

BÁO CÁO
NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN MỘT
SỐ BỆNH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI
ĐỂ SÀNG LỌC PHÔI THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

**GS. Nguyễn Đình Tảo, PGS. Trần Văn Khoa, PGS. Quản Hoàng
Lâm, TS. Triệu Tiến Sang, TS. Nguyễn Thanh Tùng, Ths. Nguyễn Thị
Thanh Nga, Ths. Ngô Trường Giang**

BỆNH DI TRUYỀN

TRÊN 4.000 BỆNH DI TRUYỀN ĐƠN GEN KHÁC NHAU



ĐẶT VẤN ĐỀ CÁC BƯỚC DỰ PHÒNG



Mang gen, bất thường NST
Bất đồng nhóm máu

- Tiền sử gia đình: CF, FragileX, DMD, hemophilia, chậm pttt, CAH, BDTCH
- Chủng tộc

.....

Tránh yếu tố độc hại
Dùng thuốc dự phòng
Sàng lọc và CĐTS

C TIÊU

- 1. Xây dựng được quy trình chẩn đoán gen trước chuyển phôi (Pre-Implantation Genetic Diagnosis) trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm.**
- 2. Ứng dụng quy trình chẩn đoán gen trước chuyển phôi trong sàng lọc một số bệnh lý di truyền phổ biến ở Việt Nam trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm.**

TỔNG QUAN PGD & PGS

PGD (pre-implantation genetic diagnosis):

Chẩn đoán các bất thường đã biết về gen/ NST của phôi

PGS (pre-implantation genetic screening):

Sàng lọc bất thường NST có thể xảy ra đối với bất kỳ trường hợp nào

TAN MÁU DI TRUYỀN- THALASSEMIA

Thalassemia (tan máu di truyền) là một trong những bệnh di truyền đơn gen phổ biến nhất trên thế giới. Ở Việt Nam, ước tính có khoảng 5 triệu người mang gen và bị bệnh. Hàng năm có khoảng 2.000 trẻ sinh ra mắc bệnh thalassemia.



Tuỳ theo thiếu hụt tổng hợp chuỗi alpha, beta hay thiếu hụt cả chuỗi beta và delta mà gọi là alpha-thalassemia, beta-thalassemia, delta-beta-thalassemia

BỆNH α -THALASSEMIA

Thể bệnh	α -thalassemia	Biểu hiện
α thalassemia thể ẩn	mất 1 trong 4 gen	không có biểu hiện lâm sàng và huyết học.
α thalassemia thể nhẹ	mất 2 trong 4 gen	biểu hiện lâm sàng và huyết học nhẹ hoặc rất nhẹ.
Bệnh HbH	mất 3 trong 4 gen	biểu hiện lâm sàng và huyết học như một thalassemia trung gian.
Bệnh Hb Bart's	mất cả 4 gen alpha	biểu hiện rất nặng, thường gây chết ngay từ thời kỳ phôi thai nhi hoặc ngay sau sinh.

BỆNH β -THALASSEMIA

Thể bệnh	<i>Beta-thalassemia</i>	Biểu hiện
β -thalassemia thể ẩn	Mang 1 đột biến β^+	Không có biểu hiện lâm sàng rõ ràng, không phải truyền máu.
β -thalassemia thể nhẹ hay thể dị hợp tử	hai đột biến β^+ nhẹ hay có sự phối hợp với α -thalassemia	Thiếu máu mức độ vừa, biến đổi hồng cầu như thể nặng, nhiễm sắt muộn
β -thalassemia thể nặng		Thiếu máu ngày càng nặng, lách to, biến dạng xương

BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ TỦY (SMA- SPINAL MUSCULAR ATROPHY)

- Tần số: 1 / 6.000 đến 1/10.000 trẻ
- Là bệnh di truyền lặn autosome phổ biến hàng thứ hai (sau chứng xơ nang).
- Tần số người mang đột biến gen SMN1 (SMNt) ở các nước phương tây 2% đến 3% dân số.

LÂM SÀNG LOẠN DƯỠNG CƠ TỬY



Trẻ bị bệnh loạn dưỡng cơ tủy type I (mất 2 copy gen)



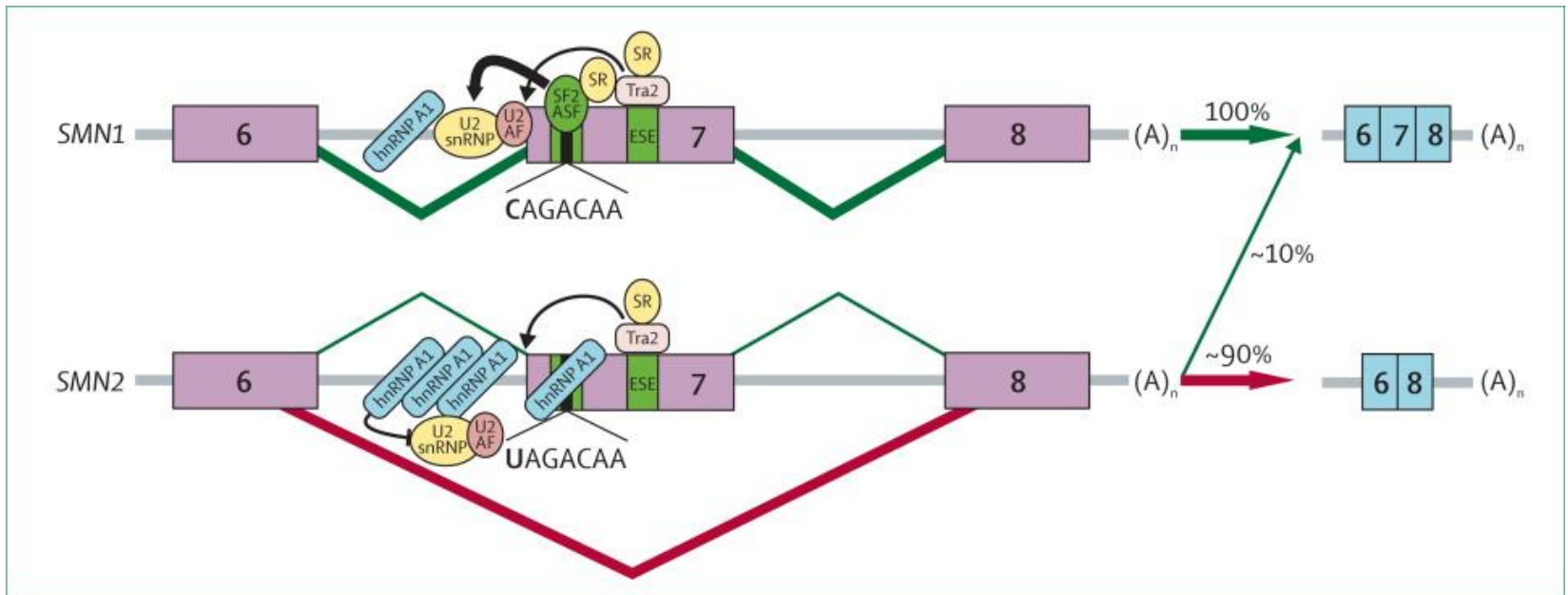
Trẻ bị bệnh loạn dưỡng cơ tủy type II (mất 1 copy gen)



Bệnh nhân bị bệnh loạn dưỡng cơ tủy type III (mất 1 copy gen, lặp vị trí khác).

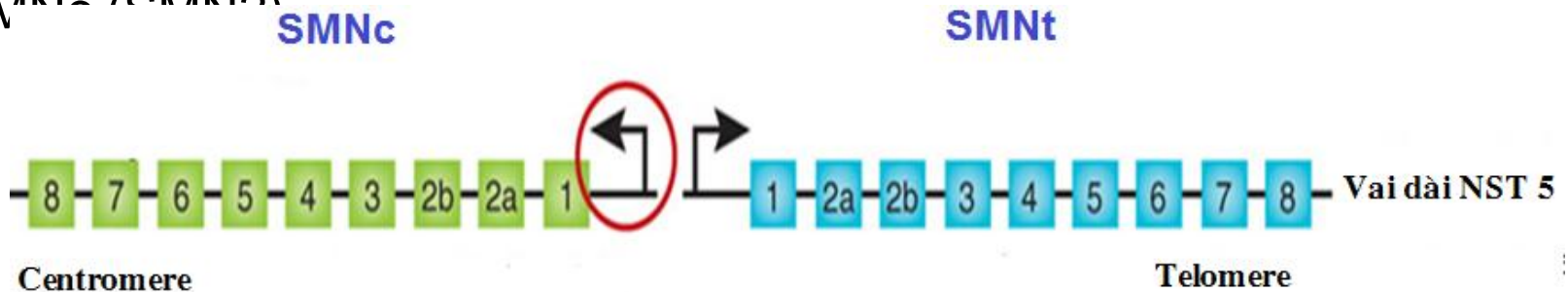


CƠ SỞ DI TRUYỀN LOẠN DƯỠNG CƠ TỦY

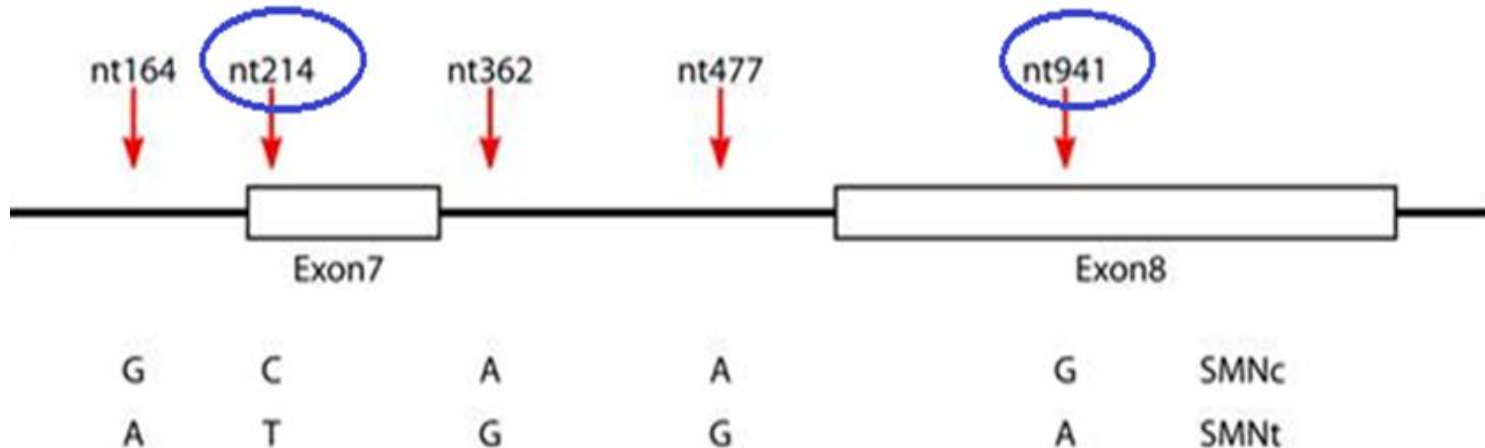


CƠ SỞ DI TRUYỀN LOẠN DƯỠNG CƠ TỦY

Năm 1995, Judith Melki đã mô phỏng gen SMN: Gen SMN bao gồm 9 exon mã hóa cho phân tử protein SMN dài 294 acid amin. Gen SMN có hai bản sao giống nhau là gen SMNt (SMN1) và gen SMNc (SMN2).



