

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH NHANH HAI ĐỘT BIẾN TRÊN GEN β -GLOBIN CỦA BỆNH NHÂN CÓ HỘI CHỨNG THALASSEMIA

Dương Văn Cường¹, Nguyễn Tiến Minh¹, Phạm Minh Tuấn¹, Nguyễn Thị Ngọc Diệp¹, Hoàng Thanh Mộc², Dương Bá Trức², Nông Văn Hải¹, Đinh Duy Kháng¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT

Bệnh thiếu máu β -thalassemia là bệnh di truyền do đột biến trên gen β -globin. Ở khu vực Đông Nam Á, hai trong số các đột biến thường gặp là đột biến mất đoạn 4 cặp base CCCT tại mã bộ ba (codon-CD) 41/42 và đột biến thay thế Adenine (A) thành Thymine (T) tại codon 17. Để phát hiện nhanh 2 đột biến này trong các bệnh nhân Việt Nam, chúng tôi đã ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR sử dụng hệ thống Light Cycler 2.0 và hai cặp mồi dò (hybridization probes) đặc hiệu. DNA khuôn cho phản ứng Real-time PCR là 16 mẫu DNA tổng số được tách chiết từ 16 bệnh nhân có triệu chứng thiếu máu β -thalassemia và 3 mẫu đối chứng. Ngoại trừ 1 mẫu bị hỏng do DNA khuôn không đạt yêu cầu, kết quả phân tích bằng đường cong nhiệt độ nóng chảy (melting curves analysis) cho thấy có 4/15 mẫu mang đột biến dị hợp tử CD17, 5/15 mẫu mang đột biến đồng hợp tử CD41/42, 1/15 mẫu mang cả hai đột biến và 5 mẫu còn lại không mang đột biến tại 2 vị trí này. Từ kết quả này, chúng tôi kết luận đột biến tại codon 17 và 41/42 cũng có tần số cao ở bệnh nhân Việt Nam có triệu chứng thiếu máu Thalassemia.

Từ khóa: Bệnh di truyền, bệnh nhân Việt Nam, đột biến gen β -globin, Real-time PCR, β -thalassemia

MỞ ĐẦU

Thalassemia là một nhóm các rối loạn di truyền trong việc tổng hợp hemoglobin mà nguyên nhân là do các đột biến gen. Các đột biến này làm giảm hoặc ngăn cản hoàn toàn quá trình tổng hợp các chuỗi α hay β -globin là các thành phần cấu tạo nên phân tử hemoglobin. Các dạng β -thalassemia chủ yếu bị gây ra bởi các đột biến điểm và các đột biến mất hay thêm đoạn nhỏ xảy ra trên gen β -globin (Ho, Thein, 2000). Dựa trên mức độ ảnh hưởng của đột biến mà β -thalassemia được phân chia thành các dạng β^0 -thalassemia và β^+ -thalassemia. Đối với dạng β^0 -thalassemia thì bệnh nhân không còn khả năng tổng hợp chuỗi β -globin, còn đối với dạng β^+ -thalassemia thì khả năng này vẫn còn nhưng đã bị giảm sút ở nhiều mức độ (Weatherall, 2001).

Cho đến nay, đã có hơn 200 đột biến gây ra các dạng β -thalassemia được ghi nhận. Thông thường, ở mỗi quần thể người chỉ mang phổ biến khoảng 4 đến 5 đột biến chính (Weatherall, 2001). Ở khu vực Đông Nam Á, các đột biến này là -28 A $\rightarrow$ G, codon (CD) 17 A $\rightarrow$ T, CD 26 G $\rightarrow$ A, CD 41/42 -CTTT, CD71/72 + A, IVS2 + 654 C $\rightarrow$ T, ngoài ra còn một số đột biến khác.

