XÁC ĐỊNH NHANH ĐỘT BIẾN ĐIỂM HAY GẶP Ở BỆNH NHÂN THIẾU HỤT G6PD BẰNG PHƯƠNG PHÁP ARMS (AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM)

Phạm Thị Hương Trang[1,*], Nguyễn Thị Thanh Hải[1], Phạm Thị Ánh Tuyết[2], Đặng Thị Ngọc Dung[1]

TÓM TẮT: *Thiếu hụt G6PD là một bệnh lý enzyme hồng cầu hay gặp nhất ở người. Ngày nay đã có hơn 140 loại đột biến được công bố trên thế giới mà chủ yếu là đột biến điểm. Canton và Kaiping là hai loại đột biến hay gặp nhất đã được xác định ở Việt Nam.* ***Mục tiêu****: xác định nhanh hai đột biến Canton và Kaipingnày bằng phương pháp ARMS (Amplification Refractory Mutation System).* ***Đối tượng và phương pháp nghiên cứu****: nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 31 mẫu máu được thu thập từ 31 trẻ nam, sơ sinh được chẩn đoán thiếu hụt G6PD bằng phương pháp định lượng G6PD.* ***Kết quả****: 3 trẻ có đột biến Kaiping (G1388A) và 4 trẻ có đột biến Canton (G1376T). 7 trường hợp này được kiểm tra lại bằng giải trình tự exon 12 gen G6PD. Kết quả giải trình tự gen hoàn toàn phù hợp với kết quả ARMS.* ***Kết luận****: ARMS là phương pháp đơn giản, nhanh, tin cậy và chính xác trong việc xác định đột biến Canton và Kaiping.*

Từ khóa*: ARMS, bệnh thiếu hụt G6PD*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu hụt G6PD là bệnh lý enzym hồng cầu hay gặp nhất ở người [1]. Cơ sở di truyền học của bệnh thiếu hụt G6PD là do đột biến xảy ra trên gen mã hóa G6PD. Gen này nằm trên nhánh dài, vùng 2, băng 8 của nhiễm sắc thể giới tính X (Xq28), không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y nên gặp nhiều ở nam hơn ở nữ. Ngày nay đã có hơn 140 loại đột biến được công bố trên toàn thế giới với nhiều biến thể khác nhau, hầu hết là đột biến điểm [1]. Phương pháp hay được sử dụng nhất tại Việt Nam để xác định đột biến điểm gây bệnh là giải trình tự gen. Phương pháp này đòi hỏi thời gian và giá thành cao, do đó không thể áp dụng rộng rãi. Amplification refractory mutation system - ARMS là một trong những phương pháp đáp ứng được tiêu chí trên với độ tin cậy, chính xác, đã được các nhà khoa học trên thế giới chứng minh và ứng dụng trong nhiều nghiên cứu xác định đột biến điểm [2,3,4,5,6,7]. Trong số 8 loại đột biến đã được xác định tại Việt Nam, hai trong ba loại đột biến hay gặp nhất là Canton (G1376T) và Kaiping (G1388A) [8]. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài với mục đích xách định hai đột biến Canton và Kaiping bằng phương pháp ARMS.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nhóm bệnh: 31 trẻ sơ sinh nam đủ tháng (14-28 ngày tuổi) được chẩn đoán thiếu hụt G6PD bằng phương pháp định lượng G6PD trên máy hóa sinh tự động.

