# PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ADN PHÔI THAI TỰ DO TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI MẸ BẰNG PHƯƠNG PHÁP REALTIME - PCR

*Triệu Tiến Sang*; Trần Văn Khoa*; Đinh Đoàn Long***

**TÓM TẮT**

Việc phát hiện ra sự tồn tại của ADN phôi thai tự do và tế bào phôi thai tự do trong huyết tương người mẹ đã mở ra một hướng chẩn đoán trước sinh mới bằng biện pháp không can thiệp. Để định lượng được ADN phôi thai tự do trong huyết tương người mẹ, chúng tôi sử dụng phương pháp Realtime - PCR dựa trên kỹ thuật TaqManPCR Realtime có sử dụng đầu dò huỳnh quang. Kỹ thuật này cho phép quan sát được các tín hiệu huỳnh quang của gen đích và biết được số bản copy của chúng ở từng chu kỳ nhân gen. Đối tượng nghiên cứu: 40 thai phụ đang mang thai từ tuần thứ 7 đến tuần thứ 12 của thai kỳ. Kết quả: gen GAPDH xuất hiện tín hiệu ở cả 40 mẫu với số bản copy dao động từ 4,63E + 02 đến 7,99E + 05/1 ml huyết tương. Gen SRY xuất hiện tín hiệu huỳnh quang ở các mẫu thai nam từ 1,48E + 00 đến 2,97E + 03. Hai mẫu nội chứng âm gen SRY không xuất hiện tín hiệu và gen GAPDH xuất hiện tín hiệu với số bản copy mẫu nội chứng âm số 1 là 1,33E + 04 và số bản copy của mẫu nội chứng âm 2 là 1,44E + 04.

* Từ khoá: ADN phôi thai tự do; Huyết tương mẹ, Định lượng.

# DETECTION AND QUANTITATION OF FETAL CELL DNA IN MATERNAL PERIPHERAL BLOOD BY REALTIME - PCR

**SUMMARY**

*Introduction: the discovery of the existence of fetal cells in maternal peripheral blood has opened up a new direction for early diagnosis of congenital anomalies by means of non-Interference. To quantify fetal DNA circulating in maternal blood we used Realtime - PCR method based on TaqMan PCR technique using fluorescent probes. This technique allows to observe the fluorescence signal of the target gene DNA for us to know the number of copies of each target gene at each time point of the PCR process. Objects, chemicals DNA research methods: we shall select 40 pregnant women in the 7th week to the 12th week of pregnancy. Along with two negative control sample of 2 DNA pregnant women not yet having sex once 5 ml of blood is taken DNA conduct split DNA separated plasma free plasma DNA as the other sample. Results: 40 samples were studied gene GAPDH signals appear with number of copy of GAPDH gene in 1 ml is from 4.63E + 02 to 7.99E + 05 in 1 ml of plasma. SRY gene appearance signals in the positive samples ADN the number of copies of the SRY gene ranged from 1.48 to 2.97E + 03 in 1 ml of plasma. The form does not appear SRY gene signal is the pregnant female gender, levels of GAPDH gene in plasma DNA of this sample ranged from 1.88 to 8.13E + 04E + 03 copies in 1 ml of plasma. For internal negative control sample 2 signal SRY gene does not appear DNA GAPDH gene signal of internal negative control sample 1 is 1.33E + 04 DNA internal negative control 2 is 1.40E + 04 copies/ml.*

** Key words: Fetal DNA; Realtime - PCR; Non-interference.*

** Học viện Quân y*

*** Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội*

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

***Ngày nhận bài: 28/04/2014; Ngày phản biện đánh giá bài báo: 18/05/2014***

***Ngày bài báo được đăng: 26/06/2014***

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều phương pháp chẩn đoán trước sinh đã được áp dụng trong lâm sàng như: siêu âm thai, test sàng lọc bộ ba *(triple test)*, là những biện pháp không can thiệp, nhưng cho kết quả muộn và độ đặc hiệu thấp. Ngoài ra, còn có các phương pháp cho kết quả sớm như: chọc hút nước ối, sinh thiết gai rau. Nhưng đây là những phương pháp có can thiệp, tỷ lệ biến chứng cao cho cả thai nhi và sản phụ.

