

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ HAI DẠNG ĐỘT BIẾN TRÊN NGƯỜI DÂN TỘC ĐAO VÀ HÀ NHÌ THIẾU HỤT ENZYME G6PD HỒNG CẦU

Đỗ Thị Tuyên¹, Quách Xuân Hình², Quyền Đình Thi¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài: 27.4.2014

Ngày nhận đăng: 19.6.2014

TÓM TẮT

Thiếu hụt enzyme G6PD là nguyên nhân gây ra hàng loạt rối loạn (trong chuyển hóa và dẫn tới tình trạng oxy hóa globin và protein cấu trúc của hồng cầu, gây vỡ hồng cầu. Bệnh thiếu hụt G6PD dẫn đến những biến chứng nguy hiểm ở trẻ sơ sinh như vàng da nhân não (gây tổn thương thần kinh), ở phụ nữ mang thai đe dọa sẩy thai và tử vong. Việc phát hiện các dạng đột biến điểm, đột biến mất đoạn hoặc mất 2 nucleotid (rất ít gặp) trên các cá thể thiếu hụt G6PD có thể sử dụng các phương pháp như MPTP (multiplex PCR using tandem primer), realtime PCR, giải trình tự gen... Do đó phương pháp đọc trình tự kết hợp với PCR-MPTP vẫn được dùng nhiều nhất vì phương pháp này có thể phát hiện ra được đột biến đồng hợp tử hay dị hợp tử. Trong bài báo này bằng phương pháp PCR- MPTP, kết hợp với đọc trình tự gen exon 2 và exon 9, chúng tôi đã phân tích gen được 6 mẫu thiếu hụt enzyme G6PD hồng cầu người (dương tính 3+) trong tổng số 225 đối tượng người dân tộc Hà Nhì và Dao. Kết quả cho thấy đã phát hiện được 01 mẫu người dân tộc Hà Nhì bị đột biến ở exon 2, trong đó tại vị trí nucleotide A→G thuộc đoạn trình tự GAG AAA CTC bị biến đổi thành GAG AGA CTC, dẫn đến biến đổi acid amin tại vị trí His→Arg (đột biến dạng gaohe). Và 02 mẫu người dân tộc Dao bị đột biến ở exon 9, tại vị trí nucleotide G→A thuộc đoạn trình tự CAA GGT GTT bị biến đổi thành CAA GAT GTT, dẫn đến biến đổi acid amin tại vị trí 291 từ Val→Met (đột biến dạng viangchan).

Từ khóa: Exon 2, exon 9, thiếu hụt enzyme G6PD, PCR- MPTP

MỞ ĐẦU

G6PD là enzyme chính mở đầu cho con đường oxy hóa trực tiếp glucose ở hồng cầu. Thiếu hụt enzyme G6PD dẫn đến hàng loạt quá trình chuyển hóa liên quan bị rối loạn, các tác nhân oxy hóa tác động trực tiếp đến hồng cầu gây ra hiện tượng vỡ hồng cầu hay tiêu huyết, tan máu (Nguyễn Hữu Chấn *et al.*, 1992). Bệnh thiếu hụt enzyme G6PD là bệnh di truyền liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính, là bệnh thường gặp nhất trong các bệnh sai lệch di truyền của tế bào hồng cầu người. Hiện nay có khoảng hơn 400 dạng đột biến trên thế giới đã được công bố (Beutler 1994).

Gen *G6PD* có 13 exon và 12 intron, dài khoảng 100 kb, nằm trên nhiễm sắc thể X. Gen cấu trúc của *G6PD* dài 20114 bp, trong đó chỉ có 1548 bp được mã hóa. Intron giữa exon 2 và exon 3 dài tới 9857 bp (Beutler 1994). (Hsia *et al.*, 1993) khi nghiên cứu trên 4948 người Trung Quốc, Lào, Philipin ở Hawaii đã tìm ra 11 dạng đột biến trên DNA của người thiếu hụt G6PD hồng cầu trong đó có hai dạng đột biến gaohe 95 A→G (exon 2), 1003 catham G→ A (exon 9)

(Hsia *et al.*, 1993). Liu và cộng sự (2000) đã công bố nghiên cứu so sánh các dạng đột biến giữa hai nhóm người Dao và Hán ở Guangxi Trung Quốc. Kết quả cho thấy ở nhóm người Dao, các đột biến thường gặp là 41,2% canton (1376 G→T), 26,5% catham 1388 G→A, 14,7% gaohe 95A→ G, ngoài ra còn phát hiện ra đột biến mới ở vị trí nucleotid 1311 C→ T. Trong khi đó ở người Hán tỉ lệ các dạng đột biến tương ứng là 16,2%, 40,6% và 5,4% .