Nhóm chứng: 01 mẫu máu người bình thường không thiếu hụt G6PD

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Phương pháp: mô tả cắt ngang

2.2.2. Quy trình nghiên cứu

2.2.2.1. Thu thập mẫu: bệnh nhân đủ tiêu chuẩn lựa chọn được lấy máu chống đông EDTA

2.2.2.2. Tách chiết DNA: Máu toàn phần chống đông bằng EDTA được tách chiết theo phương pháp phenol/chloroform. DNA tổng số được hòa tan trong TE, bảo

[1] Trường Đại học Y Hà Nội
[2] Bệnh viện Đa khoa tỉnh Tuyên Quang
* Tác giả chịu trách nhiệm chính:
Phạm Thị Hương Trang
Email: trangbc512@gmail.com
Ngày nhận bài: 25/8/2015
Ngày nhận bài phản biện: 3/9/2015
Ngày chấp nhận đăng: 29/9/2015

quản ở - 20^{0}C. Kiểm tra chất lượng DNA bằng phương pháp đo phổ hấp thụ cực đại ở bước sóng tử ngoại 260nm và 280 nm, xác định tỷ lệ OD_{260}/OD_{280} , nếu đạt tỷ lệ trong giới hạn 1,8 - 2,0 thì đưa vào sử dụng.

2.2.2.3. Thực hiện ARMS để xác định đột biến

Nguyên tắc của ARMS dựa trên sự khác biệt về các nucleotid của primer ở đầu 3' thiết kế cho các alen khác nhau. Chính vì vậy ARMS còn có một số tên gọi khác nữa căn cứ vào bản chất của kỹ thuật: PCR đặc hiệu alen (allele specific PCR - ASP), khuếch đại PCR các alen đặc hiệu (PCR amplification of specification of specific alleles - PASA) hay khuếch đại allele đặc hiệu (allele specific amplification - ASA). Trong kỹ thuật ARMS, hai quy trình PCR được tiến hành với cùng một khuôn DNA, một mồi giống nhau song khác nhau về mồi đặc hiệu alen. Như vậy, trong cùng một phản ứng, một mồi sẽ khuếch đại một alen trong khi mồi kia sẽ khuếch đại alen khác. Các mồi này chỉ đặc hiệu cho một alen chính bởi sự khác biệt trình tự nucleotid ở đầu 3', tương ứng với vị trí mà có sự khác biệt về trình tự nucleotid giữa các alen.

Điều đặc biệt quan trọng ở đây là Taq hoặc các DNA polymerase trong phản ứng PCR này phải không có chức năng sửa chữa 3' → 5'. Thêm vào đó, enzyme này phải không có khả năng khởi đầu sự tổng hợp DNA tại vị trí cặp đôi nhầm để đảm bảo không có quá trình khuếch đại và kết quả là không có sản phẩm. Điều này hoàn toàn đối lập với trường hợp là khi các mồi liên kết bổ sung phù hợp 100% với alen thì hiệu quả khuếch đại sẽ tương ứng là 100%. Các sản phẩm tạo thành sẽ được phân tích bằng điện di trên gel agarose.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng 1 mồi xuôi chung và 4 mồi ngược.

- Mồi xuôi chung:
5' GACCTGACCTACGGCAACAGATAC 3' (1388L2)
- Các mồi ngược:
5'GGTGCAGCAGTGGGGTGAAAATAC 3' (1388N2)
5'GGTGCAGCAGTGGGGTGAAATTAT 3' (1388M2)
5'GGGTGAAAATACGCCAGGCCACAC 3' (1376N2)
5'GGGTGAAAATACGCCAGGCCACAA 3' (1376M2)

Trong đó:
- Mồi 1367N2 khuếch đại đoạn DNA đích không có đột biến G1376T
- Mồi 1376M2 khuếch đại đoạn DNA đích có đột biến G1376T
- Mồi 1388N2 khuếch đại đoạn DNA đích không có đột biến G1388A
- Mồi 1388M2 khuếch đại đoạn DNA đích có đột biến G1388A
- Thành phần PCR: 5µl golden taq; 0,5 µl mồi xuôi; 0,5µl mồi ngược; 1µl DNA đích; 3µl nước cất (tổng thế tích là 10µl). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 940 x 3 phút; [940 x 30 giây; 620 x 45 giây; 720 x 50 giây] x 35 chu kỳ; 720 x 10 phút; bảo quản ở 40C

