

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



**ĐỖ NGỌC HẢI**

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH BIẾN VÀ LỢP BUN  
BIẾN GEN DYSTROPHIN TRÊN BỆNH NHÂN  
LOẠI DÒNG C Duchenne Việt Nam

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2015**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**ĐỖ NGỌC HẢI**

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN VÀ LỘP BUN ĐỘ  
ĐỘ BIẾN GEN DYSTROPHIN TRÊN BỆNH NHÂN  
LOẠI DẠNG CỨ DUCHENNE VIỆT NAM

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số: 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Trần Văn Khánh
2. GS.TS. Tạ Thành Văn

**HÀ NỘI - 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đỗ Ngọc Hải, nghiên cứu sinh khóa 29 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Văn Khánh và GS.TS. Tạ Thành Văn.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2015*

**Người viết cam đoan**

**ĐỖ NGỌC HẢI**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BMD	Becker Muscular Dystrophy
BVSKTE	Bảo vệ sức khoẻ trẻ em
CK	Creatine Kinase
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy (Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne)
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
KB	Kilo Base
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
NST X	Nhiễm sắc thể X
NST Y	Nhiễm sắc thể Y
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT – RCR	Reverse transcription PCR (PCR sao mã ngược)
RNA	Ribo Nucleic Acid

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy-DMD) là một bệnh lý thần kinh cơ do di truyền thường gặp nhất, được phát hiện ở tất cả các chủng tộc khác nhau trên thế giới. Tần suất bệnh vào khoảng 1/3500 trẻ trai. Duchenne là người đầu tiên đã mô tả chi tiết bệnh này vào năm 1861 [1]. Đây là một bệnh lý cơ rất nặng, mang tính chất tuần tiến, nặng dần theo thời gian. Hầu hết trẻ trai mắc bệnh đều có dấu hiệu lâm sàng với triệu chứng suy yếu cơ, biểu hiện bằng khó đi lại, khó đứng lên ngồi xuống và khó khăn khi leo cầu thang. Trong giai đoạn nặng, bệnh nhân trở nên tàn phế, mất khả năng đi lại vào lứa tuổi 12 và thường tử vong ngoài 20 tuổi do tổn thương cơ tim và rối loạn hô hấp [2, 3]. Một thể bệnh nhẹ của DMD rất hay gặp là loạn dưỡng cơ Becker (BMD). Bệnh nhân BMD xuất hiện triệu chứng lâm sàng muộn hơn DMD, biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn và thời gian tiến triển chậm hơn. Với những biểu hiện nặng nề, cùng với rối loạn về tinh thần, DMD/BMD thực sự không chỉ là một tai họa đối với bản thân người bệnh mà còn là gánh nặng của gia đình cũng như của cả cộng đồng.

DMD/BMD là bệnh di truyền lặn liên kết giới tính, gây nên bởi đột biến gen dystrophin. Gen dystrophin nằm ở vị trí Xp21 trên nhiễm sắc thể X, có chiều dài hơn 3000 kb, gồm 79 exon với 7 promotor khác nhau và là gen người lớn nhất được phát hiện cho đến nay. Gen dystrophin mã hoá 14 kb mRNA và tổng hợp sản phẩm tương ứng là protein dystrophin. Protein này có mặt ở màng của tế bào cơ và có chức năng chính trong việc duy trì sự ổn định màng, bảo vệ tế bào cơ khỏi bị tổn thương trong quá trình co cơ [4, 5].

Hiện nay, bản đồ đột biến gen dystrophin gần như đã được xác định. Dạng đột biến xóa đoạn gen là phổ biến nhất, chiếm 60%. Dạng đột biến điểm đứng thứ hai về mức độ thường gặp, chiếm 20-30%. Dạng đột biến lặp đoạn

chiếm khoảng 10-15% [5]. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy, đột biến xóa đoạn gen thường tập trung vào hai vùng trọng điểm (hotspot): vùng trung tâm (exon 43-60) và vùng 5' tận (exon 1-19) [3, 6]. Đột biến điểm và đột biến lặp đoạn nằm rải rác trên chiều dài gen [5].

Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu. Với sự phát triển của ngành sinh học phân tử trong những năm gần đây, liệu pháp điều trị gen đối với bệnh nhân DMD đã đem lại hy vọng to lớn cho người bệnh. Tuy nhiên với mỗi dạng đột biến gen dystrophin khác nhau sẽ có liệu pháp điều trị gen khác nhau. Vì vậy, việc nghiên cứu xác định đột biến gen cho bệnh nhân là tiền đề quan trọng để lựa chọn liệu pháp điều trị gen hiệu quả nhất. Ngoài ra, việc xác định chính xác dạng đột biến gen còn giúp cho chẩn đoán người lành mang bệnh, chẩn đoán trước sinh tư vấn di truyền nhằm giảm tỉ lệ mắc bệnh, giảm hậu quả của bệnh gây cho gia đình bệnh nhân và xã hội.

Những năm gần đây, nhiều nhà khoa học nước ngoài cũng như trong nước đã tiến hành nghiên cứu và phát hiện đột biến gen dystrophin ở các bệnh nhân DMD. Ở Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về đột biến gen dystrophin. Tuy nhiên, các công trình chủ yếu mới chỉ dừng ở phát hiện đột biến xóa đoạn và tập trung vào 2 vùng đột biến trọng điểm, vẫn chưa có nghiên cứu nào tiến hành phát hiện toàn diện các dạng đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm trên toàn bộ 79 exon của gen dystrophin.

Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài “**Nghiên cứu xác định đột biến và lập bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne Việt Nam**” được tiến hành với các mục tiêu sau:

- 1. Xác định đột biến xóa đoạn, lặp đoạn và đột biến điểm của gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD.*
- 2. Bước đầu xây dựng bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam.*

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Đặc điểm của bệnh DMD

#### 1.1.1. Lịch sử phát hiện bệnh

Năm 1851, Meryon ghi nhận có 8 trẻ trong 3 gia đình mắc cùng một loại bệnh với biểu hiện yếu cơ dần dần và dẫn đến tử vong ở thời niên thiếu mà ông cho rằng do thiếu dinh dưỡng gây nên, ông nhận thấy bệnh chỉ gặp ở trẻ trai và tử không bị tổn thương, vì thế bệnh được đặt tên là bệnh Meryon [7].

Năm 1861, bác sĩ người Pháp Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806 – 1875) đã mô tả chi tiết dạng giả phì đại cơ ở bé trai mắc bệnh loạn dưỡng cơ trong quyển sách của ông mang tên "*Paraplégie Hypertrophique de l'enfance de cause cérébrale*", xuất bản năm 1861.

Đến năm 1868, Duchenne tiến hành một nghiên cứu quy mô trên 13 trẻ có biểu hiện liệt cơ giả phì đại (còn gọi là nhược cơ). Ông là người đầu tiên đã tiến hành sinh thiết cơ trên người sống để làm xét nghiệm mô học và nhận thấy có sự thay thế mô cơ bằng mô xơ hoặc mô liên kết trên tiêu bản, triệu chứng có cải thiện ở vài bệnh nhân khi điều trị bằng thủy trị liệu kết hợp xoa bóp. Từ đó ông đưa ra tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh dựa trên kết quả giải phẫu bệnh và ghi điện cơ, vì thế, bệnh được đặt tên là bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [8].

Năm 1879, Gower cũng nhận thấy những biểu hiện yếu cơ chỉ ghi nhận ở trẻ nam và là bệnh di truyền thông qua người mẹ. Ông ghi nhận các trẻ bệnh có đặc điểm giống nhau khi thay đổi tư thế từ nằm sang ngồi hay từ ngồi sang đứng và dấu hiệu này được đặt tên là dấu hiệu Gower, rất đặc trưng cho bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [9].

Trong thời gian dài sau đó, các nghiên cứu hầu như chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá các biểu hiện lâm sàng và điều trị hỗ trợ làm giảm các triệu chứng của bệnh.

Năm 1950, Peter Emil Becker một bác sĩ người Đức đã mô tả một trong những dạng của bệnh DMD, thể bệnh này có cơ chế bệnh sinh giống bệnh DMD nhưng bệnh cảnh lâm sàng thường nhẹ hơn. Thể bệnh này đã được mang tên ông – Becker muscular dystrophy (BMD).

Năm 1981, Zatz M. và CS quan sát những trẻ gái mắc bệnh và phát hiện ra gen dystrophin nằm ở vị trí Xp21 trên nhiễm sắc thể (NST) X, những trẻ gái này mang chuyển đoạn giữa NST X và NST thường [10].

Năm 1985, Kukel và CS đã phân lập được DNA từ một bệnh nhân nam mắc bệnh DMD và thấy có xóa đoạn lớn NST X của bệnh nhân này.

Những năm sau đó, nhờ sự phát hiện ra gen dystrophin và sản phẩm protein tương ứng vào năm 1987, cùng với các kỹ thuật di truyền phân tử phát triển mạnh đã giúp phát hiện được đột biến trên gen dystrophin gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne và phát hiện người mẹ mang gen bệnh [11, 12].

Đến năm 1993 người ta đã phát hiện được đầy đủ các thành phần và cấu trúc của gen dystrophin gồm 79 exon với 7 promoter khác nhau, mã hóa cho 14kb mRNA, trong đó hơn 99% là intron.

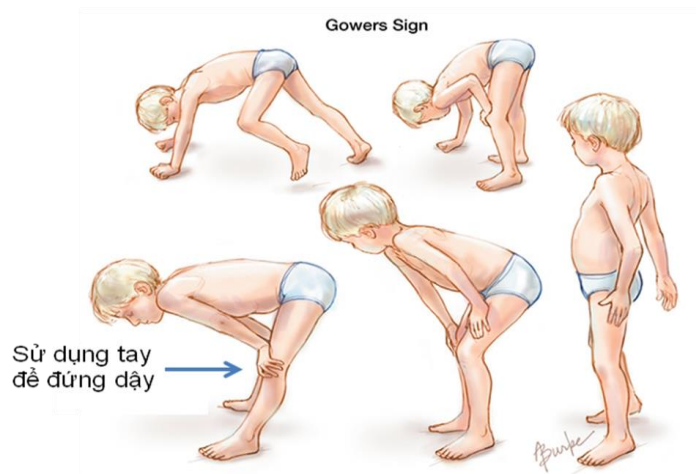
Ngày nay, cơ chế phân tử của bệnh ngày càng được hiểu rõ đã giúp hoàn thiện thêm các kỹ thuật chẩn đoán bệnh, tư vấn di truyền, tầm soát trước sinh, cũng như bước đầu ứng dụng liệu pháp gen trong điều trị bệnh DMD, nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân và làm giảm gánh nặng cho gia đình và xã hội.



### 1.1.2. Biểu hiện lâm sàng của DMD

Trẻ trai hiếm khi biểu hiện các triệu chứng lúc sinh hoặc trong những năm đầu của thời kỳ ấu nhi mặc dù một số trẻ đã có biểu hiện giảm trương lực cơ kín đáo. Các kỹ năng vận động thô sớm như lật, ngồi và đứng thường phù hợp với lứa tuổi hoặc có thể hơi chậm. Dấu hiệu sớm nhất của yếu cơ có thể là trẻ giữ cổ kém hơn. Những triệu chứng thường bắt đầu từ 3-5 tuổi, khởi đầu bởi sự khó đi lại, khó khăn khi leo cầu thang và khi đứng, chân bệnh nhân thường dạng ra cho chắc chắn, lưng uốn để bù trừ cho cơ mông bị yếu.

Dấu hiệu **Gower** sớm có thể thấy rõ vào lúc 3 tuổi và biểu hiện đầy đủ vào lúc trẻ được 5 đến 6 tuổi: Khi người bệnh đang ngồi xổm phải đứng lên hoặc đang nằm phải ngồi dậy thì người bệnh phải quay người sang một bên, gập đầu gối vào mông, hai tay chống nặng đỡ lấy thân để giữ tư thế quỳ bấn, sau đó, bằng cách tì hai tay lần lượt lên cẳng chân, đầu gối và đùi, người bệnh đẩy cho thân thẳng dậy. Sự tiếp nối các động tác như vậy được xem là đặc hiệu cho bệnh loạn dưỡng cơ tuần tiến. Dáng đi Trendelenberg hay hông lắc lư cũng xuất hiện vào thời điểm này [13].



**Hình 1.1. Dấu hiệu Gower**

(nguồn <http://www.alison-burke.com/works-medicine.html> )

Thời gian bệnh nhi còn duy trì được khả năng di chuyển thay đổi rất lớn. Một số bệnh nhân phải sử dụng xe lăn lúc 7 tuổi, trong khi đó một số bệnh nhân khác có thể đi lại mặc dù có khó khăn đến năm 10 tuổi mà không cần có bất kỳ một can thiệp chỉnh hình nào. Bằng việc sử dụng các khung nâng đỡ, vật lý trị liệu và đôi khi bằng những can thiệp phẫu thuật nhỏ (kéo dài gân Achilles), hầu hết trẻ mắc DMD có thể đi lại đến năm 12 tuổi. Di chuyển không chỉ có ý nghĩa quan trọng trong việc làm chậm lại quá trình ức chế tâm thần vốn thường đi kèm với việc người bệnh mất đi sự độc lập cá nhân mà nó còn có tác dụng phòng ngừa chứng vẹo cột sống ở các bệnh nhân này. Chứng vẹo cột sống có thể phòng ngừa được ngay cả khi bệnh nhân chỉ còn duy trì được quá trình di chuyển 1 giờ/ngày. Ngược lại, khi bệnh nhân phụ thuộc vào xe lăn thì chứng vẹo cột sống sẽ tiến triển rất nhanh chóng [14].