Cấu trúc gen SMN.



Sự khác biệt giữa gen SMNt với SMNc

TÌNH HÌNH PGD CHO BỆNH THALASSEMIA

- **Zexu Jiao và các cs.** (Trung Quốc), 2003: Nested PCR (single cell) + lai trên màng. Kết quả 28 tế bào phôi, chẩn đoán được 24 tế bào phôi, tỉ lệ nhân gen 86,8%, chuyển 3 phôi.
- **Wen Wang và các cs.** (Singapore) 2009: thành công đầu tiên tại Singapore. Nested PCR (single cell)+ minisequencing. Kết quả 9 phôi, 1 có thai lâm sàng.
- **Yan-Wen Xu, 2009 (TQ):** Nested PCR + gap PCR cho đột biến SEA, điện di tự động. Kết quả: 472 phôi, tỷ lệ thành công 82,6. Tỷ lệ ADO 16,4%. 25 ca có thai lâm sàng, đạt 24,0%.

TÌNH HÌNH PGD CHO BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ TỦY

- **Dreesen và các cs.** (Hà lan), 1998: Quy trình: nested PCR (single cell)+ xử lý RE. *Dral* để phân biệt exon 7 của SMNt với SMNc. Kết quả 25 phôi, hiệu suất 100%
- **Daniels và các cs** (Kết hợp giữa Mỹ, Anh và Canada), 2001; **Ce'line Moutou và các cs.**, (Pháp), 2003 : nested PCR (single cell) + xử lý RE. *Hinfl*. Kết quả 34 phôi, hiệu suất 91%
- **Fiorentino F. và các cs.**, 2003: nested PCR (single cell)+ minisequencing. Kết quả 14 phôi, hiệu suất 92,90%.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. XÂY DỰNG QUY TRÌNH SÀNG LỌC VÀ PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI

- 43 mẫu máu từ 16 gia đình thalassemia, 30 mẫu sinh thiết phôi (bình thường) bằng TripAssay và minisequencing
- 17 gia đình teo cơ tủy trên các gia đình tham gia nghiên cứu và 30 mẫu sinh thiết phôi dư bằng PCR-RFLP và Minisequencing.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2. ÁP DỤNG SÀNG LỌC VÀ PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI

- **Đối tượng:**

- 62 cặp vợ chồng có con bị thalassemia (30 tại BV nhi TW và 32 tại HVQY), 13 làm PGD
- 17 cặp vợ chồng đã có con bị bệnh teo cơ tủy (BV nhi TW), 3 làm PGD.
- Mẫu: 5ml chống đông EDTA, mẫu phôi sau sinh thiết

- **Phương pháp:**

- Nhân toàn bộ gen (WGA): 1 trong 2 loại: Omniplex (Sigma)
- Sàng lọc, phát hiện đột biến gen bệnh thal: TripAssay Vienna Lab, Áo, Minisequencing (SnaPshot, AB, Mỹ).
- Sàng lọc, phát hiện đột biến gen bệnh SMA: RFLP-PCR (DraI và Del, Thermo), Minisequencing.
- Đông lạnh phôi (Kuwayama, Nhật, 2005).

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

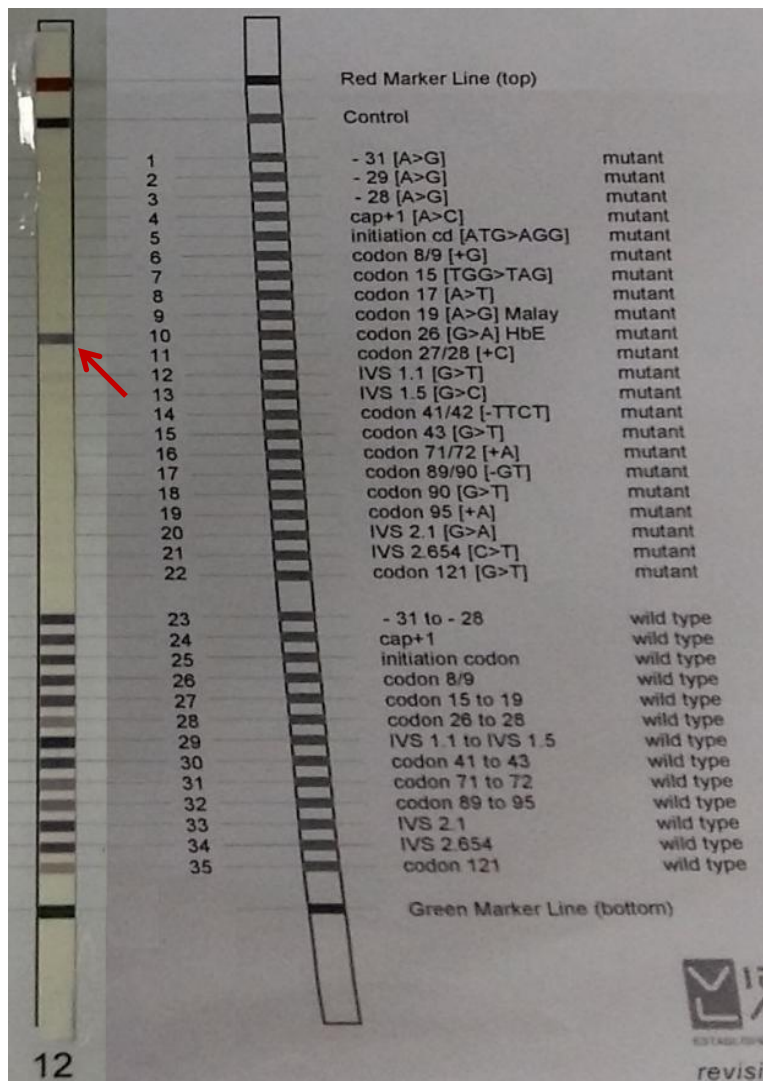
1. Kết quả xây dựng quy trình sàng lọc đột biến trước chuyển phôi

1.1. *Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gây bệnh Thalassemia trên các gia đình tham gia nghiên cứu và trên phôi dử*

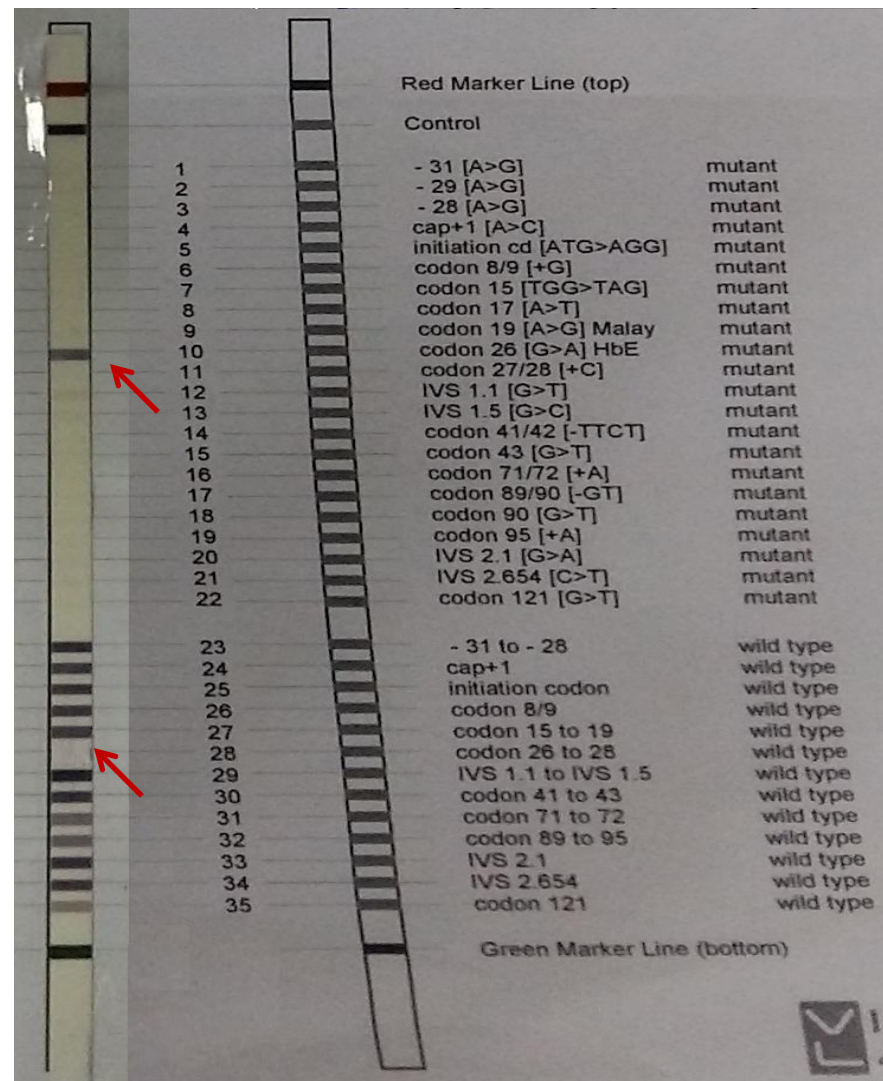
- Quy trình sàng lọc bằng bộ kit TripAssay
- Quy trình sàng lọc đột biến Beta thalassemia bằng kỹ thuật Minisequencing
- Quy trình sàng lọc alpha Thalassemia bằng kỹ thuật Gap-PCR

