

PHÁT HIỆN ADN TỰ DO CỦA THAI NHI TRONG HUYẾT TƯƠNG PHỤ NỮ MANG THAI BẰNG KỸ THUẬT PCR, ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN BỆNH DI TRUYỀN TRƯỚC SINH

Triệu Tiên Sang*, Trần Văn Khoa*, Đinh Đoàn Long**

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá chuỗi phản ứng PCR phát hiện ADN đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y trong huyết tương của phụ nữ mang thai ở các giai đoạn khác nhau. ADN được phân lập và tách chiết từ huyết tương của phụ nữ mang thai từ tuần thứ 7 đến tuần thứ 40 của thai kỳ, sau đó ADN đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y (DYS14) được khuếch đại và gen house keeping gen GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) làm gen nội chứng cũng được khuếch đại đồng thời trong phản ứng PCR. Các phân tích sau khi sinh của giới tính thai nhi cho thấy 54 phụ nữ mang thai nam và 36 nữ. Trong số 54 phụ nữ mang thai nam tín hiệu ADN của gen *DYS14* trên nhiễm sắc thể Y được phát hiện trên 53 trường hợp (98,1%), 36 trường hợp mang thai nữ không thấy phát hiện ADN của gen *DYS14*. Đối với gen GAPDH chúng tôi nhận được lên ở cả 90 trường hợp nghiên cứu này. Điều đó chứng tỏ rằng trong quá trình tách chiết ADN phôi thai tự do trong máu mẹ của chúng tôi đạt kết quả tốt và đây sẽ là một phương pháp hữu ích để có thể chẩn đoán và sàng lọc bệnh di truyền trên nhiễm sắc thể thường và nhiễm sắc thể giới tính bằng biện pháp không can thiệp trong tương lai. Ứng dụng kết quả này chúng tôi tiến hành chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ con bằng kỹ thuật PCR nhân gen *RhD* trên đối tượng bà mẹ có *Rh(-)* đang mang thai muốn xác định nhóm máu *Rh* của thai nhi. Kết quả cho thấy có 7 trong tổng số 9 bệnh nhân mang thai có *Rh(+)*, 2 trong 9 bệnh nhân mang thai có nhóm máu thai nhi phù hợp với nhóm máu của người mẹ.

SUMMARY

The present study was undertaken to evaluate a polymerase chain reaction (PCR) for detection of Y chromosome-specific fetal DNA in maternal plasma of pregnant women during different gestational stages. DNA isolated from plasma samples of 90 pregnant women (between 7 ADN 40 weeks' gestation) underwent specific DNA on the Y chromosome (*DYS14*) gene is amplified and house keeping gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene as internal control were amplified simultaneously in the PCR reaction. The postpartum analysis of fetal gender showed that 54 women carried male ADN 36 female fetuses. Among the 54 women bearing male fetuses, Y chromosome-specific signals were detected in 53 (98,1%) plasma ADN samples, 36 cases of pregnant women show no detection of gene *DYS14*. Internal control GAPDH gene is amplified in the 90 case studies. This demonstrates that the process of extracting fetal freedom DNA in maternal blood, we achieved good results and this will be a useful approach to disease diagnosis and genetic screening on autosomes and sex chromosomes as a non-invasive method in the future. The application of this result we conducted diagnostic disagreement between mother blood and fetal blood by PCR on *RhD* gene of mothers has the *Rh(-)* blood groups. Results showed that 7 out of 9 patients pregnant *Rh (+)*, 2 of 9 patients pregnancy fetal blood group matches with the mother's blood.

* *BM. Sinh học và Di truyền y học - Học viện Quân Y*

** *BM. Di truyền - Khoa Sinh học - Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQGHN*
Phân biện khoa học: GS.TS. Hoàng Văn Lương

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều phương pháp chẩn đoán trước sinh các dị tật bẩm sinh, các bệnh di truyền. Các kỹ thuật này được chia thành 2 nhóm: Phương pháp không can thiệp (*noninvasive technique*) như siêu âm sản khoa, triple test và phương pháp can thiệp (*invasive technique*) chọc hút nước ối, sinh thiết gai rau, lấy máu cuống rốn, nội soi thai. Đối với phương pháp không can thiệp chỉ cho phép sàng lọc các bệnh và các dị tật bẩm sinh, độ chính xác không cao. Các biện pháp can thiệp cho phép lấy được đầy đủ vật chất di truyền của thai nhi do vậy cho phép chẩn đoán chính xác bệnh di truyền và các dị tật bẩm sinh của thai nhi nhưng nhược điểm của kỹ thuật này là xác định muộn vào tuần 14 -22 tuần của thai kỳ và kỹ thuật này có đem lại một phần nhỏ rủi ro cho thai phụ là gây nhiễm trùng ối, đẻ non, thai lưu... Do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu là tách được ADN của thai nhi trong máu mẹ và chứng minh sự tồn tại của ADN thai nhi trong máu mẹ, phục vụ cho chẩn đoán trước sinh các bệnh di truyền và các dị tật bẩm sinh.