Quá trình yếu cơ không thể không chế được tiếp tục tiến triển trong thập niên thứ hai của đời sống. Chức năng của các cơ xa vẫn còn được bảo tồn tương đối tốt do đó trẻ vẫn có thể sử dụng được các dụng cụ ăn uống, cầm bút và sử dụng bàn phím vi tính. Yếu cơ hô hấp biểu hiện bằng ho yếu và không hiệu quả, thường xuyên nhiễm khuẩn hô hấp và giảm dung tích phổi. Yếu cơ vùng hầu họng có thể tạo điều kiện gây nên hít nhầm thức ăn vào đường hô hấp, trào ngược dịch qua mũi và trẻ có giọng mũi. Chức năng của các cơ vận nhãn còn được bảo tồn tương đối tốt. Đại tiểu tiện không tự chủ do yếu cơ vòng hậu môn cũng như cơ vòng niệu đạo thường ít gặp và chỉ xảy ra vào giai đoạn muộn của bệnh.

Cơ rút cơ thường gặp ở mắt cá, đầu gối, khớp háng và khuỷu tay. Chứng vẹo cột sống thường gặp. Biến dạng lồng ngực làm nặng thêm sự suy giảm dung tích phổi và gây chèn ép tim. Đôi khi vẹo cột sống cũng gây khó chịu và đau đớn.

Giả phì đại bắp chân và teo cơ đùi là dấu hiệu kinh điển. Sự tăng kích thước bắp chân là do một số sợi cơ có hiện tượng thâm nhiễm mỡ và tăng sinh collagen. Lưỡi và cơ cẳng tay cũng thường xuất hiện dấu hiệu giả phì đại [8].

Bệnh cơ tim là một đặc trưng hằng định của DMD. Mức độ của bệnh lý cơ tim không nhất thiết tương quan với mức độ yếu cơ hệ vận động. Một số bệnh nhân có thể tử vong sớm do bệnh lý cơ tim trầm trọng trong khi vẫn còn có khả năng đi lại. Ngược lại, ở một số khác, ngay cả khi trong giai đoạn muộn của bệnh, thì tim vẫn còn có khả năng bù trừ khá tốt.

Sa sút trí tuệ gặp ở tất cả bệnh nhân mặc dù chỉ có 20 đến 30% bệnh nhân có chỉ số IQ dưới 70. Phần lớn bệnh nhân vẫn có thể tiếp tục theo đuổi được các chương trình học bình thường, nhất là khi trẻ có được sự giúp đỡ phù hợp. Một số bệnh nhân chậm phát triển trí tuệ nặng nề tuy nhiên không có mối tương quan giữa mức độ trì độn với mức độ bệnh lý ở cơ. Tỷ lệ động kinh thường cao hơn một ít so với quần thể chung.

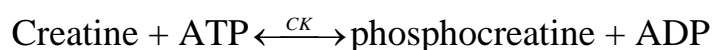
Các biến đổi thoái hóa, xơ hóa cơ là một quá trình không gây đau. Bệnh nhân thường không có đau cơ và chuột rút, hiếm khi có vôi hóa cơ.

Trẻ mắc bệnh DMD thường tử vong vào khoảng ngoài 20 tuổi. Nguyên nhân tử vong là suy hô hấp trong khi ngủ, suy tim xung huyết, viêm phổi hoặc đôi khi do sặc và tắt nghẽn đường thở [2, 3].

### ***1.1.3. Xét nghiệm cận lâm sàng***

#### ***1.1.3.1. Định lượng hoạt độ Creatine Kinase***

Creatine Kinase (CK) là enzym xúc tác cho việc tạo năng lượng giúp cho quá trình co, duỗi cơ và quá trình chuyển hóa chất trong tế bào cơ. Enzym này xúc tác cho phản ứng:



Phosphocreatine là dạng dự trữ năng lượng cho hoạt động của cơ và vận chuyển chất trong tế bào cơ.

Có ba dạng isoenzym của CK, đó là CK-MM; CK-MB và CK-BB. Dạng đồng phân CK-MM chiếm 95% của CK toàn phần, nó tập trung chủ yếu ở tổ chức cơ vân. Dạng CK-MB chiếm khoảng 5% và tập trung chủ yếu ở mô cơ tim. Dạng CK-BB chiếm tỷ lệ không đáng kể và khu trú chủ yếu ở tổ chức não, nó không qua được hàng rào mạch máu não, do đó CK-BB không xuất hiện trong huyết thanh.

Hoạt độ CK huyết thanh thường tăng rất cao ở bệnh nhân DMD, ngay cả trước khi có dấu hiệu lâm sàng, thậm chí vào lúc sinh. Hoạt độ enzym CK huyết thanh thường là từ 15000 đến 35000 UI/L (bình thường dưới 160 UI/L), bởi vậy khi hoạt độ CK huyết thanh bình thường có thể loại trừ chẩn đoán DMD. Tuy nhiên, trong giai đoạn muộn của quá trình bệnh, hoạt độ enzym này giảm thấp, lý do của hiện tượng trên là vào giai đoạn cuối, khối cơ còn lại quá ít vì vậy mà lượng cơ thoái hóa cũng ít đi [10, 15].

Các enzym tiêu thể hiện diện trong cơ như aldolase và aspartat transaminase (AST) cũng tăng nhưng ít đặc hiệu như CK.

Kiểm tra tim bằng điện tâm đồ (ECG) và X quang lồng ngực rất cần thiết và phải lặp lại định kỳ [8].

#### *1.1.3.2. Phương pháp thăm dò điện sinh lý cơ*

Ghi điện cơ là phương pháp nghiên cứu hoạt điện của cơ bằng cách ghi lại các điện thế hoạt động của các sợi cơ ở các trạng thái khác nhau.

Trong bệnh DMD, điện cơ đồ cho thấy những biến đổi đặc trưng của bệnh lý cơ nhưng lại không đặc hiệu cho DMD. Trong DMD, không có bằng

chứng việc suy giảm phân bố thần kinh trong cơ, tốc độ dẫn truyền thần kinh cảm giác và vận động bình thường [13].

#### *1.1.3.3. Sinh thiết cơ*

Sinh thiết cơ có tác dụng chẩn đoán xác định nhờ vào những thay đổi đặc trưng trên tổ chức sinh thiết. Những biến đổi mô bệnh học đặc trưng bao gồm tăng sinh tổ chức liên kết của mô bọc sợi cơ, các sợi cơ bị thoái hóa và tái sinh rải rác. Mô bệnh học cũng cho thấy có hiện tượng thâm nhiễm mô mỡ, mô liên kết và những tế bào đơn nhân. Đây là hậu quả của phản ứng viêm khởi động bởi quá trình hoại tử sợi cơ. Ngay cả các sợi cơ có chức năng bình thường cũng biểu hiện những thay đổi nhẹ về mặt cấu trúc. Ngoài ra tổ chức sinh thiết còn có rất nhiều sợi đậm đặc. Các sợi cơ co rút thái quá này có thể là hậu quả của hoại tử ở một vị trí khác trên chiều dài của sợi cơ. Quá trình hoại tử này tạo điều kiện cho canxi đi vào nội bào qua chỗ tổn thương của màng sợi cơ vân. Luồng canxi đi vào sẽ khởi động quá trình co rút của toàn bộ chiều dài sợi cơ [6, 8].

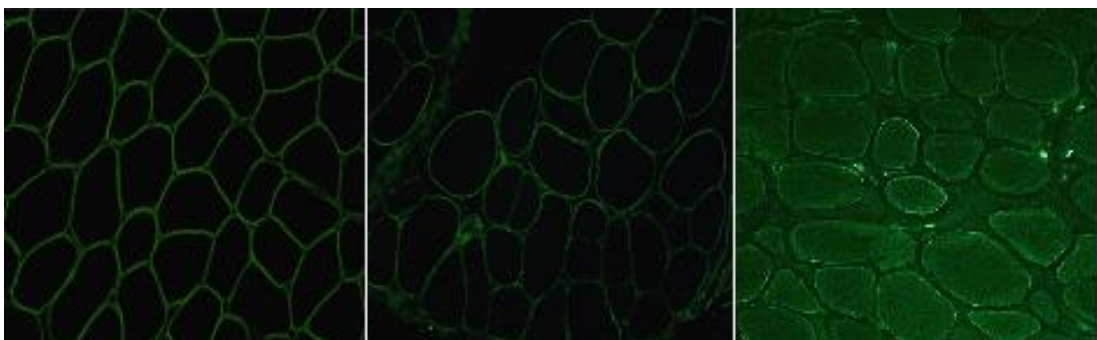
Việc quyết định nên hay không nên tiến hành sinh thiết cơ để chẩn đoán đôi khi cũng là một vấn đề gây tranh cãi. Nếu gia đình có người mắc bệnh, nhất là khi anh em trai của bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định DMD và bệnh nhân có những biểu hiện lâm sàng đặc trưng của bệnh cũng như enzym CK huyết thanh tăng cao thì không cần thiết phải sinh thiết cơ để chẩn đoán. Nếu bệnh nhân là người đầu tiên trong gia đình có biểu hiện lâm sàng và sinh hóa nghi ngờ thì nên sinh thiết cơ, việc sinh thiết cơ ở có tác dụng chẩn đoán loại trừ một số bệnh lý cơ khác có biểu hiện lâm sàng giống với DMD. Vị trí sinh thiết thường sử dụng nhất trong lâm sàng là sinh thiết cơ rộng ngoài của cơ tứ đầu đùi hoặc cơ sinh đôi ngoài [8].

#### 1.1.3.4. Hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry)

Hóa mô miễn dịch là phương pháp hóa tổ chức miễn dịch học, người ta dùng chất huỳnh quang (chất này sẽ phát sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang) gắn vào kháng nguyên hoặc kháng thể để phát hiện phức hợp kháng nguyên-kháng thể ở mức vi thể hay phân tử.

Dystrophin là một protein nên có tính sinh kháng thể. Khi nhuộm tiêu bản sinh thiết của những tế bào cơ bình thường, vì dystrophin định khu ở màng sợi cơ nên ở đó có phản ứng kết hợp kháng nguyên-kháng thể, thể hiện đường viền của các sợi cơ với sự phát sáng huỳnh quang liên tục, không ngắt quãng. Trong khi đó ở những bệnh nhân DMD không có sự bắt màu, không thấy rõ ranh giới màng tế bào cơ, phản ánh sự vắng mặt của dystrophin trên màng tế bào cơ.

Một thể bệnh nhẹ của DMD rất hay gặp là loạn dưỡng cơ Becker (BMD). Bệnh nhân BMD xuất hiện triệu chứng lâm sàng muộn hơn DMD, biểu hiện lâm sàng nhẹ hơn và thời gian tiến triển chậm hơn. Trên tiêu bản sinh thiết cơ, protein dystrophin giảm đáng kể trên màng tế bào sợi cơ song không vắng mặt hoàn toàn như trong thể nặng DMD [14].



Người bình thường

Bệnh nhân BMD

Bệnh nhân DMD

**Hình 1.2. Hình ảnh hóa mô miễn dịch của protein dystrophin khi nhuộm tiêu bản sinh thiết cơ [16]**

#### *1.1.3.5. Phương pháp di truyền phân tử xác định gen đột biến*

Gen Dystrophin rất dài với nhiều dạng đột biến khác nhau, vì thế việc xác định được có đột biến gen, cũng như xác định chính xác vị trí đột biến sẽ giúp ích rất nhiều trong chẩn đoán bệnh sớm, phát hiện người nữ mang gen bệnh trong gia đình và giúp cho việc điều trị bằng liệu pháp gen hiệu quả hơn.

Từ lúc bệnh DMD được nghiên cứu chẩn đoán bằng phương pháp phân tích di truyền bởi Kukel và CS (1985), đến thời điểm hiện nay đã có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định đột biến gen Dystrophin như: FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), Multiplex PCR (Multiplex Polymerase chain reaction), Southern blot, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), giải trình tự gen.... Và mỗi phương pháp đều có ưu và nhược điểm riêng.

#### **1.1.4. Điều trị bệnh DMD**

##### *1.1.4.1. Điều trị nội khoa*

- Điều trị thuốc:

Có nhiều nghiên cứu khác nhau về sử dụng steroids (glucocorticoids hay corticosteroids) trong bệnh DMD kể từ nghiên cứu mở đầu của Drachman và cộng sự (1974) [17] đã cho thấy hiệu quả của thuốc trong việc cải thiện sự yếu cơ và chức năng vận động ở trẻ, ngoài ra steroids còn giúp làm giảm vấn đề hô hấp, tim mạch và giảm nguy cơ vẹo cột sống, ít nhất là trong giai đoạn ngắn, nhờ tác dụng ức chế tế bào T gây độc từ cơ hoại tử [18, 19].

Cho đến nay, steroids (glucocorticoids hay corticosteroids) vẫn được khuyến cáo sử dụng. Tuy nhiên, cần cân nhắc về liều lượng, thời điểm dùng thuốc, thời gian sử dụng và cần theo dõi chặt chẽ khi dùng thuốc vì các tác dụng phụ của thuốc khi dùng lâu dài (tăng cân, rối loạn về hành vi, giảm mật độ khoáng của xương...) có thể làm trầm trọng thêm tiến trình bệnh lý [2].

