

## XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN GEN *GJB2* Ở MỘT GIA ĐÌNH BỆNH NHÂN CÓ HAI CON MẮC BỆNH KHIÊM THÍNH

Nguyễn Thùy Dương<sup>1</sup>, Phí Thị Thu Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Xuân<sup>1</sup>, Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1</sup>, Nguyễn Hải Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Đăng Tôn<sup>1</sup>, Nguyễn Tuyết Xương<sup>2</sup>, Nông Văn Hải<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Bệnh viện Nhi Trung ương, Bộ Y tế

Ngày nhận bài: 29.10.2014

Ngày nhận đăng: 30.12.2014

### TÓM TẮT

Khiếm thính là hiện tượng giảm một phần hay toàn bộ khả năng cảm nhận về âm thanh gây ra bởi môi trường và sai hỏng gen. Khoảng 50% trường hợp là khiếm thính di truyền do gen gây ra, trong đó khiếm thính di truyền không hội chứng chiếm tới 70%. Cho tới nay có hơn 160 gen được xác định là có liên quan đến khiếm thính di truyền không hội chứng, trong đó gen *GJB2* nằm trên nhiễm sắc thể 13 là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định đột biến trong gen *GJB2* ở một gia đình người Việt Nam có hai con mắc bệnh khiếm thính không hội chứng. Sử dụng kỹ thuật PCR với các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu, các đoạn exon của gen *GJB2* đã được nhân thành công. Tiếp đó, chúng tôi đã tiến hành đọc trình tự gen trực tiếp từ sản phẩm PCR tinh sạch. Sau khi so sánh trình tự gen thu được với trình tự gen công bố trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế GenBank với mã số NM\_004004, đột biến đồng hợp tử c.235delC đã được tìm thấy ở cả hai bệnh nhi. Trong khi cả bố và mẹ hai bệnh nhi này đều mang đột biến dị hợp tử c.235delC. Đây là đột biến di truyền gây bệnh, làm thay đổi khung dịch mã tạo ra một chuỗi peptide ngắn hơn p.L79CfsX3 gây mất chức năng của protein. Kết quả của nghiên cứu này cung cấp thông tin hữu ích trong nghiên cứu bệnh di truyền ở mức độ phân tử của bệnh khiếm thính và có ý nghĩa lớn trong công tác điều trị lâm sàng và tư vấn di truyền.

**Từ khóa:** khiếm thính, đột biến, *GJB2*, PCR, tư vấn di truyền

### MỞ ĐẦU

Khiếm thính là hiện tượng suy giảm thính giác phổ biến. Mức độ khiếm thính được chia thành các cấp: i) Khiếm thính nhẹ có thể nghe âm thanh từ 21 - 40 dB; ii) Khiếm thính trung bình có thể nghe âm thanh từ 41 - 70 dB; iii) Khiếm thính nặng có thể nghe âm thanh từ 71-90 dB; và iv) Khiếm thính sâu chỉ nghe được âm thanh >90 dB (Gandia *et al.*, 2013, Wei *et al.*, 2014). Tỷ lệ trẻ sơ sinh khiếm thính nặng và sâu trên thế giới cũng như ở Việt Nam hiện nay khoảng 0,1 - 0,2%, trong khi trẻ khiếm thính nhẹ và vừa là 0,3 - 0,4%. Nghĩa là, cứ 1000 trẻ sinh ra có khoảng 4 - 5 trẻ bị khiếm thính, trong đó khiếm thính nặng và sâu là 1 - 2 trẻ. Có nhiều nguyên nhân gây khiếm thính bao gồm cả yếu tố môi trường và gen. Hiện tại hơn 160 gen đã được phát hiện liên quan đến khiếm thính di truyền gồm các gen trội trên nhiễm sắc thể thường, các gen lặn trên nhiễm sắc thể thường, các gen liên kết với nhiễm sắc thể X và các gen di truyền theo dòng mẹ. Trong đó, các gen lặn trên nhiễm sắc thể thường là hay gặp nhất chiếm

khoảng 80% (Birkenhager *et al.*, 2014). Hơn 50% các trường hợp bệnh nhân mắc khiếm thính di truyền do đột biến trong gen *GJB2* (Bartolotta *et al.*, 2014, Wei *et al.*, 2014).

