

# TÁCH VÀ PHÂN LẬP TẾ BÀO PHÔI THAI TRONG MÁU NGOẠI VI CỦA MẸ ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN KHÔNG CAN THIỆP

*Triệu Tiến Sang\*<sup>1</sup>; Trần Văn Khoa\*<sup>2</sup>; Đinh Đoàn Long\*\**

## TÓM TẮT

Năm 1893, Schmorl phát hiện tế bào (TB) phôi thai ở phổi của phụ nữ mang thai. Tới nay, sau nhiều nghiên cứu, đã khẳng định sự có mặt của TB phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ. Từ tuần thứ 8 của thai kỳ, đã phát hiện được các TB của thai gồm: trophoblast, bạch cầu, hồng cầu nhân, TB gốc. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: lựa chọn 30 phụ nữ mang thai từ tuần thứ 8 đến tuần thứ 22 của thai kỳ. Sử dụng phức hợp hạt từ và kháng thể đơn dòng CD71 để tách hồng cầu có nhân ra khỏi TB máu ngoại vi của mẹ. Sau khi tách được TB hồng cầu có nhân của con ra khỏi TB máu ngoại vi của mẹ, dùng bộ kit Vysis probes Multicolor MultiVysion PGT nhuộm huỳnh quang nhiễm sắc thể (NST) 13, 18, 21, X và Y. Kết quả: 15 tế bào hồng cầu có nhân bắt màu huỳnh quang với NST X, các NST 13, 18, 21. 13 TB hồng cầu có nhân bắt màu huỳnh quang với NST XY, NST 13, 18, 21 bình thường đều có 2 tín hiệu huỳnh quang. Có hai mẫu TB hồng cầu có nhân của con không bắt được tín hiệu

\* Từ khóa: Tế bào phôi thai; Máu ngoại vi; Phân lập.

## EXTRACTION AND ISOLATION OF EMBRYONIC CELL IN MATERNAL PERIPHERAL BLOOD CELL APPLYING IN NON-INTERFERENCE DIAGNOSIS

### SUMMARY

*Introduction: the discovery of the existence of fetal cells in maternal peripheral blood has opened up a new direction for the early diagnosis of congenital anomalies by means of non-interference. Objects, chemicals and research methods: we selected 30 pregnant women in the 8<sup>th</sup> week to the 22<sup>th</sup> week of pregnancy. CD71 antibodies are associated with chemical biotin magnetic beads were attached to streptavidin. Complex particles from above CD71 binds to red blood cells of the embryo have the principle immune. After extraction of isolated embryonic cells in maternal peripheral blood cells and staining kits using Vysis probes Multicolor MultiVysion PGT probe which binds specifically on the Y chromosome. Results 15 nucleated red blood cells of fetal cells carrying XX chromosomes and 13 of nucleated red blood cells carrying XY chromosomes. In 30 nucleated red blood cells, there are 2 nucleated red blood cells not signal appeared.*

\* Key words: Embryo cells; Peripheral blood; Isolation.

\* Học viện Quân y

\*\* Đại học Y Dược - Đại học Quốc Gia Hà Nội

Người phản hồi (Corresponding): Triệu Tiến Sang (trieusangk83@yahoo.com.vn)

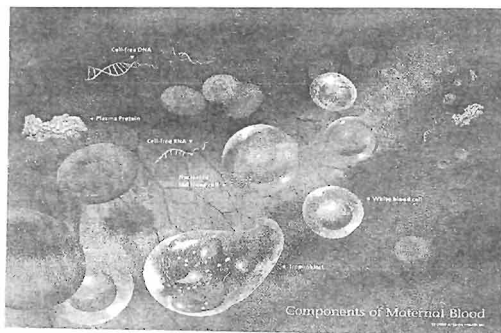
Ngày nhận bài: 28/04/2014; Ngày phản biện đánh giá bài báo: 28/07/2014