Kết quả sàng lọc đột biến Thalassemia của các gia đình tham gia nghiên cứu

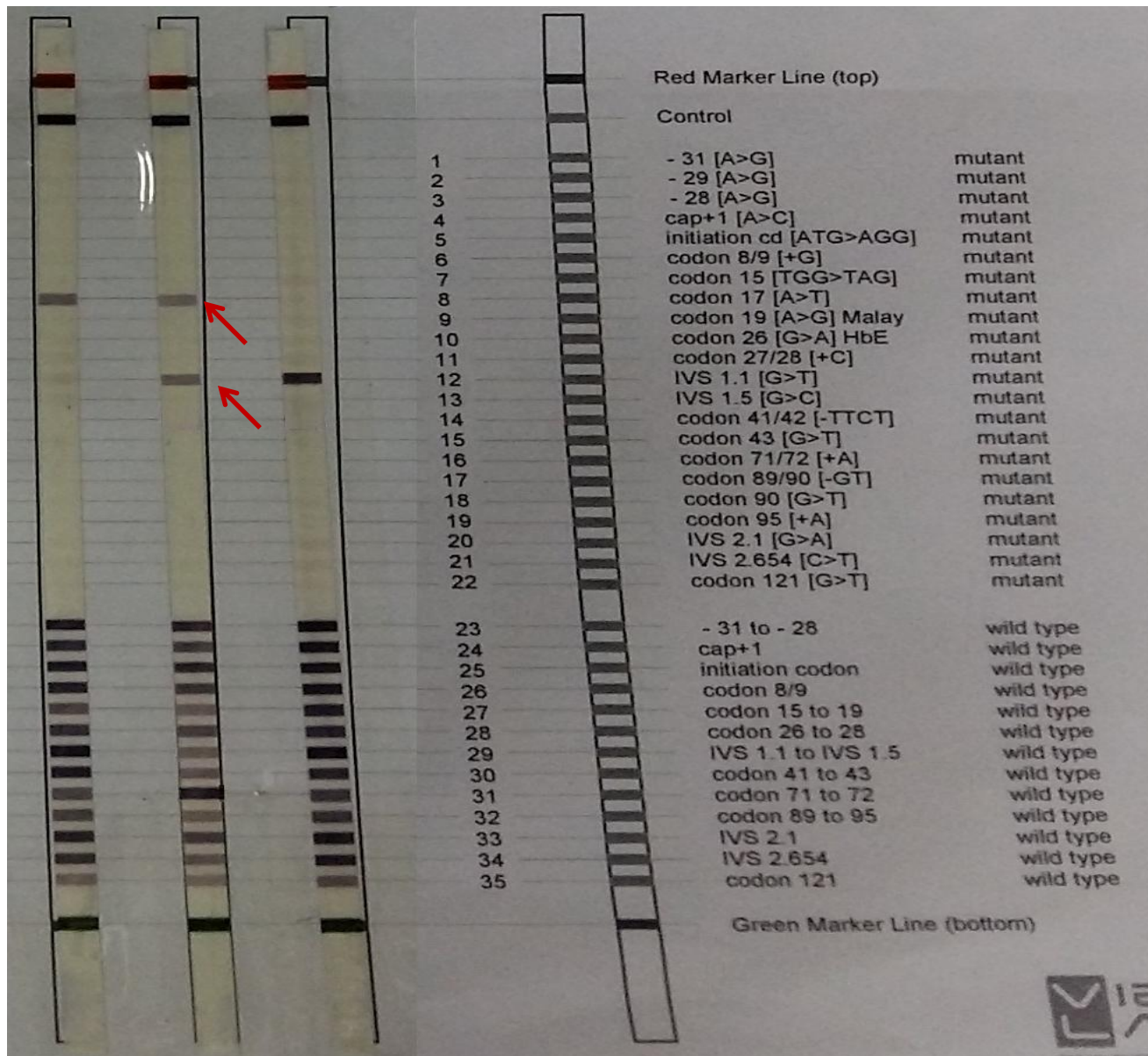
STT	Mã bệnh	Kiểu đột biến xác định trên 1 tế bào	STT	Mã bệnh	Kiểu đột biến xác định trên 1 tế bào
1	THB07	Cd26	23	THM35	Cd26
2	THM07	Cd26	24	THC35	Cd26/ Cd71/72
3	THC07	Cd26/Cd26	25	THB48	Cd41/42
4	THB09	IVS1-1	26	THM48	IVS1-1
5	THM09	Cd17	27	THC48	Cd41/42/IVS1-1
6	THC09	Cd17/ IVS1-1	28	THB49	Cd17
7	THB16	Cd17	29	THM49	Cd17
8	THM16	Cd26	30	THC49	Cd17/Cd17
9	THC16	Cd17/Cd26	31	THB38	3.7
10	THB20	IVS1-1	32	THM38	SEA
11	THM20	Cd17	33	THC38	3.7/SEA
12	THC20	IVS1-1/ Cd17	34	THB56	SEA
13	THB24	Cd17	35	THM56	SEA
14	THM24	Cd17	36	THB59	SEA
15	THC24	Cd17/Cd17	37	THM59	SEA
16	THC26	Cd17	38	THB60	SEA
17	THB26	IVS2-654	39	THM60	SEA
18	THM26	Cd17/ IVS2-654	40	THB61	SEA
19	THB29	Cd41/42	41	THM61	SEA
20	THM29	Cd26	42	THB62	SEA
21	THC29	Cd26/ Cd41/42	43	THM62	SEA
22	THB35	Cd71/72			



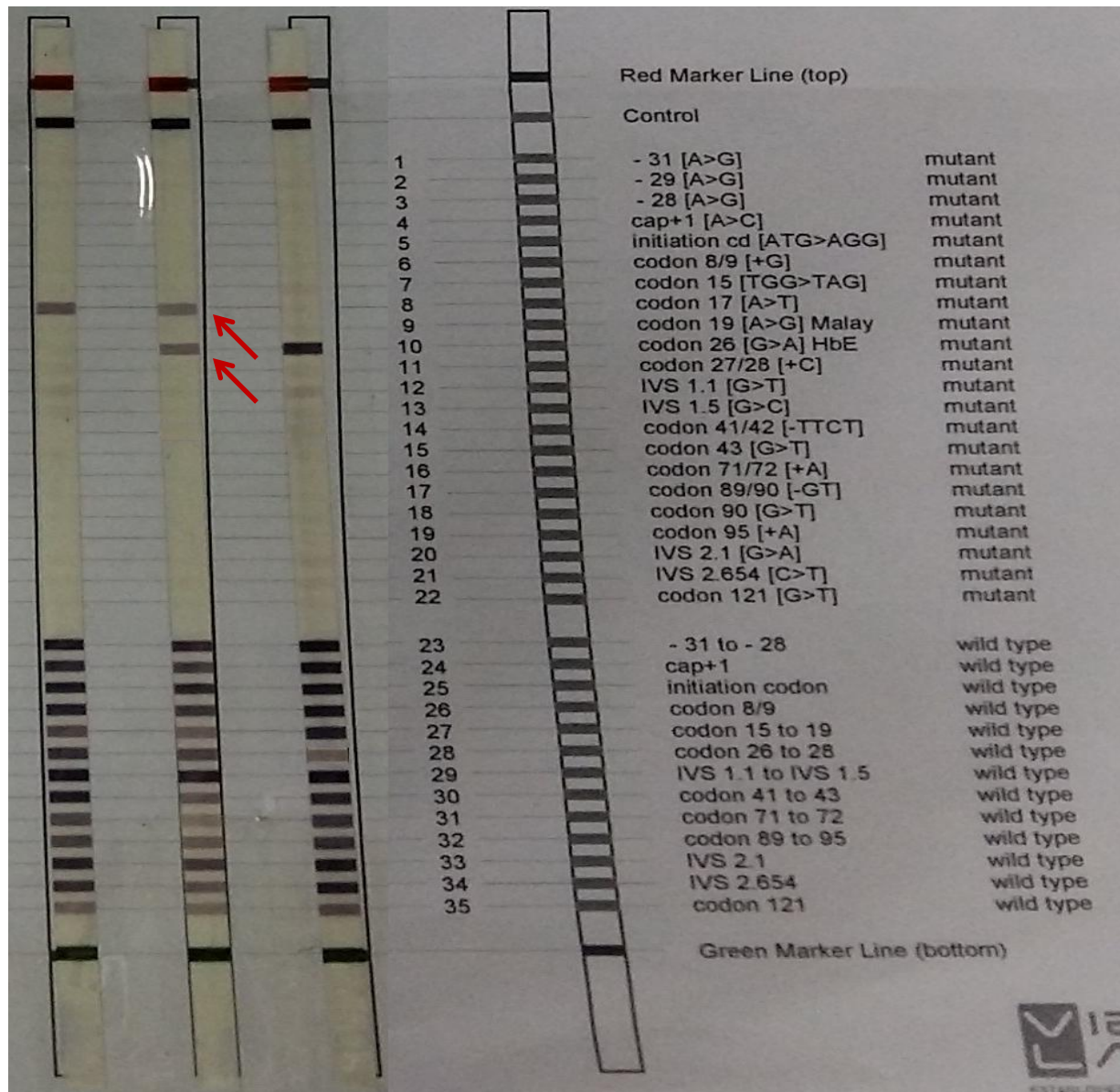
Kết quả của trường hợp mang đột biến Cd26 dị hợp



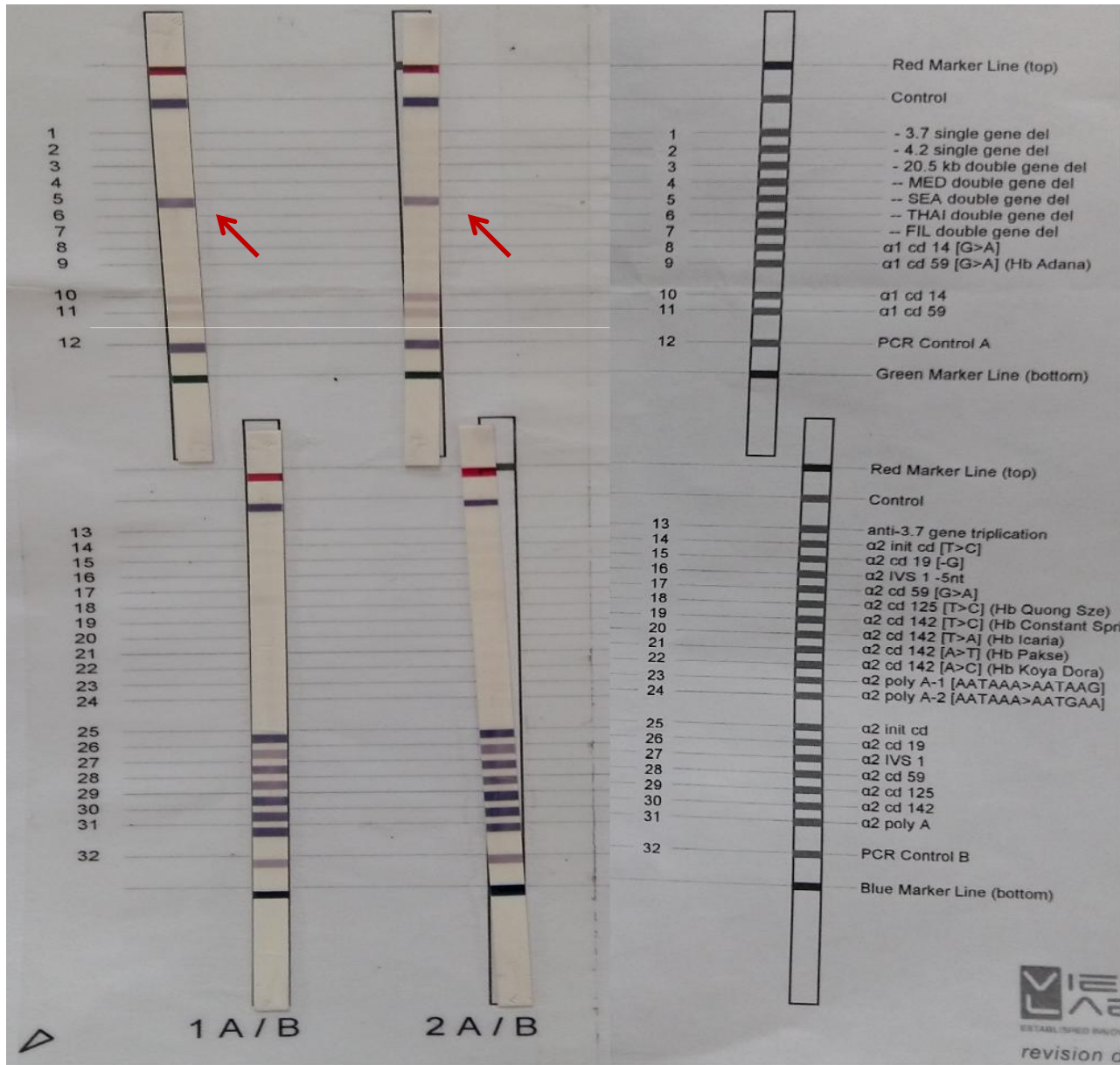
Kết quả của trường hợp mang đột biến Cd26 đồng hợp



