

GIÁ TRỊ CỦA KỸ THUẬT MLPA TRONG CHẨN ĐOÁN ĐỘT BIẾN GEN DMD GÂY BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ DUCHENNE

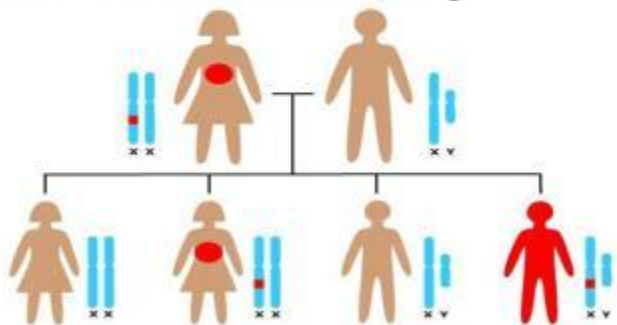
BCV: Ths.Bs. Quách Thị Hoàng Oanh
Chủ nhiệm đề tài: ThS.BS. Nguyễn Khắc Hân Hoan
Khoa XN di truyền Y học – Bệnh viện Từ Dũ

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

1

ĐẶT VẤN ĐỀ

- Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) và loạn dưỡng cơ Becker (BMD): bệnh di truyền lặn liên kết với giới tính X.
- Tần suất: 1/3.500 trẻ trai sinh sống



Kiểu di truyền trong bệnh DMD

3

DÀN BÀI

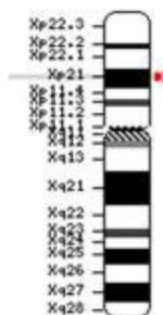
- ĐẶT VẤN ĐỀ
- MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU
- PHƯƠNG PHÁP
- KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN
- KẾT LUẬN
- KIẾN NGHỊ

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

2

ĐẶT VẤN ĐỀ

- Bệnh do đột biến gen *dystrophin*, gen lớn nhất ở người, dài 2400kb, 79 exon vị trí Xp21 trên NST X.
- Đột biến mất đoạn, lặp đoạn: 33-65%, tập trung hot spot đầu 5' và trung tâm (exon 44-55)



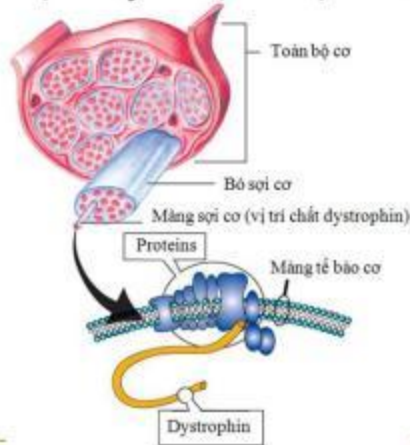
(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

4

ĐẠT VẤN ĐỀ

- Protein mã hóa dystrophin: chức năng chính trong việc duy trì sự ổn định của màng cơ.



Vị trí protein dystrophin trên mặt trong màng tế bào cơ vân

(Theo Muscular Dystrophy Association of NSW)

ĐẠT VẤN ĐỀ

➤ Chẩn đoán bệnh DMD

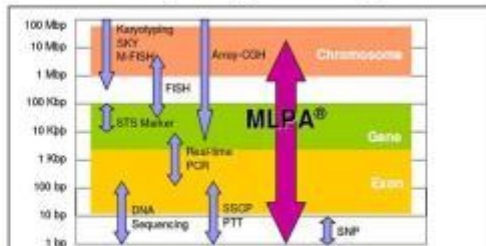
- Tiền sử gia đình
- Lâm sàng: thoái hóa cơ không ngừng, không hồi phục, không liên quan TK
- Điện cơ: điện thế thấp bé, hẹp
- CK: tăng ≥ 40 lần
- Sinh thiết cơ: kiểm tra dystrophin, thoái hóa TB
- Chẩn đoán di truyền phân tử



ĐẠT VẤN ĐỀ

➤ Các phương pháp phát hiện đột biến gen:

- Southern blot: tốn công và thời gian
- Multiplex PCR: đặc hiệu, số exon khảo sát hạn chế, tốn công
- Real-time PCR
- MLPA: khuếch đại cùng lúc 45 vị trí