Gen *GJB2* nằm trên cánh tay dài nhiễm sắc thể 13 (13q12), có kích thước khoảng 7 kb và gồm 2 exon. Gen này mã hóa cho protein connexin 26 (Cx26). Cx26 cùng các thành viên khác thuộc họ protein connexin tạo thành kênh dẫn vận chuyển chất dinh dưỡng, các ion giữa các tế bào láng giềng (Birkenhager *et al.*, 2014). Cho tới nay hơn 90 đột biến trên gen *GJB2* đã được phát hiện (Bartolotta *et al.*, 2014). Các đột biến này có ảnh hưởng khác nhau tới mức độ nặng nhẹ của bệnh khiếm thính.

Ở Việt Nam hàng năm có từ 1200 - 1400 trẻ khiếm thính ra đời (Nguyễn Tuyết Xương *et al.*, 2014). Trẻ khiếm thính thường chậm nói hoặc không nói được, từ đó dẫn đến chậm phát triển ngôn ngữ và gây khó khăn cho việc học tập. Việc điều trị bệnh khiếm thính hiệu quả phụ thuộc vào mức độ và nguyên nhân gây bệnh. Kết quả điều trị khiếm thính cho thấy

một số bệnh nhân có kết quả tốt với máy trợ thính số khác lại cần phải cấy điện cực ốc tai. Bệnh nhân khiếm thính mang đột biến *GJB2* có khả năng hồi phục thính giác tốt sau khi được cấy điện cực ốc tai (Green *et al.*, 2002, Lustig *et al.*, 2004, Peyvandi *et al.*, 2011). Do đó, xác định đột biến gen *GJB2* ở bệnh nhân khiếm thính giúp lựa chọn phương pháp chữa trị hiệu quả. Do hạn chế về điều kiện hiện nay việc khám phát hiện bệnh khiếm thính chủ yếu là các xét nghiệm lâm sàng và chưa có xét nghiệm đột biến gen. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khả năng bày kết quả sàng lọc đột biến gen *GJB2* ở một gia đình bệnh nhân có hai con mắc bệnh khiếm thính không hội chứng. Kết quả của nghiên cứu này sẽ góp phần đáng kể trong việc cung cấp thông tin chẩn đoán bệnh khiếm thính ở mức độ phân tử là yếu tố quan trọng cho việc lựa chọn phương pháp chữa trị và tư vấn di truyền.

## ĐỐI TƯỢNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là hai chị em ruột (ký hiệu HLF2.3 và HLF2.4) được khám chẩn đoán tại Bệnh viện Nhi Trung ương là mắc bệnh khiếm thính không hội chứng. Cả hai bệnh nhi không có phản ứng với âm thanh mức độ khiếm thính sâu. Cha mẹ hai bệnh nhi đã đồng ý cho mẫu máu của mình và con để sử dụng cho quá trình nghiên cứu. Mẫu máu tất cả các thành viên trong gia đình sau khi lấy vô trùng được đựng trong ống chống đông EDTA và bảo quản ở -20°C.

### Phương pháp

#### Tách chiết DNA tổng số

Dung dịch NaCl 6M được sử dụng để tách chiết DNA tổng số từ mẫu người. Máu chống đông trong EDTA được rửa kỹ để dung giải tế bào hồng cầu bằng lysis buffer. Dung dịch SDS 20% và proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Mỹ) được sử dụng để phá vỡ nhân tế bào bạch cầu và phân hủy protein. DNA tổng số được phân tách nhờ bổ sung NaCl 6M và kết tủa bằng isopropanol (Merck, Kenilworth, NJ, Mỹ). DNA sau khi tách chiết đã được đo nồng độ kiểm tra chất lượng trước khi giữ ở -20°C.

#### Thiết kế mỗi nhân và xác định trình tự gen *GJB2*

Các cặp mồi sử dụng để nhân đoạn gen *GJB2* được thiết kế dựa trên trình tự gen đã được công bố trên Ngân hàng dữ liệu gen quốc tế GenBank với mã

số NM\_004004. Mồi được thiết kế ở vùng intron cách exon khoảng 150 - 250 bp. Thông tin các cặp mồi nhân gen *GJB2* sẽ được cung cấp nếu độc giả có yêu cầu.