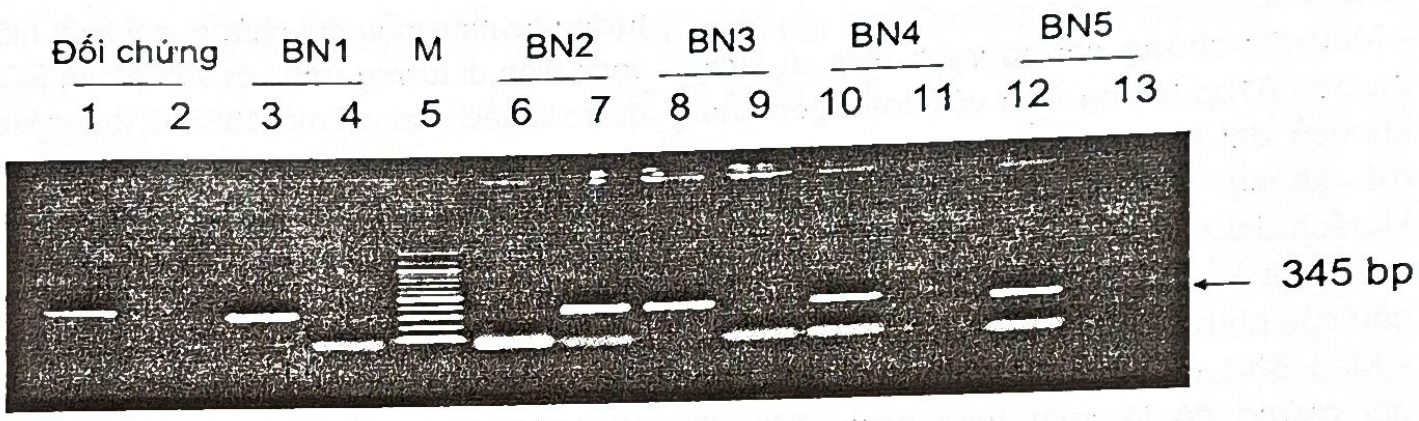
2.2.2.4. Điện di sản phẩm sau PCR trên gel agarose 1,5% ở 100 V trong 40 phút.

2.2.2.5. Giải trình tự gen trực tiếp: Sản phẩm PCR được xác định có đột biến Canton và Kaiping được tinh sạch theo quy trình của bộ kit PCR purification và được tiến hành đọc trình tự trực tiếp.

2.2.2.6. *Đạo đức nghiên cứu :* Các thông tin được thu thập trung thực, chính xác, đảm báo bí mật. Đề tài chỉ được thực hiện vì mục đích nghiên cứu chứ không vì mục đích gì khác.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định hai đột biến Canton và Kaiping bằng phương pháp ARMS