- Điều trị hỗ trợ (khi cần) để đảm bảo thông khí cho người bệnh, lưu ý những trường hợp giảm thông khí về đêm, khó thở khi ngủ, suy hô hấp...

Cần phát hiện sớm bệnh cơ tim và những biến chứng tim mạch thông qua đo điện tâm đồ và siêu âm tim định kỳ để điều trị kịp thời cho bệnh nhân. Siêu âm tim và điện tâm đồ nên thực hiện mỗi 2 năm cho đến khi trẻ 10 tuổi, sau đó thực hiện hàng năm hoặc thường xuyên hơn nếu phát hiện bất thường [2, 14].

- Chế độ dinh dưỡng cần đầy đủ và hợp lý để tránh béo phì và phòng ngừa loãng xương do thiếu canxi, nhưng không nên cho trẻ uống quá nhiều vitamin vì đây không phải là bệnh do thiếu vitamin gây ra [13].

- Tập vật lý trị liệu: tất cả các trẻ khi được chẩn đoán DMD nên được tập vật lý trị liệu nhằm hạn chế bớt mức độ co rút cơ, tuy nhiên, việc tập luyện nên phù hợp theo lứa tuổi và không nên tập luyện nhiều quá [13].

#### *1.1.4.2. Điều trị bằng liệu pháp gen*

Trên thực tế, gần như tất cả các bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne dần dần sẽ bị tàn phế và chết do suy hô hấp, tổn thương cơ tim hoặc các nhiễm trùng bội phụ ở lứa tuổi thiếu niên hoặc trước 20 tuổi. Rõ ràng với phác đồ điều trị bằng thuốc, việc điều trị bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne mới chỉ



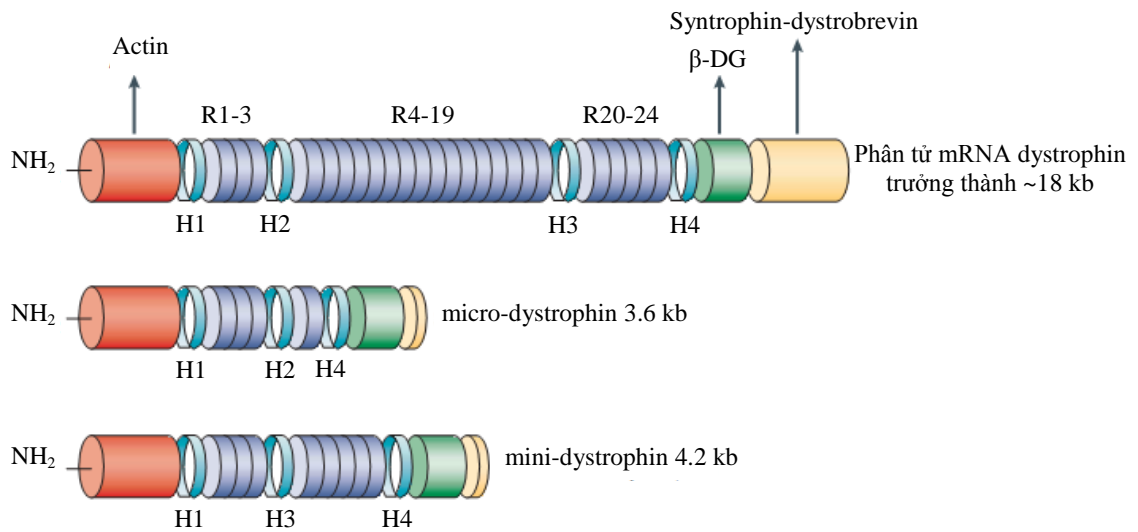
dừng lại ở điều trị triệu chứng, làm chậm diễn biến của bệnh, hoàn toàn chưa tác động tới những sai hỏng ở mức độ gen - bản chất gây bệnh DMD.

Do đó, liệu pháp điều trị gen với khả năng can thiệp tận gốc đột biến gen dystrophin đang được các nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu theo 3 hướng chính:

*i) Thiết kế vector mang gen mini hoặc micro dystrophin*

Ý tưởng sử dụng vector mang gen dystrophin có chức năng như một liệu pháp điều trị tổng thể cho mọi dạng đột biến gặp nhiều thách thức do kích thước khổng lồ của gen dystrophin ở mức độ genome (2.4 Mb) cũng như ở mức độ cDNA (18 kb). Một số ít nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc thiết kế vector mang gen dystrophin có bản chất là virus HSV-1 hoặc plasmid, tuy nhiên hiệu suất chuyển nhiễm các vector vào tế bào đích rất thấp do kích thước quá lớn của thể truyền. Hướng đi này gần như đã đi vào ngõ cụt cho đến khi có những nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân Becker (một thể bệnh nhẹ của DMD) thường bị đột biến xóa đoạn một số vùng nhất định trên gen dystrophin, kết quả sinh thiết cơ vẫn phát hiện được một lượng nhỏ các protein dystrophin chức năng. Điều này gợi ý rằng một số vùng trên gen dystrophin không thực sự cần thiết và có thể được loại bỏ mà không làm ảnh hưởng đến chức năng của protein dystrophin. Bằng việc sử dụng các mô hình chuột chuyển gen bị loạn dưỡng cơ Duchenne (chuột *mdx*) mang nhiều đột biến xóa đoạn khác nhau, các nhà khoa học đã xác định được những vùng chức năng thiết yếu của protein dystrophin. Trong đó, vùng N-tận đóng một vai trò quan trọng nhưng không phải là quyết định đến khả năng bám của bộ khung xương tế bào lên dystrophin, đột biến xóa đoạn vùng N-tận thường gây

thể bệnh nhẹ. Một số giả thuyết trước đây cho rằng vùng giàu Cystein và vùng C-tận đều tương đối quan trọng với chức năng của dystrophin thông qua việc tạo thành phức hợp DGC. Tuy nhiên nghiên cứu của Crawford và Rafael đã chỉ ra rằng quá trình hình thành phức hợp DGC không đòi hỏi sự tham gia của vùng C-tận, chỉ có đột biến xóa đoạn vùng giàu Cystein mới làm phá hủy hoàn toàn phức hợp DGC gây thể bệnh nặng. Đáng chú ý, một số nghiên cứu đã chỉ ra việc gây đột biến xóa những vùng lặp lại trên gen dystrophin có thể giúp cắt ngắn đáng kể vùng trung tâm rod (chiếm tới 75% chiều dài gen dystrophin) mà vẫn đảm bảo chức năng của dystrophin. Nhóm nghiên cứu của Harper và cộng sự đã thành công trong việc xây dựng một mini-dystrophin dài 6.2 kb (xóa vùng H2-R19) mang 8 vùng trình tự lặp lại và các vùng nối 1,3,4 nhằm mô phỏng lại đột biến xóa exon 17-48 của một bệnh nhân Becker đã được England phát hiện trước đó [20]. Chuột *mdx* chuyển gen mang mini-dystrophin có khả năng vận động bình thường, không xuất hiện các dấu hiệu loạn dưỡng cơ đặc trưng, điều này chứng tỏ mini-dystrophin mã hóa ra protein dystrophin có chức năng. Tiếp nối khám phá này, một số nghiên cứu cũng đã thành công trong việc xây dựng những micro-dystrophin khi cắt ngắn thêm những vùng trình tự lặp lại khác. Cho đến nay mô hình tối giản nhất của gen dystrophin đã được xây dựng là một micro-dystrophin (xóa vùng R4-R23) có kích thước 3.6 kb (so với phân tử mRNA trưởng thành dystrophin nguyên gốc dài 18 kb).



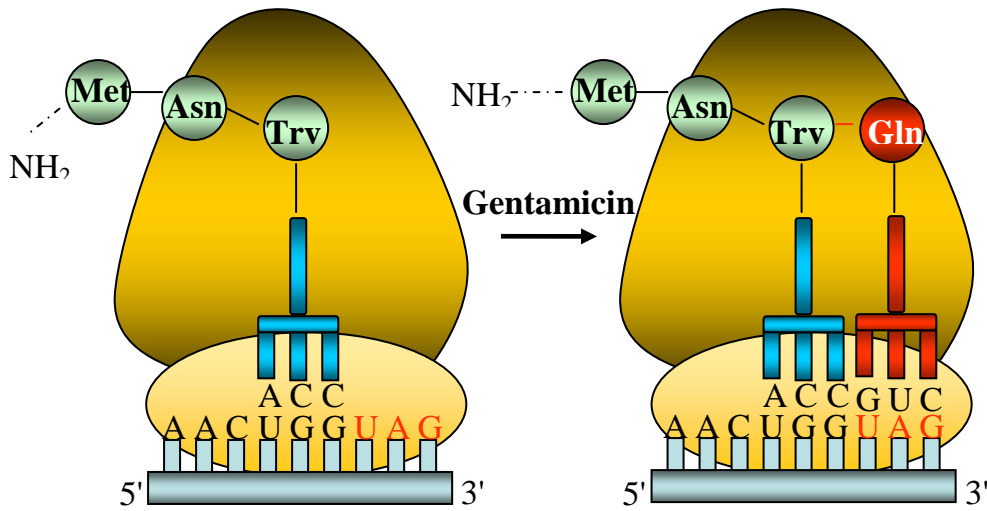
Vùng rod trung tâm gồm 24 đoạn trình tự lặp lại (R1-R24) và 4 vùng nối (H1-H4).  
 Mô hình tối giản gen dystrophin được xây dựng thông qua việc xóa một số vùng trình tự lặp lại và vùng nối.

**Hình 1.3. Cấu trúc phân tử mRNA dystrophin trưởng thành và các mô hình micro và mini dystrophin [21]**

Việc thử nghiệm thành công mô hình mini và micro-dystrophin đã tạo bước đột phá trong hướng nghiên cứu áp dụng các vector mang gen chức năng. Trong số các dạng thể truyền, virus adeno-associated tái tổ hợp (recombinant adeno associated virus-rAAV) được coi như thể truyền tốt nhất để truyền tải gen vào tế bào cơ do có các đặc điểm như: kích thước nhỏ phù hợp cho việc xâm nhập qua mạng lưới các vi sợi ngoại bào của tế bào cơ, hiệu suất chuyển nhiễm cao nhờ khả năng gắn kết với tế bào đích thông qua các heparan sulphate proteoglycan AAV type-2 receptor trên bề mặt tế bào, khả năng biểu hiện tương đối ổn định gen chuyển sau khi hội nhập vào genome tế bào chủ.

*ii) Thử nghiệm các loại thuốc có hoạt tính readthrough*

Một hướng nghiên cứu khác đang thu hút nhiều sự quan tâm các nhà khoa học trên thế giới là việc thử nghiệm các loại thuốc có khả năng can thiệp trực tiếp vào quá trình dịch mã protein chức năng. Hướng nghiên cứu này được khởi nguồn từ một phát hiện mới về hoạt tính của gentamicin (kháng sinh quen thuộc trong điều trị nhiễm khuẩn) giúp hồi phục quá trình tổng hợp protein dystrophin ở bệnh nhân DMD và protein CFTR ở bệnh nhân xơ nang bị đột biến vô nghĩa. Thông thường những kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside có hoạt tính kháng khuẩn nhờ khả năng ức chế quá trình dịch mã protein ở các sinh vật đơn bào. Nghiên cứu của Palmer đã chỉ ra rằng những kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside (gentamicin, tobramycin, amikacin, hygromycin) có thể tác động đến bộ máy dịch mã của tế bào, giúp tổng hợp nên những phân tử protein hoàn chỉnh từ phân tử mRNA mang mã đột biến dừng [22]. Những nghiên cứu *in vitro* cho thấy gentamicin giúp ribôxôm sử dụng glutamin là axit amin tương ứng của các mã kết thúc UAG, UAA và tryophan cho mã kết thúc UGA-**hoạt tính readthrough**. Gentamicin cũng tác động tới các yếu tố giải phóng RF1 và RF2 giúp ổn định quá trình tổng hợp protein của ribôxôm.