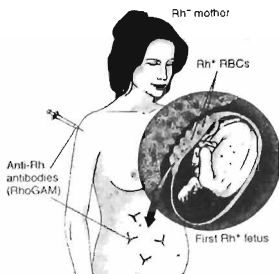
Gần đây có rất nhiều nhà khoa học quan tâm tới việc sử dụng các ADN từ huyết tương và huyết thanh của phụ nữ mang thai để chẩn đoán trước sinh các bệnh di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại trình tự gen của thai nhi trong máu mẹ (Botezatu et al., 2000; Lo, 2000). Đoạn ADN đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y là gen đích của phản ứng PCR để chứng minh được sự hiện

diện của ADN của tế bào thai nhi trong máu người mẹ bởi vì một phụ nữ bình thường trong máu của họ không mang nhiễm sắc thể Y. Sự hiện diện của các đoạn ADN trên NST Y trong mẫu máu của mẹ có nguồn gốc là từ thai nhi nam.

Để áp dụng thành công của kỹ thuật tách ADN tự do của thai nhi trong máu ngoại vi của mẹ chúng tôi tiến hành chẩn đoán sự bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con. Những trường hợp bất đồng nhóm máu này thường dẫn tới tình trạng sảy thai, thai chết lưu do kháng thể của cơ thể mẹ nhận diện rằng thai nhi là vật thể lạ và tấn công.

Nếu máu thai nhi là Rhesus dương, máu mẹ là rhesus âm thì máu mẹ có thể tạo ra kháng thể kháng rhesus. Kháng thể này có thể đi vào lại bánh nhau, đến máu thai nhi gắn lên hồng cầu của thai nhi gây nên hiện tượng tán huyết. Hầu như trẻ sinh ra lần đầu tiên là bình thường vì hồng cầu của thai nhi mới đi qua máu mẹ vào thời điểm lúc sinh. Khi đó, trẻ được tách khỏi tuần hoàn của mẹ.

Đối với thai nhi thứ hai, có rhesus dương, khi đó sẽ gây hiện tượng miễn dịch mạnh hơn, dẫn đến bất đồng nhóm máu rhesus cho thai thứ hai. Nhưng trường hợp mẹ bị rhesus âm tính, trước đây có nhận máu của người Rhesus dương, hoặc đã từng nạo thai, thai ngoài tử cung, sảy thai, hoặc có can thiệp thủ thuật hoặc yếu tố nào đó gây xuất huyết qua bánh nhau rộng đều có nguy cơ dẫn đến trao đổi máu mẹ- thai mà thai có Rhesus dương thì thai đầu tiên cũng có bất đồng nhóm máu Rhesus nặng.



Hình 1: Hình minh họa sự bất đồng nhóm máu Rh giữa mẹ và con

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bệnh nhân chúng tôi lấy là 90 mẫu phụ nữ mang thai ở các tuổi thai khác nhau từ tuần thứ 7 đến tuần thứ 40 của thai kỳ. Các mẫu máu được lấy 5ml máu toàn phần chống đông trong ống EDTA. Sau khi lấy mẫu máu vào ống chống đông EDTA cần được ly tâm ngay lập tức. Trong 90 mẫu này được xác định và theo dõi sau sinh có 54 người mang thai nam và 36 người mang thai nữ.

Máu ngoại vi của 9 phụ nữ mang thai có nhóm máu Rh(-), tuổi thai từ 7-27 tuần, mỗi mẫu 5 ml chống đông bằng ống chứa EDTA. Các mẫu nghiên cứu được tiến hành lấy mẫu tại trung tâm nghiên cứu Sinh Y Dược – Học viện Quân y.

Hóa chất, thiết bị và phương pháp nghiên cứu:

Hóa chất: EDTA, TBE, acid boric, Ethanol, nước deion, tube PCR, ống eppendopf, agarose, ethidium bromide, ...

Thiết bị nghiên cứu: Máy ôn nhiệt Eppendopf, máy PCR ABI9700, hệ thống điện di Biorad, hệ thống chụp gel Biorad...

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp tách chiết ADN từ huyết tương được tiến hành theo phương pháp có cải tiến được miêu tả trước đó bởi Lo và cộng sự năm 1997. Lấy 200 μ l huyết tương biến tính ở nhiệt độ 99°C trong 5 phút, sau đó được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút, thu lấy dịch nổi, dùng 10 μ l cho phản ứng PCR.