Kết quả của trường hợp mang đột biến Cd17 và IVS1.1 lần lượt từ trái sang là THM20, THC20, THB20

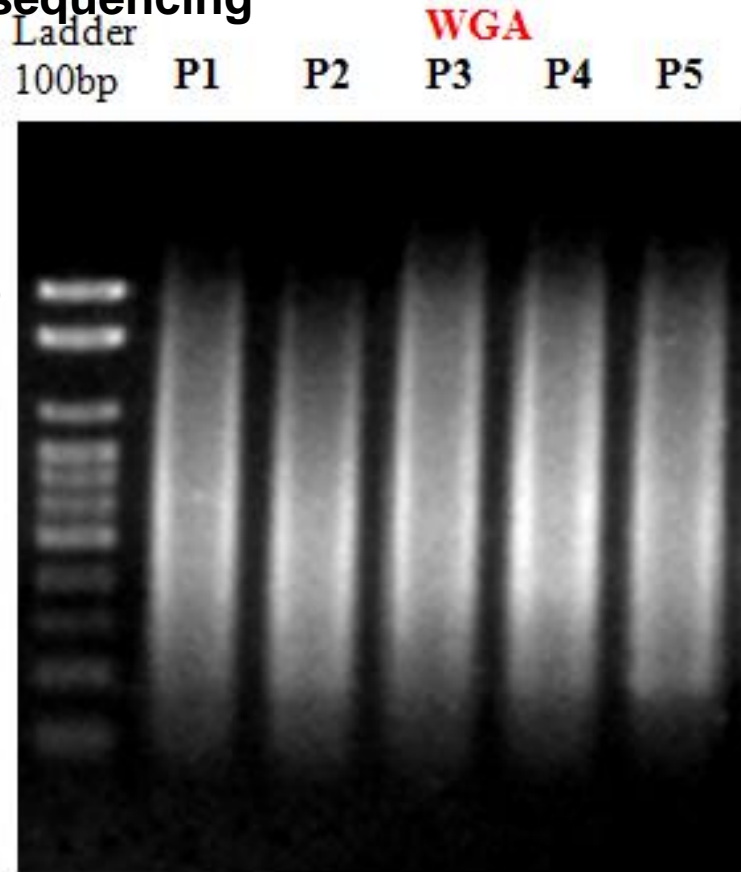


Kết quả của trường hợp mang đột biến Cd17 và Cd26 lần lượt từ trái sang là THB16, THC16, THM16

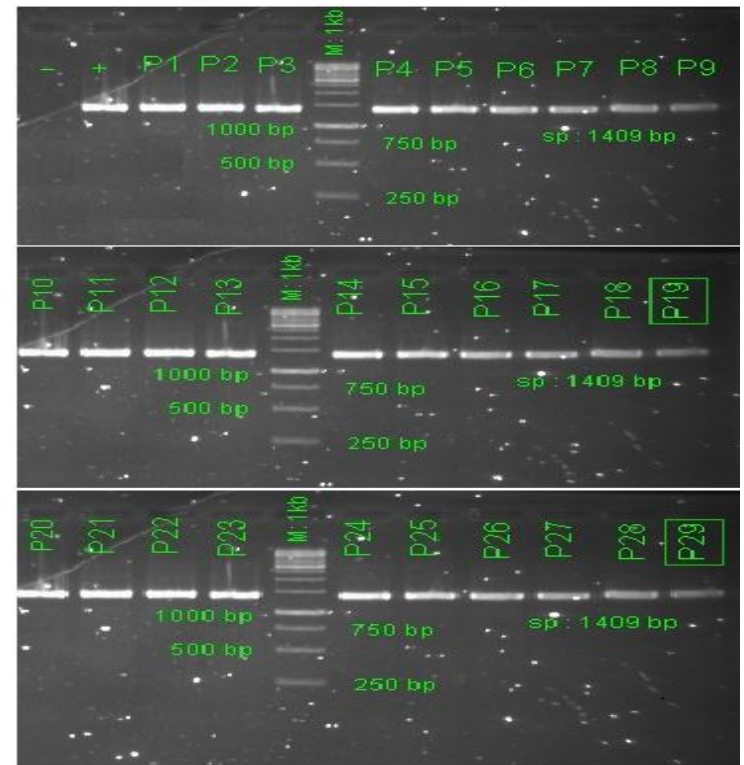


Kết quả của trường hợp mang đột biến Alpha thalassemia lần lượt từ trái sang là THB60, THM60 (SEA)

Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến beta Thalassemia bằng kỹ thuật Minisequencing



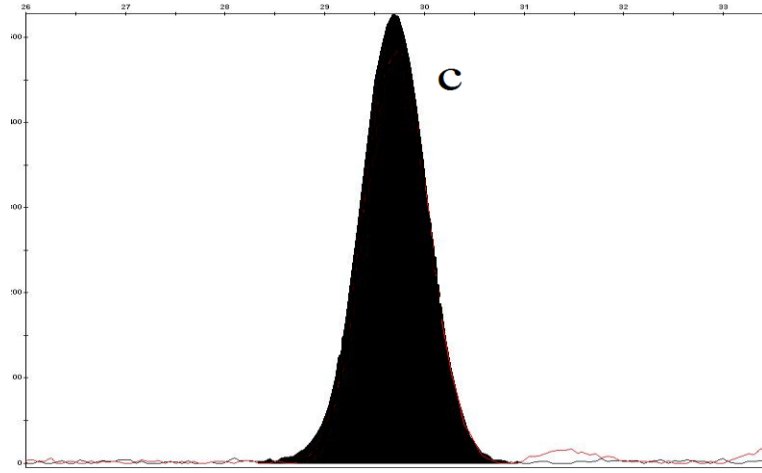
Kết quả điện di bằng gel agarose 2% sản phẩm nhân toàn bộ gen (WGA4, GenomePlex, Sigma) từ tế bào phôi: P1: Phôi 1; P2: Phôi 2; P3: Phôi 3; P4: Phôi 4; P5: Phôi 5



Hình ảnh điện di trên gel agarose sản phẩm khuếch đại gen β -globin

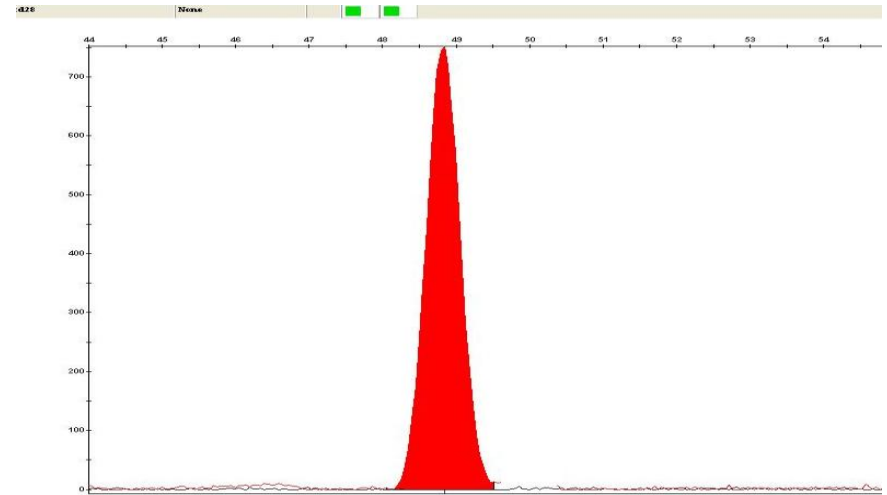
3.1.3. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gây bệnh thalassemia

3.1.3.2. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến beta Thalassemia bằng kỹ thuật Minisequencing



Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing IVS 2-645 mẫu P1-P30. Các mẫu chỉ xuất hiện 1 peak

màu đen là nucleotide **C** (bình thường)

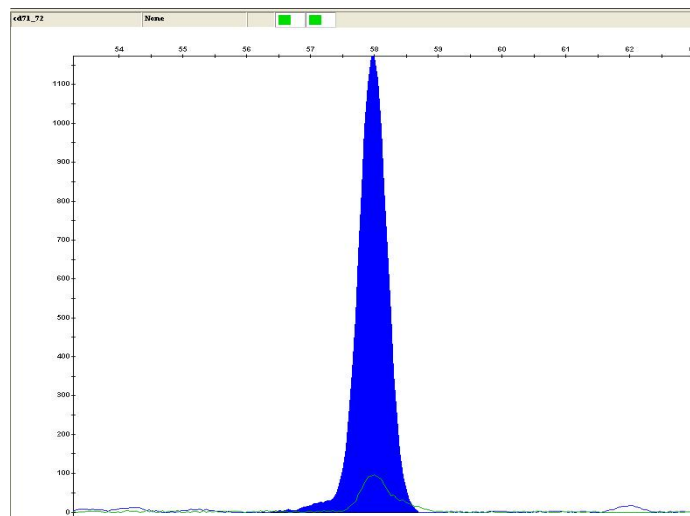


Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing Cd28 mẫu P1-P30. Các mẫu chỉ xuất hiện 1

peak màu đỏ là nucleotide **T** (bình thường)

3.1.3. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gây bệnh thalassemia

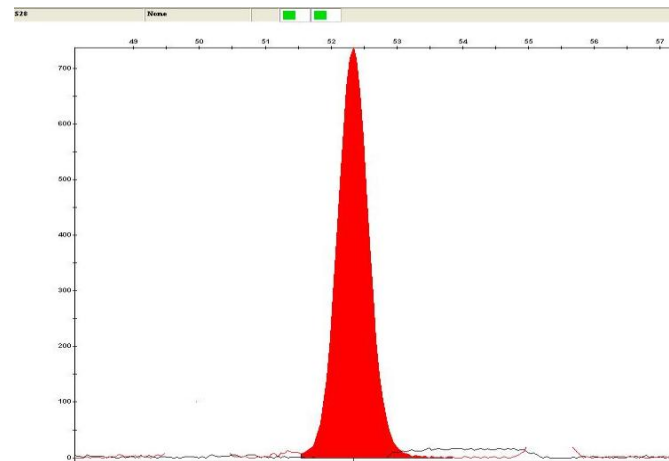
3.1.3.2. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến beta Thalassemia bằng kỹ thuật Minisequencing



Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing Cd71/72 mẫu P1-P30.

Các mẫu chỉ xuất hiện 1 peak màu

xanh da trời là nucleotide **G** (bình thường)



Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing SNP28 mẫu P1-P30.

