

NGHIÊN CỨU CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH THỂ THIẾU ENZYME 21-HYDROXYLASE

Nguyễn Hà Hương Ly[✉], Nguyễn Văn Phong, Nguyễn Thị Việt Hà, Trần Văn Tuấn[✉]

Học viện Quân y

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xây dựng hoàn thiện quy trình chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzyme 21-hydroxylase trước làm tổ và ứng dụng quy trình chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzyme 21-hydroxylase trước làm tổ cho gia đình đã có con bị bệnh. 4 mẫu máu EDTA ngoại vi và 4 mẫu phôi ngày 5 được lấy từ một gia đình có con mang biến thể gây bệnh trên gen CYP21A2. Phương pháp phân tích di truyền liên kết được sử dụng để phát hiện bốn STR được chọn liên kết chặt chẽ với gen CYP21A2 mang biến thể gây bệnh ở các cặp vợ chồng và con của họ. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng quy trình chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu enzyme 21-hydroxylase trước làm tổ. Áp dụng quy trình cho 4 phôi ngày 5 của gia đình Đ.V.Th., chúng tôi đã xác nhận đồng hợp tử biến thể gây bệnh (mang gen) ở ba trong số các phôi và đồng hợp tử bình thường ở một phôi (khỏe mạnh).

Từ khóa: Tăng sản thượng thận bẩm sinh, gen CYP21A2, chẩn đoán trước làm tổ, phân tích di truyền liên kết.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (Congenital adrenal hyperplasia - CAH) là bệnh di truyền do gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể thường gây ra. Từ khi ca bệnh đầu tiên được mô tả trong y văn vào năm 1865 cho đến nay, đã có hơn 5 thể bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh được biết đến, trong đó thể thiếu enzyme 21-hydroxylase (21-OH) là phổ biến nhất (chiếm khoảng 90% các trường hợp mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh).¹ Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh ở trẻ em do thiếu 21-OH là khoảng 1/10.000 đến 1/15.000.² Tỷ lệ mắc bệnh thay đổi theo dân tộc và địa lý, tần suất cao nhất được phát hiện là 1/282 ở tộc người Yupik Eskimos (Alaska) và 1/2.100 ở đảo La Reunion, Pháp.³ Bên cạnh đó, tỷ lệ

mắc bệnh thấp hơn cũng được tìm thấy ở Nhật Bản: 1/21.000 và Đài Loan là: 1/28.000.⁴ Ở Việt Nam, chưa có đề tài nào nghiên cứu về tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ người lành mang gen bệnh. Theo Vũ Chí Dũng và cộng sự (2017), dựa trên số liệu thống kê tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương, trong khoảng thời gian 17 năm (1999 - 2016) có tổng số 842 bệnh nhân đã được chẩn đoán và điều trị. Trong đó, thể thiếu 21-hydroxylase (21-OH) chiếm tỷ lệ cao nhất 98,3% (828 bệnh nhân).

Các nghiên cứu trên quần thể người châu Á đã chỉ ra thể mất muối chiếm tỉ lệ cao nhất trong số các ca mắc tăng sản thượng thận bẩm sinh với 75%, thể nam hóa đơn thuần chiếm tỉ lệ thấp hơn (20-25%) và thể không cổ điển hiếm gặp hơn (< 5%).⁵ Sự rối loạn này luôn dẫn đến bệnh cảnh lâm sàng đặc trưng của bệnh đi kèm những hậu quả và di chứng nặng nề nếu không được phát hiện sớm như: rối loạn điện giải, mất muối, mất nước và nam hóa ở trẻ gái hoặc dậy

Tác giả liên hệ: Nguyễn Hà Phương Ly

Học viện Quân y

Email: leenguyen1897@gmail.com

Ngày nhận: 15/09/2022

Ngày được chấp nhận: 01/01/2023

thì sớm già ở trẻ trai. Việc mất muối và mất nước rất dễ dẫn đến bệnh nhân trụy tim mạch, sốc, và nguy hiểm đến tính mạng.⁶