Hình 3.1. Hình ảnh điện di với mồi 1376N2 và mồi 1376M2

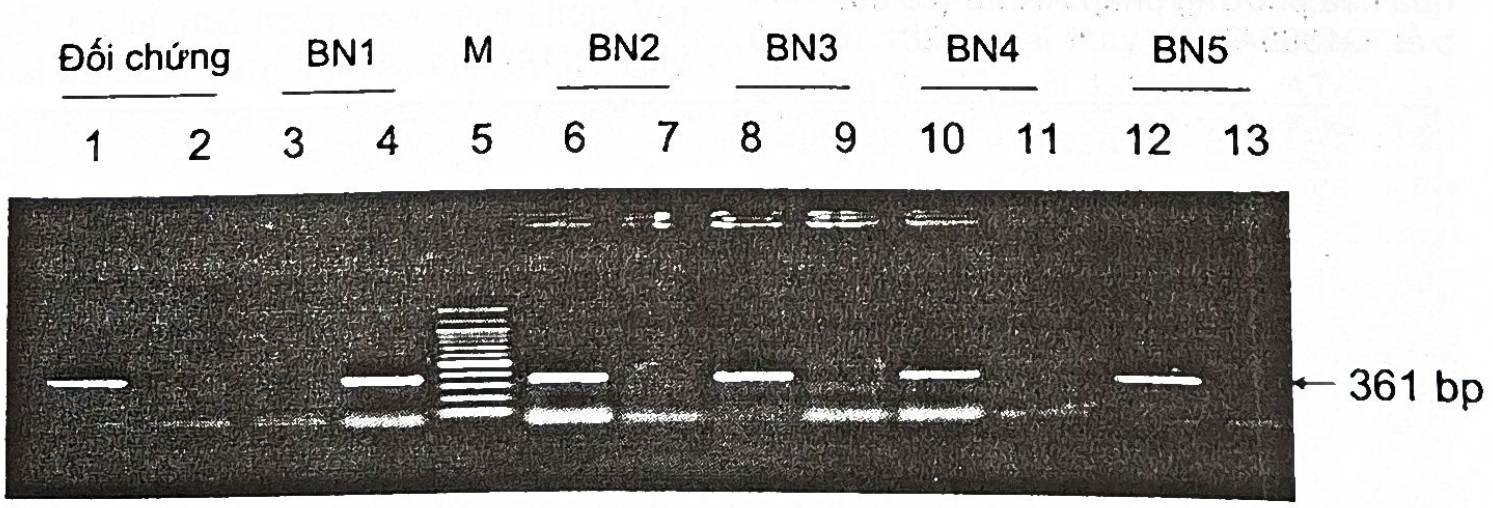
Băng 5: Marker 100bp;

Băng 1,3, 6, 8 10, 12: hình ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi 1376N2 trên mẫu chứng và 5 mẫu bệnh nhân;

Băng 2,4,7,9,11,13: hình ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi 1376M2 trên mẫu chứng và 5 mẫu bệnh nhân.

Nhận xét:

- Mẫu đối chứng chỉ có vạch điện di kích thước 345bp tương ứng với đoạn gen cần khuếch đại khi sử dụng với mồi 1376N2 mà không xuất hiện vạch điện di khi khuếch đại mồi 1376M2. Điều đó chứng tỏ mồi thiết kế đủ tiêu chuẩn, đảm bảo yêu cầu của phương pháp ARMS
- Các mẫu bệnh BN1, BN3, BN4 có hình ảnh tương tự mẫu đối chứng đó là xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR được khuếch đại với mồi 1376N2 (băng kích thước 345bp) mà không xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR với mồi 1376M2. Như vậy, mẫu bệnh BN1, BN3, BN4 không có đột biến loại G1376T.
- Mẫu bệnh BN2 chỉ xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR được khuếch đại với mồi 1376M2 (băng kích thước 345bp) mà không xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR với mồi 1376N2. Như vậy, mẫu bệnh số BN2 có đột biến loại G1376T.



Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng mồi 1388N2 và 1388M2

Băng 5: Marker 100bp

Băng 1,3, 6, 8 10, 12: hình ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi 1388N2 trên mẫu chứng và 5 mẫu bệnh nhân

Băng 2,4,7,9,11,13: hình ảnh điện di sản phẩm PCR với mồi 1388M2 trên mẫu chứng và 5 mẫu bệnh nhân

