

Kết quả bước đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy tại Học viện Quân y

Nguyễn Đình Tảo^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Nga¹, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Thị Hồng Vân²,
Triệu Tiên Sang¹, Nguyễn Thanh Tùng¹, Nguyễn Ngọc Khánh³

¹Học viện Quân y

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Viện Nhi Trung ương

Ngày nhận bài 6/9/2019; ngày chuyển phản biện 9/9/2019; ngày nhận phản biện 7/10/2019; ngày chấp nhận đăng 30/10/2019

Tóm tắt:

Từ tháng 2/2015 tới 11/2019, Học viện Quân y đã nghiên cứu xây dựng và áp dụng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh teo cơ tủy (spinal muscular atrophy - SMA). Nghiên cứu bước đầu ứng dụng quy trình này được thực hiện trên 6 cặp gia đình mang đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA. Máu ngoại vi bố, mẹ được tách ADN, sinh thiết 1-2 tế bào từ các phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 hoặc ngày 5 của các cặp gia đình này, nhân toàn bộ gen các mẫu phôi sinh thiết, phát hiện đột biến gây bệnh trên máu bố mẹ và phôi bằng phương pháp PCR-RFLP, chọn phôi lành chuyển vào người mẹ để sinh ra trẻ khỏe mạnh.

Từ khóa: bệnh teo cơ tủy, chẩn đoán trước chuyển phôi, mất đồng hợp exon 7 gen SMNt, tế bào phôi.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

SMA là bệnh thần kinh cơ di truyền lặn do đột biến gen SMNt nằm trên nhiễm sắc thể số 5. Trong đó, 95% bệnh nhân bị bệnh SMA do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt, 5% do đột biến điểm trên gen SMNt. Tỷ lệ mắc bệnh SMA là 1/10.000 trẻ đẻ sống và tần suất người mang gen trong cộng đồng là 1/50 [1, 2]. Trẻ bị bệnh SMA thường mất sớm ở lứa tuổi đi học do những biến chứng suy hô hấp. Hiện nay, phương pháp điều trị bệnh SMA rất hạn chế và giá thành quá cao đối với các gia đình có con bị bệnh trên thế giới, còn ở Việt Nam hiện chưa có thuốc điều trị mà chỉ điều trị triệu chứng là chủ yếu nên mỗi trẻ em mắc bệnh SMA ra đời là gánh nặng cho gia đình cả về tâm lý và tài chính [3]. Do vậy, vấn đề dự phòng bệnh này là rất cần thiết. Trong đó, phương pháp chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả nhất, bởi có thể chọn được phôi lành ngay từ trước khi cấy phôi vào tử cung của người mẹ [4-9].

Sau khi xây dựng được quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA, chúng tôi bước đầu ứng dụng vào chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi cho các gia đình có bố mẹ mang gen đột biến gây bệnh SMA đã sinh con bị bệnh và có nguyện vọng sinh con khỏe mạnh tại Học viện Quân y. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu đánh giá kết quả ban đầu ứng dụng quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA.

*Tác giả liên hệ: Email: dinhtao1955@gmail.com

Đối tượng, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

19 mẫu máu của 6 gia đình gồm bố, mẹ là người mang gen và con bị bệnh SMA (con bị bệnh SMA đã được Viện Nhi trung ương chẩn đoán do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt được sử dụng làm đối chứng), 33 mẫu phôi sinh thiết từ các phôi thụ tinh trong ống nghiệm phát triển đến ngày 3 và ngày 5 của các gia đình này (trong đó có gia đình SMA18 làm chẩn đoán di truyền 2 lần: lần 1 đã sinh được 1 bé khỏe mạnh, lần 2 đã chuyển phôi, đang mang thai chờ sinh). Bố, mẹ lấy 5 ml máu cho vào ống chống đông bằng EDTA, phôi ngày 3 sinh thiết 1-2 tế bào và phôi ngày 5 sinh thiết 3-5 tế bào rửa nhiều lần bằng PBS1X đặt trong ống 0,2 ml.

Hóa chất

- Hóa chất nhân toàn bộ gen: bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification của Hãng Sigma.
- Hóa chất cho PCR-RFLP: PCR Reaction mix, DNA Polymerase, primers; enzym *HinfI*.
- Thiết bị: máy ly tâm văng, kính hiển vi soi nổi 32X, buồng thao tác PCR(Mỹ), máy PCR ABI 9700 (Applied biosystem), hốt ủ hóa chất (Hàn Quốc).

