

and psychosocial concerns of patients with newly diagnosed lung cancer. *CMAJ*. **152(5)**, 701–708.

7. **Huong, T.T.H. et al. (2006)** Life time suicidal thoughts in an urban community in Hanoi, Vietnam. *BMC Public Health* **6**, 76.

8. **Brown GK et al. (2005)**. The internal struggle between the wish to die and the wish to live: a risk factor for suicide. *Am J Psychiatry*. **162(10)**, 1977-1979.

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ SANGER PHÁT HIỆN CÁC BIẾN THỂ DNA TY THỂ

Lê Thái Khương¹, Hồ Quốc Chương¹, Dương Bích Trâm¹, Hoàng Anh Vũ^{1,2}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Ty thể đóng vai trò trung tâm trong quá trình chuyển hóa năng lượng của tế bào. DNA ty thể có tỷ lệ đột biến cao hơn so với DNA nhân và đột biến DNA ty thể là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây bệnh ở người. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phát hiện đột biến DNA ty thể ở người bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** DNA của những bệnh nhân nghi ngờ mắc các bệnh lý rối loạn ty thể được tách chiết từ mẫu máu ngoại vi. Sau đó, sử dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự bằng phương pháp Sanger để xác định các đột biến thường gặp. **Kết quả:** Nghiên cứu đã phát hiện 19 trường hợp có biến thể DNA ty thể trong tổng số 43 trường hợp thu thập được, trong đó đột biến m.3243A>G chiếm tỷ lệ cao nhất (73,68%). **Kết luận:** Xây dựng thành công quy trình phát hiện đột biến DNA ty thể ở bệnh nhân mắc các bệnh lý rối loạn ty thể bằng kỹ thuật giải trình tự.

Từ khóa: Bệnh lý ty thể, DNA ty thể, giải trình tự Sanger.

SUMMARY

APPLICATION OF SANGER SEQUENCING TO DETECT MITOCHONDRIAL DNA VARIANTS

Aim: Mitochondria play a critical role in the generation of metabolic energy in eukaryotic cells. Mitochondrial DNA is assumed to experience a higher mutation rate than nuclear DNA and mitochondrial DNA mutation is one of the major causes of human diseases. This study aims to detect mitochondrial DNA mutations using Sanger sequencing technique. **Materials and methods:** Mitochondrial DNA was extracted from peripheral blood samples of patients with mitochondrial disorders. PCR and Sanger sequencing were thereafter established to identify mutations on mitochondrial DNA. **Results:** There were 19 cases carrying mitochondrial DNA variants among a

total of 43 cases, in which m.3243A>G mutation accounted for the highest rate (73.68%). **Conclusion:** Detection of mitochondrial DNA variants has been successfully and effectively established via utilization of Sanger sequencing technique.

Keywords: Mitochondrial disorders, mitochondrial DNA, Sanger sequencing.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ty thể là bào quan phổ biến được tìm thấy trong hầu hết các tế bào nhân thực. Ty thể có bộ gen riêng, sao chép độc lập với bộ gen trong nhân. DNA ty thể người tồn tại ở dạng mạch kép vòng, có kích thước 16.569 bp, với 37 gen mã hóa cho 2 RNA ribosome, 22 RNA vận chuyển và 13 protein thành phần cần thiết trong các phức hợp của chuỗi truyền điện tử hô hấp tế bào [1]. DNA ty thể (mtDNA) dễ bị hư hại do ty thể là môi trường giàu các gốc oxy hóa tự do (ROS: reactive oxygen species) và thiếu cơ chế sửa sai hiệu quả dẫn đến nhiều đột biến xuất hiện trong mtDNA. Hầu hết các hoạt động của tế bào đều dựa vào nguồn năng lượng ổn định do ty thể cung cấp, do đó những sai sót trong mtDNA có thể gây ra sự rối loạn đa hệ thống ảnh hưởng đến nhiều tế bào, mô và các cơ quan khác nhau [2].