MỤC TIÊU

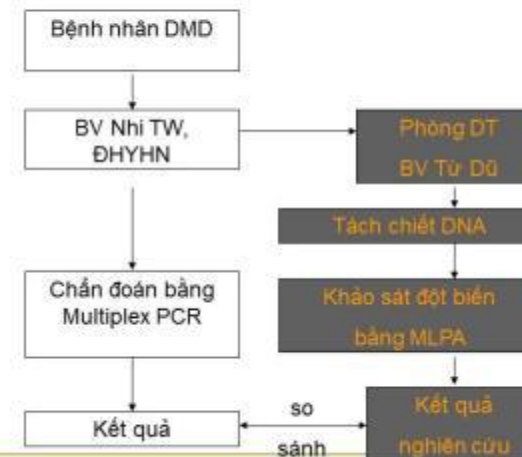
Xác định giá trị của kỹ thuật MLPA trong chẩn đoán đột biến gen DMD gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne và Becker năm 2010 tại Bệnh viện Từ Dũ

PHƯƠNG PHÁP

- Thiết kế: test chẩn đoán
- Thời gian: 1-12/2010, khoa XN DT y học
- Dân số:
 - 45 mẫu máu: 39 của bn và 6 thân nhân DMD
 - 40 mẫu máu người nam không bệnh DMD

PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

Lưu đồ thực hiện nghiên cứu



PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

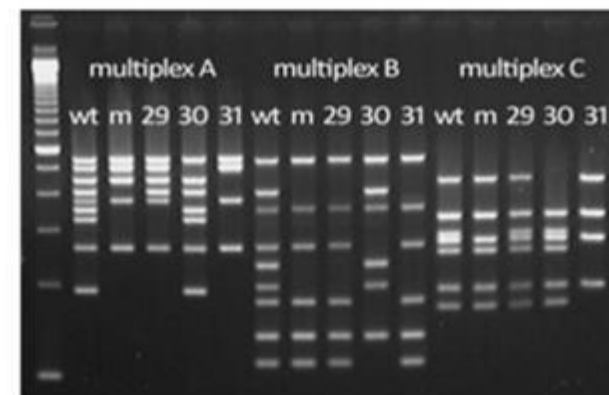
- ❖ Multiplex PCR phát hiện đột biến mất đoạn: BV Nhi trung ương, ĐHYHN
- 3 phản ứng multiplex PCR A, B, C: 25 exon

Multiplex A		Multiplex B		Multiplex C	
Exon	Kích thước	Exon	Kích thước	Exon	Kích thước
45	547	Pm	535	49	439
48	506	3	410	Pb	332
19	459	43	357	16	290
17	416	50	271	41	270
51	388	13	238	32	253
8	360	6	202	42	195
12	331	47	181	34	171
44	268	60	139		
4	196	52	113		

PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

- ❖ Phương pháp Multiplex PCR

Điện di gel agarose phát hiện đột biến

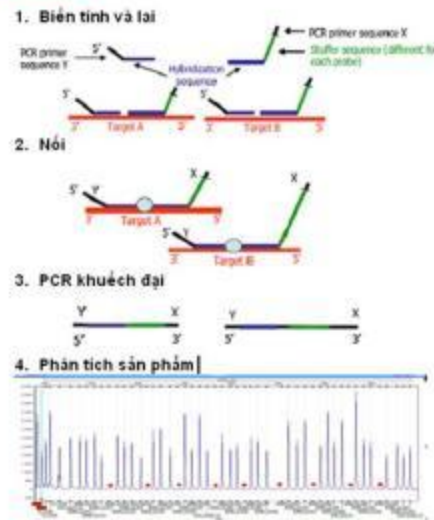


PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

❖ Phương pháp MLPA: BV Từ Dũ

Sự hiện diện của 79 exon của gen DMD được khảo sát bằng kit SALSA® MLPA® P034 – A2 và P035 – A2.