Việc phát hiện ra sự tồn tại của tế bào phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ đã mở ra một hướng đi mới cho chẩn đoán sớm các dị tật bẩm sinh bằng phương pháp không can thiệp.

Để định lượng được ADN phôi thai lưu hành trong máu mẹ, chúng tôi dùng phương pháp realtime - PCR dựa trên kỹ thuật PCR TaqMan sử dụng đầu dò huỳnh quang. Kỹ thuật này cho phép quan sát các tín hiệu huỳnh quang của gen đích và cho ta biết số bản copy của từng gen đích ở từng thời điểm của quá trình PCR. Do vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: *Phát hiện và định lượng ADN phôi thai tự do trong huyết tương người mẹ bằng phương pháp realtime - PCR.*

## ĐỐI TƯỢNG, HOÁ CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

40 phụ nữ mang thai từ tuần thứ 7 đến tuần thứ 12 của thai kỳ. Tất cả được lấy 5 ml máu toàn phần và ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút rồi lấy huyết tương. Cùng với 2 mẫu đối chứng âm là 2 nữ giới chưa mang thai và chưa quan hệ tình dục lần nào, lấy 5 ml máu và tiến hành tách huyết tương, tách ADN tự do trong huyết tương như các mẫu nghiên cứu khác. Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

### 2. Hóa chất nghiên cứu.

- Hóa chất tách chiết ADN: ethanol 70%, ethanol 100%, proteinase K, nước cất, bộ kít Quiagen.

- Hóa chất cho PCR: PCR Reaction Mix, DNA Polymerase, Reverse primer, Forward primer, probe, nước cất khử ion và vô trùng.

- Thiết bị: máy lắc ổn nhiệt (Eppendorf, Đức), máy ly tâm cao tốc (Hettich, Đức), buồng thao tác PCR (Mỹ), máy Realtime - PCR (RotoGen, Quiagene), máy PCR ABI 9700 (Applied Biosystem), tủ hốt hoá chất (Hàn Quốc), máy đo nồng độ ADN (Nano Drop, Mỹ).

### 3. Phương pháp nghiên cứu.

Huyết tương sau khi ly tâm, lấy 200 ml tách chiết bằng bộ kít của Quiagen. ADN sau khi tách chiết được hòa tan trong 50 ul $H_2O$ deion.

ADN này sau đó được khuếch đại bằng kỹ thuật realtime - PCR với các đầu dò:

| | |
|---|---|
| SRY_F | 5-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3' |
| SRY_R | 5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3' |
| Probe SRY | 5'-(FAM)_TCTGCCTCCCTGACT-GCTCTACTGCT_(TAMRA)-3' |
| GAPDH_F | 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3' |
| GAPDH_R | 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3' |
| Probe GAPDH | 5'(HEX)_AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC_(BHQ1)3 |

Đánh dấu đầu dò bằng 2 màu huỳnh quang HEX và FAM.

Thực hiện quá trình chạy PCR theo chu trình sau:

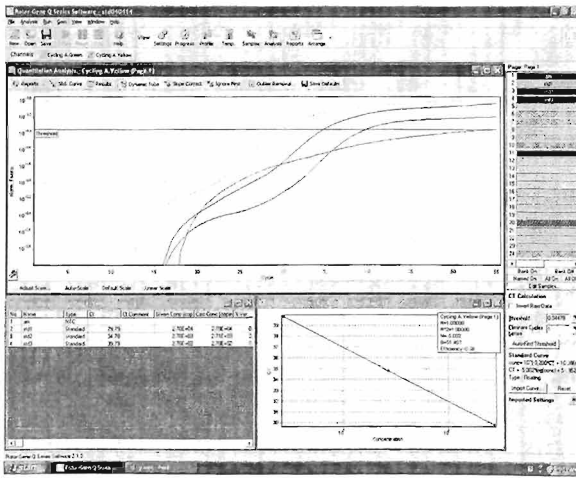
Phản ứng PCR với tổng thể tích phản ứng 25 ul, trong đó PCR master mix 10 ul; primer SRY (F, R probe):(0,25:0,25:0,5) ul và primer GAPDH (F, R probe):(0,25:0,25:0,5 ul); nước: 8 ul.