Nhiều phương pháp để xác định các đột biến trên gen β -globin đã được phát triển bao gồm: lai oligonucleotide, phân tích sơ đồ cắt giới hạn endonuclease trên sản phẩm PCR, phương pháp Amplification Refractory Mutation System (ARMS), và phương pháp điện di biến tính gradient trên gel và giải trình tự trực tiếp. Tuy nhiên, các phương pháp này đều cần có thời gian từ vài giờ đến vài ngày. Việc chẩn đoán nhanh các đột biến này có nhiều ý nghĩa thực tiễn mà điển hình là trong trường hợp tư vấn bệnh di truyền trước sinh cho các cặp vợ chồng (Weatherall, Clegg, 2001). Xuất phát từ những lý do trên, trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu sử dụng phương pháp Real-time PCR để xác định đồng thời hai đột biến CD17 A $\rightarrow$ T và CD 41/42 -CTTT.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

DNA khuôn

Mười chín mẫu DNA tổng số do Bệnh viện Nhi Trung ương cung cấp, trong đó có một mẫu đối chứng âm, một mẫu đối chứng dương CD17, một mẫu đối chứng dương CD41/42 và 16 mẫu của bệnh nhân có triệu chứng thiếu máu β -thalassemia. Phân

ứng Real-time PCR sử dụng bộ sinh phẩm LightCycler Control Kit (Roche).

Mồi (primer) và mẫu dò (probe)

Cặp mồi (primers) được thiết kế nhờ phần mềm PC GENE để nhân đoạn DNA kích thước 587 bp có mang các vị trí đột biến CD17 và CD41/42.

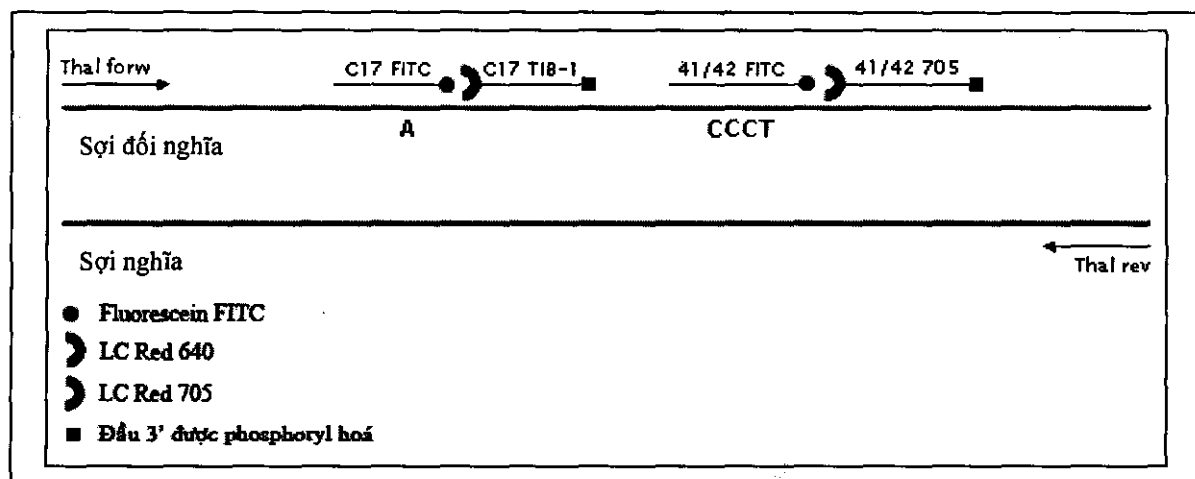
Hai cặp mẫu dò (Hybridization probes) được thiết kế để bắt cặp bổ sung hoàn toàn (100% match) với trình tự nucleotide kiểu wild type tại hai vùng đột biến trên sợi đối nghĩa của gen.

Cặp mẫu dò thứ nhất dùng để phát hiện đột biến CD17. Mẫu dò C17 Fluorescein isothiocyanate (FITC) đóng vai trò là mẫu dò cho (donor probe) được gắn chất phát huỳnh quang (FITC) ở đầu 3'. Mẫu dò C17 TIB-1 đóng vai trò mẫu dò nhận (acceptor probe) được gắn chất cảm ứng huỳnh

quang LC Red 640 ở đầu 5'. Khi cặp mẫu dò này được bắt cặp bổ sung đúng vị trí trên gen β -globin thì FITC sẽ kích thích LC Red 640 phát huỳnh quang ở bước sóng 640 nm. Khoảng cách giữa hai mẫu dò khi chúng bắt cặp trên gen là 1 nucleotide.