Quy trình kỹ thuật MLPA
(Nguồn: www.mlpa.com)



PHƯƠNG PHÁP

- Điện di phân tách đoạn MLPA bằng hệ thống điện di mao quản CEQ™ 8000



KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

➤ Đặc điểm đối tượng:

45 mẫu bn và thân nhân: 2 nhóm:

- ❑ Nhóm A: 36 bệnh nhân nam, tuổi 4-15
- ❑ Nhóm B: 9 mẫu 3 gia đình:
 - 3 mẫu bệnh, tuổi cao nhất: 23
 - 6 mẫu: mẹ, chị em gái bn

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

■ Nhóm A: Phát hiện đột biến:

	Multiplex PCR	MLPA
Đột biến	15	14
Wild - Type	31	32
Tổng	36	36

- ❑ MLPA: 15/36 mẫu (41,7%)
- ❑ Bộ 3 multiplex PCR: 14/36 mẫu (38,9%).

→ mẫu MS17 đột biến phát hiện bằng MLPA: ngoài vùng khảo sát của multiplex PCR

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

> Nhóm A

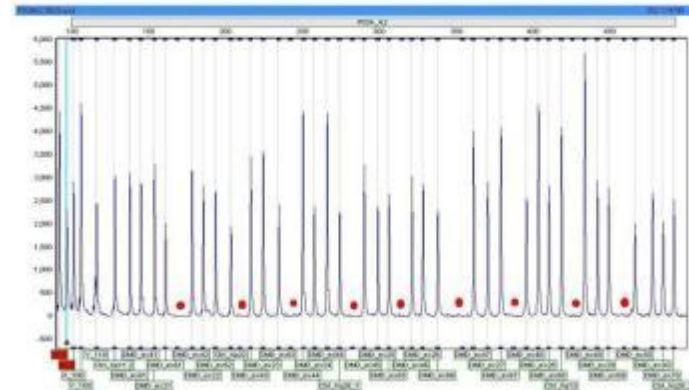
■ Số exon mất:

- Multiplex PCR: 2 – 25 exon
- MLPA: 3 -79 exon

→ MLPA phát hiện thêm mất đoạn exon khác.

KẾT QUẢ

MLPA phân tích bằng phần mềm GeneMarker kit P034



KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

> Nhóm B

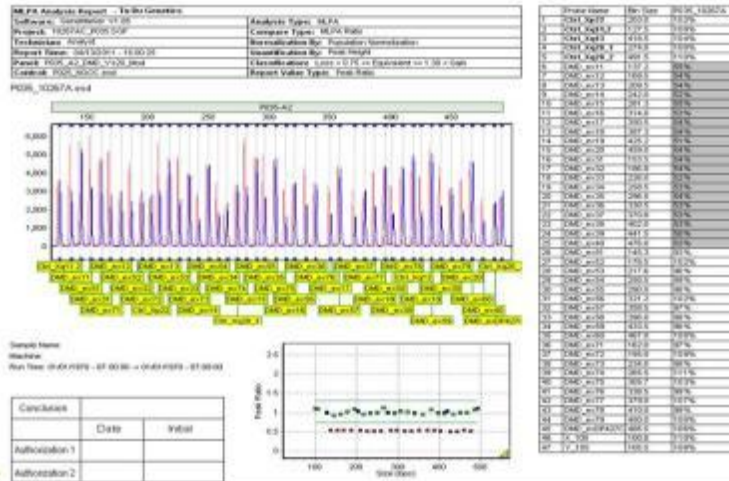
STT	Mã số	Multiplex PCR	MLPA
1	10267A	WT	Mất đoạn exon 01-40
3	10267B	Mất đoạn exon 3,4,6,8,12,13,16,17,19,32,34	Mất đoạn exon 01-40
2	10267C	WT	Mất đoạn exon 01-40
4	N10222A	WT	WT
5	N10222B	WT	WT
6	N10222C	WT	WT
7	N10222D	WT	WT
8	07029B	WT	Mất đoạn exon 50-54
9	07029C	Mất đoạn 50,51,52	Mất đoạn exon 50-54

> Nhóm B

- MLPA: đột biến 5/9 mẫu (55,6%), từ 2 gia đình. 1 gia đình không đột biến.
- Bộ 3 multiplex PCR: đột biến 2/9 (22,2%).
→ MLPA phát hiện được đột biến mất đoạn trên nữ (46,XX)

➤ Nhóm B

Kết quả MLPA của nữ mã số 10267A mang gen DMD đột biến



Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

21

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

➤ Giá trị MLPA

		Bệnh DMD		Tổng
		Bệnh	Bình thường	
MLPA	Đột biến	17	0	17
	Wild type	22	40	62
Tổng		39	40	89

- ❑ Độ nhạy: 43,6% (17/39)
- ❑ Độ đặc hiệu: 100% (40/40)
- ❑ Giá trị tiên đoán dương: 100% (17/17)
- ❑ Giá trị tiên đoán âm: 64,5% (40/62)

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

22

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

➤ Giá trị MLPA

- Phát hiện đột biến: 17/39 bệnh nhân (43,6%)
 - phù hợp với y văn: 33-65%
 - cao hơn các nghiên cứu trước ở người Việt Nam (38%)
- Số mẫu còn ít → không tìm được mẫu đột biến lặp đoạn.