| | | |
|---|---|---|
| 95°C | 10 phút | 1 chu kỳ |
| 95°C | 1 phút | 55 chu kỳ |
| 60°C | 1 phút | |

* *Xử lý số liệu:* bằng phần mềm chuyên dụng của máy chạy realtime-PCR RotoGen - Quiagen đã tích hợp sẵn và các thuật toán thống kê trên phần mềm phân tích số liệu Excel Microsoft Office.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

**1. Kết quả sau khi chạy đường chuẩn của gen SRY và gen GAPDH trong mẫu chuẩn pha loãng ở các nồng độ $10^4$, $10^3$, $10^2$.**

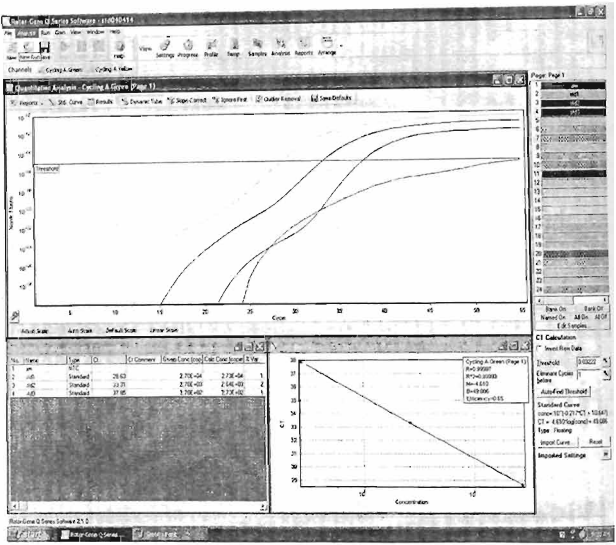


*Hình 1:* Hình ảnh phân tích đường chuẩn của gen GAPDH.

Tín hiệu của gen GAPDH lên đẹp, đường chuẩn tốt có hệ số R = 0,99997; $R^2$ = 0,99993, hệ số tương quan rất chặt. Tính được số bản copy của các mẫu nghiên cứu của gen GAPDH theo công thức:

$$conc = 10^{(-0.200*CT + 10.386)}$$
$$CT = -5.002*\log(conc) + 51.952$$

Gen SRY với tín hiệu huỳnh quang màu xanh dưới đây cũng cho tín hiệu tốt và đường chuẩn lên đẹp với hệ số tương quan chặt R = 0,99988 và $R^2$ = 0,99975.



*Hình 2:* Hình ảnh phân tích đường chuẩn của gen SRY.

Tính số bản copy của gen SRY theo công thức sau:

$$conc = 10^{(-0.217*CT + 10.647)}$$
$$CT = -4.610*\log(conc) + 49.086$$

**2. Kết quả chạy định lượng 40 mẫu huyết tương phụ nữ mang thai từ tuần thứ 8 đến tuần 12 của thai kỳ.**

Áp dụng quy trình trên để định lượng kiểm tra nồng độ ADN thai nhi trong huyết tương người mẹ trên 40 mẫu bằng cặp mồi và probe trên gen SRY, cùng với 2 mẫu đối chứng âm, thu được các kết quả sau:

*Bảng 1:* Nồng độ ADN của thai nhi trong huyết tương người mẹ.