Cặp mẫu dò thứ hai dùng để phát hiện đột biến CD41/42. Tương tự như cặp thứ nhất, mẫu dò 41/42 FITC có gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 3' và mẫu dò 41/42 705 có gắn chất cảm ứng huỳnh quang LC Red 705. Khi cặp mẫu dò này hoạt động sẽ phát huỳnh quang ở bước sóng 705 nm. Khoảng cách giữa hai mẫu dò này khi chúng bắt cặp trên gen cũng là 1 nucleotide.

Sơ đồ thiết kế thí nghiệm được mô tả trên hình 1; trình tự cặp mồi và hai cặp mẫu dò ở bảng 1; trình tự gen β -globin bình thường và đột biến theo lý thuyết ở bảng 2.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi và hai cặp mẫu dò.

Mồi xuôi (thal forw)	5'- GCTGTCATCACTTAGACCTCA -3'
Mồi ngược (thal rev)	5'- CACAGTGCAGCTCACTCAG -3'
C17 FITC	5'- TGGGGCAAGGTGAACGTGG -3'
C17 TIB-1	5'- TGAAGTTGGTGGTGAAGGCCCTGGG -3'
41/42 FITC	5'- CCCTTAGGCTGCTGGTGGTC -3'
41/42 705	5'- ACCCTTGGACCCAGAGGTTCTT -3'

Bảng 2. Trình tự gen β -globin bình thường và đột biến theo lý thuyết.

Gen β -globin bình thường	311 GTGGGGCAAG ...ACCCCTTAGGC 490
Gen β -globin mang đột biến CD17A $\rightarrow$ T	311 GTGGGGCTAG ...ACCCCTTAGGC 490
Gen β -globin mang đột biến CD41/42 - CCCT	311 GTGGGGCAAG ...A—TAGGC 486
Gen β -globin mang cả hai đột biến	311 GTGGGGCTAG ...A—TAGGC 486

Chương trình phản ứng

Phản ứng Real-time PCR được thực hiện 2 lần, lần đầu 7 mẫu và lần sau 9 mẫu. Mỗi phản ứng tiến hành trong tổng thể tích 20 μ l, bao gồm 1X LC Faststart Master Mix, khoảng 0,2 μ M DNA khuôn, 3 mM Mg^{2+} , 0,5 μ M cho một mỗi và 0,15 μ M mỗi mẫu dò. Chương trình phản ứng Real-time PCR gồm 1 bước biến tính ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 45 chu kỳ (95°C trong 5 giây, 58°C trong 10 giây và 72°C trong 24 giây) với tốc độ gia nhiệt (temperature ramp) là 20°C/s. Trong quá trình khuếch đại này, cường độ tín hiệu huỳnh quang phát ra được đo tại điểm cuối pha gắn mỗi của mỗi chu kỳ. Tiếp theo là giai đoạn phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy (melting curves analysis) bao gồm hai bước: Hạ nhiệt độ xuống 45°C trong 2 phút để đạt điều kiện tối đa cho việc gắn các mẫu dò vào mạch đích, sau đó nâng dần nhiệt độ lên đến 85°C với tốc độ gia nhiệt là 0,4°C/s. Tín hiệu huỳnh quang phát ra được đo liên tục ở cả hai bước sóng 640 nm và 705 nm. Cuối cùng là giai đoạn làm mát hệ thống (cooling) tại 40°C trong 30 giây.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định nhiệt độ nóng chảy của các mẫu dò và chuẩn hóa phản ứng Real-time PCR

Đầu tiên, chúng tôi dùng phần mềm TM Utility để ước lượng nhiệt độ nóng chảy của các mẫu dò. Ở điều kiện 3,0 mM Mg^{2+} và nồng độ oligonucleotide là 0,2 μ M thì nhiệt độ nóng chảy của hai cặp mẫu dò CD17 và CD41/42 được xác định lần lượt là 66,66°C và 67,22°C.