Primer để phát hiện ra nhiễm sắc thể Y:

Dùng primer đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y (DYS14) để phát hiện ra sự có mặt của NST Y. Sản phẩm của gen là là đoạn gen đặc hiệu có kích thước 137bp. Để kiểm chứng cho việc tách ADN có thành công hay không chúng tôi sử dụng thêm một primer cho gen nội chứng GAPDH, gen này có cả ở mẹ và con. Gen GAPDH này có sản phẩm là 97bp. Chúng tôi tiến hành chạy multiplex PCR với 2 cặp mỗi này đồng thời.

Gen DYS14

Forward :

5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3'

Reverse:

5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3'

Gen GAPDH

Forward:

5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'

Reverse:

5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'

Quy trình chạy PCR:

Thành phần phản ứng PCR: master mix của hãng Promega, Primer được đặt của công ty IDT của Mỹ.

Master mix	12,5 µl
DYS14 F	0,25µl
DYS14 R	0,25µl

GAPDH F	0,25µl
GAPDH R	0,25µl
Nước	2,0µl
Template (mẫu)	5,0 µl

Với chu trình nhiệt như sau:

95°C	10 phút	1 chu kỳ
94°C	1 phút	55 chu kỳ
60°C	1 phút	
72°C	1 phút	
72°C	20 phút	1 chu kỳ
4°C	∞	1 chu kỳ

Để chẩn đoán sự bất đồng nhóm máu chúng tôi thiết kế primer trên gen RhD:

Gen RhD

RhD-F: 5'-AAAGGGGTGGGTAGGGAATA-3'

RhD-R: 5'-AGGTAGGGGCTGGACAGAA-3'

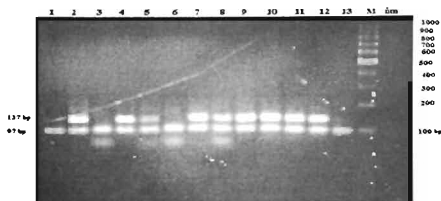
Sản phẩm phản ứng của gen RhD này là 366bp

Bước 1	94°C – 4 phút	1 chu kỳ
Bước 2	94°C – 1 phút	30 chu kỳ
	54°C – 1 phút	
	72°C – 1 phút	
Bước 3	72°C – 10 phút	1 chu kỳ
Bước 4	4°C – vô cùng	1 chu kỳ

Sản phẩm PCR sẽ được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2%. Đệm điện di TBE IX.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen DYS14 và GAPDH



Hình 2: Hình ảnh điện di kiểm tra nhân gen DYS14 và GAPDH

M: Marker 100 (thang chuẩn từ 100bp đến 1000bp)

Âm: chứng âm nước cất

Giếng 13: nội chứng âm

Giếng 12: nội chứng dương

Giếng 11: chứng dương

Các giếng còn lại từ 1 đến 11 là mẫu nghiên cứu

Từ kết quả điện di trên chúng tôi nhận thấy:

Các mẫu chứng âm không thấy xuất hiện băng nào do vậy quá trình chạy PCR không bị nhiễm. Giếng số 13 là mẫu nội chứng âm là mẫu AND từ người phụ nữ chưa quan hệ tình dục bao giờ và chưa mang thai lần nào. Mẫu số 12 là mẫu nội chứng dương được lấy từ mẫu nam giới bình thường. Giếng số 11 là mẫu chứng dương đã được xác định mang thai nam bằng siêu âm ở tuần thứ 36. Mẫu chứng dương lên cả hai băng 97bp của gen GAPDH và 137bp của gen DYS14.

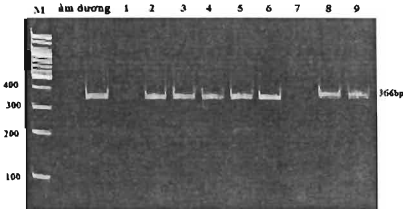
Các mẫu số 1, 3, 6 chỉ thấy xuất hiện băng 97bp của gen GAPDH, kết quả này đối chiếu với kết quả sau sinh cho thấy phù hợp (các bà mẹ này mang thai nữ); Các mẫu 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 thấy xuất hiện cả hai băng 97bp và 137bp, chứng tỏ các mẫu nghiên cứu này là các bà mẹ mang thai nam phù hợp với kết quả sau sinh.

