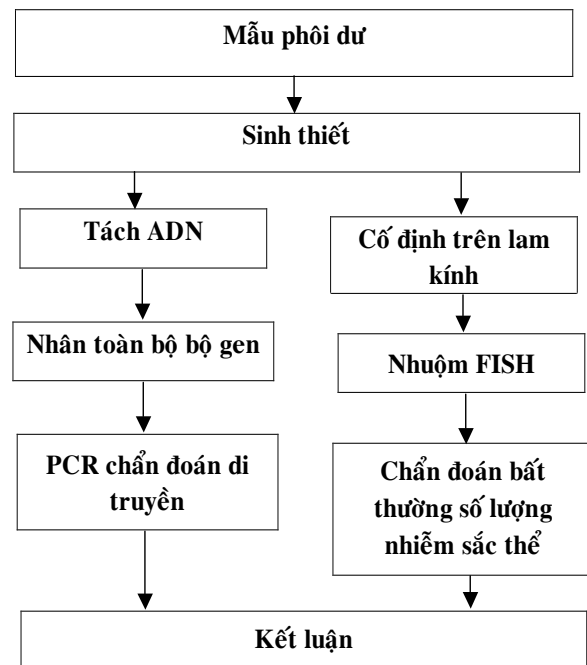
Đối tượng nghiên cứu là 30 phôi dư được tiến hành sinh thiết tại Trung tâm Công nghệ phôi - Học viện Quân y. Trong 30 phôi có 5 phôi túi và 25 phôi phân cắt. Các phôi này được sinh thiết và hút lần lượt 2 tế bào: 1 tế bào nhân toàn bộ bộ gen, 1 tế



Hệ thống sinh thiết phôi

bào thực hiện kỹ thuật FISH. Các thiết bị, máy móc được dùng bao gồm: máy định lượng ADN, đèn soi UV, máy ly tâm cao tốc, hệ thống sinh thiết phôi, máy PCR ABI 9700, máy lắc ổn nhiệt.

Phương pháp nghiên cứu



- Sử dụng phương pháp sinh thiết phôi bằng hệ thống kính hiển vi có hỗ trợ tia laser.

- Sử dụng các kỹ thuật chẩn đoán: nhân gen PCR để phân tích các đột biến về gen; nhân gen huỳnh quang để chẩn đoán bất thường số lượng nhiễm sắc thể; nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm huỳnh quang FISH để phân tích bất thường nhiễm sắc thể.

- Sử dụng kỹ thuật điện di trên gel agarose và điện di mao quản.

- Kỹ thuật phân tích kết quả bằng phần mềm GenMapper ID3.2.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Thành công trong kỹ thuật sinh thiết phôi: chúng tôi đã tiến hành sinh thiết 30 phôi, trong đó có 5 phôi túi, kiểm tra thấy kết quả sinh thiết tốt. Các phôi sau sinh thiết được đánh giá về mặt hình thái tốt, bề mặt nhẵn, tròn đều. Trong quy trình sinh thiết có sử dụng tia laser để chọc thủng màng ZP của

Bảng 1: số tế bào phôi được sinh thiết từ các phôi dư

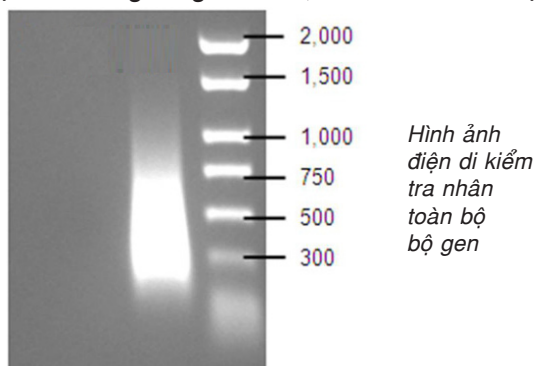
Tên phôi	Số tế bào sinh thiết được từ phôi	Tên phôi	Số tế bào sinh thiết được từ phôi
Số 1	2	Số 16	2
Số 2	2	Số 17	2
Số 3	2	Số 18	2
Số 4	2	Số 19	2
Số 5	2	Số 20	2
Số 6	2	Số 21	2
Số 7	2	Số 22	2
Số 8	5	Số 23	2
Số 9	2	Số 24	2
Số 10	2	Số 25	2
Số 11	2	Số 26	2
Số 12	2	Số 27	6
Số 13	2	Số 28	4
Số 14	2	Số 29	5
Số 15	2	Số 30	4

phôi.