Các phương pháp xét nghiệm sinh học phân tử giúp chẩn đoán sớm bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh ở thai nhi giúp định hướng phác đồ điều trị sớm cho người bệnh, tuy nhiên, hướng phát triển trong công tác phòng bệnh vẫn còn hạn chế. Phương pháp chẩn đoán di truyền trước làm tổ được biết đến 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. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh tuy đã được công bố nhiều, nhưng chủ yếu chỉ tập trung vào phân tích về đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm, đặc điểm di truyền, điều trị biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2*, hiện nay vẫn chưa có công bố nào về chẩn đoán trước làm tổ bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh. Xuất phát từ điều kiện thực tiễn và những ý nghĩa thiết thực mang lại, chúng tôi thực hiện đề tài với hai mục tiêu:

1) Xây dựng quy trình phân tích di truyền liên kết phát hiện kiểu gen gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh do biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2*.

2) Ứng dụng quy trình đã xây dựng trong chẩn đoán di truyền trước làm tổ bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh do biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng sử dụng trong nghiên cứu bao gồm mẫu máu của 4 thành viên trong gia đình bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh do biến thể gây bệnh của gen *CYP21A2* (gồm người bố Th., người mẹ V., người con gái thứ nhất Tr. không biểu hiện bệnh lý và người con gái thứ hai A. đã

được chẩn đoán mắc bệnh) cùng 4 mẫu phôi sinh thiết ngày 5 (A1-A4) của gia đình.

2. Phương pháp

Mẫu máu của người con gái bị bệnh đã được xác định loại biến thể gây bệnh bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) kết hợp sử dụng phương pháp MLPA. Kết quả cho thấy bệnh nhân A. mang hai loại biến thể gồm *CYP21A2* c.515T>A và một biến thể mất đoạn lớn. Tuy nhiên, do gen *CYP21A2* có gen giả là *CYP21A1P* có tính tương đồng cao nên không thể áp dụng được phương pháp phát hiện biến thể bằng giải trình tự Sanger. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã xây dựng quy trình dựa trên kỹ thuật phân tích trình tự lặp lại ngắn (Short Tandem Repeats - STR) - các trình tự có kích thước nhỏ dưới 1000 base tạo nên bởi các trình tự lõi khoảng 2 đến 4 base được lặp lại nhiều lần (từ 10 đến 60 lần). Bốn locus STR được lựa chọn có trình tự nằm gần vị trí gen *CYP21A2* gồm: TNFa, TNFd, MIB và C1.2. Các STR được lựa chọn đều nằm gần và cách dưới 1kB so với gen *CYP21A2* trên trình tự tham chiếu để hạn chế tối đa hiện tượng hoán vị gen. Các mẫu DNA sau tách chiết được sử dụng cho phản ứng PCR với các cặp mồi huỳnh quang đặc hiệu cho từng locus STR. Sản phẩm PCR sau đó được chạy điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer và phân tích bằng phần mềm GeneMapper ID 6.0.

DNA tách chiết từ các phôi ngày 5 đã sinh thiết sẽ được khuếch đại bằng bộ kit REPLI-g® Single Cell Kit (Lot.No. 166013027). Sau đó, áp dụng quy trình đã xây dựng ở trên trong chẩn đoán di truyền trước làm tổ biến thể của gen *CYP21A2* gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh.

III. KẾT QUẢ

1. Hoàn thiện quy trình STR analysis – phân tích 4 STR liên kết với biến thể của gen

CYP21A2 gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh

STR analysis là kỹ thuật sử dụng PCR khuếch đại 4 STR mục tiêu để phân tích độ dài của các STR dựa trên độ dài của sản phẩm PCR. Các sản phẩm PCR được phân tích theo kích thước bằng phương pháp điện di mao

quản. Mỗi STR mục tiêu có kích thước khác nhau và cùng liên kết với gen CYP21A2.