Bệnh lý rối loạn ty thể là bệnh lý trong đó khả năng sản xuất năng lượng và vai trò bình thường của ty thể trong tế bào bị tổn hại. Các bệnh lý rối loạn ty thể có ảnh hưởng đến nhiều cơ quan, tập trung chủ yếu vào cơ, hệ thần kinh, các cơ quan cần nhu cầu năng lượng cao và các chuyển hóa của cơ thể. Hiện nay, đã có nhiều bệnh lý rối loạn ty thể được phát hiện và nghiên cứu, bao gồm hội chứng MELAS (Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), hội chứng MERRF (Myoclonic epilepsy with ragged-red fibres), bệnh thần kinh thị giác di truyền Leber (LHON: Leber hereditary optic neuropathy), hội chứng Leigh, bệnh NARP (Neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa), bệnh CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia)... Biểu hiện lâm sàng của những bệnh lý này rất đa

¹Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Anh Vũ

Email: hoanganhv@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.7.2022

Ngày phản biện khoa học: 24.8.2022

Ngày duyệt bài: 7.9.2022

dạng, có những triệu chứng đan xen nhau. Sự khởi phát các triệu chứng lâm sàng, sự biến đổi kiểu hình và mức biểu hiện của bệnh lý rối loạn ty thể chịu sự chi phối của một số yếu tố bao gồm hiệu ứng ngưỡng, sự phân chia tế bào chất trong phân bào, số lượng bản sao DNA được nhân lên trong ty thể và sự di truyền "nút thắt cổ chai" [1,2].

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh lý rối loạn ty thể để xác định nguyên nhân, cơ chế biểu hiện bệnh cũng như tính di truyền của bệnh. Tuy nhiên, tại Việt Nam, ít có công trình nghiên cứu giải trình tự toàn bộ mtDNA. Do đó, nghiên cứu này nhằm góp phần vào công tác chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình bệnh nhân mắc các bệnh lý rối loạn ty thể.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu bệnh phẩm. Mẫu máu ngoại vi chống đông bằng EDTA của 43 bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh lý liên quan rối loạn ty thể được lấy theo quy chuẩn của các bệnh viện. Nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (số: 317/HĐĐĐ ngày 14 tháng 03 năm 2022).

Tách chiết genomic DNA. DNA từ tế bào máu được tách chiết bằng GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thu nhận 200 µl dung dịch chứa gDNA. Dung dịch gDNA sau khi tách chiết được bảo quản và lưu trữ ở -20°C.

Thiết kế môi cho PCR và sequencing. Các cặp môi đặc hiệu dùng để nhân bản toàn bộ 37 gen của DNA ty thể được thiết kế dựa trên trình tự chuẩn (accession number NC_012920.1) bằng phần mềm CLC Main Workbench v5.5. Thông tin về các đoạn môi sẽ được cung cấp nếu độc giả có yêu cầu.

Thiết lập điều kiện PCR. Mỗi phản ứng (20 µl) bao gồm các thành phần: 0,2 µl Taq DNA polymerase (5U) của Takara; 2 µl đệm 10X; 2 µl dNTPs (2,5mM); 1 µl mỗi loại môi (10 µM); 1,5 µl DNA tổng số (100 ng/µl) và 12,3 µl H₂O. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt Mastercycler@Pro S (Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt như sau: 98°C trong 3 phút, 40 chu kỳ (98°C trong 10 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 10 phút. Các phản ứng luôn kèm theo một chứng âm không chứa DNA để kiểm soát ngoại nhiễm.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di.

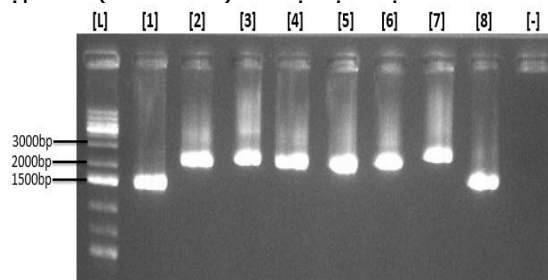
Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1,5% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới hệ thống chụp gel GelDoc-It TS 310 (UVP, Mỹ).