Dưới đây là một số hình ảnh phôi sau sinh thiết:

Tách thành công ADN từ một tế bào phôi sau khi sinh thiết và nhân được toàn bộ bộ gen của tế bào phôi đó phục vụ cho chẩn đoán bệnh di truyền ở các bước tiếp theo. Để tiến hành kiểm tra việc tách ADN từ một tế bào phôi có thành công hay không, chúng tôi tiến hành khuếch đại toàn bộ bộ gen của một tế bào phôi từ các ADN tách được từ các tế bào phôi trên. Sản phẩm của quá trình khuếch đại này sẽ là mẫu ADN cho các phản ứng nhân gen để chẩn đoán các bệnh di truyền. Tiến hành nhân toàn bộ bộ gen của tế bào bằng bộ kit WGA của hãng Sigma. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và được nhuộm bằng

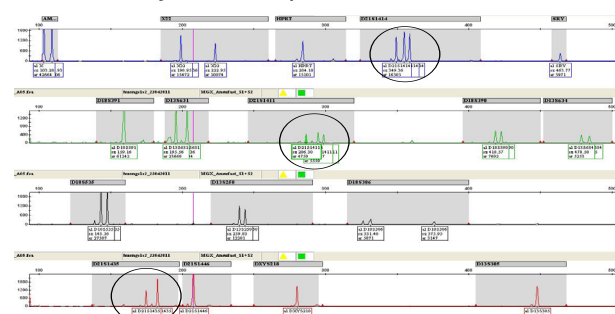


thuốc nhuộm Ethidium bromide.

Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm nhân toàn bộ bộ gen đạt kết quả tốt, băng điện di có vạch sáng đẹp, kích thước các đoạn gen sau khi nhân nằm trong khoảng 200-1.000 bp. Kích thước này cho phép sản phẩm có thể dùng để tiếp tục tham gia vào các xét nghiệm chẩn đoán di truyền của các phôi này.

Kết quả ứng dụng chẩn đoán bất thường số lượng nhiễm sắc thể trước chuyển phôi: đã chẩn đoán được các bất thường nhiễm sắc thể ở 30 phôi dư bằng 2 phương pháp nhuộm huỳnh quang nhiễm sắc thể (FISH) và bằng nhân gen định lượng huỳnh quang (QF-PCR). Cả hai phương pháp này đều cho kết quả khớp nhau hoàn toàn.

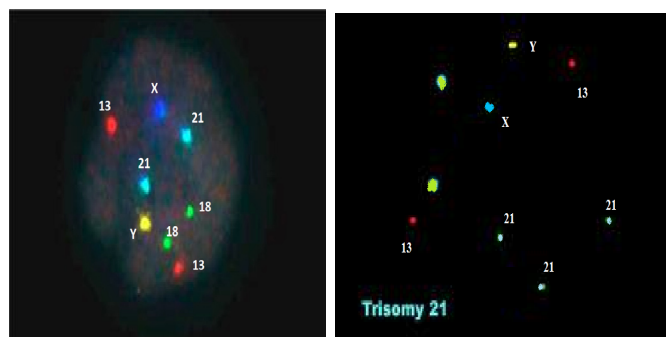
Dưới đây là kết quả hình ảnh chẩn đoán bất



Kết quả chẩn đoán phôi thứ 5 (trisomy 21)

thường nhiễm sắc thể:

Hình ảnh trên cho thấy, các tín hiệu của các locus có kết quả tốt và các locus của nhiễm sắc thể 21 có tỷ lệ 1:1:1 hoặc 1:2 hoặc 2:1. Điều này chứng tỏ nhiễm sắc thể 21 này có 3 nhiễm sắc thể, như vậy phôi 5 bị bất thường nhiễm sắc thể (mang hội chứng Down). Ở phôi này thấy xuất hiện allen của locus SRY và allen Y của locus AmelY, chứng tỏ phôi này mang nhiễm sắc thể giới tính XY.



Phôi 8 mang 2 NST 13, 18, 21 và XY

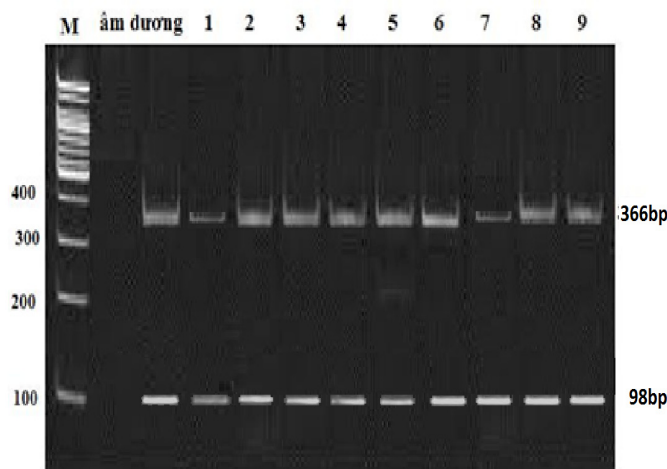
Phôi 5 mang 3 NST 21, 2 NST 13, 18 và XY

Bảng 2: kết quả chẩn đoán bất thường số lượng nhiễm sắc thể (cả 2 phương pháp nhân gen định lượng huỳnh quang QF-PCR và nhuộm huỳnh quang FISH đều cho kết quả giống nhau)

