

- Level. American Journal of Pediatrics. 2021; 7(1):9-13.
2. **Bhand, Sikandar Ali, et al.** "Neonatal hypoglycemia." The Professional Medical Journal 21.04 (2014): 745-749.
 3. **Khan, Inayatullah et al.** "Frequency and clinical characteristics of symptomatic hypoglycemia in neonates." Gomal Journal of Medical Sciences 8.2 (2010).
 4. **Khairuzzaman, M., et al.** "Blood Glucose Level in Low Birth Weight Babies in First 48 Hours of Life." Journal of Current and Advance Medical Research 5.1 (2018): 33-38.
 5. **Hawdon JM., et al.** "Neonatal hypoglycaemia: learning from claims." Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition 102.2 (2017): F110-F115.
 6. **Saini A, Gaur BK, Singh P.** Hypoglycemia in low birth weight neonates: frequency, pattern, and likely determinants. Int J Contemp Pediatrics. 2018 Mar;5:526-32
 7. **Thompson-Branch, Alecia, and Thomas Havranek.** "Neonatal hypoglycemia." Pediatrics in review 38.4 (2017): 147-157.
 8. **World Health Organization.** UNICEF-WHO low birthweight estimates: levels and trends 2000-2015. No. WHO/NMH/NHD/19.21. World Health Organization, 2019.

CHẨN ĐOÁN NGƯỜI LÀNH MANG GEN ĐỘT BIẾN BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ DUCHENNE BẰNG MỘT SỐ KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ

Dinh Thuý Linh¹, Trần Văn Khánh²

TÓM TẮT

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất trong nhóm bệnh lý loạn dưỡng. Đây là bệnh lý di truyền lặn, liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X. Chẩn đoán người lành mang gen bệnh cho các thành viên nữ trong gia đình có bệnh nhân DMD giúp tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh trước sinh các bà mẹ mang thai có nguy cơ sinh con bị bệnh giúp phát hiện sớm các trường hợp thai mắc DMD. **Mục tiêu:** Ứng dụng kỹ thuật giải trình gen và MLPA trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh DMD. **Đối tượng nghiên cứu:** 85 thành viên nữ của các gia đình bệnh nhân DMD mang đột biến xóa đoạn, lặp đoạn hoặc đột biến điểm. **Phương pháp nghiên cứu:** mô tả cắt ngang. Thực hiện kỹ thuật MLPA chẩn đoán người lành mang gen đột biến lặp đoạn, xóa đoạn trên gen Dystrophin và thực hiện giải trình tự gen chẩn đoán người lành mang gen đột biến điểm trên gen Dystrophin. **Kết quả:** Kết quả 52 người được chẩn đoán là người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 61%; 33 người được xác định không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 39%.

Từ khóa: loạn dưỡng cơ Duchenne, giải trình tự gen, MLPA, người lành mang gen bệnh.

SUMMARY

DIAGNOSIS OF DUCHENNE CARRIERS USING MOLECULAR GENETICS TECHNIQUE

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common inherited neuromuscular disease in the muscular dystrophy pathology's group. This recessive genetic disease is linked to the chromosome X,

therefore the diagnosis of the pathologic gene's carriers for female members in the family of DMD patients play important role in the genetic counseling before birth. This also allows early detections of fetuses in case the pregnant women are at risk.

Objectives: To apply whole genome sequencing (WGS) and MLPA technique in the diagnosis of DMD carriers for 85 females in DMD families. **Methods and Subjects:** Cross sectional, descriptive study. WGS was performed to confirm the carriers of point mutations on Dystrophin gene, MLPA technique was performed to confirm the carriers of duplication, deletion mutations on Dystrophin gene for females. **Results:** 52 female members are carriers, accounting for 61%; 33 females do not carry pathologic genes, accounting for 39%. **Conclusions:** MLPA and WGS could be applied successfully in the diagnosis of DMD carriers in current era. **Keywords:** DMD, whole genome sequencing, carrier

