

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG KỸ THUẬT QF-PCR TRONG CHẨN ĐOÁN MỘT SỐ HỘI CHỨNG BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ

Triệu Tiến Sang; Nguyễn Duy Bắc*; Trần Văn Khoa*;
Trần Ngọc Anh*; Đặng Tiến Trường**

TÓM TẮT

Chúng tôi nghiên cứu áp dụng và cải tiến quy trình chẩn đoán các hội chứng bất thường số lượng nhiễm sắc thể (NST) bằng kỹ thuật QF-PCR, đồng thời đánh giá độ chính xác của kỹ thuật. Phân tích 9 mẫu dịch ối mắc các bệnh bất thường NST, 23 mẫu máu của những trẻ mắc hội chứng Down và 10 mẫu dịch ối bình thường (mẫu chứng) bằng các kỹ thuật multiplex PCR, kỹ thuật điện di huỳnh quang trên máy đọc trình tự tự động ABI 3130 XL, kỹ thuật phân tích số liệu kết quả điện di huỳnh quang bằng phần mềm GernerMapper ID 3.2. Đã xây dựng được quy trình chẩn đoán bất thường số lượng NST có độ chính xác 100% so với kỹ thuật di truyền tế bào. Kỹ thuật QF-PCR có những ưu điểm nổi bật, độ chính xác cao, giá thành thấp và khả năng áp dụng rộng rãi trên quy mô lớn, do đó có thể triển khai áp dụng tại các cơ sở y tế đủ điều kiện trên cả nước.

* Từ khoá: Hội chứng bất thường nhiễm sắc thể; Kỹ thuật QF-PCR.

STUDY OF APPLYING QF-PCR ASSAY FOR DETECTION OF MAJOR CHROMOSOME NUMERICAL DISORDERS

SUMMARY

We have studied this thesis aimed: to apply and adjust this technique in prenatal diagnosing chromosome numerical disorders; to evaluate the detection power and accuracy of this approach. The Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) tests were performed on a total of 9 anormal amniocentesis samples, 23 blood samples and 10 control sample. The results of this investigation provided clear evidence that the QF-PCR assays are powerful adjuncts to conventional cytogenetic techniques and can be applied for the rapid and accurate prenatal diagnosis of the most frequent aneuploidies. We can apply QF-PCR in prenatal diagnosing common chromosome numerical disorders with high accuracy adjuncts to conventional cytogenetic techniques, rapid and low price.

* Key words: Chromosome numerical disorders; Quantitative fluorescent polymerase chain reaction.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Những di chứng và hậu quả của dị tật bẩm sinh đã và đang là một vấn đề lớn không chỉ với Ngành Sản khoa mà còn thu hút sự quan tâm của toàn xã hội. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới, hiện nay

tỷ lệ trẻ sinh ra mắc dị tật bẩm sinh trên thế giới là 1,73% và ở Việt Nam là 2,4 - 3,6%. Do đó, việc chẩn đoán sớm dị tật bẩm sinh ở thời kỳ phôi thai là cần thiết để có thể đưa ra biện pháp can thiệp kịp thời, hạn chế phần nào khó khăn do bệnh gây ra.

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lương

Có nhiều phương pháp chẩn đoán trước sinh đã được áp dụng, trong đó kỹ thuật QF-PCR với nhiều ưu điểm vượt trội. Tuy nhiên, nó mới chỉ được sử dụng trên thế giới mà chưa được áp dụng ở Việt Nam.

Xuất phát từ nhu cầu trên, chúng tôi nghiên cứu đề tài nhằm mục tiêu:

- *Áp dụng và cải tiến quy trình chẩn đoán các hội chứng trisomy 13, 18, 21 và bất thường số lượng NST X, Y bằng kỹ thuật QF-PCR.*

- *Đánh giá kỹ thuật QF-PCR trong chẩn đoán các hội chứng trên.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

9 mẫu dịch ối thu thập từ Bệnh viện Từ Dũ của những phụ nữ mang thai mắc các hội chứng trisomy 13, 18, 21 Klinefelter (XXY) và Turner (X0), được chẩn đoán xác định bằng kỹ thuật FISH.

23 mẫu máu của những trẻ mắc hội chứng Down được chẩn đoán sau sinh bằng kỹ thuật Karyotype tại Trung tâm Sao Mai.

10 mẫu chứng là dịch ối của phụ nữ mang thai bình thường.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Phương pháp chọc hút nước ối.
- Tách chiết ADN và lưu trữ ADN từ dịch ối.
- Thiết kế mồi đặc hiệu cho từng đoạn STR và đánh dấu huỳnh quang.
- Kỹ thuật Multiplex PCR với các cặp mồi huỳnh quang.
- Điện di huỳnh quang trên máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL.

- Phân tích số liệu kết quả điện di huỳnh quang bằng phần mềm GernerMapper ID 3.2.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Đặc điểm chung của mẫu nghiên cứu.

Bảng 1: Đặc điểm tuổi thai và số lần mang thai.