#### Nhân gen *GJB2*

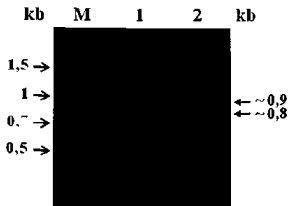
Các đoạn exon của gen *GJB2* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Mỗi phản ứng (25 µl) bao gồm các thành phần: 0,125 µl Taq DNA polymerase (5U); 2,5 µl đệm 10X; 0,5 µl dNTPs (Bartolotta *et al.*); 1 µl mỗi loại mồi (10 pmole); 1,5 µl DNA tổng số (100 ng/ µl) và 18,375 µl H<sub>2</sub>O. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt (MJ Research) với chu trình nhiệt như sau: 96°C 3 phút, 35 chu kỳ (96°C 20s, 57°C - 58°C 45 giây, 72°C 45 giây), 72°C 10 phút; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET<sup>TM</sup> PCR purification (Thermo Scientific) theo phương pháp của nhà sản xuất.

#### Xác định trình tự gen

Trình tự các đoạn exon của gen *GJB2* được xác định trên hệ thống máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer sử dụng bộ kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems). Xử lý và so sánh các trình tự nhận được với trình tự đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế GenBank với mã số NM\_004004 bằng phần mềm sinh học BioEdit.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nhân các đoạn exon của gen *GJB2*



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen *GJB2*: Marker 1 kb Plus, 1-2. Sản phẩm PCR điện di exon 1 và exon 2 của gen *GJB2*

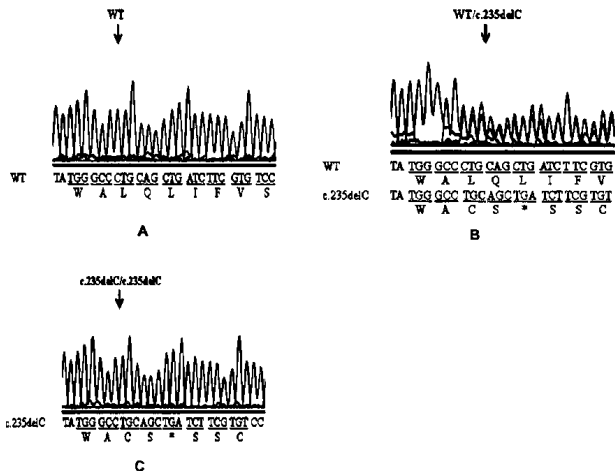
DNA tổng số tinh sạch từ máu được sử dụng để tổng hợp các exon của gen *GJB2* bằng cách sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR của hai đoạn exon 1 và 2 của gen *GJB2* thu được là các băng đặc hiệu có kích thước tương ứng khoảng 0,9 kb và 0,8 kb (Hình 1). Sản phẩm PCR của gen trên được tinh sạch cho phản ứng đọc trình tự tiếp theo.

#### Xác định trình tự gen *GJB2*

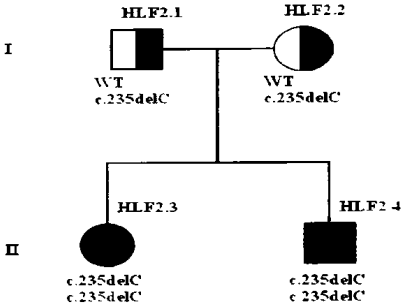
Để xác định đột biến gen *GJB2* cho gia đình có hai con mắc bệnh khiếm thính không hội chứng, sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch được tiếp tục xác định trình tự nucleotide. Kết quả phân tích trình tự gen thu được hai đoạn gen có chiều dài lần lượt là 936 bp và 802 bp tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết của exon 1 và 2 của

gen *GJB2*. Khi so sánh trình tự hai đoạn exon của gen *GJB2* với trình tự trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế GenBank với mã số NM\_004004, chúng tôi thu được đột biến đồng hợp từ c.235delC ở hai bệnh nhi và đột biến dị hợp từ c.235delC ở cả bố và mẹ hai bệnh nhi (Hình 2).

Đột biến đồng hợp từ c.235delC tìm thấy ở hai bệnh nhi là đột biến phổ biến thường gặp ở các nước Đông Á (Yan *et al.*, 2003). Cả bố mẹ hai bệnh nhi đều mang đột biến c.235delC dạng dị hợp tử. Đây là đột biến di truyền gây bệnh khiếm thính (Hình 3) (Choung *et al.*, 2002) Đột biến này làm thay đổi khung dịch mã của protein tạo ra một chuỗi peptide ngắn hơn (p.L79CfsX3) chuỗi peptide bình thường (dài 226 amino acid) do đó làm mất chức năng của protein connexin 26.