Ngày bài báo được đăng: 08/08/2014

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 1893, Schmorl phát hiện sự tồn tại của TB phôi thai ở phổi của phụ nữ mang thai. Sau nhiều nghiên cứu, đến nay đã khẳng định sự có mặt của TB phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ. Từ tuần thứ 8 của thai kỳ, đã phát hiện được các TB của thai gồm: trophoblast, bạch cầu, hồng cầu nhân, TB gốc. Số lượng các TB này rất thấp, nhưng mang vật chất di truyền của phôi thai, do vậy rất có ý nghĩa trong chẩn đoán dị tật sớm cho thai. Tuy nhiên,

có sự khác biệt giữa các TB: trophoblast xuất hiện sớm nhất, nhanh bị hủy, không có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu; bạch cầu phôi thai tồn tại cả sau thai kỳ, không có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu; hồng cầu nhân xuất hiện sớm và tồn tại trong suốt thai kỳ, có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu. Do vậy, các nghiên cứu trên thế giới tập trung vào phân tách hồng cầu nhân. Tách được riêng biệt TB phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ đã mở ra một hướng mới trong chẩn đoán trước sinh bằng biện pháp không can thiệp.



Hình 1: Hình ảnh các TB tồn tại trong máu ngoại vi của thai phụ (©2009 Arternmis Health Inc.).

## ĐỐI TƯỢNG, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

30 phụ nữ mang thai ở tuần thứ 8 đến tuần thứ 22 của thai kỳ. Tất cả được lấy 5 ml máu toàn phần. 2 mẫu đối chứng âm là 2 nữ giới chưa mang thai và chưa quan

hệ tình dục lần nào, cũng được lấy 5 ml. Các mẫu nghiên cứu được lấy tại Trung tâm Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

### 2. Hóa chất nghiên cứu.

Hạt từ tính đã gắn streptavidin, kháng thể CD71 đã biotin hóa, PBS 1X, ethanol 70%,

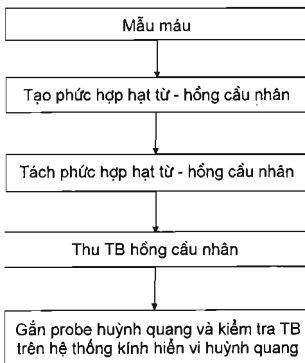
ethanol 100%, proteinase K, nước cất, bộ kit Vysis MultiVysion PGT Multicolor probes, lam kính, lamen, NP40, SSC20X, antifade II, formalamide, nước tinh khiết, HCl, methanol, axit acetic.

### 3. Thiết bị máy móc.

Máy lắc ổn nhiệt (Eppendorf, Đức), máy li tâm cao tốc (Hettich, Đức), pipet man (Ginson, Mỹ), buồng thao tác PCR (Mỹ), giá từ tính (Promega, Mỹ), bể nước ổn nhiệt (Mỹ), hệ thống kính hiển vi huỳnh quang (Axio Zeiss, Đức).

### 4. Phương pháp nghiên cứu.

Quy trình thực hiện



#### \* Quy trình tách chiết bằng hạt từ tính:

Kháng thể CD71 được biotin hóa gắn với hạt từ tính đã gắn với streptavidin. Phức hợp hạt từ trên có CD71 gắn với hồng cầu nhân của phôi thai theo nguyên tắc miễn dịch.

Cụ thể các bước như sau:

+ Bước 1: lấy 10  $\mu$ l kháng thể đã biotin hóa vào ống 1,5 ml.

+ Bước 2: thêm 20  $\mu$ l hạt từ đã gắn streptavidin, ủ ở 4°C trong 30 phút.

+ Bước 3: thêm 100  $\mu$ l PBS 1X, lắc nhẹ, đặt vào giá từ tính, hút bỏ dịch.

+ Bước 4: thêm 100  $\mu$ l PBS 1X, lắc nhẹ, hút hết dịch cho vào ống chứa máu ngoại vi của mẹ đã lấy trước đó. Lắc quay tròn 15 phút ở 4°C.

+ Bước 5: hút từng 1 ml máu cho vào ống 1,5 ml. Đặt lên giá từ tính hút bỏ toàn bộ dịch, giữ lại phức hợp hạt từ - hồng cầu nhân đã bị gắn lên trên thành ống phía giá từ tính.