Phản ứng Real-time PCR được tiêu chuẩn hóa sau hai lượt chạy kiểm tra. Lượt chạy kiểm tra thứ nhất đã thử nghiệm thành công sự hoạt động của cặp mỗi và có thể đánh giá sơ lược về chất lượng DNA khuôn. Mẫu DNA số 2 được lựa chọn ngẫu nhiên làm khuôn cho phản ứng này. Lượt chạy kiểm tra thứ hai với một mẫu đối chứng dương CD17 và một mẫu đối chứng dương CD41/42 đã thử nghiệm thành

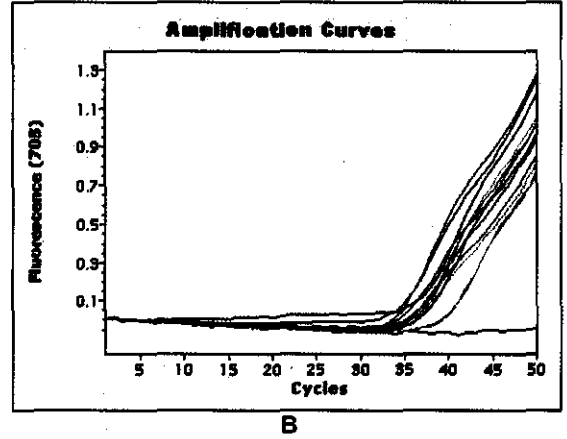
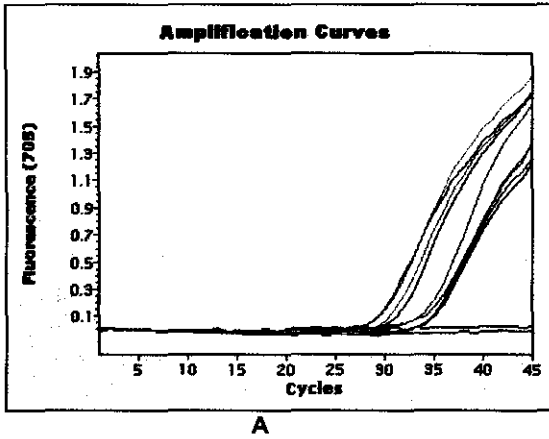
công sự hoạt động của hai cặp mẫu dò. Từ hai lượt chạy kiểm tra chúng tôi xác định được đầy đủ các điều kiện chuẩn cho phản ứng như đã trình bày trong phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu, với kết quả sự khác biệt các đỉnh trong phân tích melting curves là rõ ràng.

Xác định các đột biến trên gen beta-globin bằng Real-time PCR

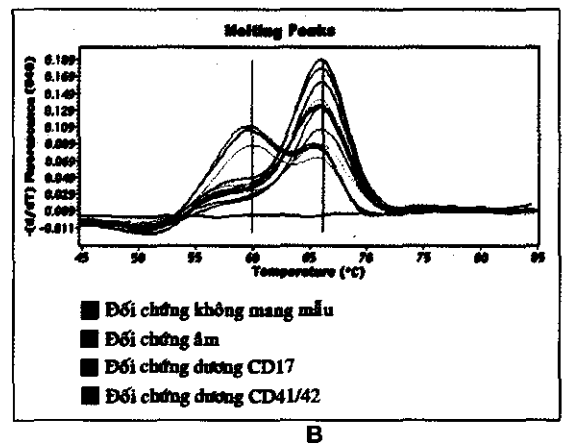
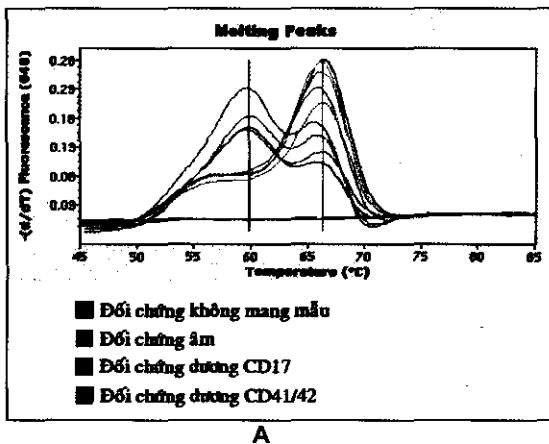
Mười sáu mẫu DNA của bệnh nhân nghi mắc β -thalassemia được phân tích bằng 2 lần chạy Real-time PCR. Lượt chạy chính thức thứ nhất được tiến hành với 7 mẫu và lượt chạy thứ hai là 9 mẫu còn lại.