Các mẫu chỉ xuất hiện 1 peak màu

đỏ là nucleotide **T** (bình thường)

Kết quả phát hiện đột biến gây bệnh *Beta thalassemia* trên các mẫu phôi dư bằng kỹ thuật *Minisequencing*

STT	Mã phôi	Kiểu đột biến xác định trên 1 tế bào phôi	STT	Mã phôi	Kiểu đột biến xác định trên 1 tế bào phôi
1	P1	Bình thường	16	P16	Bình thường
2	P2	Bình thường	17	P17	Bình thường
3	P3	Bình thường	18	P18	Bình thường
4	P4	Bình thường	19	P19	Bình thường
5	P5	Bình thường	20	P20	Bình thường
6	P6	Bình thường	21	P21	Bình thường
7	P7	Bình thường	22	P22	Bình thường
8	P8	Bình thường	23	P23	Bình thường
9	P9	Bình thường	24	P24	Bình thường
10	P10	Bình thường	25	P25	Bình thường
11	P11	Bình thường	26	P26	Bình thường
12	P12	Bình thường	27	P27	Bình thường
13	P13	Bình thường	28	P28	Bình thường
14	P14	Bình thường	29	P29	Bình thường
15	P15	Bình thường	30	P30	Bình thường

1.2. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gen gây bệnh Teo cơ tủy trên các gia đình tham gia nghiên cứu và các phôi dư

Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gen gây bệnh Teo cơ tủy trên các gia đình tham gia nghiên cứu

Bước 1: Tách ADN từ mẫu máu toàn phần

Bước 2: Nhân exon 7- SMN từ máu toàn phần

Bước 3: PCR –RFLP và Minisequencing

Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gen gây bệnh Teo cơ tủy trên các phôi dư

Bước 1: WGA

Bước 2: Nhân exon 7- SMN

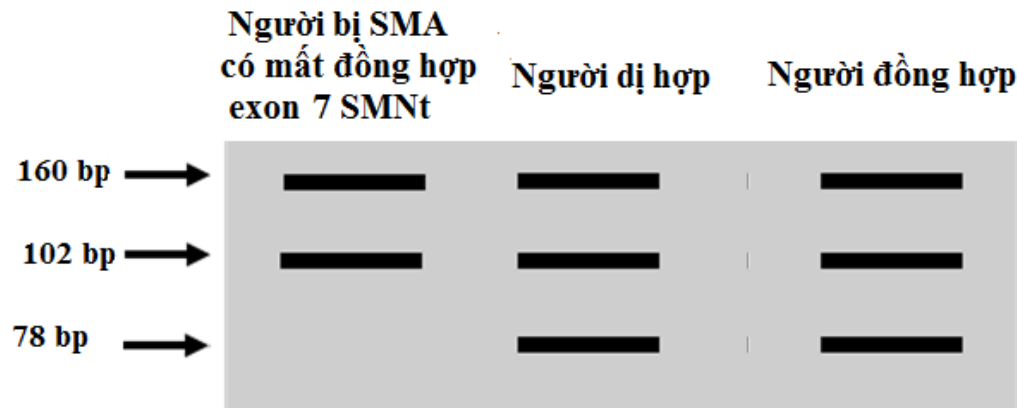
Bước 3: PCR-RFLP và Minisequencing

Sàng lọc bằng kỹ thuật RFLP-PCR từ tế bào phôi

- Ủ sản phẩm PCR với enzym giới hạn
- Để phân biệt sản phẩm nhân exon 7- SMNt với exon 7- SMNc, chúng tôi dùng enzym cắt giới hạn *Hinf I* của hãng Thermo scientific.
- Sản phẩm PCR được ủ với enzym giới hạn *Hinf I* trong thời gian từ 2-3 giờ. *Hinf I* cắt cả exon 7 SMNt và SMNc

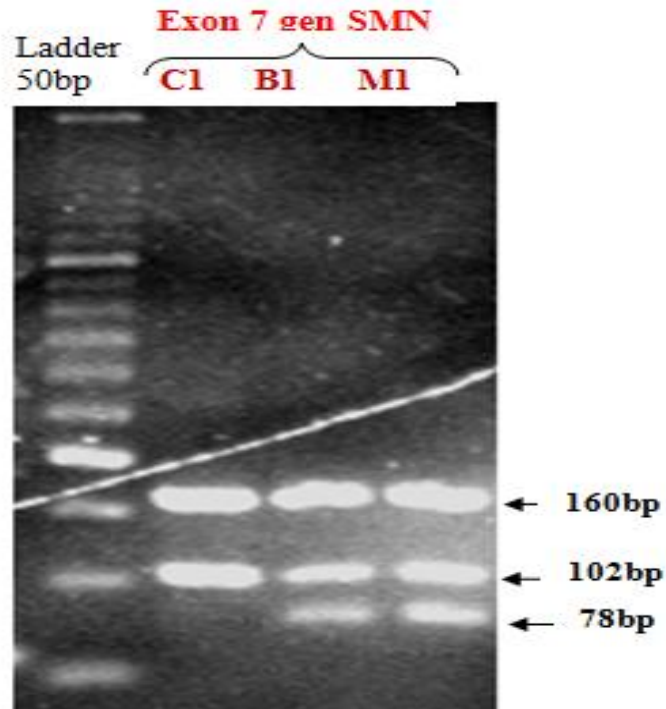


Vị trí cắt exon 7 SMNt và SMNc của enzym *Hinf I*.

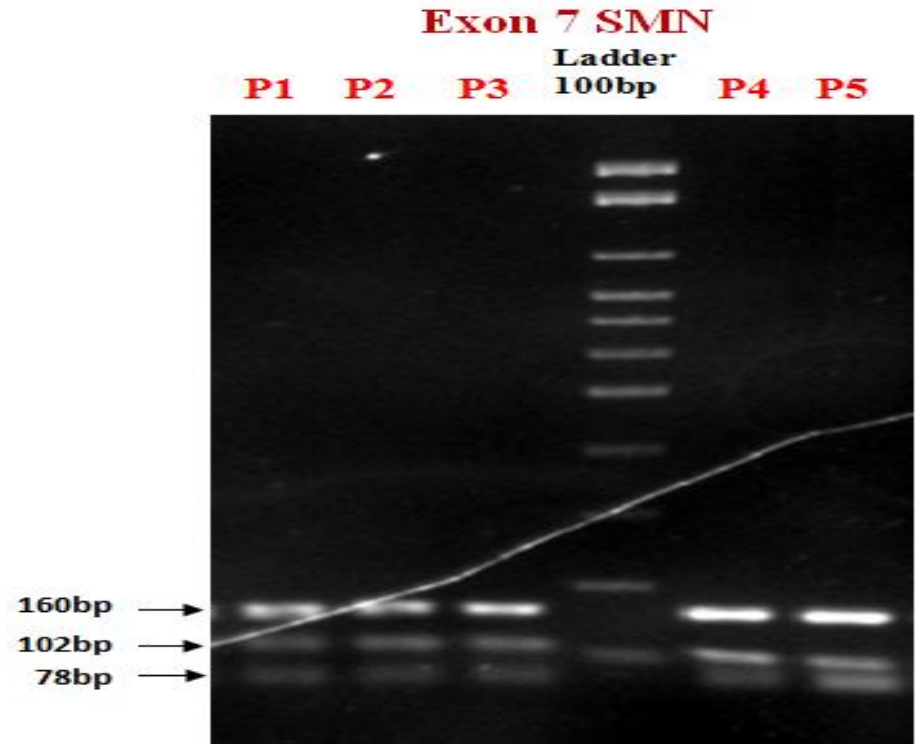


3.1.3. Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gen gây bệnh loạn dưỡng cơ tủy

3.1.3.1. Sàng lọc bằng kỹ thuật RFLP-PCR từ tế bào phôi



Kết quả nhân exon 7- gen SMN máu toàn phần gia đình bệnh nhân C1.
B1: Bố bệnh nhân 1; M1: Mẹ bệnh nhân 1; C1: Bệnh nhân 1

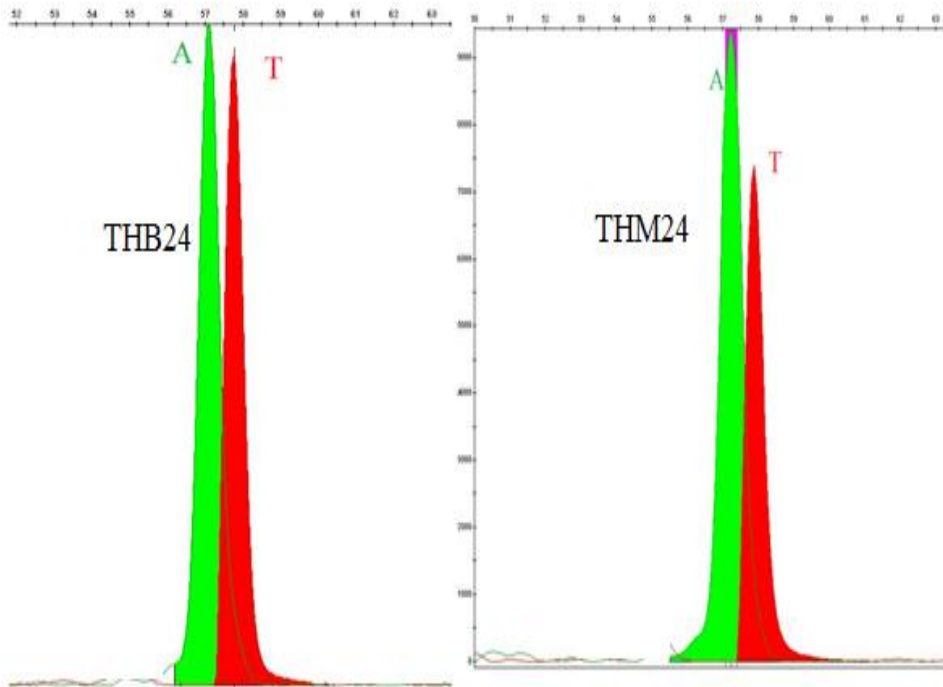


Kết quả điện di trên gel 3% của exon 7-SMN nhân từ sản phẩm nhân toàn bộ gen từ tế bào phôi dư bình thường.
P1: Phôi một; P2: Phôi hai; P3: Phôi ba; P4: Phôi bốn; P5: Phôi 5

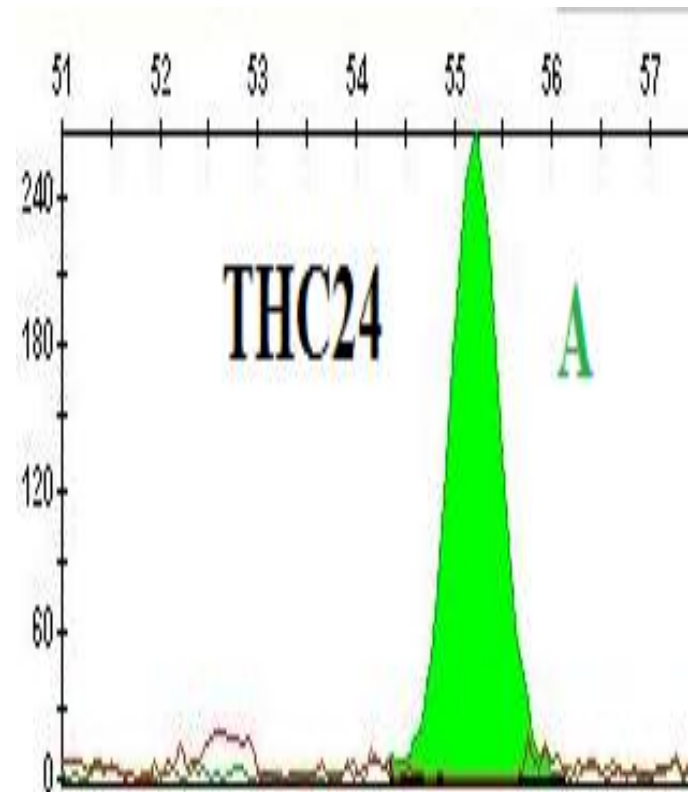
Xây dựng quy trình sàng lọc đột biến gen gây bệnh Teo cơ tủy trên các phôi dư bằng kỹ thuật Minisequencing

Danh sách các gia đình đã được sàng lọc gen SMN (-) mất đồng hợp exon 7; (+) có exon 7.