Bốn STR được chọn lần lượt là MIB, C1.2, TNFa và TNFd. Trình tự 4 cặp mồi cho phản ứng khuếch đại STR do nhóm nghiên cứu thiết kế dựa trên phần mềm Primer Blast, được trình bày như bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng phản ứng khuếch đại các STR

Primer	Trình tự (5'-3')	Primer	Trình tự (5'-3')
MIBf*	CCTGCAGATTTTCATACTT	C1.2f*	GGATCCTAGGAACTCCC
MIBr	CTTCAGAGAAGCAGAACCAA	C1.2r	GAGCAGAAGGGAGATGA
TNFaf*	GCCTCTAGATTTTCATCCAG	TNFdf*	CATAGTGGGACTCTGTCTC
TNFar	CCTCTTCCCCTGCAA	TNFdr	AGATCCTTCCCCTGTGAGTT

*: Trình tự có đuôi gắn huỳnh quang

- Tối ưu điều kiện phản ứng PCR

Sau khi tách chiết, mẫu DNA thu được của 4 mẫu máu ngoại vi gia đình đối tượng nghiên cứu (gồm người bố Th., người mẹ V., người con gái thứ nhất Tr. không biểu hiện bệnh lý và người con gái thứ hai A. đã được chẩn đoán mắc bệnh) được sử dụng làm mẫu chuẩn trong tối ưu quy trình khuếch đại các STR.

Dựa trên kích thước của từng cặp mồi và đoạn gen cần khuếch đại, chúng tôi đã thực

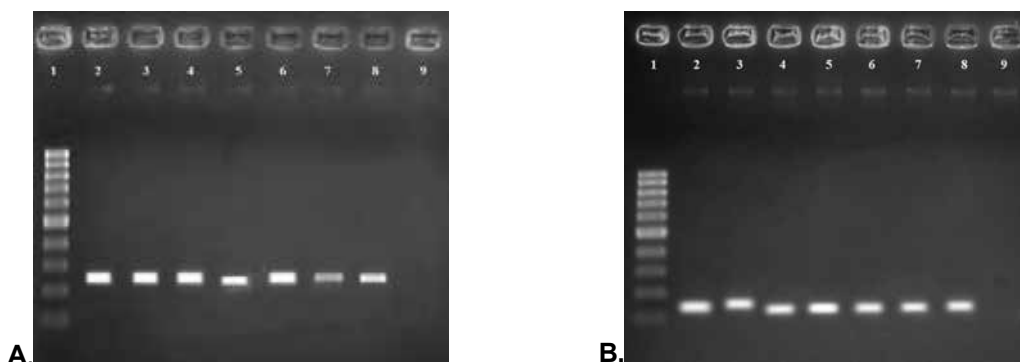
hiện chạy gradient nhiệt độ để tìm nhiệt độ gắn mồi tối ưu. Qua quá trình thực hiện phản ứng PCR khuếch đại các STR ban đầu, chúng tôi đã lựa chọn được chu trình nhiệt và nồng độ các thành phần (bảng 2) tối ưu chung cho phản ứng khuếch đại 4 STR. Kết quả lựa chọn điều kiện tối ưu dựa trên tiêu chí khuếch đại đặc hiệu đoạn gen đích và không hình thành dimer giữa các mồi.