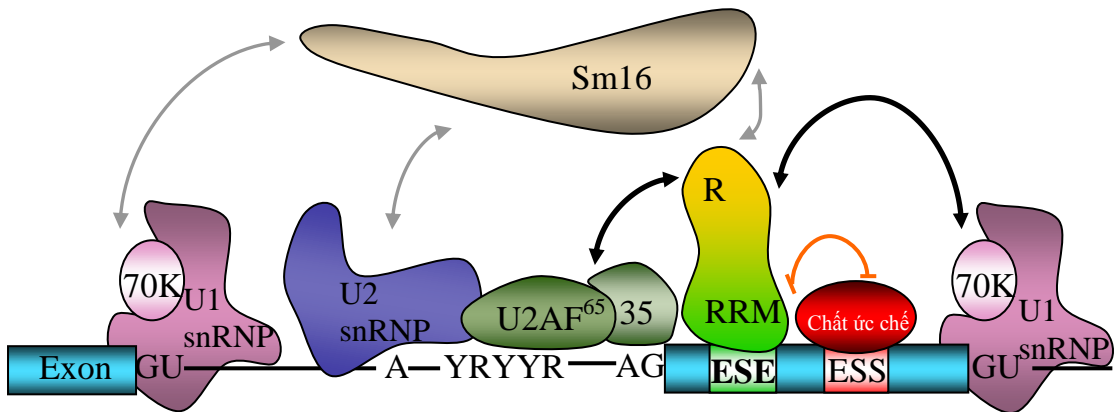
**Hình 1.4. Gentamicin giúp bộ máy dịch mã của tế bào vượt qua mã dừng đột biến bằng việc sử dụng axit amin glutamin cho mã dừng UAG.**

(Nguồn <http://quest.mda.org/article/clinical-trials-and-studies-july-august-2005>)

iii) Sử dụng antisense gây xóa đoạn exon

Gây xóa exon cần thiết trên gen dystrophin nhằm khôi phục lại khung dịch mã ở các bệnh nhân DMD, giúp chuyển từ thể bệnh nặng sang thể bệnh nhẹ. Điều này được thực hiện thông qua việc tác động trực tiếp vào các yếu tố điều khiển quá trình cắt nối exon-intron. Đích nhắm đầu tiên có thể tác động là hai vùng trình tự bảo thủ đầu 5'-GU và 3'-AG trong intron giúp bộ máy cắt nối của tế bào nhận biết ranh giới exon và intron [23]. Tuy nhiên do hai vùng trình tự này được bảo toàn một cách tuyệt đối ở mọi gen vì vậy cách tiếp cận nhằm điều khiển quá trình cắt nối exon-intron trên gen dystrophin cũng sẽ gây tác động tương tự đến các gen khác. Thay vào đó, các nhà khoa học hiện đang tập trung nghiên cứu theo hướng tác động vào vùng trình tự tăng cường cắt nối trong mỗi exon (Exonic splicing enhancer-ESE). ESE là vị trí bám của các protein giàu

serine/arginine (serine/arginine-rich protein- protein SR). Để khởi động quá trình cắt nối exon-intron, protein SR sẽ bám chính xác vào đoạn trình tự **ESE** nhờ vùng chức năng RRM đồng thời thu hút các yếu tố U2AF<sup>35</sup> và U1snRNP. Thông qua sự tương tác đặc hiệu với vùng chức năng RS của protein SR, phức hợp U2AF- U1snRNP được gắn bền vững và đặc hiệu tại 2 vùng trình tự bảo thủ 5'-GU và 3'-AG trong intron giúp hoạt hóa phản ứng cắt nối exon-intron. Bên cạnh đó, bằng cách bám vào vùng **ESE**, protein SR còn làm bất hoạt các yếu tố ức chế quá trình cắt nối exon-intron [24].

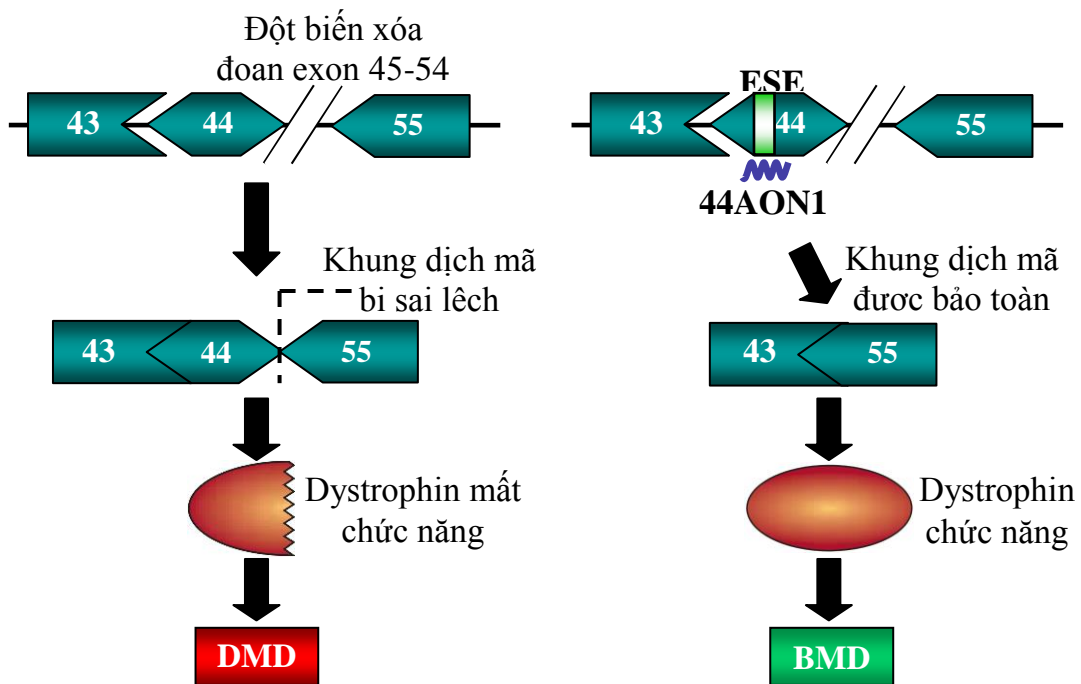


*Thông qua sự tương tác đặc hiệu với vùng ESE, protein SR hoạt hóa các thành phần U1snRNP, U2AF<sup>35</sup> và bất hoạt các chất ức chế giúp phản ứng cắt nối exon intron được diễn ra.*

**Hình 1.5. Vai trò của vùng ESE trong quá trình cắt nối exon-intron [25]**

Một khi vùng ESE của một exon bị đột biến, bộ máy cắt nối exon-intron của tế bào sẽ bỏ qua exon đó trong quá trình cắt nối, gây xóa exon này ở mức độ RNA. Giả thuyết này được chứng minh bằng một phát hiện quan trọng vào năm 1990 của Matsuo và nhóm nghiên cứu. Nhóm tác giả đã phát hiện một trường hợp bệnh nhân DMD bị đột biến xóa 52 bp thuộc vùng ESE của exon 19 gây xóa toàn bộ exon 19 ở mức độ RNA. Tiếp đó bằng việc sử dụng một đoạn trình tự không mã hóa (Antisense oligonucleotide-

AON) bổ xung với toàn bộ vùng ESE, tác giả đã thành công trong việc gây xóa đoạn exon 19 ở mức độ RNA . Kết quả phân tích cho thấy các phân tử AON đã chiếm vị trí bám ESE của protein SR khiến bộ máy cắt nối exon-intron không thể nhận biết exon 19 và bỏ qua exon này trong quá trình cắt nối . Như vậy bằng việc sử dụng những AON đặc hiệu cho từng ESE, các nhà khoa học có thể chủ động gây xóa exon cần thiết nhằm khôi phục lại khung dịch mã dystrophin.



A) Đột biến xóa đoạn từ exon 45 đến exon 54 tạo ra phân tử mRNA có exon 44 nối trực tiếp với exon 55 gây lệch khung dịch mã (tổng số nucleotide của ba exon 43, 44, 55 không chia hết cho 3). B) Bằng việc sử dụng đoạn trình tự bổ xung với vùng ESE của exon 44, exon 44 được loại bỏ giúp tạo ra phân tử mRNA có khung dịch mã đúng (tổng số nucleotide của hai exon 43 và 55 chia hết cho 3), tế bào tổng hợp được protein dystrophin có chức năng.

**Hình 1.6. Mô hình liệu pháp sử dụng AON gây xóa exon khôi phục lại khung dịch mã dystrophin [26].**

Kết quả trên đã cho thấy tiềm năng ứng dụng vượt trội của hướng nghiên cứu sử dụng AON gây xóa exon so với những hướng nghiên cứu còn lại trong việc tìm ra một phương pháp điều trị hiệu quả cho bệnh nhân DMD.

#### *1.1.4.3. Điều trị bằng liệu pháp tế bào*

Chuyên ghép nguyên bào cơ: thực hiện bằng cách nuôi cấy trong phòng thí nghiệm (*in vitro*) các nguyên bào cơ lấy từ cơ trưởng thành của một người thân không mắc bệnh DMD (thường là người cha).

Người ta cho rằng các tế bào hình sao hiện diện trong cơ là những nguyên bào cơ có nguồn gốc phôi thai nhưng ở trạng thái ngủ không hoạt động (dormant), trong quá trình sửa chữa cơ bị tổn thương, dưới các tác động khác nhau, tế bào hình sao sẽ tăng sinh và biệt hóa thành các tế bào cơ [27].

Trong liệu pháp chuyên ghép nguyên bào cơ: các nguyên bào cơ nuôi cấy sẽ được tiêm vào cơ loạn dưỡng của bệnh nhân, các tế bào cơ này sẽ thay thế các tế bào cơ bệnh lý và nhờ đó chức năng của cơ được tái lập. Trước khi thực hiện liệu pháp, bệnh nhân phải được điều trị thuốc ức chế miễn dịch để ngăn cản phản ứng thải ghép, phương thức điều trị này tương tự như trong ghép tạng [28].

Liệu pháp tế bào gốc: có nhiều hứa hẹn trong tương lai vì nghiên cứu thực nghiệm cho thấy rằng khi lấy tế bào gốc tủy xương từ người bình thường cấy ghép vào cơ của người bệnh sẽ tạo ra protein dystrophin và một lượng nhỏ sợi cơ ở người bệnh [29, 30].

#### *1.1.5. Di truyền học của bệnh DMD*

DMD là bệnh di truyền đơn gen, tuân theo quy luật di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên NST Y.



**Bảng 2.1. Kiểu gen bố mẹ và tỷ lệ bị bệnh ở thế hệ con**

Genotype và phenotype của cha mẹ		Tần số con với các genotype khác nhau				
		Trai		Gái		
Cha	Mẹ	$X^D Y$ lành	$X^d Y$ bệnh	$X^D X^D$ lành	$X^D X^d$ lành mang gen bệnh	$X^d X^d$ bệnh
$X^D Y$ lành	$X^D X^D$ lành	1	0	1	0	0
<b><math>X^D Y</math> lành</b>	<b><math>X^D X^d</math> lành mang gen bệnh</b>	<b>1/2</b>	<b>1/2</b>	<b>1/2</b>	<b>1/2</b>	<b>0</b>
$X^D Y$ lành	$X^d X^d$ bệnh	0	1	0	1	0
$X^d Y$ bệnh	$X^D X^D$ lành	1	0	0	1	0
$X^d Y$ bệnh	$X^D X^d$ lành mang gen bệnh	1/2	1/2	0	1/2	1/2
$X^d Y$ bệnh	$X^d X^d$ bệnh	0	1	0	0	1

Bệnh thường gặp ở trẻ trai mà rất hiếm gặp ở trẻ gái. Ở trẻ trai chỉ cần nhận một gen bệnh trên NST X của người mẹ mang gen ( $X^D X^d$ ) là có biểu hiện bệnh; trong khi đó trẻ gái cần nhận 2 gen X mang bệnh, một từ mẹ và một từ bố thì mới có khả năng biểu hiện bệnh. Tuy nhiên trẻ trai bị bệnh DMD thường chết sớm ở tuổi từ 20 đến 25 nên không có khả năng lập gia đình. Do vậy trong sáu trường hợp ở bảng trên, khả năng thứ hai là hay gặp nhất. Người mẹ là dị hợp tử mang gen bệnh có khả năng truyền bệnh cho 50% số con trai và truyền gen bệnh cho 50% số con gái của họ [28].

Mặc dù DMD là bệnh di truyền lặn liên kết giới tính, có khoảng 30% bệnh nhân mắc bệnh là do các đột biến mới và dĩ nhiên người mẹ không mang gen bệnh. Phụ nữ mang gen bệnh thường không có triệu chứng yếu cơ hoặc bất kỳ một dấu hiệu lâm sàng nào của bệnh, con gái của những người này có thể bị ảnh hưởng, mặc dù biểu hiện yếu cơ nhẹ nhàng hơn rất nhiều so với con trai bị bệnh. Hiện tượng những trẻ gái có biểu hiện bệnh ở thể nhẹ này có thể được giải thích theo thuyết Lyon: NST X bình thường trở nên bị bất hoạt và NST mang gen bệnh lại hoạt động. Bệnh cảnh lâm sàng DMD đầy đủ như ở trẻ trai xuất hiện ở một số trẻ gái mắc hội chứng Turner vì ở những bệnh nhân này NST X duy nhất chắc chắn phải có đột biến xóa đoạn gen Xp21 [2, 6].

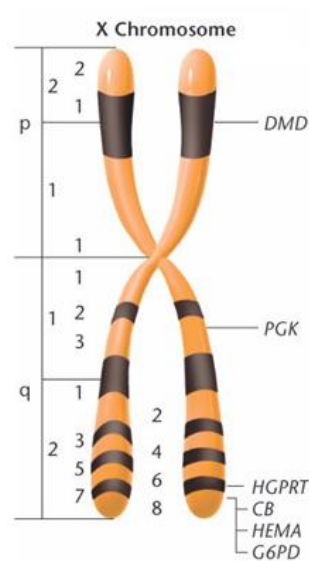
Khoảng 80% người lành mang gen bệnh có tăng hoạt độ CK huyết thanh. Mức độ tăng có thể đạt từ vài trăm đến vài ngàn đơn vị quốc tế nhưng không có tình trạng tăng quá cao như ở trẻ trai mắc bệnh. Trẻ gái tuổi tiền dậy thì mang gen DMD cũng có hoạt độ CK huyết thanh tăng và mức tăng đạt cao nhất ở lứa tuổi 8 đến 12. Khoảng 20% người lành mang gen bệnh có hoạt độ CK bình thường. Nếu người mẹ của một trẻ trai mắc bệnh có hoạt độ CK huyết thanh bình thường thì rất ít khi con gái của người này có biểu hiện hoạt độ CK tăng. Sinh thiết cơ ở những phụ nữ nghi ngờ mang gen bệnh có thể phát hiện thêm 10% có biểu hiện bệnh mặc dù ở họ hoạt độ CK huyết thanh không tăng.