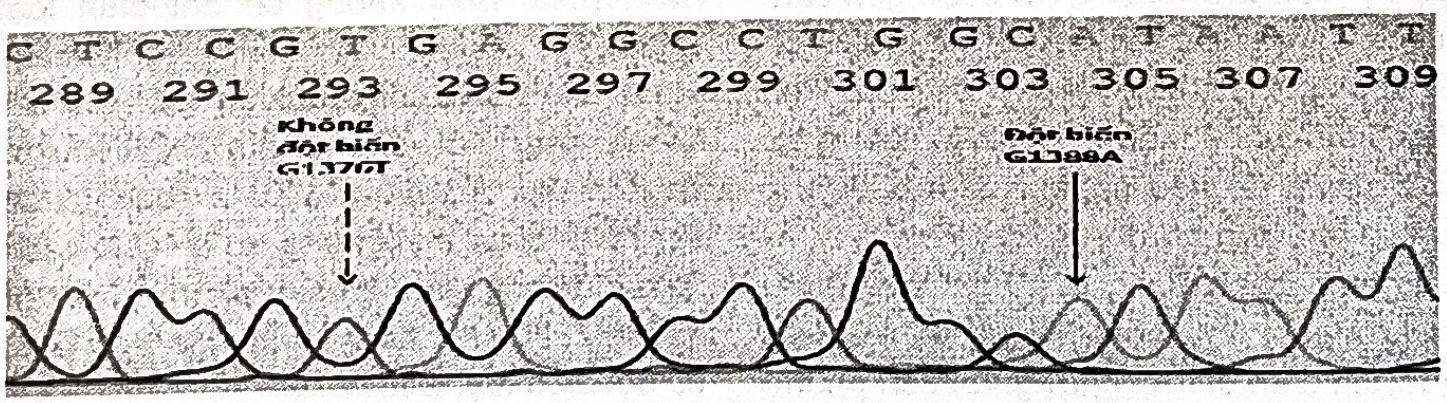
Nhận xét:

- Mẫu đối chứng chỉ có vạch điện di kích thước 361bp tương ứng với đoạn gen cần khuếch đại khi sử dụng với mồi 1388N2 mà không xuất hiện vạch điện di khi khuếch đại mồi 1388M2. Điều đó chứng tỏ mồi thiết kế đủ tiêu chuẩn, đảm bảo yêu cầu của phương pháp ARMS
- Mẫu BN1 có hình ảnh khác biệt với mẫu đối chứng đó là xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR được khuếch đại với mồi 1388M2 (băng kích thước 361bp) mà không xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR với mồi 1388N2. Như vậy, mẫu bệnh số BN1 có đột biến loại G1388A.
- Các mẫu BN2, BN3, BN4, BN5 có hình ảnh tương tự như mẫu đối chứng, chỉ xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR được khuếch đại với mồi 1388N2 (băng kích thước 361bp) mà không xuất hiện vạch điện di tương ứng với sản phẩm PCR với mồi 1388M2. Như vậy, mẫu BN2, BN3, BN4 không có đột biến loại G1388A.

Kết quả thu được: 4 trẻ có đột biến Canton (G1376T) và 3 trẻ có đột biến Kaiping (G1388A).

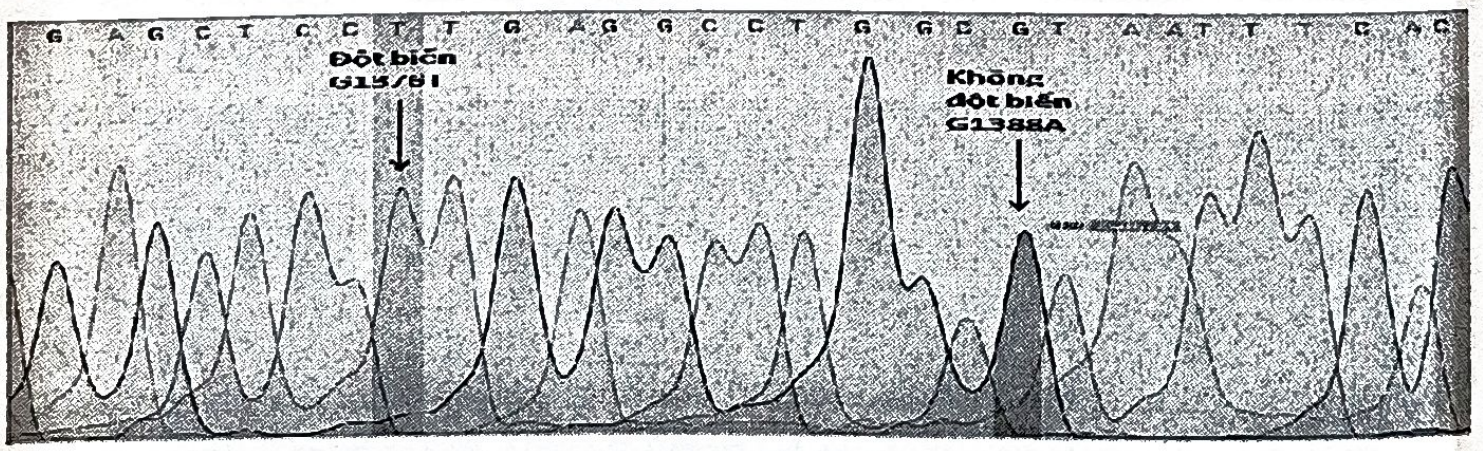
3.2. Kiểm tra kết quả xác định đột biến G1376T và G1388A bằng ARMS với phương pháp giải trình tự gen trực tiếp