Hình 2. So sánh trình nucleotide của đoạn gen *GJB2* và trình tự đã công bố NM\_004004. A. Trình tự đoạn gen *GJB2* đọc từ sản phẩm PCR của người khỏe mạnh. B. Trình tự đoạn gen *GJB2* đọc từ sản phẩm PCR của bố/mẹ bệnh nhi. C. Trình tự đoạn gen *GJB2* đọc từ sản phẩm PCR của bệnh nhi.



Hình 3. Phả hệ gia đình HLF2. I.HLF2.1: Bố bệnh nhi mang đột biến dị hợp tử *c.235delC*. II.HLF2.2: Mẹ bệnh nhi mang đột biến dị hợp tử *c.235delC*. III.HLF2.3: Bệnh nhi mang đột biến đồng hợp tử *c.235delC*. III.HLF2.4: Bệnh nhi mang đột biến đồng hợp tử *c.235delC*.

Trẻ khiếm thính nếu được chẩn đoán sẽ có thể điều trị kịp thời để nghe, nói, và phát triển thần kinh tâm lý như trẻ bình thường. Ở Việt Nam, do điều kiện còn hạn chế nên chưa có các chẩn đoán gen ở bệnh nhân khiếm thính. Thông thường trẻ khiếm thính sâu sau khi đeo máy trợ thính không hiệu quả thì sẽ tiếp tục được cấy điện cực ốc tai. Việc chữa trị như vậy sẽ mất thời gian và tốn kém hơn. Biết chính xác nguyên nhân gây khiếm thính do sai hỏng gen đóng vai trò quan trọng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp cho bệnh nhân. Trẻ khiếm thính khi được điều trị bằng phương pháp cấy điện cực ốc tai, trẻ mang đột biến gen *GJB2* dạng đồng hợp tử có khả năng nghe thấy và phân biệt được thanh tốt hơn trẻ mang đột biến dị hợp tử và trẻ mang đột biến có khả năng nghe tốt hơn trẻ không mang đột biến (Lustig *et al.*, 2004, Peyvandi *et al.*, 2011). Bệnh nhân khiếm thính mang đột biến *c.235delC* cũng đã được chứng minh là có phản ứng tốt với âm thanh sau khi được cấy điện cực ốc tai (Matsushiro *et al.*, 2002). Vì vậy, đối với hai bệnh nhi trong nghiên cứu này nếu được điều trị thì nên chọn phương pháp cấy điện cực ốc tai. Giai đoạn trẻ từ 1 - 3 là tốt nhất để thực hiện cấy điện cực ốc tai, vì thời gian này trẻ phát triển về thần kinh thính giác, ngôn ngữ. Do đó, xác định đột biến gen *GJB2* ở bệnh nhân khiếm thính là một yếu tố dự

báo hữu ích cung cấp thông tin quan trọng cho việc tư vấn di truyền và cấy điện cực ốc tai.

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu được các điều kiện kỹ thuật cho phép xác định đột biến trên vùng điều khiển, vùng mang mã và vùng biên exon-intron của gen *GJB2* ở một gia đình có hai con mắc bệnh khiếm thính. Cả hai bệnh nhi mang đột biến di truyền đồng hợp tử *c.235delC*. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng trẻ mắc bệnh khiếm thính di truyền không hội chứng nên được làm các xét nghiệm phát hiện đột biến gen càng sớm càng tốt để xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc đưa ra biện pháp chữa trị phù hợp và kịp thời cho bệnh nhân. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cung cấp thông tin hữu ích cho công tác tư vấn di truyền cho gia đình có con mắc bệnh khiếm thính di truyền không hội chứng này.

**Lời cảm ơn:** Công trình hoàn thành với kinh phí được tài trợ bởi đề tài: "Nghiên cứu xác định các đột biến gen nhằm phục vụ chẩn đoán bệnh khiếm thính di truyền bẩm sinh ở trẻ em", thuộc hướng công nghệ sinh học của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, với mã số: VAST02.05/13-14.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Tuyết Xương, Nguyễn Anh Dũng, Khu Thị Khánh Dung (2014) Tỷ lệ nghe kém và một số đặc điểm nghe kém ở trẻ em từ 2 đến 5 tuổi tại các trường mẫu giáo công lập nội thành, thành phố Hà Nội. *Tạp chí y học Việt Nam* 1: 15.