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là một trong những bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất. Bệnh có tần suất 1/3500 trẻ trai, nguyên nhân là do đột biến gen dystrophin nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X. Khi người mẹ là người lành mang gen bệnh thì có thể sinh ra con trai mắc bệnh với tỷ lệ 50% [1],[2]. Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne có triệu chứng đặc trưng với sự yếu cơ tiến triển, phì đại bắp chân, tăng sinh các tổ chức trong cơ. Bệnh nhân thường mất khả năng đi ở lứa tuổi 11-12 và tử vong ở lứa tuổi 20 do các biến chứng của bệnh [3], [4], [5]. Bệnh vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, vì vậy xét nghiệm phát hiện người mang gen bệnh, tư vấn thực hiện di truyền và chẩn đoán trước sinh với những phụ nữ là người lành mang gen bệnh vẫn đóng một vai trò quan trọng trong

¹Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

²Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khánh

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 3.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 22.2.2023

Ngày duyệt bài: 6.3.2023

giảm tỉ lệ sinh con mắc bệnh. Trong các kỹ thuật di truyền phân tử hiện nay đang được áp dụng để phát hiện đột biến gen dystrophin thì kỹ thuật MLPA được ứng dụng rộng rãi do có khả năng khảo sát đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen Dystrophin trên 79 exon, tuy nhiên vẫn còn khoảng 35-40% các đột biến điểm cần phải áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện mặc dù kỹ thuật giải trình tự gen thường cần nhiều thời gian và giá thành cao [6],[7],[8].

Nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu ứng dụng kỹ thuật MLPA và giải trình trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh DMD nhằm phát hiện tối đa các loại đột biến gen Dystrophin, từ đó làm cơ sở chẩn đoán trước sinh bệnh lý này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. 85 thành viên nữ trong 35 gia đình người bệnh DMD có đột biến gen Dystrophin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang

Xác định đột biến điểm gây bệnh DMD bằng kỹ thuật MLPA

Biến tính DNA. Phản ứng lai: Hai đoạn lai của 2 phân tử oligonucleotid sẽ gắn với DNA đích đặc hiệu ở vị trí sát nhau.

Phản ứng nối. Phản ứng khuếch đại gen PCR: Sau phản ứng PCR, mỗi probe sẽ được khuếch đại thành nhiều bản sao, sau đó được phân tách bằng phương pháp điện di mao quản.

Xác định đột biến điểm gây bệnh DMD bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại bằng những cặp mồi đặc hiệu sẽ được làm nguyên liệu cho kỹ thuật giải trình tự gen.

Phản ứng PCR giải trình tự phát hiện đột biến của gen dystrophin:

- + Phản ứng PCR giải trình tự
- + Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự
- + Điện di sản phẩm PCR giải trình tự gen

Bảng 1. Các dạng đột biến được phát hiện trên người lành mang gen bệnh bằng kỹ thuật MLPA

STT	Dạng đột biến ở BN	Exon	Vị trí đột biến	Số thành viên nữ mang gen	Số thành viên nữ không mang gen
1	Xoá đoạn	3-7	Vùng 5' tận	1	0
2	Xoá đoạn	3-13	Vùng 5' tận	3	1
3	Xoá đoạn	4-6	Vùng 5' tận	1	0
4	Xoá đoạn	8-12	Vùng 5' tận	1	0
5	Xoá đoạn	8-13	Vùng 5' tận	1	3
6	Xoá đoạn	12-13	Vùng 5' tận	10	3
7	Xoá đoạn	12-29	Vùng 5' tận	1	0
8	Xoá đoạn	7-43	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
9	Xoá đoạn	11-39	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	5	6

dystrophin bằng hệ thống giải trình tự ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

+ Phân tích kết quả: So sánh kết quả giải trình tự các exon của gen dystrophin với trình tự gen chuẩn tương ứng của ngân hàng gen (GeneBank). Tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein sử dụng phần mềm CLC Main Workbench để phân tích kết quả giải trình tự gen.