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

23

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

➤ Ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh

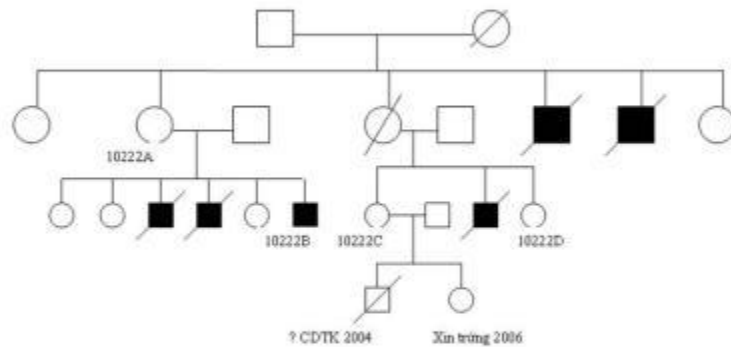
- Gia đình 10267, 7029: xác định được đột biến mất đoạn → chẩn đoán trước sinh cho thai dễ dàng.
- Gia đình N10222: không tìm được đột biến
 - ↓
 - chẩn đoán trước sinh ?

Hội thảo Khoa học công nghệ BVTD

24

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

> Cây gia hệ gia đình N10222



→ Phân tích liên kết dựa vào STR

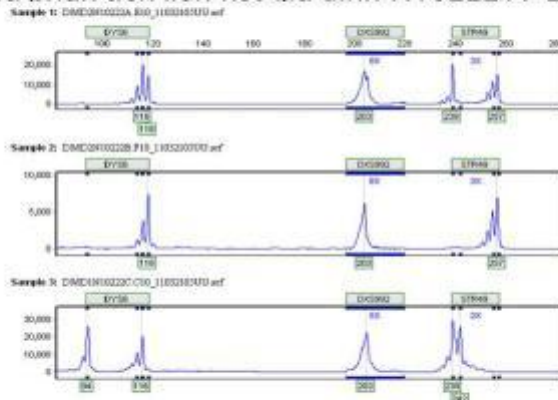
KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

> Phân tích liên kết dựa vào STR

- Nguyên tắc: 2 NST cùng cặp có cùng gen, cùng vị trí, nhưng khác trình tự STR → tìm ra NST nào nhận bố hay mẹ.
- Khuếch đại 3 marker STR trong gen DMD: DYS 6, DXS992 và STR 49 của người mẹ và con trai hoặc anh em trai bệnh → xác định gen bệnh nằm trên NST X nào

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

■ Kết quả phân tích liên kết gia đình N10222 A+B+C.



→ N10222C không mang gen bệnh (99,7%)

KẾT LUẬN

- MLPA chẩn đoán mất đoạn gen DMD: độ nhạy: 43,6%; độ đặc hiệu: 100%; giá trị tiên đoán dương: 100%; giá trị tiên đoán âm: 64,5%.
- Tỷ lệ đột biến mất đoạn gen DMD 43,6%, cao hơn nghiên cứu trước ở Việt Nam. MLPA phát hiện thêm những mất đoạn ngoài vùng khảo sát 25 exon của PCR và phát hiện được đột biến trên mẫu nữ 46,XX.
- Chẩn đoán trước sinh bệnh DMD cho gia đình mang bệnh DMD không đột biến mất đoạn: phối hợp thêm phân tích liên kết tìm gen bệnh.

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu thêm kỹ thuật multiplex STR PCR phân tích liên kết trên các marker DYS 6, DXS992 và STR 49.
- Triển khai chẩn đoán trước sinh bệnh DMD lưu đồ:



CHÂN THÀNH CẢM ƠN !