Bartolotta C, Salvago P, Cocuzza S, Fabiano C, Sammarco P, Martines F (2014) Identification of D179H, a novel missense GJB2 mutation in a Western Sicily family. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271: 1457-1461.

Birkenhager R, Prera N, Aschendorff A, Laszig R, Arndt S (2014) A novel homozygous mutation in the EC1/EC2 interaction domain of the gap junction complex connexon 26 leads to profound hearing impairment. *Biomed Res Int* 2014: 307976.

Choung YH, Moon SK, Park HJ (2002) Functional study of GJB2 in hereditary hearing loss. *Laryngoscope* 112: 1667-1671.

Gandia M, Del Castillo FJ, Rodriguez-Alvarez FJ, Garrido G, Villamar M, Calderon M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I (2013) A novel splice-site mutation in the GJB2 gene causing mild postlingual hearing impairment. *PLoS One* 8: e73566.

Green GE, Scott DA, McDonald JM, Teagle HF, Tomblin BJ, Spencer LJ, Woodworth GG, Knutson JF, Gantz BJ, Sheffield VC, Smith RJ (2002) Performance of cochlear

implant recipients with GJB2-related deafness. *Am J Med Genet* 109: 167-170

Lustig LR, Lin D, Venick H, Larky J, Yeagle J, Chinnici J, Polite C, Mhatre AN, Niparko JK, Lalwani AK (2004) GJB2 gene mutations in cochlear implant recipients: prevalence and impact on outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130: 541-546

Matsushiro N, Doi K, Fuse Y, Nagai K, Yamamoto K, Iwaki T, Kawashima T, Sawada A, Hibino H, Kubo T (2002) Successful cochlear implantation in prelingual profound deafness resulting from the common 233delC mutation of the GJB2 gene in the Japanese. *Laryngoscope* 112: 255-261.

Peyvand A, Morovvati S, Rabiee H, Ranjbar R, Ajalloueyan M, Hassanifard M (2011) Detection of the GJB2 Mutation in Iranian Children with Hearing Loss Treated with Cochlear Implantation. *Balkan J Med Genet* 14: 19-24.

Wei Q, Liu Y, Wang S, Liu T, Lu Y, Xing G, Cao X (2014) A novel compound heterozygous mutation in the GJB2 gene causing non-syndromic hearing loss in a family. *Int J Mol Med* 33: 310-316.

Yan D, Park HJ, Ouyang XM, Pandya A, Doi K, Erdenetungalag R, Du LL, Matsushiro N, Nance WE, Griffith AJ, Liu XZ (2003) Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet* 114: 44-50.

## DETECTION OF GJB2 MUTATIONS IN A FAMILY WITH TWO DEAF CHILDREN

Nguyen Thuy Duong<sup>1</sup>, Phi Thi Thu Trang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Xuan<sup>1</sup>, Huynh Thi Thu Hue<sup>1</sup>, Nguyen Hai Ha<sup>1</sup>, Nguyen Dang Ton<sup>1</sup>, Nguyen Tuyet Xuong<sup>2</sup>, Nong Van Hai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>National Hospital of Pediatrics, Ministry of Health

### SUMMARY

Hearing loss (HL) is a partial or total inability to hear. It is caused by several environmental and genetic factors, and the proportion attributed to inherited causes is assumed at 50%. About 70% of cases are nonsyndromic hearing loss since hearing loss is the only symptom. To date, more than 160 genes have been identified to be associated with nonsyndromic HL. Genetic defects in GJB2 gene are the most common cause of nonsyndromic HL. In this work, we detected mutations in the GJB2 gene localized on chromosome 13q11 for a Vietnamese family with two children affected with nonsyndromic HL. Using PCR with specific primers, we could amplify all exons of the gene. Then, the PCR products were purified and sequenced. When compared with GJB2 published in GenBank with accession number NM\_004004, a homozygous mutation c.235delC was found in the two children. Both father and mother are heterozygous for the mutation. The mutation is inherited from the parents and well known to be pathogenic, resulting in a putatively truncated GJB2 peptide p.L79CfsX3 which leads to the loss of a functional protein in a homozygous individual. The results partly contribute to molecular studies on human inherited disorders and can be used for genetic counseling and clinical management.

**Keywords:** Hearing loss, mutation, GJB2, PCR, genetic counseling

\* Author for correspondence: E-mail: [vhnong@igr.ac.vn](mailto:vhnong@igr.ac.vn)