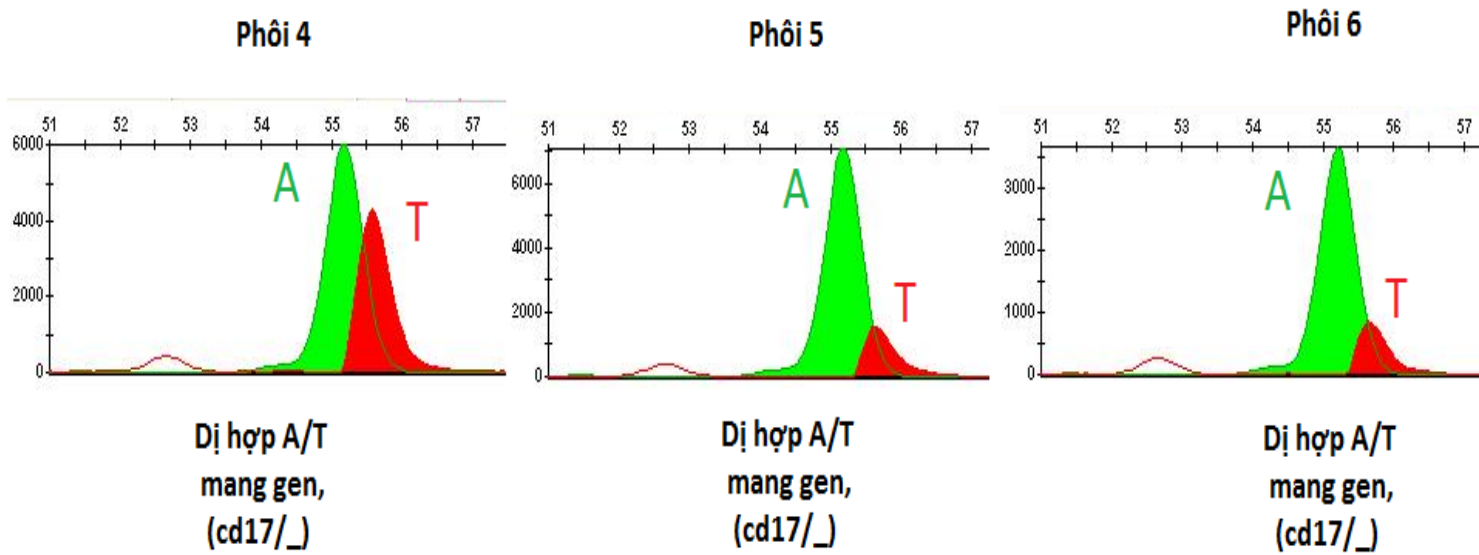
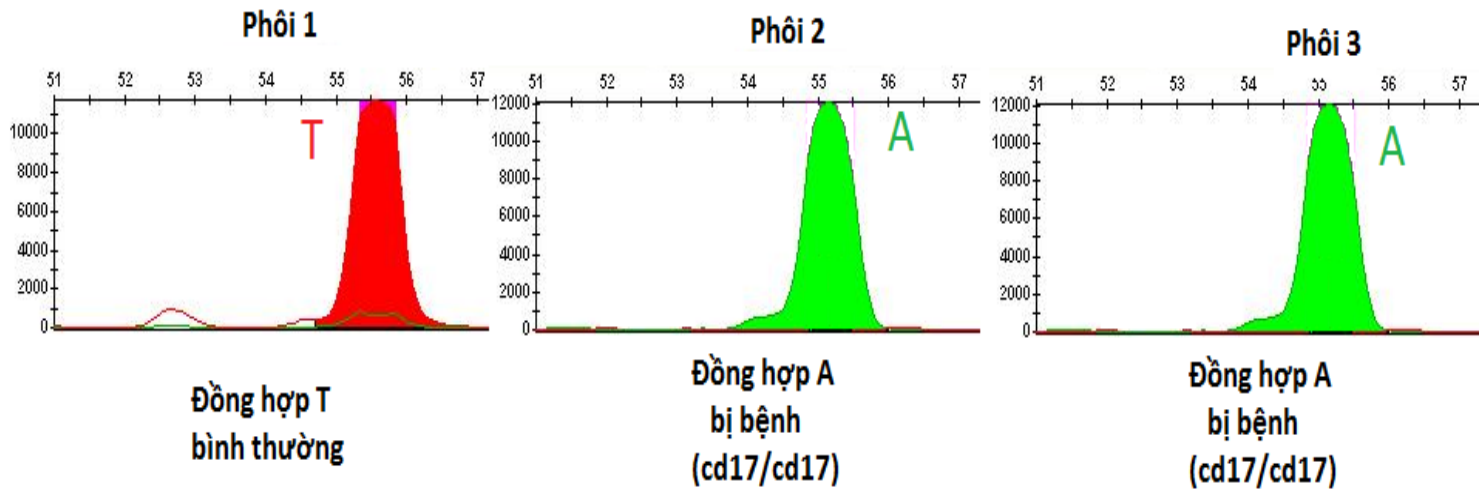
STT	Mã gia đình	Kết quả nhân exon 7 gen SMNt			STT	Mã gia đình	Kết quả nhân exon 7 gen SMNt		
		Bố	Mẹ	Con			Bố	Mẹ	Con
1	SMA1	+	+	-	10	SMA11	+	+	-
2	SMA2	+	+	-	11	SMA12	+	+	-
3	SMA3	+	+	-	12	SMA13	+	+	-
4	SMA4	+	+	-	13	SMA14	+	+	-
5	SMA5	+	+	-	14	SMA15	+	+	-
6	SMA6	+	+	-	15	SMA16	+	+	-
7	SMA7	+	+	-	16	SMA17	+	+	-
8	SMA8	+	+	-	17	SMA18	+	+	-
9	SMA10	+	+	-					



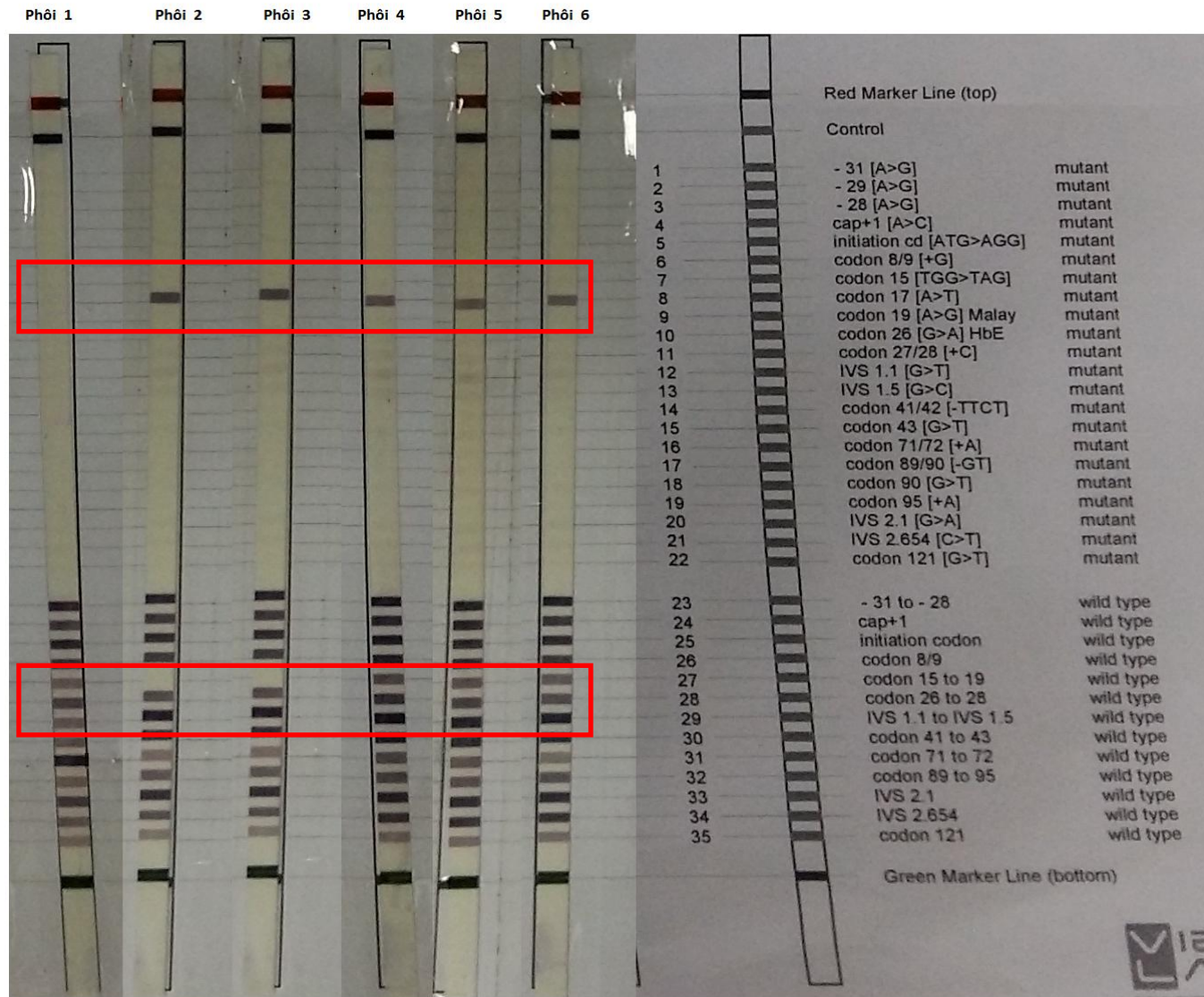
Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing mẫu THB24, THM24.



Hình ảnh điện di tự động sản phẩm minisequencing mẫu THC24.
Cd17/Cd17



Hình ảnh điện di minisequencing 6 phôi của gia đình 24.