2.3. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.

Những gia đình có bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne sẽ được đưa vào nghiên cứu khi đồng ý tự nguyện tham gia. Gia đình và bệnh nhân sẽ được tư vấn và giải thích cụ thể về ý nghĩa, mục đích, qui trình nghiên cứu, quyền được tự do rút khỏi nghiên cứu, quyền được đảm bảo bí mật cá nhân trong quá trình nghiên cứu và về kết quả nghiên cứu. Các thông tin về bệnh nhân, người nhà bệnh nhân và kết quả chẩn đoán hoàn toàn được giữ bí mật, đặc biệt đối với thông tin về giới tính của thai nhi.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

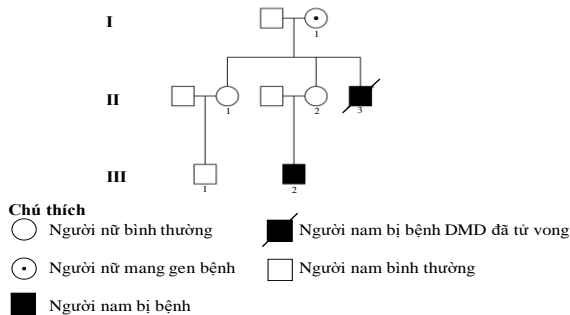
Trong 85 thành viên nữ của 35 gia đình bệnh nhân DMD, xác định 52 thành viên là người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 61%; 33 thành viên không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 39%. Trong số 52 người lành mang gen bệnh, xác định được 33 dạng đột biến trong đó có 20 dạng đột biến xóa đoạn, chiếm tỷ lệ 64,5%; 9 dạng đột biến điểm, chiếm tỷ lệ 29% và 2 dạng đột biến lặp đoạn, chiếm tỷ lệ 6,5%.

3.1. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh đột biến xóa đoạn và lặp đoạn bằng kỹ thuật MLPA. Trong 85 thành viên nữ, 66 thành viên nữ thuộc gia đình người bệnh DMD có đột biến xóa đoạn và lặp đoạn và được tiến hành xác định người lành mang gen đột biến bằng kỹ thuật MLPA. Kết quả đã xác định được 40 (60,6%) người lành mang gen bệnh và 26 (39,4%) người không mang gen đột biến.

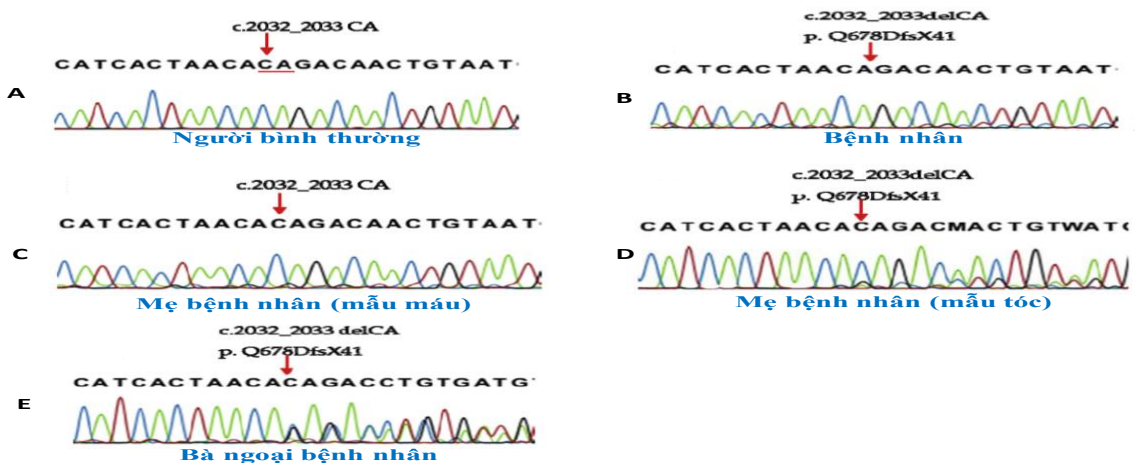
10	Xoá đoạn	19-52	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
11	Xoá đoạn	35-43	Vùng trung tâm	1	0
12	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
13	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	4	8
14	Xoá đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
15	Xoá đoạn	45-47	Vùng trung tâm	1	0
16	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
17	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
18	Xoá đoạn	48-50	Vùng trung tâm	1	0
19	Xoá đoạn	49-52	Vùng trung tâm	1	0
20	Xoá đoạn	51	Vùng trung tâm	1	0
21	Xoá đoạn	51-53	Vùng trung tâm	0	1
22	Xoá đoạn	45-51	Vùng trung tâm	0	3
23	Xoá đoạn	47-50	Vùng trung tâm	0	1
24	Lặp đoạn	14-43	Vùng 5' tận đến vùng trung tâm	1	0
25	Lặp đoạn	44	Vùng trung tâm	1	0
Tổng				40	26