+ Bước 6: thêm 100  $\mu$ l PBS, lắc đều, đặt lên giá từ tính, hút bỏ phần dịch lỏng (làm lại 3 lần).

+ Bước 7: thêm 20  $\mu$ l PBS 1X, Voltex 5 giây, lưu mẫu TB trong tủ -20°C.

\* Quy trình gắn probe lên TB hồng cầu có nhân:

Bước 1: hút dịch TB phôi đã tách được sau khi tách ở quy trình trên đặt lên lam kính. Đánh dấu vị trí đặt TB bằng cách khoanh vùng mặt dưới của lam kính.

Bước 2: để khô lam kính trong không khí, sau đó chuyển lam kính vào dung dịch nước trương 0,2% Tween20 in 0,01 M HCl, pH 2,0 bọc lọ nhân TB.

Bước 3: rửa lam kính bằng dung dịch PBS 1X (pH 7,0: 0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa sạch trong nước cất vô trùng 2 lần. Loại nước bằng dung dịch cồn 70%, 90%, 100% trong 2 phút ở nhiệt độ phòng và làm khô trong không khí.

Bước 4: thêm 2  $\mu$ l hỗn hợp probe và phủ lên trên bằng 1 lamen kích thước 9 x 9 mm. Bao phủ xung quanh bằng lớp nhựa gắn cao su để tránh thoát hơi nước.

Bước 5: ủ trong block nhiệt 75<sup>o</sup>C trong 5 phút, sau đó lại từ 16 - 22 giờ trong tủ ấm 37<sup>o</sup>C.

Bước 6: tách bỏ lamen và keo gắn lam kính, rửa lam kính trong dung dịch SSC 4X/0,05% Tween20 (pH 7,0) ở nhiệt độ phòng.

Bước 7: rửa nghiêng mặt lam kính bằng dung dịch 0,4X SSC/0,3% NP40 ở 73<sup>o</sup>C trong 5 phút.

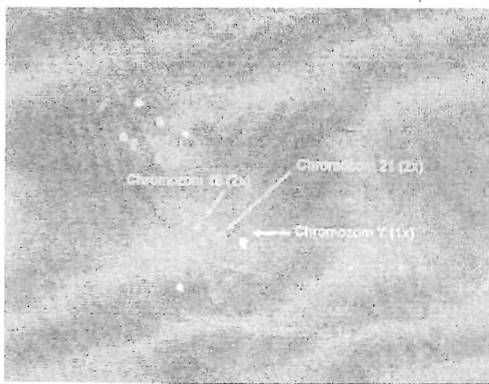
Bước 8: rửa lam kính trong dung dịch SSC 2X ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.

Bước 9: lấy lam kính ra đặt trong phòng tối, dùng giấy mềm lau khô. Thêm 3  $\mu$ l antifade II, sau đó đặt lamen lên trên.

Bước 10: quan sát tín hiệu huỳnh quang của TB phôi trên kính hiển vi huỳnh quang.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

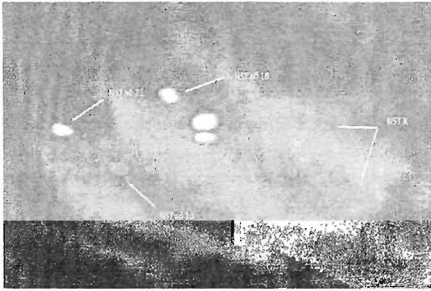
Sau khi tách chiết phân lập được TB phôi trong máu ngoại vi mẹ và nhuộm TB bằng bộ kit Vysis MultiVysion PGT Multicolor probes, trong đó có probe gắn đặc hiệu trên NST Y.



Hình 2: Hình ảnh nhuộm huỳnh quang mẫu TB phôi thai số 555.

(NST số 13: phổ màu đỏ, NST số 18: phổ Aqua xanh nước biển, NST số 21: phổ xanh lá cây, NST Y: phổ màu vàng, NST X: phổ màu xanh rêu).