Chúng tôi cũng đã tiến hành nhân gen PCR và điện di kiểm tra sản phẩm của tất cả các mẫu nghiên cứu còn lại và có bảng kết quả như sau:

Mẫu	Kết quả PCR/sau sinh	Mẫu	Kết quả	Mẫu	Kết quả	Mẫu	Kết quả	Mẫu	Kết quả
1	-/-	19	+/+	37	+/+	55	+/+	73	-/-
2	+/+	20	-/-	38	-/-	56	+/+	74	-/-
3	-/-	21	-/-	39	+/+	57	-/-	75	-/-
4	+/+	22	+/+	40	+/+	58	-/-	76	+/+
5	+/+	23	+/+	41	-/-	59	-/-	77	+/+
6	-/-	24	+/+	42	+/+	60	+/+	78	+/+
7	+/+	25	-/-	43	+/+	61	+/+	79	-/-
8	+/+	26	+/+	44	-/-	62	-/-	80	-/-
9	+/+	27	+/+	45	+/+	63	-/-	81	+/+
10	+/+	28	+/+	46	+/+	64	+/+	82	+/+
11	+/+	29	-/-	47	-/-	65	+/+	83	-/-
12	+/+	30	+/+	48	+/+	66	-/-	84	-/-
13	+/+	31	-/-	49	+/+	67	-/-	85	+/+
14	-/-	32	-/-	50	-/-	68	+/+	86	-/-
15	+/+	33	+/+	51	+/+	69	+/+	87	+/+
16	-/-	34	+/+	52	-/-	70	+/+	88	-/+
17	++	35	--	53	+/+	71	-/-	89	+/+
18	--	36	++	54	-/-	72	+/+	90	+/+

Từ bảng trên kết quả của 90 mẫu nghiên cứu thấy rằng có mẫu số 88 kết quả PCR không âm tính, kết quả kiểm chứng sau sinh thấy dương tính, chúng tôi nhận định rằng mẫu 88 này chúng tôi không tách được ADN của phôi thai, nguyên nhân có thể là do nồng độ ADN phôi thai của bệnh nhân này ở giai đoạn 8 tuần không đủ nhiều. Các mẫu còn lại 89 mẫu cho thấy kết quả PCR và kết quả sau sinh thấy phù hợp hoàn toàn. Vậy độ nhạy của phương pháp này 89/90 (98,89%).

2. Kết quả chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con.



Hình 3: Hình ảnh điện di kiểm tra bất đồng nhóm máu

*M: Marker 1200bp Âm: chứng âm nước ối Dương: chứng dương
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 là các mẫu bệnh nhân nghiên cứu*

Từ kết quả trên cho chúng ta thấy: trong 9 bệnh nhân nghiên cứu này có 2 bệnh nhân mang thai mang nhóm máu Rh(-), cho thấy không có sự bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con (mẫu số 1 và mẫu số 7). Có 7 trong tổng số 9 mẫu nghiên cứu có thai nhi mang nhóm máu Rh (+) là mẫu số 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, các mẫu này có sự bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con.

IV. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trên 90 trường hợp các bà mẹ mang thai ở tuần thứ 7 đến tuần thứ 40 của thai kỳ, chúng tôi tiến hành tách chiết ADN phôi thai tự do trong máu ngoại vi của mẹ và nghiên cứu chẩn đoán trên 9 bệnh nhân thai phụ mang nhóm máu Rh(-) chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

1. Đã phát hiện và chứng minh được sự tồn tại của ADN tự do của thai nhi trong máu ngoại vi của phụ nữ mang thai.

2. Ứng dụng thành công chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con cho các sản phụ mang Rh(-).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KF Jr, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal Rh(D) status using fetal DNA in maternal serum ADN PCR. J Soc Gynecol Investig 1999;6:64-9.
2. Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: The prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. Prenat Diagn 2000;20:353-7.

3. **Chen XQ, Stroun M, Magnenat J-L, et al.** Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2: 1033-35.
4. **Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW.** Prenatal diagnosis of sickle cell anemia ADN thalassemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet* 1996;14:264-68.
5. **Emanuel SL, Pestka S.** Amplification of specific gene products from human serum. *GATA* 1993;10:144-46
6. **Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, Hotzman EJ, Vadnais TJ, DeMaria MA, et al.** Fetal Rh(D) genotyping in fetal cells flow-sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:818-22.
7. **Gynaecol 2000;**107:766-9. 55.
8. **Lo YMD, Bowell PJ, Selinger M, MacKenzie IZ, Cham-berlain P, Gillmer MDG, et al.** Prenatal determination of fetal Rh(D) status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1997;341:1147- 8.
9. **Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent PL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al.** Prenatal diagnosis of fetal Rh(D) status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734 - 8.
10. **Lo YMD, Lo ESF, Watson N, et al.** Two-way cell traffic between mother ADN fetus biologic ADN clinical implications. *Blood* 1996; 88: 4390 - 95.
11. **Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA.** Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989; ii: 1363-65.
12. **Mulcahy HE, Croke DT, Farthing MJG.** Cancer ADN mutant DNA in blood plasma. *Lancet* 1996;348:628.
13. **Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D.** Microsatellite alterations in serum DNA of head ADN neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1035-37.
14. **Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T.** Prenatal diagnosis of the fetal Rh(D) blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol* 1996;87:501-5.
15. **Simpson JL, Elias S.** Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993;270: 2357-61.
16. **Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M.** Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-22.
17. **Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S.** Detection of fetal Rhesus D ADN sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Obstet.*