Phôi	Kết quả trên NST 13, 18, 21 và XY	Phôi	Kết quả trên NST 13, 18, 21 và XY	Phôi	Kết quả trên NST 13, 18, 21 và XY
1	46, XX	11	46, XY	21	46, XY
2	46, XX	12	46, XY	22	46, XY
3	45, XX, -13	13	46, XX	23	46, XY
4	46, XX	14	47, XY, +21	24	46, XX
5	47, XY, +21	15	47, XY, +21	25	47, XY, +21
6	47, XX, +13	16	46, XX	26	46, XY
7	47, XY, +21	17	46, XX	27	47, XX, +18
8	46, XY	18	45, XX, -18	28	46, XY
9	47, XY, +21	19	47, XXY	29	47, XX, +18
10	47, XY, +21	20	45, XO	30	46, XY

Dưới đây là một số hình ảnh kết quả FISH:

Kết quả chẩn đoán nhóm máu Rh của phôi: đã tiến hành nhân gen để chẩn đoán nhóm máu của 9 phôi bào sau khi sinh thiết, ứng dụng cho việc chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con đối với



Hình ảnh điện di kiểm tra bất đồng nhóm máu
M: Marker 1.200 bp; âm: chứng âm nước cất; dương: chứng dương
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 là các mẫu bệnh nhân nghiên cứu

các gia đình có mẹ mang nhóm máu Rh(-)

Sản phẩm PCR của gen RhD là 366 bp. Từ kết quả trên cho thấy: 9 tế bào phôi này đều mang nhóm máu Rh(+). Kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã thực hiện thành công nhân gen RhD cho các phôi sinh thiết, có thể tiến tới áp dụng kỹ thuật này cho các cặp bố mẹ mang nhóm máu Rh(-) để có các chỉ định cần thiết khi mang thai.

Kết luận

Đề tài đã thành công trong kỹ thuật sinh thiết

phôi phân cắt 3 ngày tuổi hoặc phôi túi 5 ngày tuổi bằng cách sử dụng công nghệ laser. Đã nhân được toàn bộ gen từ một tế bào phôi làm cơ sở cho việc nhân gen chẩn đoán bệnh di truyền ở các bước tiếp theo. Ứng dụng thành công các kỹ thuật chẩn đoán di truyền để chẩn đoán các bất thường nhiễm sắc thể sử dụng kỹ thuật FISH và QF-PCR, trong tương lai có thể áp dụng chẩn đoán được nhóm máu Rh của tế bào phôi và chẩn đoán các bệnh di truyền khác. Kỹ thuật PGD này cần được áp dụng rộng rãi cho nhiều bệnh di truyền khác: thalassemia, teo cơ tủy, Hemophilia, teo cơ Duchene, ung thư...

Đề tài có ý nghĩa thực tiễn và sáng tạo cao, mở ra một tương lai cho các cặp vợ chồng trong việc tránh nguy cơ sinh ra những đứa trẻ mang các dị tật di truyền bẩm sinh; góp phần quan trọng trong việc điều trị bệnh nhờ kỹ thuật PGD; góp phần loại bỏ dần các gen bệnh trong xã hội, để xã hội có được nguồn gen khỏe mạnh, giảm bớt gánh nặng cho gia đình và xã hội.

Tài liệu tham khảo

1. Trần Quang Hanh (2009). Nhận xét kết quả chuyển phôi giai đoạn Blastocyte tại Trung tâm hỗ trợ sinh sản Bệnh viện phụ sản trung ương từ 2006 đến 2008. Luận văn thạc sỹ y học, Đại học Y Hà Nội.
2. Nguyễn Khắc Hân Hoan, Quách Thị Hoàng Oanh, Phạm Việt Thanh, Trương Đình Kiệt (2008). Chẩn đoán di truyền phân tử bệnh beta thalassemia tại Bệnh viện Từ Dũ Tp Hồ Chí Minh. Tạp chí Y học Tp Hồ Chí Minh, Tập 12 (phụ bản số 1), 341-347.
3. Nguyễn Khắc Hân Hoan, Phạm Việt Thanh, Trương Đình Kiệt, Lâm Thị Mỹ (2008). Chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia trên 290 trường hợp thai. Tạp chí Nghiên cứu Y học 74 (3), 1-7.
4. Alan H. Handyside et al. (2004). Isothermal whole genome amplification from single ADN small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. Molecular Human Reproduction Vol.10, No.10 pp. 767-772, 2004.
5. Ali Hellani et al. Multiple displacement amplification on single cell ADN possible PGD applications. Molecular Human Reproduction Vol.10, No.11 pp. 847-852, 2004.
6. Avi Tsafir et al. (2010). PGD for fragile X syndrome: ovarian function is the main determinant of success. Human Reproduction, Vol.25, No.10 pp. 2629-2636, 2010.