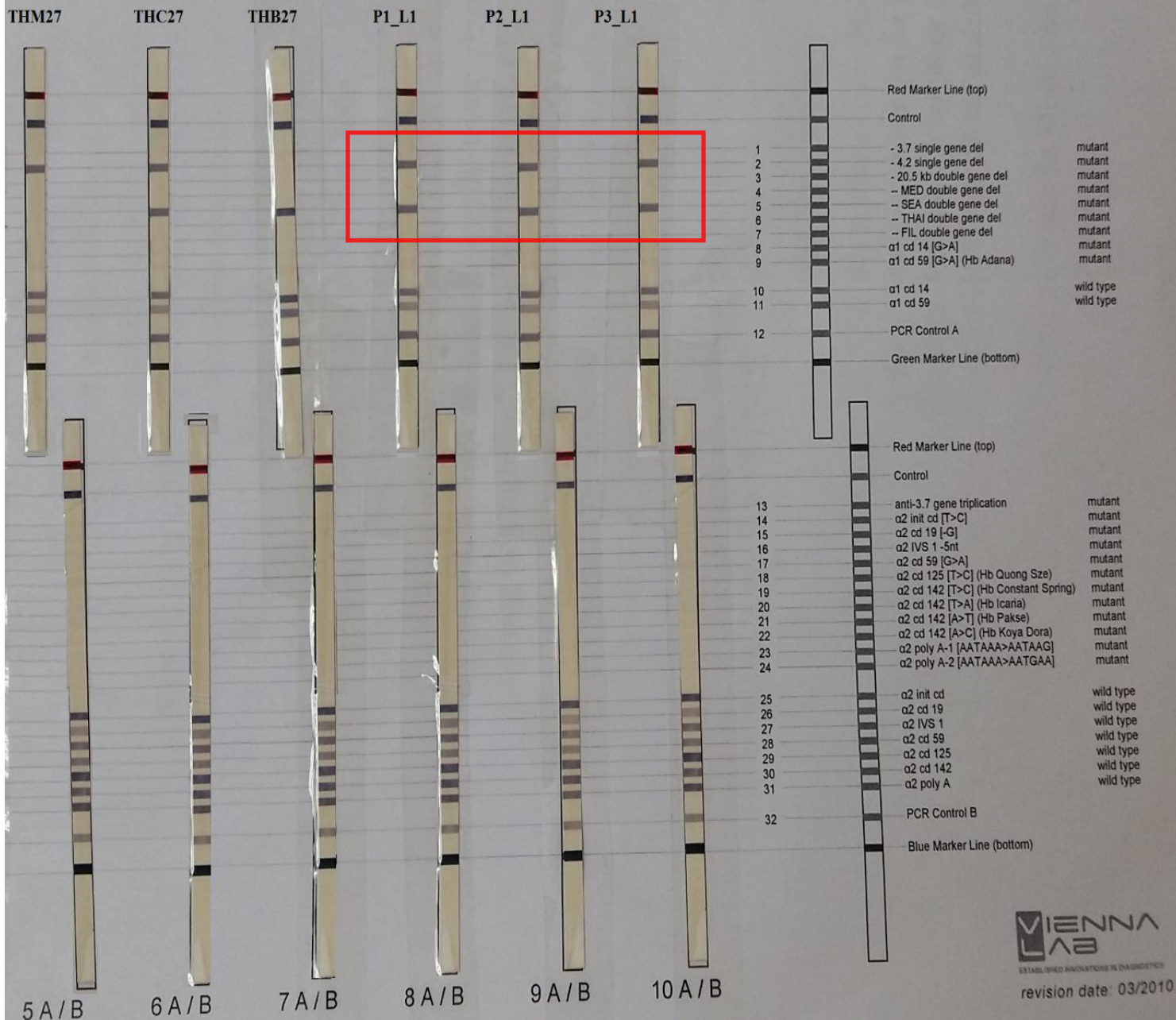


Hình ảnh chẩn đoán 6 phôi sinh thiết bằng kit TripAssay gia đình 24 (Cd17)

E1 bt, E2,3 bệnh, E4,5,6 dị hợp

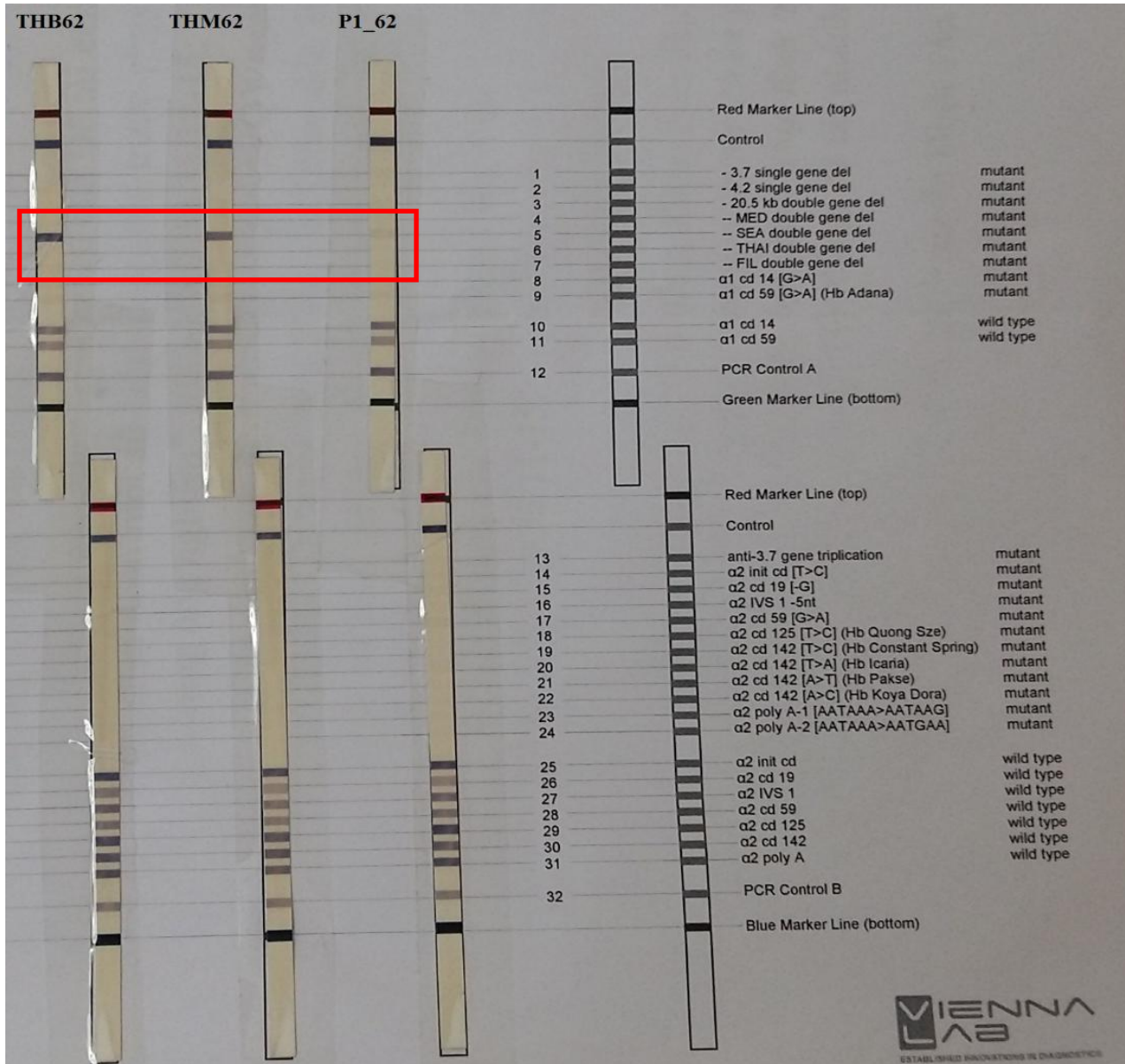
Kết quả phát hiện đột biến gây bệnh Alpha thalassemia trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm của các gia đình tham gia nghiên cứu

STT	MÃ BỆNH	KIỂU ĐỘT BIẾN		MÃ BỆNH	KIỂU ĐỘT BIẾN		MÃ BỆNH	KIỂU ĐỘT BIẾN	
1	THC23	SEA	HBC	THB23	SEA	+	THM23	+	HBC
	P1_23	+	+	P2_23	+	SEA	P3_23	SEA	SEA
	P4_23	SEA	+	P5_23	+	+			
2	THC27	SEA	4.2	THB27	SEA	+	THM27	4.2	+
	P1_27	SEA	4.2	P2_27	SEA	4.2	P3_27	SEA	4.2
	P1_L2_24	-	-	P2_L2_27	-	-			
3	THC38	3.7	SEA	THB38	3.7	+	THM38	SEA	+
	Gia đình 38 không có phôi sinh thiết								
4	THC	-	-	THB56	SEA	+	THM56	SEA	+
	P1_56	+	+	P2_56	SEA	SEA	P3_56	SEA	+
	P4_56	SEA	SEA						
5	THC	-	-	THB59	SEA	Cd26	THM59	SEA	+
	P1_59	+	+	P2_59	SEA	+	P3_59	SEA	+
6	THC	-	-	THB60	SEA	+	THM60	SEA	+
	P1_60	+	+	P2_60	SEA	SEA	P3_60	SEA	+
7	THC	-	-	THB62	SEA	+	THM62	SEA	+
	P1_62	+	+	P2_62	SEA	+			



3 phôi
đều bị bệnh

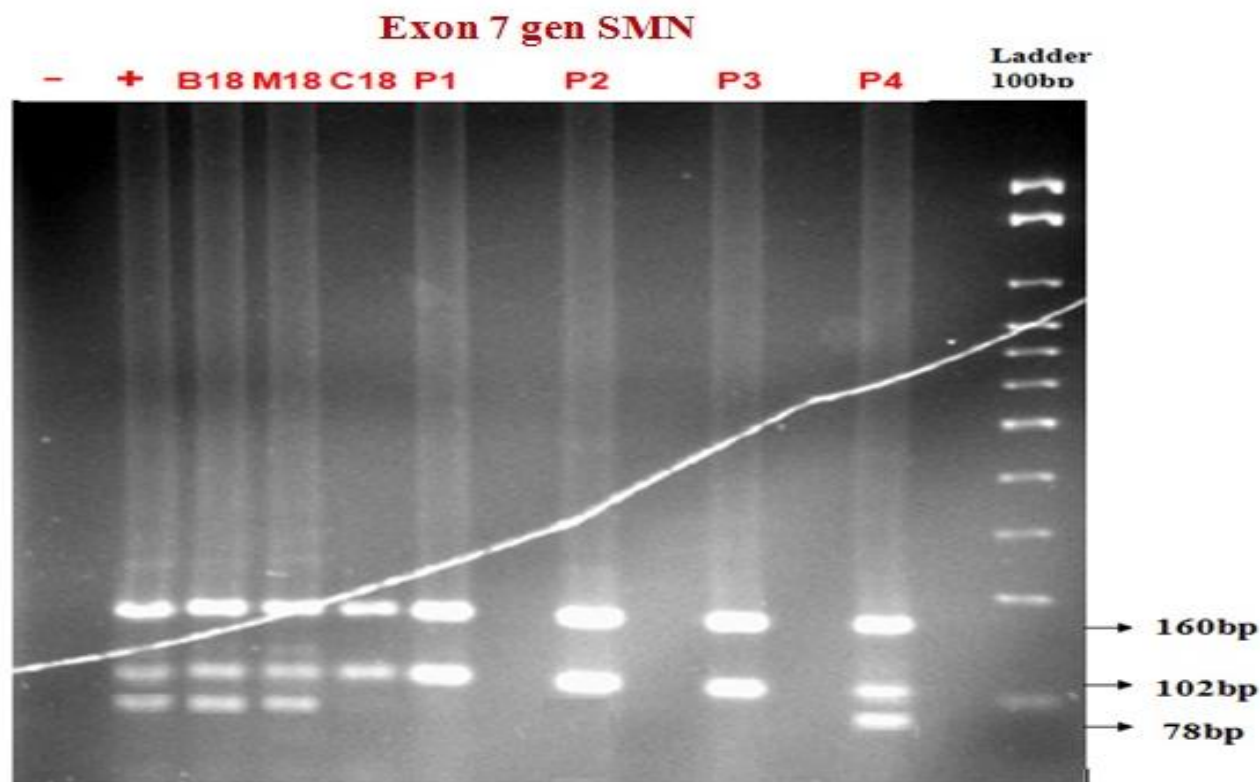
Kết quả chạy TripAssay của gia đình 27 (Đột biến 4.2 và SEA)