| STT | MÃ BỆNH NHÂN | TUỔI THAI | SỐ BẢN COPY GEN SRY | CT_SRY | SỐ BẢN COPY GEN GAPDH | Ct_GAPDH | TỶ LỆ GEN SRY/GAPDH (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 623 | 8,3 | 2,60E + 02 | 36,96 | 2,13E + 04 | 24,55 | 1,2207 |
| 2 | 622 | 8,4 | 3,50E + 02 | 38,62 | 2,89E + 04 | 25,65 | 1,2115 |
| 3 | 621 | 8 | 1,59E + 02 | 35,54 | 2,10E + 04 | 23,48 | 0,7571 |
| 4 | 301 | 9 | 1,01E + 03 | 29,62 | 7,99E + 05 | 27,47 | 0,1264 |
| 5 | 296 | 8,2 | 3,51E + 00 | 35,21 | 5,08E + 02 | 26,95 | 0,6909 |
| 6 | 308 | 8,4 | 1,48E + 00 | 34,33 | 6,92E + 02 | 27,75 | 0,2139 |
| 7 | 269 | 8,3 | 2,97E + 03 | 32,51 | 1,89E + 05 | 26,48 | 1,5714 |
| 8 | 317 | 8 | 1,96E + 03 | 33,6 | 4,33E + 04 | 24,47 | 4,5266 |
| 9 | 322 | 8 | 7,24E + 01 | 40,89 | 7,56E + 02 | 29,95 | 9,5767 |
| 10 | 277 | 8,2 | 2,31E + 02 | 36,85 | 3,47E + 03 | 25,67 | 6,6571 |
| 11 | 303 | 8 | 1,66E + 01 | 42,34 | 1,38E + 03 | 29,98 | 1,2029 |
| 12 | 323 | 8,3 | 2,31E + 02 | 35,87 | 2,79E + 03 | 30,99 | 8,2766 |
| 13 | 555 | 12 | 1,09E + 02 | 38,72 | 7,43E + 02 | 31,02 | 14,6703 |
| 14 | 545 | 8,2 | 6,77E + 01 | 39,66 | 1,21E + 03 | 34,68 | 5,5950 |
| 15 | 551 | 8 | 6,86E + 02 | 35,02 | 3,11E + 04 | 23,49 | 2,2058 |
| 16 | 540 | 10 | 5,27E + 02 | 35,55 | 4,02E + 03 | 27,62 | 13,1095 |
| 17 | 542 | 7,5 | 1,23E + 02 | 36,56 | 1,20E + 04 | 25,42 | 1,0250 |
| 18 | 570 | 8 | 1,28E + 02 | 38,38 | 1,51E + 04 | 24,94 | 0,8477 |
| 19 | 327 | 9 | 7,81E + 01 | 39,38 | 2,41E + 03 | 33,29 | 3,2407 |
| 20 | 582 | 9 | 1,64E + 02 | 37,89 | 5,19E + 03 | 31,74 | 3,1599 |
| 21 | 567 | 10 | 1,95E + 02 | 39,82 | 2,21E + 03 | 28,83 | 8,8235 |
| 22 | 538 | 8 | 7,24E + 01 | 34,99 | 3,19E + 03 | 32,72 | 2,2696 |
| 23 | 537 | 8 | 2,31E + 02 | 39,52 | 2,57E + 04 | 23,87 | 0,8988 |
| 24 | 583 | 8 | 1,66E + 01 | 36,56 | 2,41E + 03 | 28,65 | 0,6888 |
| 25 | 575 | 8 | 4,15E + 01 | 41,1 | 2,28E + 04 | 24,12 | 0,1820 |
| 26 | 316 | 8 | 1,35E + 02 | 38,28 | 1,61E + 04 | 34,1 | 0,8385 |
| 27 | 331 | 11,2 | 2,57E + 02 | 36,99 | 2,34E + 03 | 28,71 | 10,9829 |
| 28 | 298 | 8 | 1,36E + 02 | 38,27 | 9,21E + 04 | 21,3 | 0,1477 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 | 297 | 8 | 2,87E + 02 | 38,21 | 1,08E + 04 | 30,27 | 2,6574 |
| 30 | 314 | 11 | 4,02E + 01 | 40,71 | 4,63E + 02 | 31,97 | 8,6825 |
| 31 | Âm nội chứng 1 | | | | 1,33E + 04 | 29,08 | 0,00 |
| 32 | Âm nội chứng 2 | | | | 1,40E + 04 | 27,75 | 0,00 |
| 33 | 270 | 8,4 | - | - | 8,13E + 04 | 31,97 | 0,00 |
| 34 | 271 | 11 | - | - | 3,42E + 04 | 34,1 | 0,00 |
| 35 | 275 | 8 | - | - | 2,74E + 04 | 24,47 | 0,00 |
| 36 | 276 | 8 | - | - | 5,28E + 04 | 24,74 | 0,00 |
| 37 | 280 | 8,2 | - | - | 1,88E + 03 | 29,95 | 0,00 |
| 38 | 295 | 8 | - | - | 5,21E + 04 | 30,99 | 0,00 |
| 39 | 300 | 8,3 | - | - | 7,93E + 04 | 33,29 | 0,00 |
| 40 | 309 | 9 | - | - | 1,38E + 04 | 28,71 | 0,00 |
| 41 | 310 | 11,2 | - | - | 1,90E + 04 | 28,79 | 0,00 |
| 42 | 311 | 12 | - | - | 1,40E + 04 | 27,75 | 0,00 |