#### ***1.1.6. Bệnh học phân tử bệnh DMD***

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh thần kinh cơ do di truyền khá phổ biến, xảy ra do đột biến trên gen dystrophin.

### 1.1.6.1. Gen Dystrophin

- Gen Dystrophin (còn gọi gen DMD) nằm trên nhánh ngắn của NST X ở vị trí Xp21 (vùng 2, băng 1), là gen dài nhất ở người được phân lập cho tới hiện nay với chiều dài khoảng 2,4 Mb, bao gồm 79 exon với 7 promoter khác nhau, mã hóa cho 14 Kb mRNA để tổng hợp nên protein đặc hiệu là protein dystrophin [4, 5].



**Hình 1.7. Vị trí của gen DMD trên NST X**

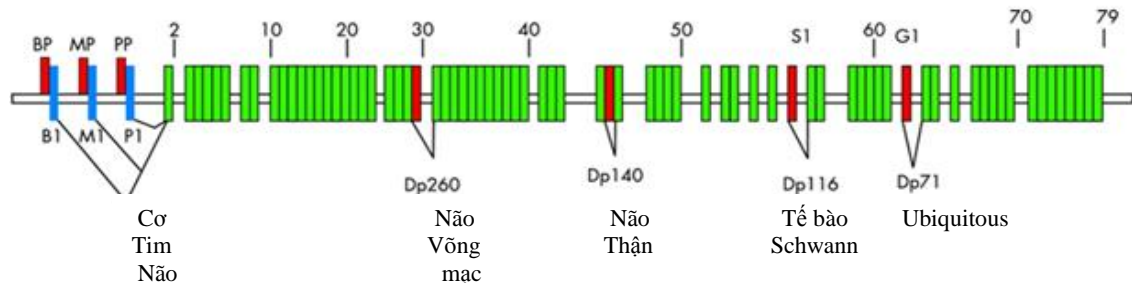
(Nguồn: *Concepts of genetic*, 2008)

- Về mặt cấu trúc, gen Dystrophin là một phức hợp gồm:

**Promoter:** là trình tự nhận biết và gắn của enzyme RNA polymerase trong quá trình chuyển mã, cho phép gen hoạt động khi đóng - mở và tạo ra các sản phẩm protein đặc hiệu mô tương ứng. Gen DMD có 7 promoter là: promoter não, cơ, purkinje, promoter Dp260, Dp 140, Dp 116 và Dp 71.

**Exon:** là vùng gen mã hóa để phiên mã thành mRNA, exon chứa đựng thông tin di truyền để tổng hợp ra protein tương ứng. Gen DMD có 79 exon.

*Intron*: nằm xen kẽ giữa các exon, là vùng gen không mã hóa nhưng đóng vai trò quan trọng trong quá trình hoàn thiện mRNA [31].



**Hình 1.8. Cấu trúc của gen Dystrophin** (xanh lá cây: exon; xanh nước biển: exon đặc biệt cho mỗi promoter; màu đỏ: promoter)

(Nguồn: Cohen N. và Muntoni F., 2004)

#### 1.1.6.2. Protein dystrophin: Vai trò và chức năng

- Sản phẩm protein của gen Dystrophin là protein dystrophin nằm ở màng bào tương của tế bào cơ, được tìm thấy trong cơ xương, cơ trơn, cơ tim và cơ não.

- Chức năng chính xác của protein dystrophin thì không rõ, nhưng nó giữ vai trò quan trọng trong việc duy trì sự ổn định màng tế bào cơ, bảo vệ cơ khỏi bị tổn thương trong quá trình co cơ và giữ vững khung tế bào cơ [5].

- Protein dystrophin có trọng lượng phân tử 427kDa (chiếm khoảng 0,002% tổng số protein cơ), chứa khoảng 3685 acid amin và được chia thành 4 vùng chức năng (domains) với chức năng rất khác nhau:

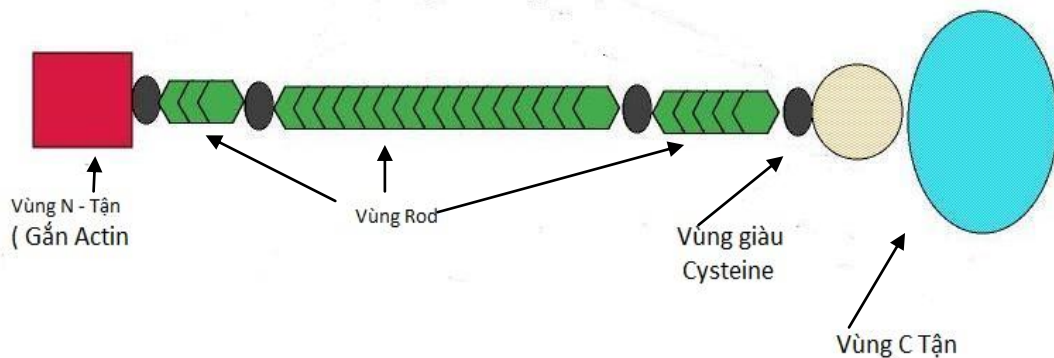
Vùng giàu cystein: có 280 acid amin

Vùng C-tận (có chức năng liên kết màng tế bào): có 420 acid amin

(Hai vùng này có chức năng rất quan trọng, khi bị đột biến sẽ biểu hiện triệu chứng lâm sàng rất nặng nề)

Vùng N-tận (gắn với actin): có 240 acid amin, khi bị đột biến sẽ biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở thể trung gian giữa DMD và BMD.

Vùng trung tâm rod (giống spectrin): có 2700 acid amin, ít chức năng nhất, khi bị đột biến sẽ biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở thể nhẹ [14, 31, 32].



**Hình 1.9. Các vùng chức năng của protein dystrophin**

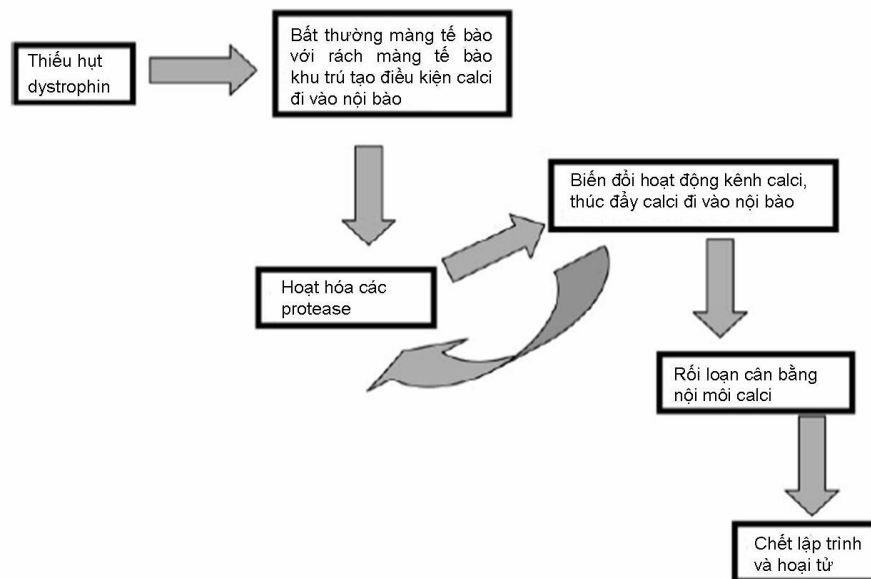
(Nguồn: Yaffe, 2002)

- Protein dystrophin hoạt động thông qua sự tương tác với nhóm protein màng gọi là phức hợp dystrophin-glycoprotein (DGC), trong đó protein chính là dystroglycan  $\alpha$  và  $\beta$ .  $\beta$ -dystroglycan gắn với vùng C-tận của dystrophin và  $\alpha$ -dystrophin gắn với lớp lưới ngoại bào. Phức hợp DGC giữ vai trò quan trọng đối với chức năng của dystrophin trong ổn định màng bào tương và là cầu nối giữa sợi actin và khung xương ngoài tế bào xuyên qua màng sợi cơ. Phức hợp này có vai trò như tín hiệu hóa học, sự mất tín hiệu này góp phần gây bệnh [33].

- Ở bệnh nhân DMD/BMD, gen DMD bị đột biến làm cho protein dystrophin không được sản xuất hoặc giảm số lượng đáng kể trên màng tế bào sợi cơ. Tuy nhiên, cơ chế gây bệnh không chỉ đơn giản là do mất dystrophin mà nhiều nghiên cứu cho thấy rằng có nhiều glyco-protein tương tác với dystrophin cũng không hiện diện trong bệnh DMD. Những protein kết hợp

với dystrophin có thể liên quan trực tiếp với dòng canxi vào sợi dystrophin, do đó, mất dystrophin có thể chỉ là bước đầu tiên của quá trình dẫn đến loạn dưỡng cơ [15, 34].

Tuy nhiên, nhiều điểm trong gen dystrophin có tỷ lệ đột biến cao nên rõ ràng nó là đích đặc hiệu cho việc gây đột biến [35]. Trong nhiều trường hợp, sự nghiêm trọng lâm sàng của kiểu hình này có thể có liên quan đến bản chất của sự loại bỏ phân tử. Kiểu hình DMD nói chung là do đột biến làm phá vỡ khung đọc ( out-frame) rồi dẫn đến tạo sản phẩm gen không có chức năng và kiểu hình thiếu hụt chức năng một cách nghiêm trọng. Còn kiểu hình BMD nói chung cũng do sự đột biến hay sự loại bỏ nhưng vẫn duy trì được khung đọc (in-frame) do đó tạo nên các sản phẩm protein bất thường, tuy có bị biến đổi về cấu trúc nhưng vẫn còn giữ được một vài chức năng, kiểu hình này luôn luôn phụ thuộc vào quá trình đột biến [36]



**Hình 1.10. Cơ chế bệnh sinh của DMD do thiếu hụt dystrophin [37].**

## 1.2. Các dạng đột biến cấu trúc của gen dystrophin

Khoảng 60 - 65% trường hợp bệnh DMD là do đột biến xóa đoạn gen, đột biến lặp đoạn gen chiếm 5 – 10% trường hợp và khoảng 25 – 30% là đột biến điểm và các đột biến nhỏ khác [5].

### 1.2.1. Đột biến xóa đoạn gen

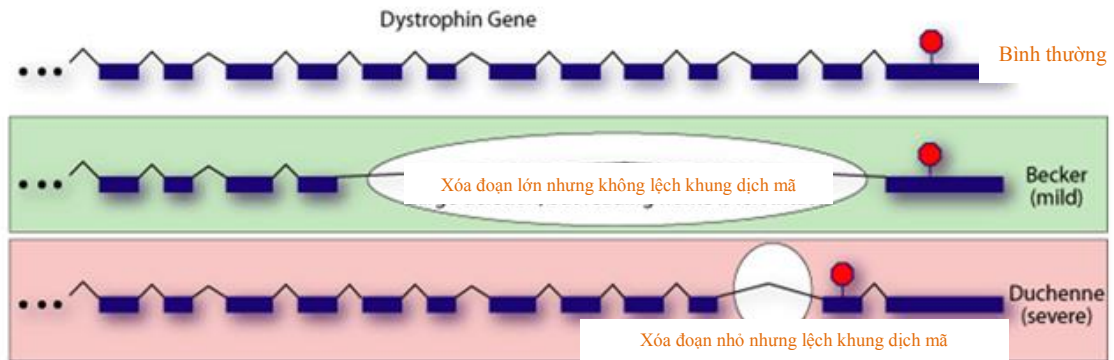
Người ta quan sát thấy khoảng 60 – 65% các đột biến gây bệnh DMD là xóa đoạn lớn trên gen dystrophin, tập trung chủ yếu ở 2 vùng trọng điểm (còn gọi là vùng “hot-spot”) là vùng tận cùng 5’ (chứa exon 1 – 19) và vùng trung tâm (chứa exon 43 – 60). Trong đó, tần suất xóa đoạn ở vùng trung tâm chiếm khoảng 80% và ở vùng tận cùng 5’ là 20% trường hợp [3, 6].

Đặc biệt, một vùng dài khoảng 200Kb (chứa intron 44, exon 45, intron 45) là vùng hay xảy ra điểm gãy nhất của gen DMD và đa số các xóa đoạn gen lớn thường khởi đầu ở vùng tận 5’ của gen [5].

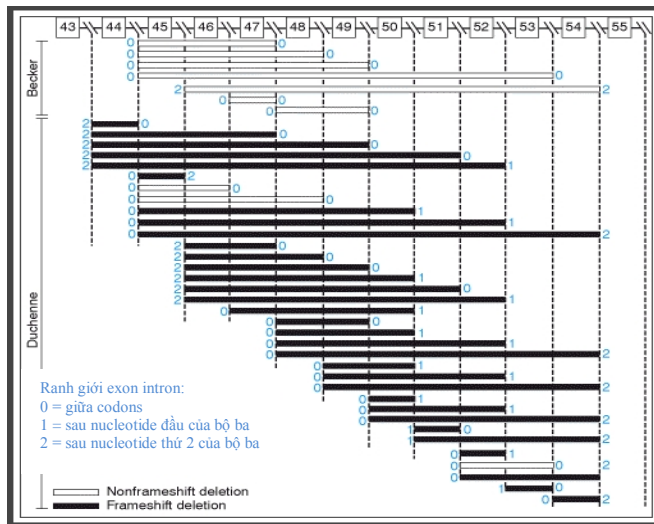
Nghiên cứu của Chaudhary (2009) trên 15 trẻ vùng Saudi từ 2 – 19 tuổi có biểu hiện lâm sàng của DMD được phân tích bằng kỹ thuật multiplex PCR, cho thấy 12/15 trẻ có xóa đoạn gen và vùng bị xóa đoạn đều là vùng trung tâm. Điều này cũng cho thấy tần suất đột biến xóa đoạn ở vùng trung tâm cao hơn.