Initial result of using preimplantation genetic diagnosis protocol for spinal muscular atrophy disease in the Military Medical University

Dinh Tao Nguyen^{1*}, Thi Thanh Nga Nguyen¹,
Van Khoa Tran¹, Thi Hong Van Nguyen²,
Tien Sang Trieu¹, Thanh Tung Nguyen¹, Ngoc Khanh Nguyen³

¹Military Medical University

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³National Hospital of Pediatrics

Received 6 September 2019; accepted 30 October 2019

Abstract:

The preimplantation genetic diagnosis protocol for spinal muscular atrophy disease in the Military Medical University was successfully built and applied from 2/2015 to 11/2019. The study was carried out on 6 couples who are carriers of the disease. DNA of carriers were isolated from the whole blood. One or two blastomere(s) was/were biopsied from 3-day or 5-day embryos of these couples, and then the whole genome of biopsied blastomeres was duplicated. PCR-RFLP and minisequencing methods were performed to detect mutations and select unaffected embryos for transfer.

Keywords: blastomere, homozygous deletions in exon 7 of the survival motor neurone (SMN) gene, preimplantation genetic diagnosis, spinal muscular atrophy.

Classification number: 3.2

Phương pháp nghiên cứu

Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA từ mẫu máu toàn phần của bố mẹ: thu mẫu máu toàn phần từ 19 người tham gia nghiên cứu, tách ADN, tiến hành kỹ thuật PCR-RFLP được xây dựng do nhóm nghiên cứu của đề tài thực hiện để phát hiện đột biến gen SMNt gây bệnh SMA.

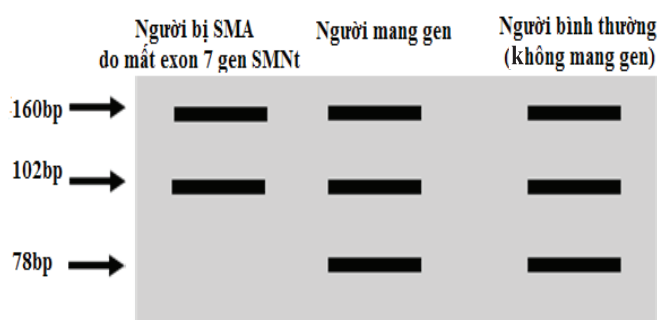
Kỹ thuật PCR-RFLP:

+ Trình tự mỗi nhân exon 7 gen SMNt:

F-5'-cttccttttattttccttacaggatt-3'

R-5'-gtaggatgtagattaaccttttatct-3'

+ Chu trình nhiệt: 96°C trong 5 phút; [94°C trong 1 phút, 54°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút] x 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút. Ủ sản phẩm PCR với enzym *HinfI* để phân biệt exon 7 SMNt với exon 7 SMNc. Điện di gel agarose 3% kiểm tra kết quả (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh minh họa kết quả điện di trên gel agarose 3% của exon 7 SMNt sau khi ủ với enzym *HinfI*.

Tuy nhiên, với việc chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA thì điều đó vẫn chưa đủ vì SMA là bệnh di truyền lặn, nên nếu trong quá trình sinh thiết phôi hoặc thao tác kỹ thuật không tốt có thể bị nhiễm ADN từ ngoài vào (bố, mẹ hoặc kỹ thuật viên thao tác) thì sẽ chẩn đoán phôi bệnh thành phôi thường, dẫn đến hậu quả cấy chuyển phôi bệnh. Để tránh nhược điểm đó, chúng tôi lựa chọn 3 polymorphic marker D5S1977, D5S629, D5S641 để đánh giá nhiễm ADN ngoại lai bởi chúng có tính đa hình và đặc trưng cho cá thể cao nên có thể dễ dàng phân tích phôi sinh thiết được có tính di truyền từ bố và mẹ hay không. Chọn ra loại polymorphic marker dị hợp với bố, mẹ.

Các bước phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA từ tế bào phôi sinh thiết của các gia đình: nuôi phôi ngày 3 hoặc ngày 5 thì tiến hành sinh thiết; sau đó nhân toàn bộ bộ gen từ các mẫu tế bào phôi sinh thiết theo các bước hướng dẫn của bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (Hãng Sigma); lấy sản phẩm sau khi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen làm mẫu để thực hiện hai bước sau:

+ Thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA.