Hình ảnh trên cho thấy đây là phôi mang bộ NST 46, XY. Các NST 13, 18, 21 đều có 2 tín hiệu, màu vàng có 1 tín hiệu của NST Y và một tín hiệu màu xanh rêu của NST X.



Hình 3: Hình ảnh nhuộm huỳnh quang NST của TB hồng cầu có nhân phôi thai số 556.

Kết quả trên TB hồng cầu có nhân của phôi thai ở bệnh nhân nghiên cứu số 556 có 2 NST X và các NST 13, 18, 21 đều có 2 tín hiệu bình thường. Trong tiêu bản này không xuất hiện tín hiệu màu vàng của NST Y.

Qua phân tích kết quả của 30 phôi thai nghiên cứu, chúng tôi thu được bảng kết quả Karotype của 5 NST 13, 18, 21 và X, Y như sau:

STT	MÃ BN	CHẨN ĐOÁN ADN PHÔI TỰ DO TRÊN GEN SRY	CHẨN ĐOÁN FISH	KẾT QUẢ SIÊU ÂM	GHI CHÚ
1	269	+	46, XY	+	
2	270	-	46, XX	-	
3	271	-	46, XX	-	
4	272	+	46, XY	+	
5	275	-	46, XX	-	
6	276	+	46, XY	+	
7	276	-	46, XX	-	
8	277	+	NG	+	Không xuất hiện tín hiệu
9	278	+	46, XY	+	
10	280	-	46, XX	-	

11	295	-	46, XX	-	
12	296	+	46, XY	+	
13	297	+	46, XY	+	
14	298	+	46, XY	+	
15	300	-	46, XX	-	
16	301	+	46, XY	+	
17	303	+	NG	+	Không xuất hiện tín hiệu
18	307	+	46, XY	+	
19	308	+	46, XY	+	
20	309	-	46, XX	-	
21	310	-	46, XX	-	
22	311	-	46, XX	-	
23	312	-	46, XX	-	
24	313	-	46, XX	-	
25	314	+	46, XY	+	
26	315	+	46, XX	+	
27	316	-	46, XY	-	
28	317	+	46, XY	+	
29	318	-	46, XX	-	
30	319	-	46, XX	-	

15 TB hồng cầu có nhân của phôi thai mang NST XX và 13 hồng cầu có nhân của phôi mang NST XY. Trong 30 phôi này, 2 phôi không xuất hiện tín hiệu. Có thể những phôi này không phá vỡ màng TB và màng nhân, do vậy các probe không thể gắn được vào NST. Trong 15 phôi được kiểm chứng bằng ADN phôi thai tự do mang NST XY được phân lập từ TB phôi, chúng tôi nhuộm thành công cho 13/15 trường hợp khi nhuộm FISH. Các phôi được kiểm chứng bằng ADN phôi thai tự do mang NST XX được nhuộm FISH đều thấy bộ NST xuất hiện 2 NST X, điều này phù hợp với kết quả của ADN phôi thai tự do và siêu âm sau này.

### KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chứng minh được trong máu ngoại vi của mẹ từ tuần thứ 8 có xuất hiện TB phôi thai tự do bằng kỹ thuật nhuộm huỳnh quang đặc hiệu NST Y. Nghiên cứu này góp phần mở ra một hướng mới trong chẩn đoán trước sinh

các bất thường NST và bệnh di truyền bằng phương pháp không can thiệp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87, pp.3279-3283.

2. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet.* 1997, 61, pp.822-829.
3. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93, pp.705-708.
4. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods.* 1995, 4, pp.357-362.
5. Lo YMD, Fleming KA, Wainscoat JS. Strategies for the detection of autosomal fetal DNA sequence from maternal peripheral blood. *Ann N Y Acad Sci.* 1994, 731, pp.204-213.
6. Lo YMD, Lo ESF, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS. Two-way cell traffic between mother and fetus. biologic and clinical implications. *Blood.* 1996, 88, pp 4390-4395.
7. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA.* 1993, 270, pp.2357-2361.
8. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn.* 1997, 17, pp.743-752.
9. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969, 1, pp.1119-1122.