Bảng 2. Chu trình nhiệt và thành phần phản ứng trong phản ứng khuếch đại STR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ	Thành phần	Thể tích (μL)
95°C	5 phút	30 chu kỳ	Mastermix	12,5
94°C	30 giây		Mồi Forward	0,4
56°C	45 giây		Mồi Reverse	0,4
72°C	45 giây		DNA	2
94°C	30 giây		H ₂ O	9,7
53°C	45 giây	10 chu kỳ	Tổng	25
72°C	45 giây			
72°C	10 phút			

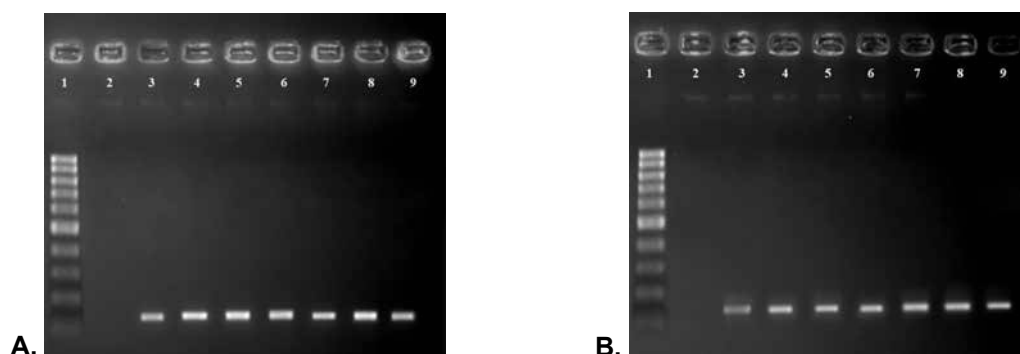
Kiểm tra sản phẩm phản ứng PCR bằng điện di trên gel agarose 2%. Kết quả điện di (hình 1 và hình 2) cho thấy các sản phẩm PCR có kích thước xấp xỉ lần lượt là 256bp; 116bp; 140bp; 148bp tương ứng với các môi C1.2; TNF α ; MIB

và TNFd, phù hợp với kích thước trên lý thuyết của 4 STR mục tiêu. Sự chênh lệch kích thước của các STR giữa các mẫu DNA thể hiện sự khác nhau về kích thước của các alen.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm của 2 môi (A: Môi C1.2; B: Môi TNF α)

Giếng 1: Marker 100bp, Giếng 2: Mẫu người mẹ V.A, Giếng 3: Mẫu người bố Th., Giếng 4: Mẫu con A., Giếng 6 - 8: Các phôi A1 - A4, Giếng 9: Chứng âm



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm của 2 môi (A: Môi MIB; B: Môi TNFd)

Giếng 1: Marker 100bp, Giếng 2: Chứng âm, Giếng 3: Mẫu người mẹ V.A, Giếng 4: Mẫu người bố Th., Giếng 5: Mẫu con A., Giếng 7 - 9: Các phôi A1 - A4

Tiếp theo, lấy 1 μ l sản phẩm PCR, thêm vào 10,25 μ L và 0,5 μ L Genescan Liz 500 (Thermo) và chạy trên SeqStudio. Bằng phương pháp điện di mao quản trên hệ thống máy SeqStudio

và phân tích tự động bằng phần mềm GeneMapper ID 6.0, chúng tôi đã xác định được chính xác kích thước các alen của 4 STR trong từng mẫu (bảng 3) (hình 3 và hình 4).

Bảng 3. Bảng tổng kết kích thước các alen của 4 người trong gia đình đối tượng nghiên cứu

Locus	V	Th	Tr	A (bệnh)
TNFa	116	134	116	116
	116	138	134	138
TNFd	141	146	146	141
	148	150	148	150
MIB	127	137	127	137
	137	137	137	
C1.2	252	254	252	266
	266	266	254	

- Nhận định kết quả:

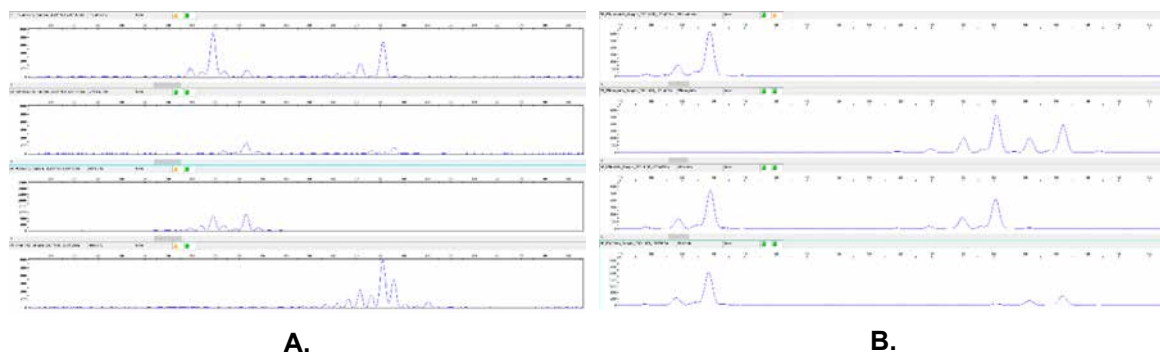
Nhiễm sắc thể của mỗi người bình thường tồn tại thành cặp, một nhận được từ bố và một nhận được từ mẹ. Hai nhiễm sắc thể của cùng một cặp có cùng gen và cùng vị trí nhưng trình tự lại không giống hệt nhau. Vì vậy có thể tìm ra nhiễm sắc thể nào của cặp tương đồng là nhận được từ bố hay từ mẹ. Đối với trường hợp mắc bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, nguyên nhân chủ yếu (chiếm 95%) là do biến thể gây bệnh của gen *CYP21A2* nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Nhờ vào các marker STR khuếch đại các đoạn trong gen của bố, mẹ và người con bị bệnh, ta sẽ xác định được gen bệnh của người con nhận được từ nhiễm sắc thể nào của người bố và mẹ.

Qua kết quả điện di mao quản, nhóm nghiên cứu phân tích trên locus TNFa, nhận thấy người mẹ V.A mang 2 alen có kích thước 116bp; người bố Th mang 2 alen có kích thước 134bp và 138bp; người con Tr. mang 2 alen có kích thước 116bp và 138bp. Trường hợp bệnh nhân A. mang 2 alen 116 và 138, chứng tỏ 2 alen này đều liên kết với gen lặn gây bệnh. Vì

vậy, ở mẹ, 1 trong 2 alen 116 sẽ liên kết với gen bệnh và ở bố thì alen 138 là alen liên kết với gen bệnh. Bố và mẹ đều không biểu hiện bệnh, nên alen 116 còn lại của mẹ và alen 138 của bố là alen liên kết với gen trội bình thường.

Với locus TNFd, người mẹ mang 2 alen có kích thước 141bp và 148bp; người bố mang 2 alen có kích thước 146bp và 150bp; người con Tr. mang 2 alen có kích thước 146bp và 148bp. Bệnh nhân A. ở locus gen TNFd mang 2 alen là 141 và 150, điều này chứng tỏ 2 alen này là 2 alen liên kết với gen lặn gây bệnh. Ở bố và mẹ không biểu hiện bệnh nên alen 148 của mẹ và alen 146 của bố là 2 alen liên kết với gen trội bình thường.

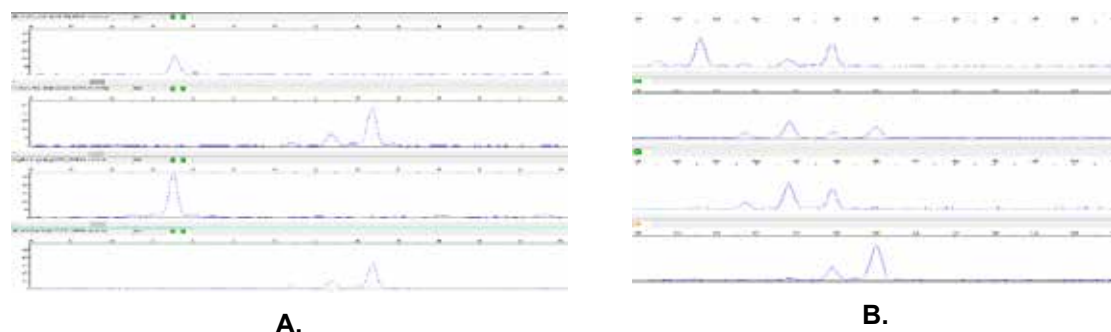
Tương tự đối với locus C1.2, ở người mẹ V.A. mang 2 alen là 256bp và 266bp; người bố Th. mang 2 alen 252bp và 266bp; người con Tr. mang 2 alen là 252bp và 254bp. Ở bệnh nhân A. mang 2 alen đồng hợp là 266, từ đó có thể thấy 1 alen 266 nhận từ mẹ và 1 alen 266 nhận từ bố là 2 alen liên kết với gen lặn gây bệnh; 2 alen 252 và 254 là 2 alen liên kết với gen trội bình thường.