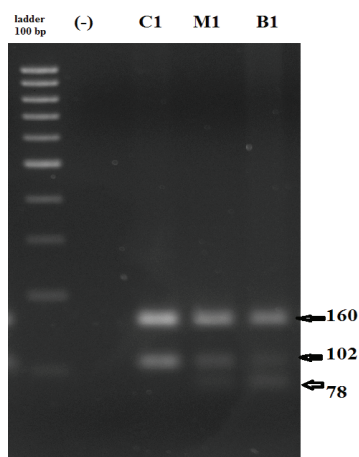
+ Nhân polymorphic marker đã chọn (đã biết dị hợp với bố mẹ) để đánh giá khả năng nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu tế bào phôi sinh thiết.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện bằng kỹ thuật RFLP-PCR và STR cho tất cả các gia đình nghiên cứu để chẩn đoán đột biến trên phôi. Dưới đây xin minh họa kết quả cụ thể của gia đình SMA1. Các gia đình khác có kết quả tương tự được thống kê ở bảng 1.

Kết quả phát hiện đột biến gen SMNt từ máu toàn phần của bố mẹ

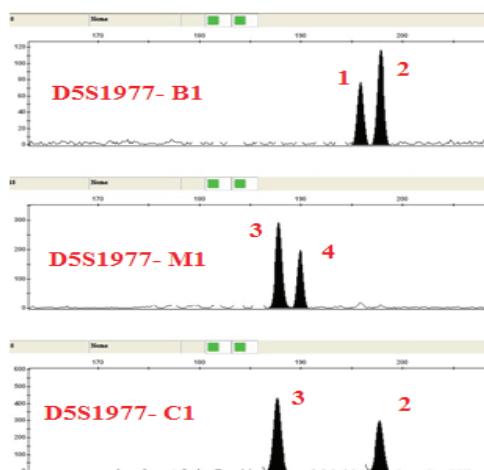
Kết quả phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA: kết quả phát hiện đột biến mất exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA bằng kỹ thuật PCR-RFLP của gia đình SMA1 thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 3% sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt từ máu toàn phần gia đình SMA1. B1: bố bệnh nhân 1; M1: mẹ bệnh nhân 1; C1: bệnh nhân 1.

Kết quả trên hình 2 cho thấy, con C1 chỉ có hai băng của exon 7 gen SMNc nên là người mắc bệnh SMA. Bố B1 và mẹ M1 đều có ba băng, nghĩa là họ có cả exon 7 gen SMNt và exon 7 gen SMNc, điều đó có nghĩa họ là người mang gen.

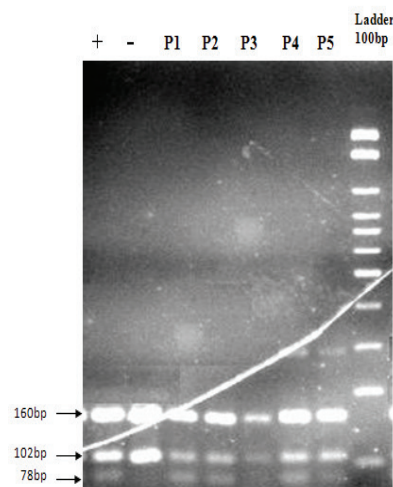
Kết quả chọn polymorphic marker dị hợp với bố, mẹ gia đình SMA1: nhân 3 polymorphic marker D5S629, D5S641, D5S1977 từ máu toàn phần gia đình SMA1. Kết quả B1 và M1 có sản phẩm nhân D5S1977 dị hợp, thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Kết quả nhân D5S1977 từ máu ngoại vi của gia đình SMA1. B1: bố 1 dị hợp với hai alen 1 và 2; M1: mẹ 1 dị hợp với hai alen 3 và 4; C1 di truyền nhận alen 3 của mẹ và alen 2 của bố.

Kết quả tiến hành trên tế bào phôi sinh thiết

Kết quả nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA: gia đình SMA1 đã sinh thiết được 5 mẫu tế bào phôi ngày 3. Tiến hành nhân toàn bộ bộ gen theo bộ kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification của Hãng Sigma. Sau đó, tiến hành nhân gen phát hiện đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt bằng kỹ thuật PCR-RFLP, kết quả thể hiện ở hình 4.