Tất cả 40 mẫu nghiên cứu gen GAPDH đều xuất hiện các tín hiệu với số bản copy của gen GAPDH này/1 ml từ 4,63E + 02 đến 7,99E + 05/1 ml huyết tương. Gen SRY xuất hiện tín hiệu ở các mẫu dương tính và số bản copy của gen SRY dao động từ 1,48 - 2,97E + 03/1 ml huyết tương. Các mẫu không xuất hiện tín hiệu của gen SRY là thai mang nhiễm sắc thể giới tính XX, nồng độ ADN gen GAPDH huyết tương của những mẫu này dao động từ 1,88E + 03 đến 8,13E + 04 bản copy/1 ml huyết tương. Đối với 2 mẫu nội chứng âm, tín hiệu gen SRY không xuất hiện và tín hiệu gen GAPDH của mẫu nội chứng âm 1 là 1,33E + 04, nội chứng âm 2 là 1,40E + 04 bản copy/ml.

## KẾT LUẬN

Đã phát hiện và định lượng được nồng độ ADN tự do của thai nhi lưu hành trong huyết tương người mẹ bằng phương pháp realtime - PCR. Nghiên cứu này mở ra hướng chẩn đoán dị tật trước sinh và các bệnh di truyền trước sinh bằng biện 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, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW.* Fetal cells in maternal blood: determination of purity DNA yield by quantitative PCR. Am J Obstet Gynecol. 1994, 171, pp.922-926

*3. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP.* PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal DNA aneuploid pregnancies. Am J Hum Genet. 1997, 61, pp.822-829.

*4. 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

*5. BolADN CR.* Setting microsatellites free. Nat Med 2: 972-974 Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, Caligaris CF, Saglio G (1990) Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. Blood. 1996, 75, pp.2102-2106

*6. Chen XQ, Stroun M, Magnenat J-L, Nicod LP, Kurt A-M, Lyautey J, Lederrey C et al.* Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. Nat Med. 1996, 2, pp.1033-1035.

*7. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW.* Prenatal diagnosis of sickle cell anemia DNA thalassemia by analysis of fetal cells in maternal blood Nat Genet. 1996, 14, pp.264-268.

*8. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H.* Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency DNA relationship to gestational age. Hum Genet. 1993, 91, pp.427-432.

*9. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.* Realtime quantitative PCR. Genome Res. 1996, 6, pp.986-994.

*10. HollADN PM, Abramson RD, Watson R, GelfADN DH.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5_–3_ exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA. 1991, 88, pp.7276-7280