Hình 3. Kết quả điện di mao quản của các locus (A: locus C1.2; B: locus TNFa)

Dòng 1: Mẫu mẹ V.A - Dòng 2: Mẫu bố Th

Dòng 3: Mẫu con Tr - Dòng 4: Mẫu con A. (bệnh)



Hình 4. Kết quả điện di mao quản của các locus (A: locus MIB; B: locus TNFd)

Dòng 1: Mẫu mẹ V.A - Dòng 2: Mẫu bố Th

Dòng 3: Mẫu con Tr - Dòng 4: Mẫu con A. (bệnh)

Như vậy, từ kết quả trên đã xác định được nhiễm sắc thể mang biến thể gây bệnh là nhiễm sắc thể chứa các STR C1.2, TNFa, TNFd có kích thước lần lượt là 266bp; 138bp; 150bp và của mẹ là 266bp; 116bp; 141bp. Riêng STR MIB của bố không xác định được alen liên kết với biến thể gây bệnh do các alen của STR MIB liên kết với biến thể gen bệnh và bình thường đều có kích thước 137bp (hình 5).

Sau khi thực hiện quy trình phân tích STR trên mẫu máu ngoại vi của 4 người trong gia đình anh Đ.V.Th., nhóm nghiên cứu đã đưa ra quy trình phân tích di truyền liên kết phát hiện kiểu gen gây bệnh tăng sản thượng bả sinh do biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2* gồm

5 bước:

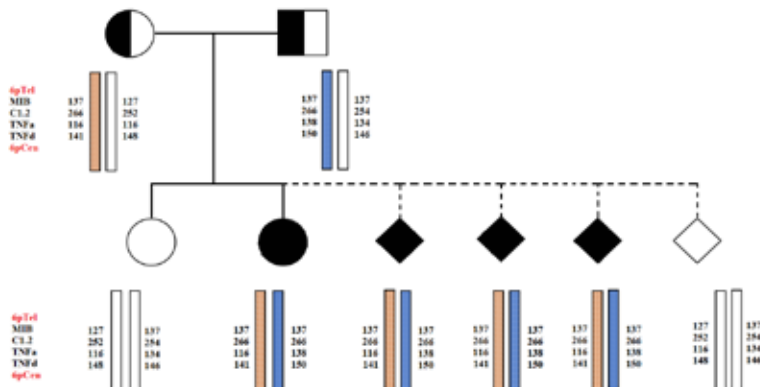
- Bước 1: Chuẩn bị DNA của các mẫu cần phân tích di truyền liên kết.
- Bước 2: Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại 4 STR.
- Bước 3: Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose.
- Bước 4: Biến tính sản phẩm khuếch đại STR sau PCR, tiến hành điện di mao quản.
- Bước 5: Phân tích các alen liên kết với gen gây bệnh và kết luận kiểu gen.