Hình 2 là kết quả tín hiệu huỳnh quang đo ở bước sóng 705 nm của phân tích định lượng tuyệt đối (Absolute Quantification). Kết quả này cho thấy các mẫu đã được khuếch đại tốt và đồng đều trong cả hai lượt chạy, kết quả này cũng xác định hoạt động của hai cặp mẫu dò đã được bảo đảm. Điều này được thể hiện ở cường độ tín hiệu huỳnh quang tối đa khá cao lên tới 1,9 ở lượt chạy thứ nhất và 1,3 ở lượt chạy thứ hai. Điểm vượt ngưỡng tín hiệu huỳnh quang cơ bản (crossing point) tập trung đồng đều và ổn định trong khoảng từ chu kỳ thứ 28 đến 32. Riêng mẫu số 3 trong lượt chạy thứ nhất (đường biểu diễn mẫu đỏ) không khuếch đại được. Mẫu này sau đó được xác định là do chất lượng DNA không đạt tiêu chuẩn.

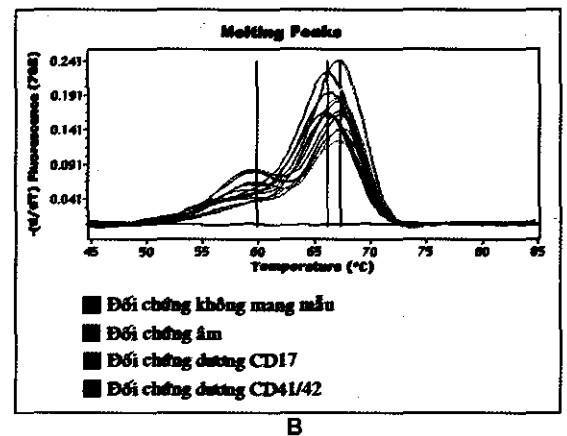
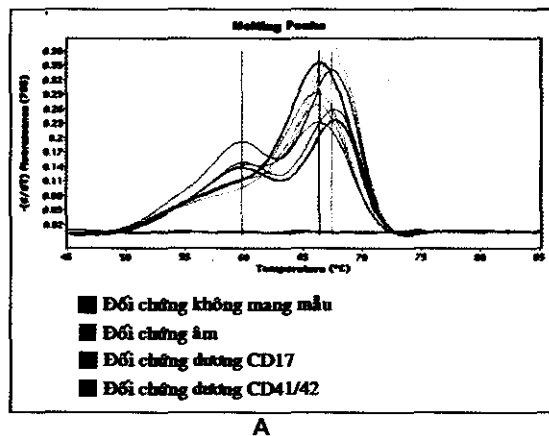
Hình 3 là đồ thị biểu diễn tín hiệu huỳnh quang trình bày dưới dạng đỉnh nóng chảy của phân tích gọi ra điểm nóng chảy (TM Calling) tại bước sóng 640 nm. Đây là bước sóng do hoạt động của cặp mẫu dò CD17 phát ra. Kết quả tại bước sóng này dùng để kết luận về đột biến CD17 nhưng không có ý nghĩa với đột biến CD41/42. Cả hai lượt chạy đều cho kết quả tốt với hai đỉnh khác biệt nhau rõ ràng. Đỉnh thứ nhất tại nhiệt độ 66,5°C là đỉnh của mẫu có allele kiểu wild type. Nhiệt độ này đúng với giá trị đã dự đoán trên lý thuyết. Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương CD41/42 xuất hiện 1 đỉnh duy nhất tại đây.