Người ta nhận thấy không có mối liên quan giữa kích thước hoặc vị trí của đoạn gen bị mất với mức độ nặng của bệnh hoặc diễn tiến lâm sàng. Tuy nhiên, vì sao bệnh DMD có biểu hiện nặng nề trong khi chỉ mất một vài exon, còn bệnh BMD có biểu hiện nhẹ hơn nhưng có thể bị xóa đoạn rất dài thậm chí vài chục exon, Monaco và CS (1988) đã giải thích dựa trên thuyết chuyển mã (frame-shift): nếu đột biến xóa đoạn nhỏ nhưng đã tạo ra mã kết thúc (stop codon) hoặc gây lệch khung dịch mã (out of frame) của mRNA thì protein dystrophin không chức năng sẽ được tạo ra và gây nên bệnh cảnh

nặng của bệnh DMD; nếu đột biến xóa đoạn dài nhưng vẫn duy trì được bộ ba mã hóa và không gây lệch khung dịch mã (in frame) vẫn có thể tạo ra protein dystrophin còn một phần chức năng và gây ra bệnh cảnh BMD nhẹ hơn [6, 38, 39].



**Hình 1.11. Giả thuyết về khung dịch mã trong bệnh Becker và Duchenne**  
(Nguồn: Monaco A.P. et al., 1998)

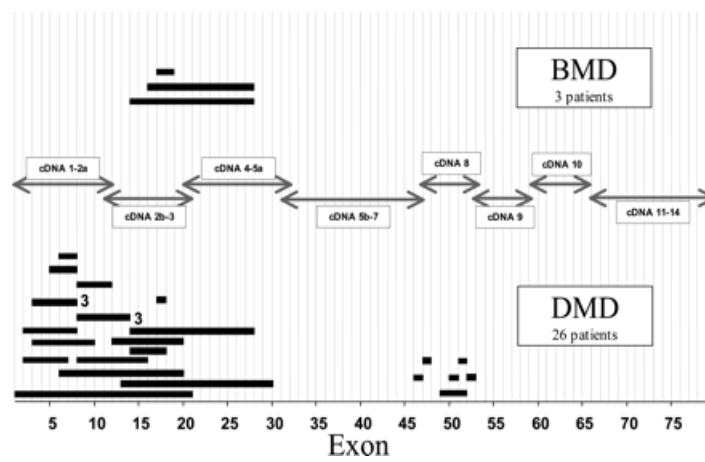


**Hình 1.12. Xóa đoạn vùng trung tâm gen DMD (exon 43 – 55) gây bệnh DMD và BMD** (Nguồn: Strachan T., 1999)



### 1.2.2. Đột biến lặp đoạn gen

Chiếm khoảng 5 – 10% trường hợp. Trong đó, khoảng 80% trường hợp lặp đoạn xảy ra ở đầu tận 5', 20% xảy ra ở vùng trung tâm và sự phân bố này có sự khác biệt đôi chút giữa những dân số và chủng tộc khác nhau. Đột biến lặp đoạn cũng chịu ảnh hưởng của thuyết chuyển mã: gây lệch khung dịch mã trong bệnh DMD và không gây lệch khung dịch mã trong bệnh BMD [5].



**Hình 1.13. Phân bố đột biến lặp đoạn gen của bệnh DMD/BMD bằng kỹ thuật Southern blot (Thanh ngang: chỉ đột biến lặp đoạn; số bên phải: chỉ số bệnh nhân có lặp đoạn giống nhau; mũi tên: chỉ đoạn dò cDNA được sử dụng)**  
(Nguồn: Prior T.W., 2005)

### 1.2.3. Đột biến điểm và những đột biến nhỏ khác

Chiếm 25 – 30% trường hợp. Đột biến điểm trong bệnh DMD hầu hết là đột biến tạo mã kết thúc sớm và gây thể bệnh nặng. Mặc dù cũng chịu ảnh hưởng của thuyết chuyển mã, nhưng đột biến loại này cung cấp ít thông tin về mối liên quan giữa cấu trúc và chức năng của protein dystrophin [5]. Đột biến điểm phân bố ngẫu nhiên, rải rác khắp chiều dài gen và không có vùng nào là phổ biến hơn. Giữa bệnh nhân và các thành viên trong gia đình mang kiểu đột biến điểm khác nhau nên đã gây trở ngại lớn trong việc xác định đột biến điểm vì xác định đột biến điểm trên toàn bộ chiều dài gen sẽ mất rất nhiều thời gian và công sức. Hiện nay có trên 200 vị trí đột biến điểm của gen DMD đã được xác định [5, 40, 41].

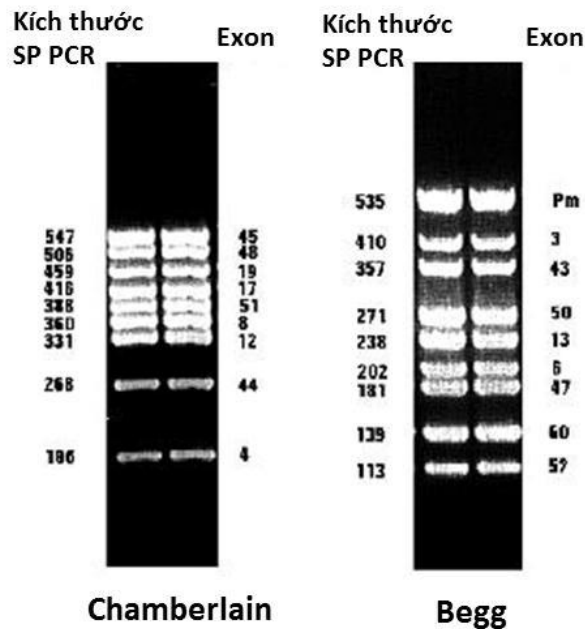
### 1.3. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen dystrophin

#### 1.3.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction)

**Nguyên tắc chung:** phản ứng PCR dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotid. Phản ứng này cần môi xuôi và môi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn [42]

Có nhiều kỹ thuật PCR được sử dụng trong chẩn đoán bệnh DMD: PCR sử dụng một cặp môi (monoplex PCR); PCR sử dụng nhiều cặp môi (multiplex PCR); PCR lồng (nested PCR); PCR sao chép ngược (RT-PCR) và PCR định lượng (Realtime PCR).

Trong đó, multiplex PCR được phát triển bởi Chamberlain (1998) đã trở thành phương tiện chẩn đoán hiệu quả hơn các kỹ thuật trước đó do tiết kiệm được thời gian và hóa chất, vì sử dụng nhiều cặp gen môi khác nhau để khuếch đại nhiều sản phẩm đích khác nhau trong cùng phản ứng.



**Hình 1.14. Nguyên tắc của kỹ thuật multiplex PCR**

(Nguồn: Chamberlain and Begg, 1988, 1990)

Kỹ thuật realtime PCR trong thời gian gần đây cũng được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh DMD và người lành mang gen nhưng còn nhiều hạn chế [43, 44].

Ở bệnh nhân DMD có đột biến xóa đoạn gen sẽ không có mặt băng tương ứng trên hình ảnh điện di sản phẩm PCR nếu chúng ta xác định ở mức độ DNA hoặc xuất hiện những băng nhỏ hơn so với mẫu đối chứng nếu xác định ở mức độ mRNA, những nhân đoạn có thể phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng với sự so sánh kiểm chứng với người bình thường.

### ***1.3.2. Kỹ thuật FISH (Fluorescence in situ hybridization)***

#### ***Nguyên tắc chung:***

Sử dụng một trình tự ngắn của chuỗi DNA sợi đơn, được gọi là mẫu DNA dò (probe DNA) để phát hiện một trình tự đích. Các mẫu DNA dò được đánh dấu huỳnh quang và sẽ lai với DNA đích trên NST ở kỳ giữa hoặc gian kỳ. Nhờ sự lai của mẫu DNA dò với trình tự bổ sung, có thể phát hiện và định vị được vị trí chuỗi DNA đặc hiệu qua phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang.

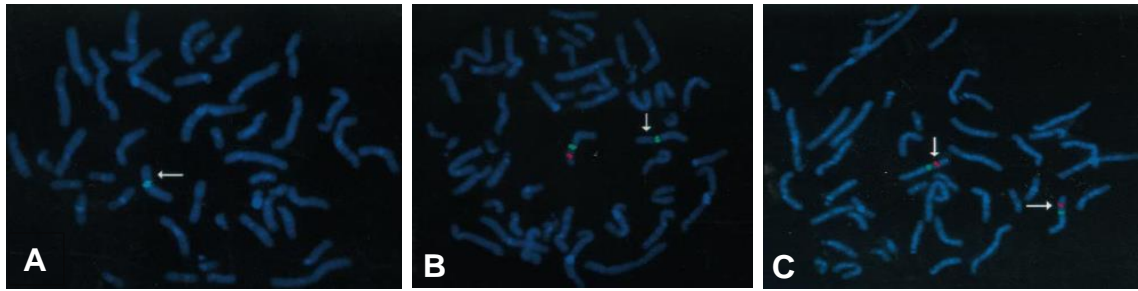
#### ***Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh DMD:***

FISH là một kỹ thuật giúp chẩn đoán hiệu quả các bệnh lý di truyền nói chung và bệnh DMD nói riêng. Để chẩn đoán đột biến gen dystrophin, Ligon (2000) đã sử dụng 2 loại probe:

- Các probe giúp xác định đột biến xóa đoạn các exon của gen dystrophin gọi là cosmid probe có gắn chất huỳnh quang digoxigenin. Khi có hiện tượng lai đặc hiệu xảy ra, digoxigenin gắn trên probe sẽ phát ra màu đỏ.

- Loại probe thứ hai giúp định vị các NST X (vì gen dystrophin nằm trên NST X), probe này có gắn biotin. Khi probe lai với NST X thì tâm động của NST X phát ra màu xanh.

Kết quả của nghiên cứu của ba gia đình được thể hiện ở hình 1.14.



**Hình 1.15. Hình ảnh xác định đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật FISH**

(Nguồn: Ligon, 2000)

(A). Bệnh nhân nam, sử dụng cosmid probe đặc hiệu cho exon 3-6. Kết quả cho thấy bệnh nhân có 1 NST X (tâm động có màu xanh đặc hiệu). Trên NST X không xuất hiện tín hiệu màu đỏ, chứng tỏ không có hiện tượng lai giữa probe và đoạn gen đặc hiệu, có nghĩa bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn exon trong khoảng 3-6

(B). FISH sử dụng probe cosmid đặc hiệu cho exon 12, áp dụng cho con gái của 1 bệnh nhân nam bị bệnh BMD. Kết quả cho thấy chỉ có 1 NST X phát tín hiệu màu đỏ và 1 NST X không xuất hiện màu đỏ. Như vậy người con gái này ở dạng dị hợp tử, mang 1 gen đột biến xóa đoạn exon 12.

(C). FISH sử dụng probe cosmid đặc hiệu cho exon 44, xác định trên người chị của gia đình thứ 3. Kết quả cho thấy hiện tượng lai xảy ra ở cả 2 NST X, như vậy người chị này không mang gen đột biến exon 44.

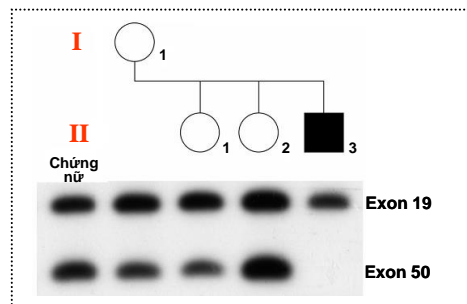
### 1.3.3. Kỹ thuật Southern blot

Trong phương pháp này, DNA được phân cắt bằng các enzym đặc hiệu. Sau đó, các đoạn DNA trong hỗn hợp được phân tách bằng điện di trên gel agarose rồi chuyển sang màng lai. Bước tiếp theo, các đoạn DNA cần xác định nằm trên màng được lai với các oligonucleic đặc hiệu có gắn chất đánh dấu như phóng xạ, chất màu huỳnh quang, biotin... Các phương pháp xác định hình ảnh tương ứng được sử dụng để chỉ ra các vạch sản phẩm chứa các đoạn DNA cần phát hiện lai với oligonucleotid đánh dấu trên màng. Phương pháp này cho phép xác định được những đoạn DNA có kích thước lớn chỉ với một nồng độ nhỏ trong hỗn hợp vốn khó có thể xác định được bằng các phương pháp khác như nhuộm ethedim bromide.

*Ứng dụng trong chẩn đoán DMD:*

Ngoài việc phát hiện được đột biến xóa đoạn, Southern blot còn cho phép xác định các đột biến lặp đoạn gen dystrophin. Ở bệnh nhân đột biến

xóa đoạn, băng lai của các exon bị đột biến và đoạn dò đặc hiệu không xuất hiện trên phim. Đối với các bệnh nhân đột biến lặp đoạn, có hiện tượng tăng cường độ phát sáng của băng lai với exon bị lặp đoạn khi so sánh với mẫu đối chứng. Ngoài ra, Southern blot còn được sử dụng để phát hiện người mẹ và chị em gái của bệnh nhân ở dạng dị hợp tử. Prior (2005) đã sử dụng phương pháp này để xác định đột biến xóa đoạn ở một bệnh nhân DMD, đồng thời phát hiện được mẹ và chị gái của bệnh nhân cũng là người mang gen bệnh.