2. Kết quả ứng dụng quy trình phân tích 4 STR trong chẩn đoán trước làm tổ bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh

Các mẫu phôi sau khi được sinh thiết ngày 5 được tiến hành thực hiện WGA nhằm nhân toàn bộ hệ gen để đảm bảo lượng DNA đầu vào cho phản ứng PCR. Sau khi thực hiện WGA theo hướng dẫn từ nhà sản xuất, sản phẩm nhân toàn bộ hệ gen được điện di trên gel agarose

1% để kiểm tra chất lượng.

Áp dụng quy trình đã xây dựng trên 4 mẫu phôi, nhóm nghiên cứu đã xác định được kích thước các alen của 4 STR trong từng mẫu (hình 5).



Hình 5. Kết quả phân tích di truyền liên kết trên các thành viên và trên các phôi của gia đình bệnh nhân

Sau khi áp dụng quy trình trên mẫu phôi, nhóm nghiên cứu nhận thấy cả 3 phôi A1, A2, A3 đều mang các STR liên kết với biến thể gây bệnh của gen *CYP21A2* nằm trên nhiễm sắc thể nhận từ giao tử của cả bố và mẹ. Do vậy 3 phôi A1, A2, A3 là những phôi mang bệnh. Chỉ có 1 phôi A4 không chứa các STR liên kết với biến thể gen bệnh, vì vậy đây là phôi không mang gen bệnh nhận từ nhiễm sắc thể của bố và mẹ.

IV. BÀN LUẬN

Tăng sản thượng thận bẩm sinh không phải là một bệnh lý có tỷ lệ cao các biến thể mới phát sinh, bệnh xuất hiện chủ yếu là do bố mẹ mang gen dị hợp tử di truyền bệnh cho con. Đột biến mất đoạn mới và chuyển đoạn gen mới đã từng được ghi nhận, trong đó chuyển đoạn gen mới thường liên quan đến biến thể ở intron 2 với tỷ lệ khoảng 1% các alen gây thiếu enzym 21-OH, bệnh nhân mang biến thể gây bệnh hoàn toàn

không do di truyền từ bố mẹ. Tỷ lệ các alen gây thiếu enzym 21-OH trong quần thể khoảng 2%, nên tỷ lệ alen mang chuyển đoạn gen mới tại intron 2 trong quần thể xấp xỉ: $1/(2 \times 10^4)$.^{7,8}

Tái tổ hợp mới liên quan đến gen *CYP21A2* đã được chứng minh bằng phản ứng PCR với DNA tách chiết từ tinh trùng và tế bào bạch cầu. Trao đổi chéo không cân gây mất đoạn gen chỉ được phát hiện ở DNA tinh trùng (1/105 - 1/106 trên hệ gen). Tần số xảy ra chuyển đoạn gen là $1/10^3$ - $1/10^5$ trên hệ gen (DNA tách chiết từ tế bào tinh trùng và bạch cầu). Điều này chứng tỏ rằng mất đoạn gen chỉ xảy ra ở trong quá trình giảm phân, trong khi chuyển đoạn gen xảy ra cả trong quá trình giảm phân và nguyên phân.⁹

Chẩn đoán di truyền trước làm tổ là một lĩnh vực rất khó do vật liệu di truyền dùng để chẩn đoán rất ít, chỉ từ 1 - 2 tế bào phôi. Vật liệu di truyền ít làm khả năng thất bại trong nhân gen chẩn đoán rất cao. Hơn nữa, các kỹ thuật chỉ được thực hiện 1 lần duy nhất không đánh giá

được sự ổn định và không kết hợp được nhiều phương pháp chẩn đoán làm giảm độ chính xác. Để giải quyết khó khăn trên, một trong những giải pháp nhóm nghiên cứu đưa ra là nhân toàn bộ gen của các mẫu phôi sinh thiết bằng kỹ thuật WGA.