Tinh sạch sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thực hiện giải trình tự. Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), theo 2 chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, hòa tan trong Hi-Di formamide, biến tính ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự DNA được đọc bằng máy ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench v5.5. Số thứ tự của các nucleotide được tính theo chuỗi DNA ty thể bình thường (với accession number NC_012920.1) trong GenBank. Các biến thể được ghi nhận sau đó sẽ đối chiếu với cơ sở dữ liệu bộ gen ty thể người (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả thiết kế môi và PCR. Các cặp môi được thiết kế bằng phần mềm CLC Main Workbench v5.5. Đây là phần mềm chuyên dụng cho phép thiết kế môi cho phản ứng PCR từ trình tự gen sẵn có. Các phần mềm Oligo Analyzer 3.1, Primer-BLAST được sử dụng để kiểm tra các thông số lý thuyết về chiều dài, nhiệt độ nóng chảy T_m, thành phần (%) GC, năng lượng tự do hình thành hetero-dimer, năng lượng tự do hình thành cấu trúc thứ cấp (hairpin), khả năng tự bắt cặp môi (self-dimer) và độ đặc hiệu của môi.



Hình 1: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản 37 gen của mtDNA. Các giếng từ 1 – 8: sản phẩm PCR tương ứng với các kích thước 1495bp, 2305bp, 2463bp, 2041bp, 2343bp, 2372bp, 2887bp và 1727bp. Giếng [-]: chứng âm, Giếng L: thang chuẩn (1kb plus).

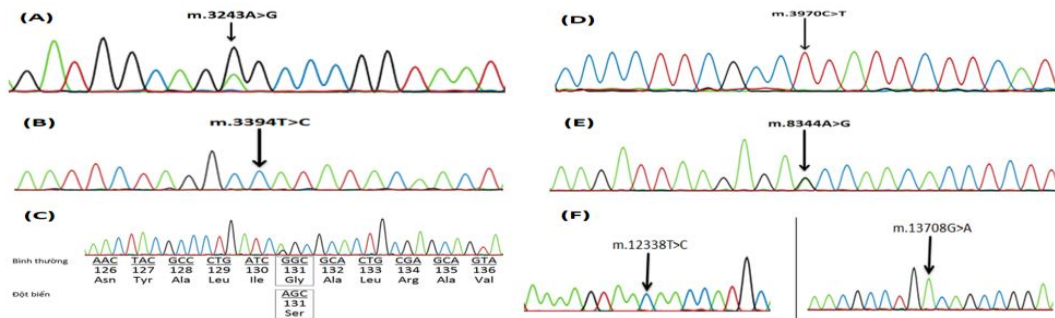
Việc nhân bản thành công đoạn gen đặc hiệu cần khảo sát đột biến bằng phản ứng PCR là khâu quan trọng nhất trong toàn bộ quy trình chẩn đoán đột biến gen. Điều kiện PCR đã được xác lập để nhân bản toàn bộ 37 gen của DNA ty thể bằng 8 phản ứng. Sản phẩm PCR sau khi kết thúc chu trình luân nhiệt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%, cho thấy các băng sản phẩm mục tiêu sáng rõ nét, không có băng ký sinh (Hình 1).

Kết quả phân tích dữ liệu giải trình tự Sanger. Các mẫu đều được giải trình tự trên cả 2 chiều xuôi và ngược. Kết quả giải trình tự cho thấy các đỉnh cao, có sự phân tách rõ ràng giữa các đỉnh. Điều này chứng minh rằng kết quả giải trình tự tốt, kết quả cũng cho thấy toàn bộ quy trình bao gồm thiết kế môi đặc hiệu, quá trình PCR cũng như thao tác tinh sạch đều đạt yêu

cầu. Trong 43 mẫu bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh lý liên quan rối loạn ty thể, đã phát hiện 19 trường hợp mang đột biến (chiếm tỷ lệ 44,19%), trong đó 01 trường hợp mang đột biến kép (xảy ra 2 đột biến đồng thời). Các dạng đột biến được mô tả trong Bảng 1 và Hình 2.

Bảng 1: Các dạng đột biến và biến thể ghi nhận được trên mtDNA

Tên đột biến/biến thể	Gen	Số ca ghi nhận	Trạng thái tồn tại
m.3243A>G	MT-TL1	14	Heteroplasmy
m.3394T>C	MT-ND1	01	Homoplasmy
m.3697G>A		01	Heteroplasmy
m.3970C>T		01	Homoplasmy
m.8344A>G	MT-TK	01	Heteroplasmy
m.12338T>C	MT-ND5	01	Homoplasmy
m.13708A>G		01	Homoplasmy



Hình 2: Kết quả giải trình tự mtDNA. (A) đột biến m.3243A>G. (B) đột biến m.3394T>C, (C) đột biến m.3697G>A, (D) SNP m.3970C>T, (E) đột biến m.8344A>G, (F) đột biến m.12338T>C và m.13708A>G.