**Hình 1.16. Kỹ thuật Southern blot xác định đột biến gen dystrophin**

(Nguồn: Prior, 2005)

Người mẹ (I-1) sinh một người con trai bị bệnh DMD (II-3) với đột biến xóa đoạn exon 50 và 2 người con gái (II-1 và II-2). Phản ứng Southern blot được tiến hành với 2 exon, 1 exon bệnh nhân không bị đột biến nhằm làm đối chứng nội là exon 19 và 1 exon mà bệnh nhân bị xóa đoạn (exon 50). Để tránh sai số, Prior phân tích kết quả dựa vào tỷ lệ đậm độ băng lai của exon 50:19 và so sánh tỷ lệ này của các thành viên với đối chứng nữ. Kết quả cho thấy ở mẹ bệnh nhân (I-1) và II-1 có tỷ lệ đậm độ exon 50:19 giảm 50% so với tỷ lệ này ở đối chứng nữ, như vậy hai người nữ này ở dạng dị hợp tử. Còn người nữ II-2 thì tỷ lệ đậm độ exon 50:19 tương đương với chứng nữ, chứng tỏ không mang gen bệnh.

#### 1.3.4. Kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Kỹ thuật MLPA (khuếch đại đa đoạn dò) được mô tả lần đầu vào năm 2002 bởi Schouten J.P. và CS, đây là phiên bản mới của phản ứng PCR, trong đó nhiều đoạn DNA đích được khuếch đại chỉ bằng 1 cặp mồi [45].

Đến nay có hơn một triệu phản ứng MLPA được thực hiện mỗi năm trên khắp thế giới và được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu về bệnh lý di truyền người, di truyền tế bào và ung thư, cho phép phát hiện các tổn thương gen một cách nhanh chóng và chính xác. Trong những năm gần đây, MLPA

là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn ngắn, lặp đoạn cũng như phát hiện dị hợp tử với độ chính xác cao và cho kết quả nhanh chóng.

*\* Nguyên tắc của kỹ thuật MLPA:*

- Kỹ thuật MLPA sử dụng các đoạn dò (probe) có khả năng lai hóa với phân tử DNA đích đặc hiệu và vấn đề thiết kế các probe rất quan trọng [46, 47].

Mỗi đoạn dò gồm 2 chuỗi oligonucleotide có kích thước khác nhau (gọi là đoạn dò xuôi và đoạn dò ngược).

+ Đoạn dò xuôi:

Đầu 5': chứa 19 nucleotide với trình tự giống nhau cho tất cả các đoạn dò, là vị trí gắn mỗi Y để khuếch đại probe khi tiến hành tất cả các phản ứng PCR.

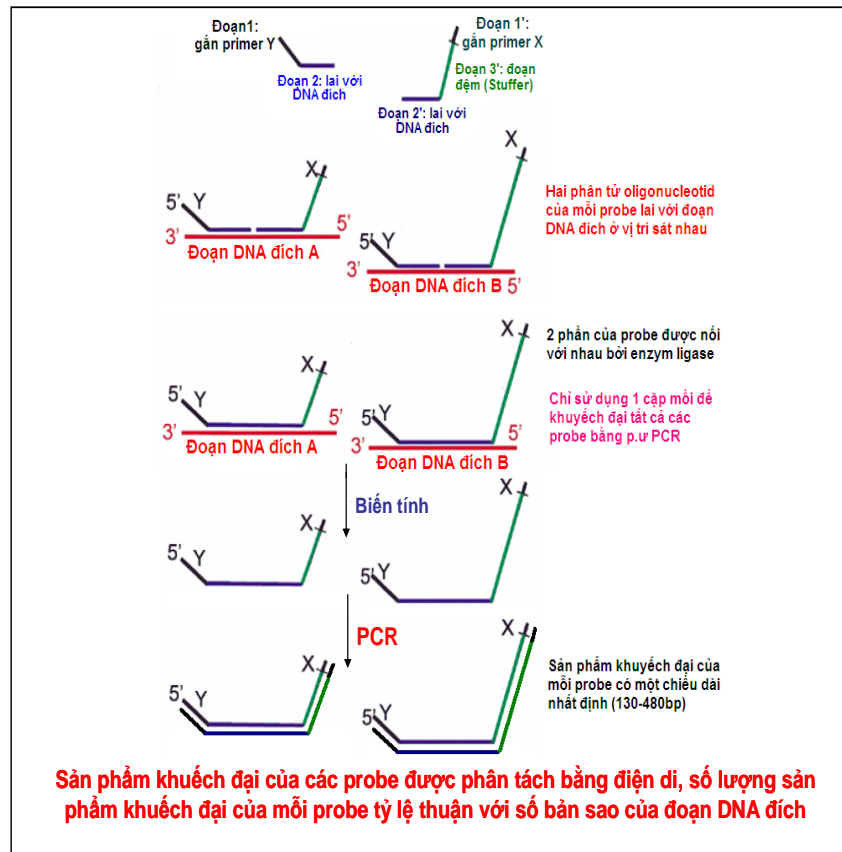
Đầu 3': chứa 21-30 nucleotid có trình tự đặc hiệu với đoạn DNA đích (gọi là trình tự lai) và sẽ lai với DNA đích khi tiến hành phản ứng lai.

+ Đoạn dò ngược: gồm 3 phần

Đầu 3': gồm 36 nucleotid với trình tự giống nhau cho tất cả các probe, là vị trí gắn với mỗi X đặc hiệu để khuếch đại probe.

Đầu 5': chứa 25-43 nucleotid, gắn đặc hiệu với DNA đích.

Phần nối giữa đầu 5' với đầu 3': là đoạn đệm nằm giữa đầu 3' và đầu 5', chứa 19 - 370 nucleotid và được thiết kế dài ngắn khác nhau ở các đoạn dò tùy loại tác nhân đích. Trình tự nucleotide không đặc hiệu với DNA đích nên không gắn vào DNA đích.



**Hình 1.17. Nguyên tắc của kỹ thuật MLPA**

(Nguồn: Schouten J.P. et al, *Nucleic acid Res*, 30(12)z, e 57)

- Các đoạn probe sẽ gắn đặc hiệu vào các exon của phân tử DNA đích, sau đó enzym ligase được thêm vào để nối hai đoạn probe này lại với nhau tạo thành đoạn probe hoàn chỉnh và được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

- Đoạn đệm được thiết kế dài ngắn khác nhau nên khi phản ứng PCR khuếch đại sẽ tạo ra nhiều đoạn DNA có chiều dài khác nhau và được phân tách bằng điện di mao quản (mỗi được đánh dấu huỳnh quang).

Phân tích kết quả MLPA là bước quan trọng trong kỹ thuật. Phân tích được tiến hành dựa trên hành ảnh, dữ liệu thô tương ứng với từng probe.

Các công cụ tiến hành phân tích MLPA bao gồm:

- Đánh giá trực tiếp qua hình ảnh và dựa vào tính toán chiều cao của các đỉnh (peak area) tương ứng với mỗi exon.

- Sử dụng các phần mềm : Gene Marker, Coffalyser.., hoặc phân tích tương quan cường độ tín hiệu từng exon của bệnh nhân so với nhóm chứng. (Coffalyser.Net website) [44].

Nếu exon bị đột biến xóa đoạn thì không có hiện tượng lai probe và probe đó sẽ không được khuếch đại, do đó khi điện di mao quản sẽ không thấy hình ảnh exon bị đột biến xóa đoạn gen.

Nếu có lặp đoạn gen, trên hình ảnh điện di ta thấy đỉnh tín hiệu của probe tương ứng với exon bị đột biến tăng cao khác biệt so với người bình thường.

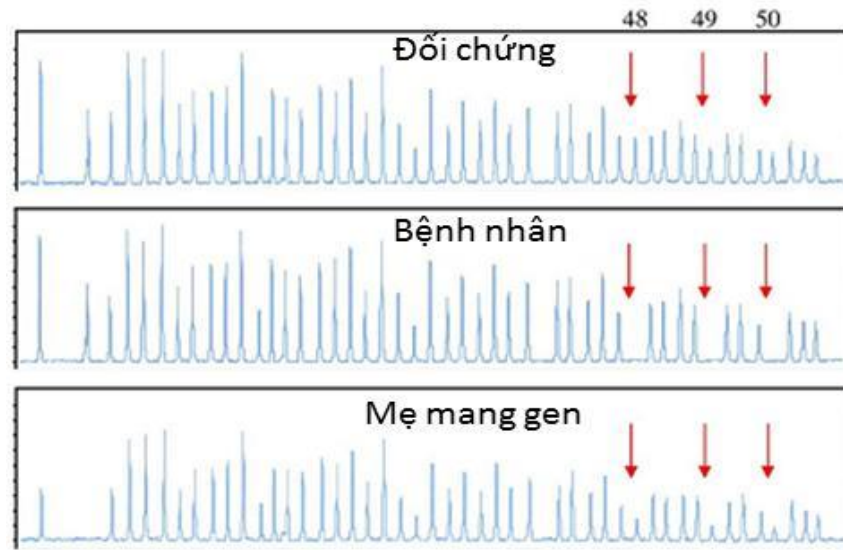
*\* Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh DMD:*

Cho đến nay, kỹ thuật MLPA là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến gen Dystrophin và phát hiện người lành mang gen bệnh.

Kỹ thuật MLPA với khả năng khuếch đại đồng thời 40 - 45 probe trong mỗi phản ứng PCR chỉ với một cặp mồi duy nhất và chỉ cần tiến hành 2 phản ứng PCR thì đột biến ở 79 exon của gen Dystrophin sẽ được khảo sát, từ đó giúp chẩn đoán đột biến xóa đoạn gen, lặp đoạn gen Dystrophin và phát hiện người lành mang gen bệnh với độ chính xác cao và cho kết quả nhanh chóng.

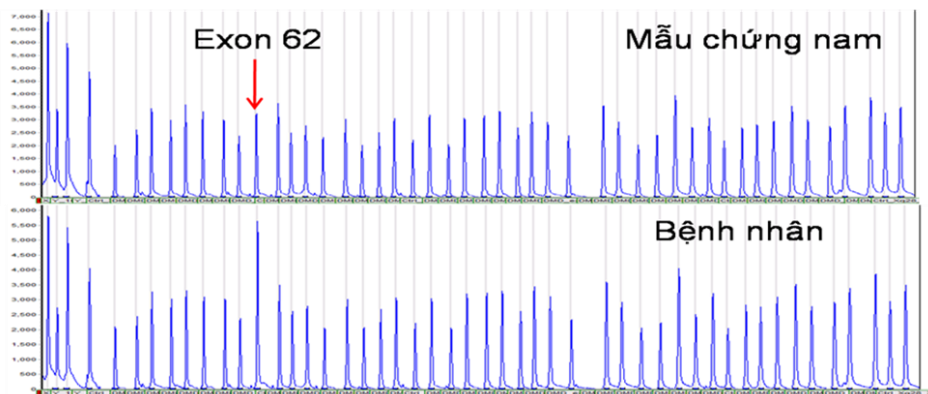
Nghiên cứu của Janssen B. (2005), Marzese D.M. (2008), Li H. (2009) cho thấy kỹ thuật MLPA có thể phát hiện đột biến xóa đoạn với độ chính xác cao và nhanh hơn so với multiplex PCR và FISH, ngoài ra MLPA còn chẩn đoán được lặp đoạn gen và giúp phát hiện người lành mang gen bệnh [48-50].





**Hình 1.18. Kết quả MLPA phát hiện xóa đoạn gen DMD ở exon 48-50**  
 Mẫu bệnh nhân có 3 đỉnh bị mất so với mẫu chứng, tương ứng với exon 48, 49, 50.  
 Mẫu người mẹ có 3 đỉnh bị giảm chiều cao  $\frac{1}{2}$  so với mẫu chứng tương ứng exon 48, 49, 50.

(Nguồn: Lai K.K, 2006)



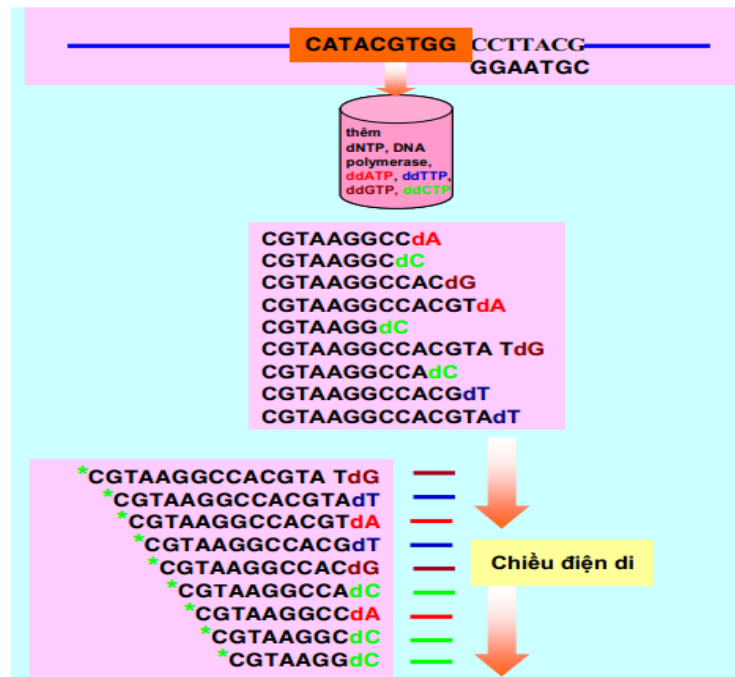
**Hình 1.19. Kết quả MLPA phát hiện đột biến lặp đoạn gen**

Đỉnh của probe tương ứng với exon 62 ở bệnh nhân cao gấp đôi so với chứng nam chứng tỏ bệnh nhân có đột biến lặp đoạn exon 62.