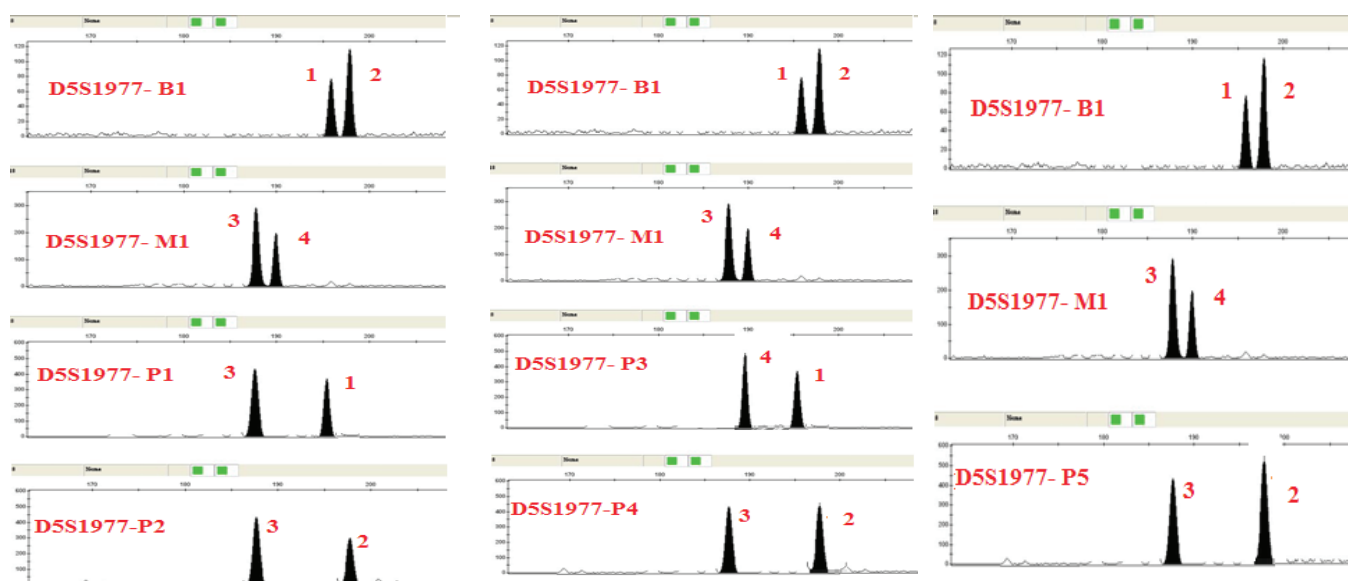
Hình 4. Kết quả điện di trên gel 3% sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt từ tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA1. (+): mẫu đối chứng dương là người không bị bệnh; (-): mẫu chứng âm là người bị bệnh; P1, P2, P4, P5: phôi 1, 2, 4, 5 có cả exon 7 gen SMNt và SMNc-phôi lành; P3: phôi 3 chỉ có exon 7 gen SMNc-phôi bệnh.

Hình 4 cho thấy, trong 5 phôi của gia đình SMA1 có phôi 3 chỉ có hai băng tương ứng kích thước 160 bp và 102 bp của exon 7 gen SMNc, nghĩa là phôi 3 bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt nên sẽ bị bệnh SMA, còn bốn phôi còn lại (phôi 1, 2, 4, 5) có xuất hiện 3 băng nên có mặt exon 7 gen SMNt, do đó phôi sẽ phát triển bình thường, không bị bệnh SMA. Vì vậy, có phôi 1, 2, 4, 5 đủ tiêu chuẩn để chuyển vào tử cung mẹ.

Đánh giá nhiễm ADN ngoại lai của các mẫu tế bào phôi sinh thiết: nhân D5S1977 (đã chọn) từ mẫu các tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA1, kết quả thể hiện ở hình 5.

Hình 5 cho thấy, phôi 1 được di truyền alen 3 của mẹ và 1 của bố, phôi 2 được di truyền alen 3 của mẹ và 2 của bố, phôi 3 được di truyền alen 4 của mẹ và alen 1 của bố, phôi 4 được di truyền alen 3 của mẹ và alen 2 của bố, phôi 5 được di truyền alen 3 của mẹ và 2 của bố. Như vậy, cả 5 phôi sinh thiết được đều không bị nhiễm ADN ngoại lai. Do vậy, chọn cấy chuyển 2 phôi không bị bệnh SMA vào tử cung mẹ, kết quả M1 đã sinh được 1 em bé khỏe mạnh. Em bé sau khi ra đời được dùng mẫu dây rốn để kiểm tra lại gen SMN cho thấy bé sinh ra hoàn toàn không bị bệnh.