Hình 2. Kết quả phân tích định lượng tuyệt đối tại bước sóng 705 nm. Lướt chạy thứ nhất với 7 mẫu (A). Lướt chạy thứ hai với 9 mẫu (B).



Hình 3. Kết quả phân tích đỉnh nóng chảy (Melting Peaks) tại bước sóng 640 nm. Lướt chạy thứ nhất với 7 mẫu (A). Lướt chạy thứ hai với 9 mẫu (B).



Hình 4. Phân tích Melting Peaks tại bước sóng 705 nm. Lướt chạy thứ nhất với 7 mẫu (A). Lướt chạy thứ hai với 9 mẫu (B).

Đỉnh thứ hai tại nhiệt độ 59,9°C là đỉnh tương ứng của các allele đột biến. Mẫu đối chứng dương CD17 xuất hiện cả hai đỉnh vì đây là mẫu dị hợp tử.

Lượt chạy thứ nhất xác định được 3 mẫu dị hợp tử CD17. Mẫu số 3 (màu đỏ) không kết luận được vì đây là mẫu hồng. Lượt chạy thứ hai xác định được thêm hai mẫu và cũng là dị hợp tử CD17. Như vậy, tổng cộng có 5 trường hợp bệnh nhân mang đột biến CD17. Hình 4 là đồ thị biểu diễn tín hiệu huỳnh quang trình bày dưới dạng Melting Peaks của phân tích TM Calling tại bước sóng 705 nm. Vì bước sóng 705 nm bao trùm lên bước sóng 640 nm nên kết quả thu được ở bước sóng này có ý nghĩa với cả hai đột biến.

Trên đồ thị xuất hiện ba đỉnh tại các nhiệt độ 59,9°C, 66,1°C và 67,3°C. Mẫu đối chứng dương dị hợp tử CD17 có hai đỉnh 59,9°C và 67,3°C. Mẫu đối chứng dương CD41/42 có một đỉnh 66,1°C, còn mẫu đối chứng âm có một đỉnh 67,3°C. Trong phản ứng này, nhiệt độ của mẫu đối chứng âm không giống với nhiệt độ này (66,5°C) khi phân tích tại bước sóng 640 nm, lý do vì đây là kết quả hoạt động của cặp mẫu dò CD41/42 chứ không phải là kết quả hoạt động của cặp mẫu dò CD17. Nhiệt độ của mẫu đối chứng âm CD41/42 vào khoảng 67°C là đúng với tính toán lý thuyết.

Đỉnh thứ nhất tại nhiệt độ 59,9°C là do hoạt động của cặp mẫu dò CD17 trên các allele mang đột biến. Kết quả này, 3 mẫu dị hợp tử CD17 ở lượt chạy thứ nhất và 2 mẫu dị hợp tử CD17 ở lượt chạy thứ hai, đã xác nhận lại chính xác kết quả của phân tích đột biến CD17 ở bước sóng 640 nm.

Đỉnh thứ hai tại nhiệt độ 66,1°C có tất cả 6 mẫu, 3 mẫu ở lượt chạy thứ nhất và 3 mẫu ở lượt chạy thứ hai. Năm mẫu trong số này là đột biến đồng hợp tử vì chỉ có 1 đỉnh tại 66,1°C. Đặc biệt, chúng tôi thu được một mẫu với 2 đỉnh tại 59,9°C và 66,1°C. Mẫu này có thể là dị hợp tử với mỗi allele mang 1 đột biến tương ứng, hoặc đồng hợp tử mang cả 2 đột biến, hoặc dị hợp tử trong đó 1 allele mang cả 2 đột biến và allele còn lại không mang đột biến nào.

Đỉnh thứ ba tại nhiệt độ 67,3°C có tổng cộng 5 mẫu sau cả hai lượt chạy. Đây là những mẫu không mang hai đột biến CD17 và CD41/42.