IV. BÀN LUẬN

Trong 19 trường hợp phát hiện đột biến, m.3243A>G và m.3697G>A là những đột biến điểm liên quan đến hội chứng MELAS [1,2]. Sự thay đổi nucleotide A thành G tại vị trí 3243 trên gen MT-TL1 của DNA ty thể làm thay đổi bộ ba mã hóa trên tRNA^{Leu}, do đó giảm khả năng tương tác với bề mặt ribosome. Đột biến tại vùng này ảnh hưởng đến sự hợp nhất của dư lượng leucine vào protein ty thể, làm suy yếu tổng hợp protein và gây ra các rối loạn chức năng của chuỗi hô hấp trong ty thể. Trong khi đó, đột biến m.3697G>A xảy ra trên gen MT-ND1 có chức năng mã hóa các protein trong tiểu đơn vị của phức hợp I (NADH dehydrogenase) trong chuỗi truyền điện tử hô hấp tế bào. Đột biến này làm thay đổi glycine (amino acid có tính bảo tồn cao và nằm ở vị trí domain xuyên màng) thành serine tại vị trí 131. Do đó, các đột biến này làm ty thể giảm hệ thống phosphoryl hóa oxy hóa, đặc biệt là các phức hợp I và IV (cytochrome C oxidase).

Đột biến m.8344A>G là đột biến điểm phổ

biến liên quan hội chứng MERRF. Sự thay đổi nucleotide A thành G tại vị trí 8344 trên gen MT-TK làm thay đổi bộ ba mã hóa trên tRNA^{Lys}. Hậu quả của đột biến này tương tự như đột biến m.3243A>G, tức là làm giảm khả năng tương tác giữa tRNA^{Lys} với bề mặt ribosome, từ đó ảnh hưởng đến sự hợp nhất của dư lượng lysine vào protein ty thể [1,2].

Đột biến m.3394T>C (p.Y30H) trên gen MT-ND1, đột biến m.12338T>C (p.M1T) và m.13708A>G (p.A458T) trên gen MT-ND5 đều được ghi nhận tồn tại ở dạng đồng tế bào chất hay đồng DNA ty thể (homoplasmy, các bản sao của DNA ty thể đều giống nhau) và có liên quan với bệnh LHON[3]. Đặc biệt, đột biến m.13708A>G còn được ghi nhận làm tăng nguy cơ mắc bệnh Alzheimer và ung thư vú [4]. Các đột biến này ảnh hưởng đến cấu trúc và sự ổn định của phức hợp I trong chuỗi truyền điện tử hô hấp tế bào, khiến cho quá trình tổng hợp ATP và điện thế màng ty thể giảm, tăng sản xuất ROS.

Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng đã ghi nhận 01

trường hợp mang SNP m.3970C>T trên gen MT-ND1. Biến thể này được ghi nhận trong quần thể người Mông Cổ ở Trung Quốc chiếm tỷ lệ 10,38% [5]. Mặc dù biến thể này là một đột biến đồng nghĩa (không ảnh hưởng đến cấu trúc của protein) nhưng nhiều nghiên cứu cho rằng biến thể này có thể cùng với một vài biến thể khác tạo thành một haplotype làm tăng nguy cơ mắc bệnh tăng huyết áp [6], ung thư đại trực tràng [7], bệnh Behçet [8].