ĐẶC ĐIỂM	MẪU CHỨNG	MẪU BỆNH
Tuổi	30,3 ± 5,4	32,7 ± 6,8
Tuổi thai (tuần)	16,4 ± 1,2	17,2 ± 1,3
Số lần sinh	2,2 ± 1,1	2,4 ± 1,4
Tổng số mẫu	10	9

Tuổi mang thai trung bình của phụ nữ thuộc nhóm có chỉ định chọc ối cao, 2 trường hợp sinh con > 35 tuổi với số lần sinh con là 4.

Tuổi thai được chỉ định can thiệp chọc ối bắt đầu từ tuần thứ 15, với tuổi thai như vậy sẽ đảm bảo tỷ lệ sảy thai thấp, chọc hút dịch ối dễ dàng do buồng ối đủ rộng.

2. Quy trình áp dụng kỹ thuật QF-PCR sau khi đã chuẩn hóa.

Bước 1: tách chiết ADN từ dịch ối và mẫu máu bằng hạt chelex 100.

Bước 2: chạy PCR bằng các cặp mồi huỳnh quang.

Thành phần phản ứng:

Hỗn hợp Multiplex PCR	5 µl
ADN	1 µl
H ₂ O	1 µl
Tổng thể tích	7µl

Chu trình nhiệt phản ứng PCR:

HOẠT HOÁ TAQ	BIẾN TÍNH	GẮN MỒI	KÉO DÀI CHUỖI	KÉO DÀI CHUỖI CUỐI	DUY TRÌ
1 chu kỳ	30 chu kỳ			1 chu kỳ	
95°C (15 phút)	95°C (40 giây)	60°C (1 phút, 30 giây)	72°C (40 giây)	60°C (30 phút)	4 - 20°C ∞

Bước 3: Điện di sản phẩm PCR trên máy đọc trình tự tự động ABI 3130 XL.

- Chuẩn bị mẫu để đưa vào chạy phân tích Fragment: Hi-Di Formamide: 12,0 µl; GeneScan-500 LIZ size: 0,25 µl; mẫu sản phẩm PCR: 0,75 µl.

- Sau khi trộn mẫu, biến tính bằng hệ thống máy PCR ABI 9700 ở 95°C trong 3 phút, sau đó chuyển sang 4°C trong thời gian ít nhất 3 phút.

- Tiến hành tra mẫu vào khay, đặt thông số cho quá trình chạy fragment trên phần mềm vận hành máy. Chú ý, chọn Genscan theo kích thước GeneScan-500 LIZ size, quy trình lựa chọn đối với ứng dụng Fragment POP4, mao quản 36.

Bước 4: phân tích bằng phần mềm chuyên dụng Genemapper ID 3.2.

3. Kết quả nghiên cứu mẫu bệnh.

* Phân bố các bất thường NST:

Trisomy 21: 28 (87,50%); trisomy 13, 18: 03 (09,34%); XXY, XO: 03 (09,34%).

2/32 mẫu dịch ối vừa mắc hội chứng trisomy 21 và XXY (23 mẫu máu và 09 mẫu dịch ối). Những trường hợp này đều có kết

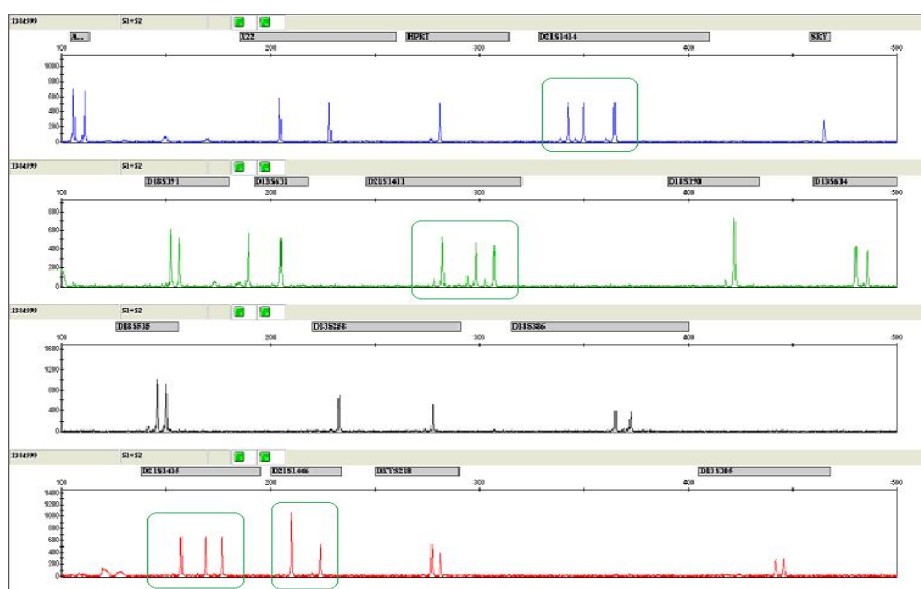
quả chẩn đoán xác định tại Khoa Di truyền, Bệnh viện Từ Dũ TP.HCM.