Nuchprayoon *et al.*, (2002) khi nghiên cứu trên 522 người dân tộc ở Bangkok, Thái Lan cho rằng các dạng đột biến điển hình là 54% viangchan, 10% canton, 8% mahidol, 5% kaiping, 2,6% union, 2,6% chinese-5 (Nuchprayoon *et al.*, 2002) Trên người campuchia, (Yoshida *et al.*, 2005) cho thấy có tới 97,9% số thiếu hụt G6PD thuộc dạng viangchan 871 G→ A và 2,1 % union 1360 C→ T. Trên người Malaixia, Wang và cộng sự (2008) phát hiện được 27 dạng đột biến: một số dạng đột biến phổ biến hay gặp ở người Campuchia, Myanmar là viangchan (871G→A, 1311C→T, IVS11 nt93TC) và G6PD mahidol (487G→A) (Wang *et al.*, 2008).

Trong một số nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu phân tích trình tự một số dạng đột biến thiếu hụt gen *G6PD* ở người dân tộc Gia rai (Đỗ Thị Tuyền *et al.*, 2010), người dân tộc Kinh và Mường (Đỗ Thị Tuyền *et al.*, 2009); dân tộc Nùng, Thái, Rục (Lê Thị Thùy Dương *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân tích các dạng đột biến trên người dân tộc Hà Nhì và dân tộc Dao để cung cấp thêm những thông tin khoa học về các dạng đột biến của dân tộc người Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là người bình thường, khỏe mạnh không có dị tật bẩm sinh, không có bệnh mạn tính, trạng thái thần kinh ổn định, tâm sinh lý bình thường. Tiêu chuẩn loại trừ: loại trừ các đối tượng bị thiếu máu cấp và mạn tính. Đối tượng nghiên cứu gồm 225 người trong đó thuộc các dân tộc Dao, Hà Nhì sinh sống ở các tỉnh miền núi phía bắc Việt Nam. Độ tuổi của đối tượng nghiên cứu từ 17-59 tuổi. Đối tượng phải có thời gian định cư tại nơi nghiên cứu từ 10 năm trở lên.

Các đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các đối tượng thiếu hụt *G6PD* sẽ được thông báo trực tiếp và được nhận tài liệu tư vấn về phòng và điều trị bệnh. Đồng thời họ được tư vấn về theo dõi, chăm sóc trẻ sơ sinh, phụ nữ có thai, những chú ý khi kết hôn, khi sinh sản, khi truyền máu ở các đối tượng bị thiếu hụt *G6PD*.

Thiết kế nghiên cứu

Lấy máu các đối tượng nghiên cứu để sàng lọc, xác định thiếu hụt *G6PD* bằng phương pháp formazan. Lấy các mẫu máu có kết quả formazan

đương tính, xác định hoạt độ *G6PD*, để đánh giá mức độ thiếu hụt *G6PD*. Lấy các mẫu máu có hoạt độ *G6PD* thấp để tiến hành tách chiết DNA, phát hiện đột biến gen *G6PD* theo 2 phương pháp: PCR-MPTP và đọc trình tự.

Chuẩn bị mẫu thử

Máu lấy từ tĩnh mạch hoặc từ đầu ngón tay, vào buổi sáng, khi đối tượng chưa ăn sáng; nhỏ 3 giọt máu vào giấy S&S#903, để khô và bảo quản ở nhiệt độ 4°C, trong thời gian 7 ngày. Sau khi sàng lọc xác định các đối tượng bị thiếu hụt *G6PD* (đương tính 3+) bằng phương pháp formazan (Kaoru *et al.*, 1997), các mẫu được tiến hành tách chiết DNA từ mẫu máu giấy (Sambrook and Russell 2000).

Hóa chất

Các hóa chất được dùng trong thí nghiệm như sucrose, tris base; $MgCl_2$, tritonX-100, proteinase K được mua từ Sigma (Mỹ); kit tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Mỹ), enzyme *Taq* polymerase, dNTP được mua từ Fermentas.

Phản ứng PCR

Tiến hành PCR trên các mẫu DNA để câu các exon. Các sản phẩm thu được sau PCR lần thứ nhất được dùng làm khuôn để tiến hành phản ứng MPTP cho các exon, xác định nhanh các dạng đột biến.

Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích là 25 μ l) bao gồm: 2,5 μ l đệm PCR; 1,5 μ l 25 mM $MgCl_2$; 2 μ l 2,5 mM dNTP; 1 μ l DNA khuôn; 16,75 μ l nước cất; 1 μ l mỗi mỗi loại; 0,5 μ l *Taq* polymerase 1 U. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95°C/10'; 35x (95°C/30"; 58°C/30"; 72°C/2'); 72°C/10'. Mỗi exon cần khuếch đại có các cặp mỗi tương ứng đặc hiệu (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mỗi của exon 2 và exon 9 trên gen *G6PD*.

Exon	Primer	Trật tự chuỗi nucleotide	Số cặp base (bp)
2	F 2-a	5'-cccagaggaactctcaagaaa	288
	R 2-b	5'-aaccaattagtgtggaagactga	
9	F E9FN	5'-agctctctcaggggtgtgga	537
	R E9RN	5'-tgaccaggaaggccattg	

Phản ứng PCR-MPTP

MPTP dựa trên các phản ứng PCR, một vùng đích trên gen *G6PD* được nhân lên, sau đó sản phẩm được sử dụng như một khuôn. Phản ứng PCR được tiến hành với nhiều primer theo chiều dọc xuôi liên tiếp trên khuôn trong vùng quan sát và một primer

đọc ngược thông thường. Sự vắng mặt một sản phẩm trong những sản phẩm được nhân lên sẽ xác định được vị trí của sự đột biến trong một vùng ngay sát vị trí ghi nhận của primer. Kết quả này đã được khẳng định lại bằng phân tích sequence.