Sau khi nhân toàn bộ gen được sản phẩm có nồng độ DNA rất cao, nếu dùng làm khuôn sẽ dẫn đến phản ứng PCR bị ức chế. Điều đó khiến chúng ta không biết đã thất bại ở khâu nào trong quy trình: ở sinh thiết phôi không lấy được tế bào hay nhân WGA không thành công. Ngoài ra, nồng độ DNA khuôn cao có thể làm xuất hiện nhiều băng phụ trong quá nhân gen, từ đó gây khó khăn cho chẩn đoán. Chính vì vậy trong quy trình, nhóm nghiên cứu đã chuẩn hóa được nồng độ pha loãng tối ưu để giải quyết được những vấn đề nêu trên.

Vì là biến thể gen lặn trên nhiễm sắc thể thường nên từ kiểu gen của người con A. đã mắc bệnh, có thể xác định được người con này đã nhận được gen từ nhiễm sắc thể nào của người mẹ và bố. Qua kết quả khảo sát STR, phân tích xem phôi có nhận phải nhiễm sắc thể mang biến thể của gen *CYP21A2* gây bệnh không, từ đó có tư vấn di truyền phù hợp. Nếu thai nhi nhận được nhiễm sắc thể không mang biến thể gây bệnh, thì sẽ tiến hành chuyển phôi trường hợp này.

Chúng tôi đã áp dụng thành công quy trình chẩn đoán trước làm tổ cho 4 phôi của gia đình Đ.V.Th. Trong đó phát hiện thấy 3 phôi mang biến thể của gen *CYP21A2* gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh, còn lại 1 phôi không mang gen bệnh.

V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu xây dựng quy trình trên mẫu máu ngoại vi và ứng dụng quy trình trên 4 phôi của gia đình tự nguyện tham gia nghiên cứu chúng tôi thu được kết quả như sau như sau:

- Đã xây dựng thành công quy trình phân tích di truyền liên kết (sử dụng 04 STR: TNFa, TNFd, MIB và C1.2) để phát hiện kiểu gen gây bệnh tăng sản thượng bẩm sinh do xuất hiện biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2*.

- Ứng dụng thành công quy trình này trên 04 mẫu phôi của một gia đình bệnh nhân mắc tăng sản thượng bẩm sinh do xuất hiện biến thể gây bệnh trên gen *CYP21A2*. Kết quả phát hiện được 03 phôi bệnh và 01 phôi bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Turcu AF, Auchus RJ. The next 150 years of congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 153:63-71.
2. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update.* 2004; 10(6): 469-485.
3. Pang S, Murphey W, Levine LS, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 55(3): 413-420.
4. Nimkarn S, New MI. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: A paradigm for prenatal diagnosis and treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1192(1): 5-11.
5. Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke DP. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23(2): 181.
6. Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS. Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *The Lancet.* 1977; 310(8052): 1309-1312.
7. Krone N, Riepe FG, Grötzinger J, Partsch CJ, Sippell WG. Functional characterization of two novel point mutations in the *CYP21* gene

causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(1): 445-454.

8. Oxford Academic. *Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency.*

Vol 21. *Endocrine Reviews* <https://doi.org/10.1210/edrv.21.3.0398>

9. Lee HH. The chimeric CYP21P/CYP21 gene and 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet.* 2004; 49(2): 65-72.

Summary

STUDY ON PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS FOR CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

This study aims to develop a protocol of PGD for CAH due to 21-OHD and applying the protocol for family in which the member was diagnosed with CAH due to 21-OHD. 4 peripheral EDTA blood samples and four day-5 embryo samples were taken from a family in which, the members carried the *CYP21A2* mutation. The linkage analysis method was used to reveal the associated four selected short tandem repeat (STR) markers closely linked to the mutational *CYP21A2* gene in the couples and their child. The results indicated that the protocol of PGD for CAH due to 21-OHD had been developed successfully. Using the PGD protocol for CAH due to 21-OHD in four day-5 embryos from V.Th.'s family, we confirmed mutant homozygosity (affected status) in three of the embryos and wild type homozygosity (healthy) in one.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia - CAH, *CYP21A2* gene, Preimplantation genetic diagnosis (PGD), linked-analysis.