3.2. Kết quả xác định người lành mang gen bệnh đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen. 19/85 thành viên nữ thuộc gia đình của 10 người bệnh DMD có đột biến điểm sẽ được phân tích tình trạng mang gen đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Kết quả chẩn đoán được 12 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 63,2% và 7 thành viên nữ không mang gen bệnh, chiếm tỷ lệ 36,8%.

Kết quả xác định người lành mang gen bệnh ở gia đình người bệnh DMD có đột biến điểm mất 2 nucleotid:



Hình 1. Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh D.81



Hình 2. Hình ảnh giải trình tự gen gia đình người bệnh DMD

Gia đình bệnh nhân DMD có 2 thành viên nam được chẩn đoán mắc bệnh. Kết quả giải trình tự gen xác định bệnh nhân DMD mang đột biến điểm mất 2 nucleotide CA ở vị trí 2032_2033 trên exon 17 gen dystrophin gây lệch khung dịch mã và hình thành mã kết thúc sớm tạo nên protein dystrophin không hoàn chỉnh. Đây là phả hệ gia đình có 2 bệnh nhân DMD, vì vậy thành viên nữ II₂ là người mang gen đột biến di hợp tử bắt buộc do có con trai và em trai bị DMD. Tiến hành giải trình tự gen cho thành viên nữ I₁ và II₂.

Qua phân tích gen cho thấy bệnh nhân DMD (hình B) mang đột biến điểm c2032_2033delCA (p.Q678DfsX41. Mẹ bệnh nhân (II₂) và bà ngoại người bệnh DMD (I₁) có kết quả giải trình tự xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến c.2032_2033 (hình E), vì vậy là người lành mang gen bệnh. Thành viên nữ II₁ không thực hiện xét nghiệm chẩn đoán gen.

IV. BÀN LUẬN

Trong các dạng đột biến, đột biến xoá đoạn xuất hiện với tỷ lệ cao nhất với tỷ lệ 64,5%; đột biến điểm chiếm tỷ lệ 29% và đột biến lặp đoạn chiếm tỷ lệ thấp nhất với 6,5%. Kết quả này cũng tương đồng với các công bố khác trên thế giới. Hiện nay,

Kỹ thuật MLPA có thể xác định các đột biến xoá đoạn và lặp đoạn, tuy nhiên với các đột biến điểm thì cần sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen. Vì vậy việc phối hợp 2 kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen sẽ giúp phát hiện được hầu hết các trường hợp người lành mang gen bệnh. Loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh lý di truyền gen lặn, liên kết với NST giới tính X, không có alen tương ứng trên Y. Người mẹ mang gen đột biến dị hợp tử có khả năng sinh con trai bị bệnh với tỷ lệ 50%. Chính vì vậy, xác người lành định người lành mang gen bệnh và tư vấn di truyền có vai trò quan trọng trong việc giảm tỷ lệ sinh con mắc bệnh thông qua chẩn đoán trước sinh hay gần đây là chẩn đoán tiền làm tổ.