Các sản phẩm PCR thu được sau PCR lần thứ

nhất được dùng làm khuôn để tiến hành phản ứng PCR-MPTP cho các exon. Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích là 10 μ l) bao gồm: 1 μ l đệm PCR; 1 μ l 25 mM $MgCl_2$; 1,6 μ l 2,5 mM dNTP; 1 μ l DNA khuôn; 4,4 μ l nước cất; 0,5 μ l mỗi mix; 0,25 μ l *Taq* polymerase 1 U. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95°C/10'; 30 x (95°C/30"; 52°C/30"; 72°C/30"); 72°C/10'.

Phản ứng PCR- MPTP được chạy song song tiến hành với 2 phản ứng, mỗi phản ứng có các

cặp mồi riêng. Trình tự mồi đặc hiệu cho các exon trong phản ứng tìm điểm đột biến PCR-MPTP (Bảng 2)

Xác định trình tự DNA

Sản phẩm PCR được tinh sạch và được đọc trình tự trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Phần mềm DNASTar và BLAST được sử dụng để tìm và so sánh trình tự nucleotide trong GenBank.

Bảng 2. Trình tự mồi của exon 2, 9 trên gen *G6PD* dùng cho phản ứng PCR-MPTP.

Exon		Trình tự nucleotide của mồi	Sản phẩm (bp)
2	2C	5'-catcggtgagatct	64
	2-95	5'-cagtcggatacacac	98
	2-95M	5'- cagtcggatacacG	98
	2-R	5'-ctccatgcctcagc	
	9C	5'- gagagggcgagg	146
9	9-871	5'- tctcaggtcaagg	229
	9-871M	5'- ctctcaggtcaagAt	94
	9-1003	5'-gtccaccaccgc	229
	9-1003M	5'- ggaccaccaccAc	95
	9-R	5'-gttctgccttgctg	

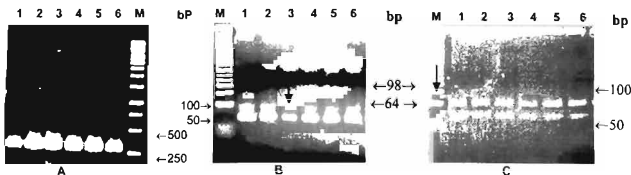
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích đột biến ở exon 2

Sau khi xác định được 6 mẫu bệnh nhân bị thiếu hụt G6PD dương tính 3+ trong tổng số 225 mẫu người dân tộc Hà nhĩ và người dân tộc Dao (Đỗ Thị Tuyền 2009- 2010), chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số và PCR tìm đột biến ở exon 2 và exon 9.

Kết quả ở hình 1B cho thấy mẫu số 3 xuất hiện đột biến ở exon 2, sản phẩm PCR- MPTP vắng sản phẩm 98 bp đột biến dạng gaohe. Bên cạnh việc dùng kỹ thuật PCR-MPTP xác định đột biến, chúng tôi cũng song song kiểm chứng lại kết quả bằng

phương pháp giải trình tự gen. Kết quả hình 2A cho thấy trình tự của đoạn gen trên exon 2 của người không bị thiếu hụt G6PD, không có đột biến (sử dụng làm mẫu đối chứng) khi so sánh với trình tự gen chuẩn của exon 2 trên ngân hàng gen có mã số X.55448, như vậy. Riêng mẫu số 3 được xác định là có đột biến gaohe theo kỹ thuật PCR-MPTP, tại vị trí nucleotid trên đoạn gen bình thường có đoạn trình tự: GAG AAA CTC (Hình 2A) tương ứng trên mẫu gen có đột biến, trình tự bị thay đổi 1 nucleotid từ A→G đó là GAG AGA CTC (Hình 2B). Đột biến được xác định là đột biến dạng gaohe thuộc exon 2, vị trí nucleotid số 95 bị biến đổi từ A→G, dẫn đến biến đổi acid amin tại vị trí 32 từ His→Arg.



Hình 1 Điện di đồ của (A) sản phẩm PCR câu exon 2 của 6 bệnh nhân thiếu hụt G6PD ((1-6) sản phẩm PCR câu exon 2. M: marker), (B) sản phẩm PCR- MPTP với mồi đột biến của exon 2 ((1-6) sản phẩm PCR- MPTP sử dụng mồi đột biến; M: marker), (C) sản phẩm PCR- MPTP sử dụng các cặp mồi không đột biến của các mẫu bệnh nhân thiếu hụt G6PD ((1-6) sản phẩm PCR- MPTP sử dụng mồi không đột biến; M: marker)