07 mẫu có đột biến đều được kiểm tra đột biến cả 2 vị trí 1388 và 1376 bằng giải trình tự gen trực tiếp với mồi xuôi 1388L2



Hình 3.3. Hình ảnh giải trình tự mẫu bệnh nhân có đột biến G1388A

Nhận xét: Kết quả trùng khớp với kết quả của phương pháp ARMS (có đột biến G1388A)



Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự mẫu bệnh nhân có đột biến G1376T

Nhận xét: Kết quả trùng khớp với kết quả của phương pháp ARMS (có đột biến G1376T)

Kết luận: Kết quả giải trình tự các mẫu có đột biến Canton và mẫu có đột biến Kaiping trùng với kết quả xác định đột biến bằng ARMS.

Bảng 3.1. Bảng tổng hợp mức độ thiếu hụt G6PD của 5 bệnh nhân

Đột biến	Mức độ thiếu hụt			Tổng số
	Nặng (<20U/10^{12}HC)	Vừa (20-120U/10^{12}HC)	Nhẹ (120-200U/10^{12}HC)	
G1376T	4	0	0	4
G1388A	3	0	0	3
Không đột biến	6	12	6	24
Tổng số	13	12	6	31

Nhận xét: Tất cả 7 trẻ nam có đột biến Canton và Kaiping đều có thiếu hụt G6PD mức độ nặng.

4. BÀN LUẬN

Với kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy phương pháp ARMS có những ưu điểm: Một là, với phương pháp ARMS, chỉ cần một phản ứng PCR, sau đó điện di sản phẩm khuếch đại trên gel agarose là đã có thể kết luận được [5]. Rõ ràng phương pháp này đơn giản, nhanh gọn trong cách tiến hành [6], từ đó tiết kiệm thời gian, công sức cho người nghiên cứu, tiết kiệm hóa chất, có ý nghĩa về mặt kinh tế. Thứ hai, tính chính xác, độ tin cậy của phương pháp cao. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài trên 31 trẻ nam, có 4 trẻ có đột biến Canton, 3 trẻ có đột biến Kaiping. Khi kiểm tra lại bằng giải trình tự gen trực tiếp thì kết quả hoàn toàn trùng khớp. Với hai ưu điểm vượt trội này mà ARMS ngày càng được áp dụng rộng rãi trong nghiên cứu cũng như trên lâm sàng, không chỉ trong bệnh thiết hụt G6PD mà còn trong các bệnh như β - thalassemia, xác định tính đa hình của HLA, apoprotein E trong bệnh Alzeimer