Theo phân tích đột biến tại một phả hệ bệnh nhân DMD cho thấy mẹ bệnh nhân (thành viên nữ II₂) được xác định là người lành mang gen bệnh qua phân tích phả hệ (người mang đột biến dị hợp tử bắt buộc), tuy nhiên kết quả giải trình tự gen từ DNA mẫu máu của thành viên nữ này không phát hiện đột biến (hình C). Khi giải trình tự gen từ DNA mẫu tóc của thành viên nữ này thấy xuất hiện các đỉnh chồng lên nhau từ điểm đột biến c.2032_2033 trên gen dystrophin, khẳng định có đột biến dị hợp tử từ DNA mẫu tóc (hình D). Do không phát hiện được đột biến từ DNA mẫu máu nhưng lại tìm thấy đột biến từ DNA mẫu tóc của thành viên nữ II₂ nên đây là người mang gen đột biến dị hợp tử thể khảm.

Hiện nay có rất nhiều các kỹ thuật di truyền phân tử được ứng dụng trong chẩn đoán người lành mang gen bệnh DMD. Tuy nhiên do gen Dystrophin là một trong những gen lớn nhất cơ thể với 79 exon, việc xác định đột biến gen trên

gen Dystrophin đôi khi còn gặp nhiều khó khăn. Hiện nay, với những trường hợp đột biến xoá đoạn hoặc lặp đoạn có thể sử dụng kỹ thuật MLPA để xác định người lành mang gen bệnh, tuy nhiên với các đột biến điểm thì vẫn cần sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen. Kỹ thuật giải trình tự gen mặc dù tốn nhiều thời gian và chi phí cao, tuy nhiên với những trường hợp không phát hiện được đột biến bằng kỹ thuật MLPA hay PCR thì kỹ thuật giải trình tự gen vẫn cần được thực hiện để phát hiện các trường hợp đột biến điểm ở bệnh nhân DMD. Khi đã có đột biến chỉ điểm ở bệnh nhân, kỹ thuật giải trình tự gen sẽ được thực hiện để phát hiện đột biến cho các thành viên nữ trong phả hệ. Từ đó tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh bệnh DMD khi các thành viên nữ này mang thai.

V. KẾT LUẬN

Ứng dụng thành công kỹ thuật MLPA và giải trình tự gen trong phát hiện người lành mang gen bệnh DMD cho 85 thành viên nữ của 35 gia đình bệnh nhân DMD. Xác định 52 thành viên nữ là người lành mang gen bệnh, 33 thành viên nữ không mang gen bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bushby, K., et al.** (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*, 9(2), 177-189.
2. **Tạ Thành Văn** (2011). Bệnh loạn dưỡng cơ Duchene và Becker, *Bệnh học phân tử*, Nhà xuất bản Y học.
3. **Kneppers, A. L., Ginjaar, I. B., and Bakker, E.** (2004). Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Methods Mol Med*, 92, 311-41.
4. **Mendell R.J., Griggs C.R.** (1991), "Muscular dystrophin", *Harrison's principles of internal medicine*, 12th edition, pp. 2112-8.
5. **Hwa H.L., Chang Y.Y., Chen C.H. et al** (2007), "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects", *J Formos Med Assoc*, 106, pp. 339-46.
6. **Janssen B., Hartmann C., Scholz V., et al.** (2005). MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics*, 6(1), 29-35.
7. **Prior TW, Bridgeman SJ** (2005). Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophin. *JMD*, 7(3), 317-25.
8. **Matsuo M.** (2002), "Duchenne and Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy", *IUBMB Life*, 53, pp. 147-52.