Thời gian để hoàn tất một phản ứng Real-time PCR 45 chu kỳ cùng một phân tích melting curves mất 53 phút. Nếu so với phản ứng PCR bình thường

kèm theo một công đoạn điện di sản phẩm trên gel bắt buộc phải có (ước chừng 4 h) thì Real-time PCR nhanh hơn rất nhiều. Điều này rất có ý nghĩa một khi kỹ thuật này được áp dụng vào thực tiễn.

KẾT LUẬN

Phản ứng Real-time PCR đã được áp dụng thành công để sàng lọc nhanh 2 đột biến CD17 và CD41/42 trên gen β -globin ở người Việt Nam. Trong số 16 mẫu được phân tích, trừ 1 mẫu hồng, có 4 trường hợp mang đột biến dị hợp tử CD17, 5 trường hợp mang đột biến đồng hợp tử CD41/42, 1 trường hợp mang cả hai đột biến và 5 trường hợp còn lại không mang hai đột biến này. Như vậy, hai đột biến CD17 và CD41/42 cũng có tần số cao trong quần thể người Việt Nam. Từ kết quả này, hướng nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi là mở rộng phạm vi sàng lọc các đột biến bằng cách tái thiết kế các cặp mẫu dò.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn tới Ban Giám đốc Bệnh viện Nhi Trung ương đã tạo mọi điều kiện để công trình này được hoàn thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Herrmann MG, Dobrowolski SF, Wittwer CT (2000) Rapid β -globin genotyping by multiplexing probe melting temperature and color. *Clin Chem* 46: 425-428.
- Ho PJ, Thein SL (2000) Gene regulation and deregulation: a β -globin perspective. *Blood Rev* 14: 78-93.
- Mastropietro F, Modiano G, Cappabianca M, Foglietta E, D'Asero C, Mezzabotta M, *et al* (2002) Factors regulating Hb F synthesis in thalassemic diseases. *BMC Blood Disord* 6: 2-9.
- Weatherall DJ (2001) Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassemias. *Nat Rev Genet* 2: 245-255.
- Weatherall DJ, Clegg JB (2001) *The thalassaemia syndromes*, 4th ed. Oxford: Blackwell Science.
- Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M, Malamis G, Kanavakis E (2003) Rapid screening of multiple Beta-globin gene mutations by Real-time PCR on the LightCycler: Application to carrier screening and prenatal diagnosis of Thalassemia syndromes. *Clin Chem* 49:5 769-776.

APPLICATION OF REAL-TIME PCR FOR RAPID DETECTION OF TWO β -GLOBIN GENE MUTATIONS FROM THE PATIENTS WITH THALASSEMIA SYNDROMES

Duong Van Cuong¹, Nguyen Tien Minh¹, Pham Minh Tuan¹, Nguyen Thi Ngoc Diep¹, Hoang Thanh Moc², Duong Ba Truc², Nong Van Hai¹, Dinh Duy Khang^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology*

²*National Institute of Pediatrics*

SUMMARY

Two mutations that have been found very frequently in Asian β -thalassemia patients were 4 base pair-TCTT deletion in codon 41 - 42 and A to T substitution in codon 17. In order to quickly detect these mutations in Vietnamese patients, we applied a Real-time PCR on the LightCycler 2.0 system with two sets of hybridization probe, which are specific for these mutations. Sixteen DNA samples extracted from blood of the children with β -thalassemia syndromes were used as templates for mutation detection by using LightCycler Kit. The results obtained by Melting Curve Analysis showed that of these DNA samples, except one damaged during DNA extraction, four samples carried CD17 heterozygous mutation, five samples carried CD41/42 homozygous mutation, one sample carried both of the mutations and the last five samples did not carry any mutations. From these results, we concluded that frequency of two mutations at 17 and 41/42 codons is also high in the Vietnamese β -thalassemia patients.

Keywords: *β -thalassemia, β -globin, genetic disease, Real-time PCR, hybridization probes, Vietnamese patients*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7560339; Fax: 84-4-8363144; E-mail: khangvspt@ibt.ac.vn