Tuy nhiên, trong quá trình tiến hành, chúng tôi cũng nhận thấy phương phương pháp ARMS - PCR có một số nhược điểm. Mặc dù đơn giản, dễ tiến hành, nhưng với mỗi một mẫu bệnh cần phải tiến hành song song hai phản ứng, một với mồi bình thường, một với mồi đột biến. Nếu càng nhiều vị trí đột biến càng phải làm nhiều phản ứng dù vị trí đột biến gần nhau cũng không thể lồng ghép như giải trình tự. Hơn nữa, khâu thiết kế mồi cho phản ứng ARMS – PCR khá khó khăn để đáp ứng tiêu chuẩn đặc hiệu với sự khác biệt chỉ 1 nucleotid. Nếu mồi thiết kế không đặc hiệu thì mồi bình thường không chỉ khuếch đại đoạn DNA đích của người bình thường mà còn khuếch đại DNA đích của người có đột biến; và ngược lại, mồi đột biến không chỉ khuếch đại DNA đích của người có đột biến mà còn khuếch đại DNA đích của người bình thường. Thực tế, chúng tôi đã phải điều chỉnh trình tự mồi để đáp ứng tiêu chuẩn đặc hiệu này. Với mồi xác định đột biến ở vị trí 1376 thì chỉ cần sai khác 1 nucleotid tận cùng ở đầu 3' chúng tôi có thể khuếch đại đoạn gen chứa đột biến (C chuyển thành A) và chặn được sự nhân lên ở gen bình thường. Nhưng với mồi xác định đột biến ở vị trí 1388 phải thay đổi 2 nucleotid ở đầu tận 3' của mồi 1388N2 (...**ATAC** 3') chuyển thành mồi 1388M2 (...**TTAT** 3') thì mồi 1388M2 mới có khả năng chặn sự nhân lên của mẫu bình thường. Điều này cho thấy để thiết kế được cặp mồi ARMS thành công cần rất nhiều công sức. Và một điều nữa đặc biệt được quan tâm đó là ARMS có thể bỏ sót các trường hợp có đột biến nếu điều kiện phản ứng không được tối ưu hóa. Để khắc phục điều này cần tiến hành trên mẫu đối chứng song song gồm cả chứng âm và chứng dương với từng điều kiện cụ thể tại mỗi phòng xét nghiệm. Theo nghiên cứu của Chuân S.D (1999) [3], trong số 15 người có đột

biến Kaiping và 11 người có đột biến Canton, bằng phương pháp ARMS đã xác định được 14 người có đột biến Canton và 10 người có đột biến Kaiping. Như vậy, ARMS đã bỏ sót 1 trường hợp có đột biến Canton và 1 trường hợp có đột biến Kaiping. Tuy nhiên, với tỉ lệ sai sót này vẫn có thể chấp nhận được đối với một phương pháp khi được sử dụng trong sàng lọc bệnh. Rõ ràng, so sánh với giải trình tự gen trực tiếp - một phương pháp được coi là tiêu chuẩn vàng trong xác định các dạng đột biến nói chung, phương pháp ARMS - PCR đã khắc phục được các nhược điểm của phương pháp này. ARMS thực sự là phương pháp ưu thế trong xác định sàng lọc đột biến điểm tại vùng dịch tễ có tỷ lệ đột biến chỉ điểm cao

Trong nghiên cứu này, 7 trẻ nam có đột biến Canton và Kaiping đều có thiếu hụt G6PD mức độ nặng (hoạt độ G6PD < 20 UI/10^{12} HC. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu xưa nay trên thế giới cũng như tại Việt Nam và trùng với sự phân loại của tổ chức y tế thế giới (WHO) rằng hai đột biến Canton và Kaiping đều thuộc lớp II trong bảng phân loại thiếu hụt G6PD (hoạt độ enzyme chỉ còn < 10% so với bình thường). Nghiên cứu của Chiu D.T.Y và cộng sự trên người Trung Quốc cũng cho kết quả tương tự khi chỉ ra rằng đột biến Canton có hoạt độ enzyme 4,9% và đột biến Kaiping có hoạt độ enzyme 8% so với người bình thường [4]. Nghiên cứu của Ainoon O và cộng sự tại Malaysia, hoạt độ enzyme G6PD ở những người có đột biến Canton và Kaiping chỉ bằng < 10% hoạt độ enzyme ở người không có thiếu hụt G6PD [2]. Như vậy, đột biến Canton và Kaiping là 2 loại đột biến hay gặp gây thiếu hụt G6PD mức độ nặng. Phân tích 2 dạng đột biến này trên bệnh nhân thiếu hụt G6PD sẽ giúp bác sỹ lâm sàng tiên lượng được mức độ nguy hiểm và đưa ra điều trị hỗ trợ phù hợp. Kết quả nghiên cứu của đề tài này có thể ứng dụng rộng rãi tại Việt Nam giúp phân tích sàng lọc đột biến nguy hiểm trên bệnh nhân thiếu hụt G6PD với các cặp mồi thiết kế đã được chứng minh tính đặc hiệu.