Kết quả TripAssay của gia đình 62 (SEA)

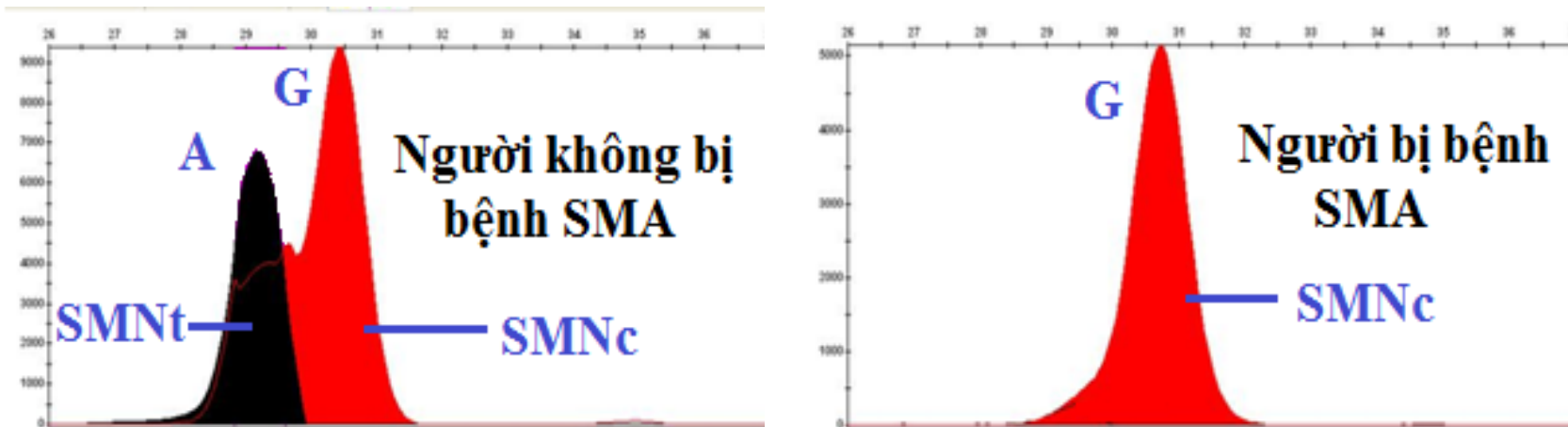
2.2. Ứng dụng quy trình chẩn đoán teo cơ tủy

Áp dụng chẩn đoán cho 3 gia đình bệnh nhân tự nguyện tham gia PGD bệnh loạn dưỡng cơ tủy



Kết quả điện di trên gel 3% sản phẩm nhân exon 7 gen SMN của gia đình SMA18 làm PGD.

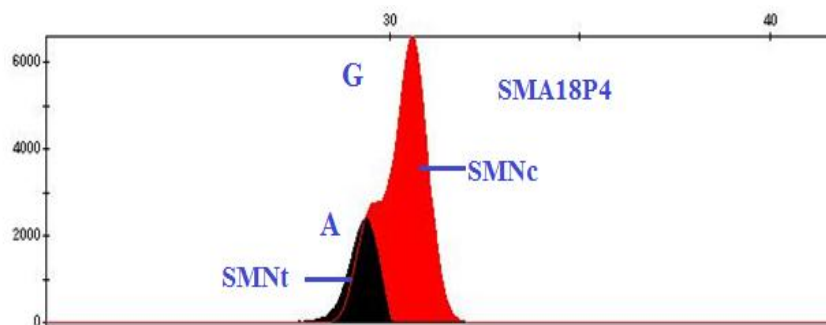
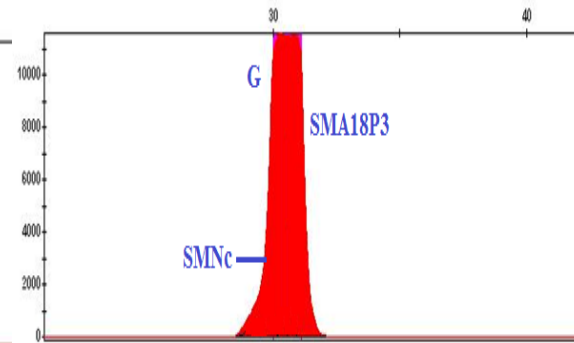
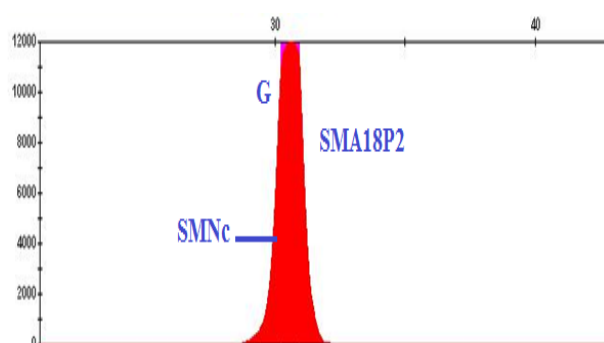
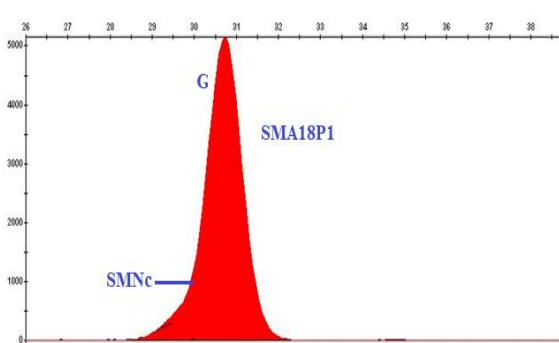
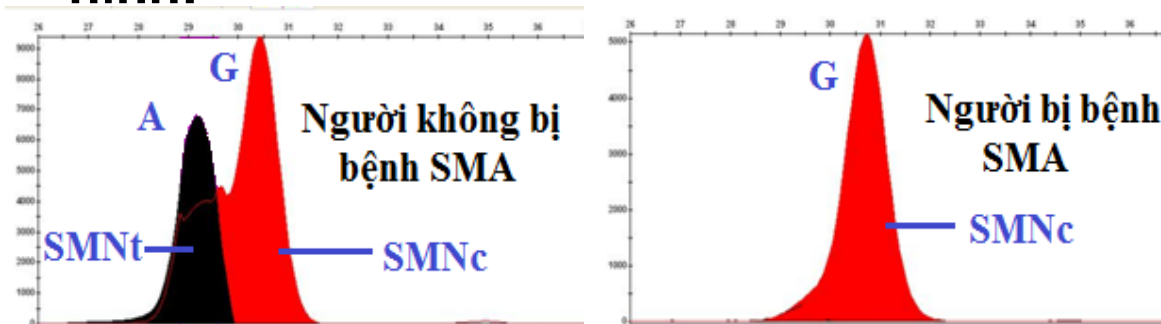
Ngoài ra, bên cạnh kỹ thuật PCR-RFLP, chúng tôi tiến hành kỹ thuật Minisequencing trong chẩn đoán trước chuyển phôi bệnh loạn dưỡng cơ tủy dựa trên sự khác biệt ở vị trí nucleotid 214 trên exon 7 gen SMNt là T, còn exon 7 gen SMNc là C



A: Người có cả exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc- người bình thường;

B: Người chỉ có exon 7 gen SMNc- người bị bệnh loạn dưỡng cơ tủy.

Kết quả minisequencing thể hiện trên hình:



Kết quả Minisequencing hoàn toàn phù hợp với kết quả PCR-RFLP

Kết quả 3 gia đình tham gia PGD bệnh teo cơ tủy.

STT	Số noãn	Số phôi	Số phôi sinh thiết	Phôi bình thường	Chuyển phôi	Kết quả
SMA1	10	8	5	4	1	Đã sinh
SMA2	5	3	Không phát triển			
SMA18	9	7	5	1	1	Đã sinh

- Dreesen và các cs. (Hà lan), 1998 25 phôi x 2 lần: được 1 trẻ.
- Daniels và các cs , Mỹ, Anh, Canada , 2001, 3/5 ca thành công, 6 trẻ.
- Ce'line Moutou và các cs., Pháp, 2003. 4 ca, không trẻ nào được sinh ra.
- Fiorentino F. và các cs, 2003: 3a ca nhưng không có ca nào mang thai.
- Girardet A. và các cs. , 2008: 1 cặp, 1 trẻ sinh ra.

KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình chẩn đoán gen trước chuyển phôi (Pre-Implantation Genetic Diagnosis) trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm.
 - Quy trình chẩn đoán bệnh Teo cơ tủy trước chuyển phôi trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.
 - Quy trình chẩn đoán bệnh Thalassemia trước chuyển phôi trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

KẾT LUẬN

2. Đã ứng dụng quy trình chẩn đoán gen trước chuyển phôi trong sàng lọc một số bệnh lý di truyền phổ biến ở Việt Nam trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm.
- Ứng dụng quy trình PGD bệnh teo cơ tủy cho 17 gia đình tham gia nghiên cứu, trong đó có 3 gia đình đã kích trứng, được 8 phôi, đã chuyển 2 phôi, đã sinh được 2 cháu bình thường.
 - Ứng dụng được quy trình PGD bệnh Thalassemia cho 80 gia đình, trong đó có 25 gia đình tham gia thụ tinh ống nghiệm và được 60 phôi. Chuyển phôi có 6 trường hợp đã sinh con khỏe mạnh và nhiều trường hợp đang mang thai, một số chuẩn bị chuyển phôi.

KIẾN NGHỊ

- Áp dụng quy trình kỹ thuật vào chẩn đoán trước chuyển phôi cho các cặp gia đình có con bị bệnh thalassemia, loạn dưỡng cơ tủy có nguyện vọng sinh thêm con bằng chẩn đoán tiền làm tổ.
- Phối hợp PGD với PGS để tăng hiệu quả IVF-ICSI.

TRÂN TRỌNG CẢM ƠN!