Ty thể là bào quan sử dụng oxy để chuyển hóa các sản phẩm trung gian của thức ăn thành năng lượng thông qua một quá trình phosphoryl oxy hóa. Những đột biến trên DNA ty thể gây ra các bệnh lý rối loạn ty thể như hội chứng MELAS, hội chứng MERRF, bệnh LHON... sẽ làm suy giảm khả năng của ty thể trong việc tạo ra các protein, sử dụng oxy và sản xuất năng lượng. Những đột biến này ảnh hưởng đến các cơ quan và các mô với nhu cầu năng lượng cao như não và cơ. Hầu hết bệnh nhân mắc các bệnh lý rối loạn ty thể đều bị tích tụ acid lactic trong cơ thể dẫn đến nhiễm toan làm nôn mửa, đau bụng, rất mệt mỏi, yếu cơ và khó thở. Một số trường hợp có thất cơ không tự chủ, giảm thính lực, bệnh tim và thận, tiểu đường, mất cân bằng nội tiết tố... Nhìn chung, những tác động của đột biến mtDNA lên bệnh nhân là khá đa dạng, phức tạp và không đồng nhất. Các rối loạn của các bệnh lý rối loạn ty thể ảnh hưởng đến nhiều bộ phận của cơ thể, đặc biệt cơ bắp và hệ thần kinh, triệu chứng xuất hiện từ thời thơ ấu hay tuổi vị thành niên [1,2]. Vì vậy, việc phân tích mtDNA là quan trọng ở nhiều trường hợp có sự rối loạn hệ thống không rõ ràng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết kế thành công 8 cặp mồi dùng để nhân bản toàn bộ 37 gen ở mtDNA; đồng thời cũng thiết lập được quy trình giải trình tự Sanger giúp phát hiện đột biến gen mtDNA trên 43 bệnh nhân nghi ngờ mắc các bệnh lý rối loạn ty thể với tỷ lệ đột biến được phát hiện là 44,18%.

Cảm ơn. Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chinnery PF (2021) Primary mitochondrial disorders overview. GeneReviews®[Internet].
2. Mustafa MF, Fakurazi S, Abdullah MA, Maniam S (2020) Pathogenic mitochondria DNA mutations: current detection tools and interventions. Genes, 11(2):192.
3. Dai Y, Wang C, Nie Z, Han J, Chen T, Zhao X, Ai C, Ji Y, Gao T, Jiang P (2018) Mutation analysis of Leber's hereditary optic neuropathy using a multi-gene panel. Biomedical Reports, 8(1):51-58.
4. Amor H, Hammadeh ME (2022) A Systematic Review of the Impact of Mitochondrial Variations on Male Infertility. Genes, 13(7):1182.
5. Lan Q, Xie T, Jin X, Fang Y, Mei S, Yang G, Zhu B (2019) MtDNA polymorphism analyses in the Chinese Mongolian group: Efficiency evaluation and further matrilineal genetic structure exploration. Molecular genetics & genomic medicine, 7(10): e00934.
6. Zhu Y, You J, Xu C, Gu X (2020) Associations of mitochondrial DNA 3777-4679 region mutations with maternally inherited essential hypertensive subjects in China. BMC Medical Genetics, 21(1):1-9.
7. Xu Y, Zhou J, Yuan Q, Su J, Li Q, Lu X, Zhang L, Cai Z, Han J (2021) Quantitative detection of circulating MT-ND1 as a potential biomarker for colorectal cancer. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 21(5):577.
8. Kwon M-H, Joung C-I (2016) Genetic Associations of Mitochondrial DNA Polymorphisms with Behçet's Disease in a Korean Population: A Pilot Study. Journal of Rheumatic Diseases, 23(1):23-29.

KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ VI PHẪU THUẬT U DÂY THẦN KINH SỐ VIII TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI

Bùi Huy Mạnh¹, Bùi Xuân Cường², Phạm Văn Cường³

TÓM TẮT

¹Bệnh viện HN Việt Đức

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Bạch Mai

Chịu trách nhiệm chính: Bùi Huy Mạnh

Email: drmanhvd2014@gmail.com

Ngày nhận bài: 7.7.2022

Ngày phản biện khoa học: 24.8.2022

Ngày duyệt bài: 6.9.2022

Đặt vấn đề: mô tả đặc điểm lâm sàng, cộng hưởng từ và kết quả vi phẫu thuật u dây thần kinh số VIII. **Đôi tượng và phương pháp nghiên cứu:** nghiên cứu mô tả cắt ngang, thời gian từ tháng 6/2019 đến tháng 8 năm 2020 trên 33 trường hợp được chẩn đoán và phẫu thuật u dây thần kinh số VIII tại khoa phẫu thuật thần kinh bệnh viện Bạch Mai. **Kết quả:** Tuổi sau 40 (66,7%), nam/nữ:1/ 2,3, triệu chứng đau đầu, buồn nôn (60,6%). Phim CHT: ranh giới u rõ (90,9%), giảm tín hiệu trên T1 (78,8%), tăng tín hiệu trên T2 (93,9%). Ngấm thuốc mạnh (84,9%), mật độ hỗn hợp (69,7%). Kích thước lớn và