Thực hiện các bước tương tự với các gia đình còn lại, thu được kết quả thống kê trong bảng 1. Các gia đình SMA1, SMA2, SMA18, SMA19 được chuyển phôi sau ngày 3 (các em bé được



Hình 5. Kết quả nhân D5S1977 từ 5 mẫu tế bào phôi của gia đình SMA1. B1: bố 1 dị hợp với hai alen 1 và 2; M1: mẹ 1 dị hợp với hai alen 3 và 4; P1: phôi 1; P2: phôi 2; P3: phôi 3; P4: phôi 4; P5: phôi 5.

sinh ra khỏe mạnh, trừ gia đình SMA2 phôi không phát triển); các gia đình SMA395, SMA18_2, SMA007 được chuyển phôi sau ngày 5 (hiện đang chờ sinh).

Các gia đình đã sinh được lấy mẫu tế bào dây rốn và thực hiện lại kỹ thuật chẩn đoán trên mẫu sau sinh và cho kết quả các bé sinh ra đều không bị bệnh. Kết quả trùng khớp với mẫu phôi được chẩn đoán trước đó. Trong đó, gia đình SMA18 làm lần thứ nhất sinh được 1 bé gái khỏe mạnh; lần 2 có 6 phôi ngày 5 và chẩn đoán có 3 phôi bình thường, chuyển 1 phôi khỏe mạnh, đang chờ sinh.

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi của các gia đình tham gia nghiên cứu.

STT	Số noãn	Phôi ngày 3	Phôi ngày 5	Phôi bình thường	Số tế bào phôi chuyển	Kết quả
SMA1	10	5		4	2	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA2	5			Phôi không phát triển		
SMA18 (lần thứ nhất)	9	4		1	1	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA19	8	3		2	2	Sinh 1 em bé khỏe mạnh
SMA395	15	13	10	5	2	Đang chờ sinh
SMA18_2 (gia đình SMA18 làm lần thứ 2)	12	9	6	3	1	Đang chờ sinh
SMA007	8	8	5	1	1	Đang chờ sinh

Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi bệnh SMA trên các phôi thụ tinh trong ống nghiệm tại Học viện Quân y và xây dựng được quy

trình chẩn đoán bệnh SMA trên mẫu máu sau sinh.

Từ kết quả của nghiên cứu này cũng mở ra hướng áp dụng chẩn đoán trước chuyển phôi của nhiều bệnh di truyền khác trên các gia đình có tiền sử sinh con bị bệnh di truyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.M. Brzustowicz, T. Lehner, L.H. Castilla, et al. (1990), "Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3", *Nature*, **344**, pp.540-541.
- [2] L. Burglen, S. Lefebvre, O. Clermont, et al. (1996), "Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene", *Genomics*, **32**, pp.479-482.
- [3] Novartis (2019), *AveXis receives FDA approval for Zolgensma®, the first and only gene therapy for pediatric patients with spinal muscular atrophy (SMA)*, <https://www.novartis.com/news/media-releases/avexis-receives-fda-approval-zolgensma-first-and-only-gene-therapy-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-sma>.
- [4] G. Daniels, et al. (2001), "Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy", *Mol. Hum. Reprod.*, **7**(10), pp.995-1000.
- [5] J.C. Dreesen, et al. (1998), "Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy", *Mol. Hum. Reprod.*, **4**(9), pp.881-885.
- [6] F. Fiorentino, et al. (2003), "The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders", *Mol. Hum. Reprod.*, **9**(7), pp.399-410.
- [7] A. Girardet, et al. (2008), "Efficient strategies for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy", *Fertility and Sterility*, **90**(2), pp.443.e7-443.e12.
- [8] C. Moutou, et al. (2001), "Allele - specific amplification for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy", *Prenatal Diagnosis*, **21**, pp.498-503.
- [9] C. Moutou, et al. (2003), "Duplex PCR for Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy", *Prenatal Diagnosis*, **23**, pp.685-689.