Kết quả phân tích những hình ảnh điện di huỳnh quang trên phần mềm chuyên dụng cho kết luận chính xác mẫu bệnh trisomy 13, 18, 21, XXY và XO.

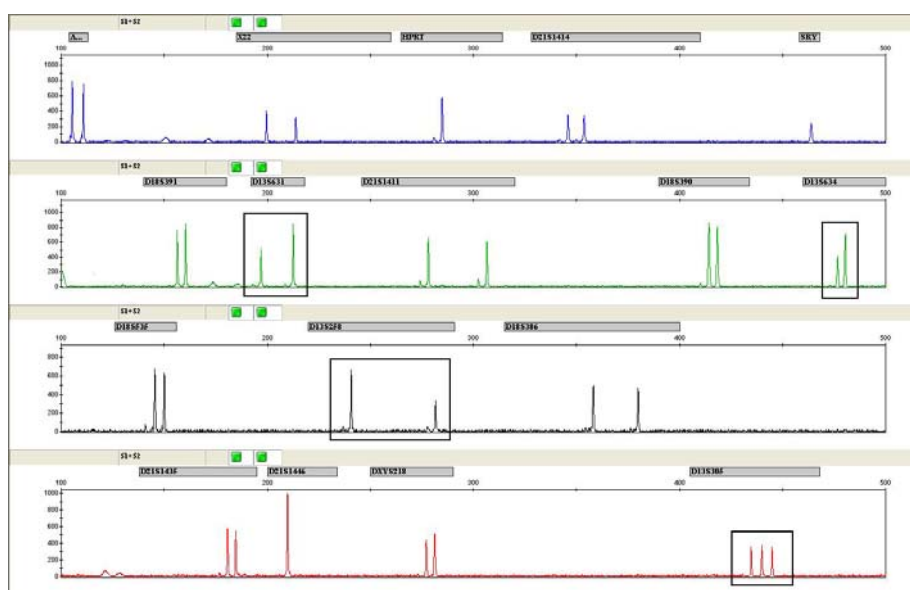
Bảng 2: Độ đặc hiệu của kỹ thuật QF-PCR so với kỹ thuật chẩn đoán NST.

THỂ BẤT THƯỜNG	KỸ THUẬT DI TRUYỀN TẾ BÀO		KỸ THUẬT QF-PCR	
	Số ca	Tỉ lệ	Số ca	Tỷ lệ
Trisomy 21	28/28	100%	28/28	100%
Trisomy 13,18	3/3	100%	3/3	100%
XXY, XO	3/3	100%	3/3	100%

Sử dụng kỹ thuật QF-PCR cho kết quả chẩn đoán tương đương như kỹ thuật di truyền tế bào với độ chính xác 100%. Kết quả này bổ sung số liệu khoa học cho việc áp dụng kỹ thuật QF-PCR trong chẩn đoán trước sinh hiện nay, đảm bảo kết quả nhanh và chính xác.



Hình 1: Kết quả phân tích mẫu bệnh trisomy 21.



Hình 2: Kết quả phân tích mẫu bệnh trisomy 13.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Qua nghiên cứu có thể đi đến kết luận:

- Cải tiến được quy trình chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật QF-PCR, thể hiện qua việc giảm hoá chất sử dụng, tăng số lượng mẫu trong phản ứng, giảm giá thành kỹ thuật.
- Xác định được độ đặc hiệu của mỗi locus STR trong chẩn đoán hội chứng bất thường NST, đồng thời đánh giá được độ chính xác của kỹ thuật (100%).
- Đây là một trong những công trình đầu tiên áp dụng kỹ thuật QF-PCR trong chẩn đoán trước sinh tại Việt Nam, nên áp dụng rộng rãi trên quy mô cả nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Edwards JH, Dent T, Kahn J.* Monozygotic twins of different sex. *J Med Genet* 3. 1996, pp.117-123.
2. *Fernández-Martínez FJ, Gallindo A, Moreno Izquierdo A, et al.* Application of QF-PCR for the prenatal assessment of discordant monozygotic twins for fetal sex. *Prenat Diagn.* 2007, 27, pp.648-652.
3. *Winfried Schmidt, Jutta Jenderny, Kurt Hecher, et al.* Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, and X by quantitative fluorescence polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther.* 2006, 21 (4), pp.326-31.
4. *Haissam Rahil, Jérôme Solassol, Christophe Philippe, et al.* Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes.
5. *Moon-Hee Lee, Hyun-Mee Ryu, Do-Jin Kim, Bom-Yi Lee, Eun-Hee Cho, et al.* Rapid prenatal diagnosis of down syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet.* 2002, Aug, 10 (8), pp.462-426.
6. *Lothar Kochhan, Karsten R. Held, et al.* Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod.* 2000, Sep, 6 (9), pp.855-860.
7. *Onay H, Ugurlu T, Aykut A, Pehlivan S, Inal M, Tinar S, Ozkinay C, Ozkinay F.* Rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in amniotic fluid using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest.* 2008, Apr 29, 66 (2), pp.104-110.