5. KẾT LUẬN

1. Xác định đột biến Canton và Kaiping ở bệnh nhân thiếu hụt G6PD bằng phương pháp ARMS – PCR: 4 trẻ có đột biến Canton và 3 trẻ có đột biến Kaiping trong 31 trẻ được phân tích
2. Phương pháp ARMS – PCR là phương pháp có độ tin cậy, chính xác cao, nhanh chóng, tiết kiệm chi phí có thể ứng dụng rộng rãi tại Việt Nam giúp phân tích sàng lọc đột biến nguy hiểm trên bệnh nhân thiếu hụt G6PD với các cặp mồi thiết kế đã được chứng minh tính đặc hiệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beutler E. (2008). Glucose - 6 – phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*, **111**, 1, 16-24.

2. Ainoon O., Yu Y.H., Amir M.A.L., et al. (2003). Glucose - 6 – phosphat dehydrogenase variants in Malaysian Malays. *Hum Mutation*, **21**, 1, 101.

3. Chuan S.D., Xiaoqin R., Luming C., at al. (1999). Detection of the most common G6PD gene mutations in Chinese using amplification refractory mutation system. *Human Heredity*, **49**, 133-138.

4. Chiu D.T.Y., Zuo L., Chao L., et al. (1993). Molecular characterization of glucose 6 - phosphat dehydrogenase (G6PD) deficiency in patients of Chinese descent and identification of new base substitution in the human G6PD gene. *Blood cells, Molecules and Diseases*, **81**, 8, 2150-2154.

5. Cynthia D.K.B., Steve S.S. (1993). PCR amplification of speciic alleles: Rapid detection of know mutations and polymorphisms. *Mutation Research*, **288**, 93-102.

6. Gillan E., Emma D., Gael M., et al. (2010). A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biosy samples. *Experimental and Clinical cancer reseacher*, **29**, 132.

7. John M.O. (1992). Detection of mutation by the Amplification refractory mutation system (ARMS). *Hum Genet*, **9**, 77-84.

8. Matsuoka H., et al. (2007). Seven different glucose-6-phosphate dehydrogenase variants including a new variant distributed in Lam Dong Province in southern Vietnam. *Acta Med Okayama*. **61**, 4, 213-9.51

SUMMARY

RAPID DETECTION OF COMMON POINT MUTATIONS IN G6PD DEFICIENCY PATIENTS USING ARMS METHOD (AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM)

Pham Thi Huong Trang[1], Nguyen Thi Thanh Hai[1], Pham Thi Anh Tuyet[2], Đang Thi Ngoc Dung[1]

[1]Hanoi Medical University, [2]General Hospital of Tuyen Quang Province

G6PD deficiency is the most common human enzymopathy. Nowadays, more than 140 mutations have been discoveried all over the world, most of which are point mutations. The two most common mutations, Canton and Kaiping are detected in Vietnam. To detect these mutations not only rapidly but also accurately, reliablely, inexpensive, we applied ARMS method in this study. Samples from 31 boy newborns diagnosed G6PD deficiency by G6PD quatitative method were collected. The results show that: 3 cases were found carrying Kaiping (G1388A) mutation and 4 cases were found carrying Canton (G1376T) mutation. These 7 cases then were judged by direct PCR sequencing at exon 12. The sequencing data supported the results obtained by ARMS. Thus we concluded that ARMS is a simple, rapid, inexpensive, accurate and reliable method for detecting Canton and Kaiping mutation.

Key words: *ARMS, Amplification refractory mutation system, G6PD deficiency.*