(Nguồn: Trung tâm Nghiên cứu gen-protein, Trường ĐHY Hà Nội)

### 1.3.5. Kỹ thuật giải trình tự gen bằng máy tự động

Máy giải trình tự gen tự động được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng dideoxynucleotid (ddNTP) do Sanger và CS phát minh. Với các máy thế hệ sau này, người ta dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP. Nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể thực hiện trong một ống nghiệm và chỉ cần điện di trên một hàng, không phải trên 4 hàng khác nhau như trước đây. Đối với phương pháp giải trình tự tự động, hệ thống điện di thường sử dụng là điện di mao quản. Mỗi khi có một vạch điện di đi qua, phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng, máy sẽ ghi nhận màu sắc này và chuyển về máy tính phân tích. Dựa vào màu huỳnh quang, máy sẽ nhận diện được các nucleotid, từ đó biết được trình tự của DNA đích. Phương pháp này giúp xác định các đột biến điểm của gen dystrophin như đột biến điểm, đột biến xóa đoạn....



**Hình 1.20. Nguyên tắc giải trình tự gen theo Sanger và CS**

Với các ddNTP đánh dấu huỳnh quang khác nhau khác nhau, các đoạn trình tự tận cùng ở đầu 5' sẽ được đánh dấu bằng 4 màu huỳnh quang khác nhau tương ứng với các nucleotide tận là A, T, G, C [51]

## **1.4. Tình hình nghiên cứu bệnh DMD**

### ***1.4.1. Trên thế giới***

Tình hình nghiên cứu về các dạng đột biến gen Dystrophin trên thế giới rất phổ biến, đã có rất nhiều phương pháp xác định đột biến được nghiên cứu ứng dụng và ngày nay được sử dụng thường quy ở các nước để phát hiện đột biến gen Dystrophin. Hiện nay, nghiên cứu về bệnh DMD/BMD trên thế giới có thể chia thành 2 hướng chính: Một là nghiên cứu áp dụng các phương pháp mới để chẩn đoán xác định các dạng đột biến gen dystrophin và lập bản đồ đột biến. Hướng nghiên cứu thứ 2 là nghiên cứu áp dụng liệu pháp điều trị gen cho bệnh DMD.

*Một số nghiên cứu có thể kể đến như:*

Nghiên cứu của Janssen B. và CS (2005) cho thấy kỹ thuật MLPA có thể chẩn đoán đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen nhanh chóng và đáng tin cậy hơn so với kỹ thuật multiplex PCR và FISH và có thể ứng dụng để phát hiện người lành mang gen bệnh [48].

Nghiên cứu của Lai K.K. và CS (2006) cho thấy kỹ thuật MLPA có thể phát hiện được đột biến trên 43 bệnh nhân DMD/BMD và 20 người nữ mang gen bệnh, trong khi kỹ thuật multiplex PCR đã bỏ sót 4 trường hợp [44].

Nghiên cứu của Marzese D.M. và CS (2008), Li H. và CS (2009) cũng cho thấy ưu điểm của kỹ thuật MLPA so với multiplex PCR trong phát hiện đột biến xóa đoạn ở những vùng không thường gặp và đặc biệt là đột biến lặp đoạn không thể phát hiện được bằng kỹ thuật multiplex PCR [49, 50].

Nghiên cứu của Sakthivel Murugan S.M. và CS (2010) trên 150 bệnh nhân nam được chẩn đoán lâm sàng, cho thấy kỹ thuật MLPA có thể chẩn

đoán được đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen DMD ở 1 hay nhiều exon trong 112/150 trường hợp, trong khi multiplex PCR chỉ phát hiện được 103/150 trường hợp [52].

Những nghiên cứu về xác định đột biến điểm của gen dystrophin cũng được quan tâm:

Tác giả Annalaura Torella (2010) và cộng sự nghiên cứu phát hiện 121 trường hợp đột biến điểm từ mẫu DNA lưu trong hơn 10 năm từ năm 1994 – 2007 bằng kỹ thuật DHPLC. Trong đó đột biến tạo mã kết thúc sớm (stop codon) là 56 trường hợp chiếm tỉ lệ 46.3% [53].

Trong một nghiên cứu khác của tác giả Thomas W. Prior (1995) và cộng sự trên 129 bệnh nhân không có đột biến lặp đoạn và xóa đoạn. Kết quả tác giả đã phát hiện được 29 trường hợp có đột biến điểm [54].

Nghiên cứu của tác giả Hyeyoung Lee (2013) và cộng sự trên một trường hợp bệnh nhân đã xác định không có đột biến xóa đoạn và lặp đoạn bằng kỹ thuật MLPA. Với kỹ thuật giải trình tự trực tiếp đã phát hiện đột biến thêm nucleotide T tại vị trí 5657 ở exon 41 trên cDNA (c.5756dupT - p.Leu1919Phefs\*13).

Những nghiên cứu về xác định các dạng đột biến gen dystrophin và xây dựng bản đồ đột biến.

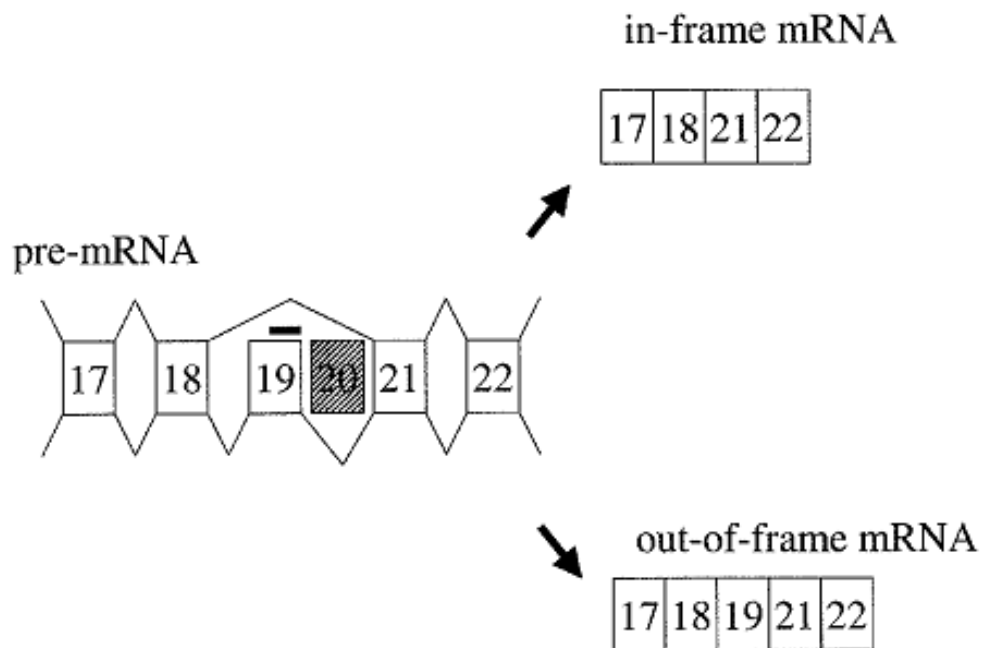
Nghiên cứu của Thomas W. Prio (2005) và cộng sự đã xây dựng được bản đồ đột biến gen với 361 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn (306 bệnh nhân DMD và 55 bệnh nhân BMD), 29 bệnh nhân đột biến lặp đoạn và 56 bệnh nhân đột biến điểm [5].

Nghiên cứu của tác giả Yasuhiro Takeshima (2010) và cộng sự trên 442 bệnh nhân DMD/BMD. Với việc kết hợp các kỹ thuật khác nhau như MLPA, giải trình tự toàn bộ gen dystrophin, phân tích toàn bộ NST, nhóm nghiên cứu đã xác định được toàn bộ đột biến gen trên 442 bệnh nhân. Kết quả đột biến xóa đoạn gen là 270 trường hợp chiếm 61% tiếp theo là đột biến điểm 29% với 127 trường hợp bao gồm đột biến vô nghĩa (nonsense mutation) 16%, đột biến thêm, xóa đoạn nhỏ 8%, đột biến tại vị trí splicing chiếm 5%, còn lại là đột biến ở intron và bất thường về nhiễm sắc thể [55].

Nghiên cứu về ứng dụng liệu pháp điều trị gen đối với bệnh nhân DMD:

Nghiên cứu của Elisabeth R. Barton-Davis (1999) và cộng sự về tác dụng của liệu pháp điều trị bằng aminoglycoside trong việc ngăn chặn stop codon. Kết quả nhóm nghiên cứu lần đầu tiên chứng minh rằng aminoglycoside có thể ngăn chặn các đột biến stop codon không chỉ trong thử nghiệm mà còn trên cả cơ thể. Hơn nữa, các kết quả đưa ra khả năng của một phác đồ điều trị mới đối với căn bệnh teo cơ và các bệnh khác gây ra bởi đột biến stop codon. Liệu pháp điều trị này có thể chứng tỏ hiệu quả đối với trên 15% bệnh nhân DMD [56].

Nghiên cứu khác của Masafumi Matsuo (2002) về những tiến bộ mới trong điều trị bệnh DMD và đề xuất sử dụng AON (antisense oligonucleotides) gây skip exon chuyển từ thể bệnh nặng DMD sang thể bệnh nhẹ hơn BMD.



**Hình 1.21. Mô hình gây skip exon 19 chuyển từ thể bệnh DMD (có đột biến xóa exon 20) sang thể nhẹ hơn BMD sử dụng AON [28].**

#### **1.4.2. Tại Việt Nam**

Ở nước ta, một số nghiên cứu thường tập trung vào xác định đột biến xóa đoạn gen ở mức độ DNA (dựa vào kỹ thuật đơn PCR, multiplex PCR, PCR định lượng...) và chỉ ưu tiên xác định đột biến trong hai vùng trọng điểm, trong khi đột biến trên gen dystrophin có thể nằm rải rác khắp 79 exon của gen.

Kỹ thuật MLPA cũng đã được nghiên cứu bước đầu trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn trên gen dystrophin, nhưng chưa được ứng dụng trong chẩn đoán đột biến lặp đoạn và phát hiện người lành mang gen bệnh.

*Một số nghiên cứu có thể kể đến như:*

- Nguyễn Thị Trang và CS (1996) cho thấy khả năng phát hiện dị hợp tử của xét nghiệm CK trong chẩn đoán người mang gen gây bệnh là 54% [57].

- Nguyễn Thị Phương, Vũ Chí Dũng (2002) đã nghiên cứu đột biến gen gây bệnh DMD bằng phương pháp multiplex PCR và đã phát hiện 6 trường hợp xóa đoạn trong 11 bệnh nhân được nghiên cứu [58].
- Trần Văn Khánh và CS (2004) chẩn đoán 85 bệnh nhân mắc bệnh DMD/BMD bằng PCR và phát hiện 38% có đột biến xóa đoạn gen Dystrophin [59].
- Nguyễn Thị Trang, Hoàng Hạnh Phúc và CS (2004) với nghiên cứu “Định lượng creatine kinase phối hợp với lâm sàng và phân tích phả hệ góp phần chẩn đoán một số bệnh cơ di truyền” [60].
- Trần Văn Khánh và CS (2005) phát hiện được đột biến ở vùng rod của gen Dystrophin gây nên bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [32].
- Nguyễn Thị Trang và Nguyễn Thị Hoàn (2005) đã phát hiện 13 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn gen trong 21 bệnh nhân được chẩn đoán DMD [61].
- Nguyễn Thị Trang và CS (2006) đã nghiên cứu 58 bệnh nhân DMD và phát hiện tỷ lệ xóa đoạn exon 46, 51 và cả hai exon là 23/58, chiếm 39,7% [62].
- Nguyễn Thị Phương Mai, Vũ Chí Dũng và CS (2007) áp dụng kỹ thuật multiplex PCR thay thế PCR cổ điển trong phân tích gen Dystrophin ở các bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne [63].
- Nguyễn Thị Băng Sương, Trần Văn Khánh và CS (2008) đã ứng dụng thành công phương pháp PCR định lượng để phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne [43].

- Nguyễn Khắc Hân Hoan, Phạm Ngọc Khôi và CS (2009) bước đầu đánh giá hiệu quả kỹ thuật MLPA phát hiện đột biến xóa đoạn gen gây bệnh DMD/BMD trên 11 bệnh nhân nam được chẩn đoán lâm sàng [64].

- Nguyễn Thị Băng Sương, Trần Văn Khánh và CS (2009) đã xác định đột biến xóa đoạn gen Dystrophin ở mức độ mRNA trên 50 bệnh nhân DMD và đã phát hiện được khoảng 50% bệnh nhân có đột biến xóa đoạn gen dystrophin [65].



## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

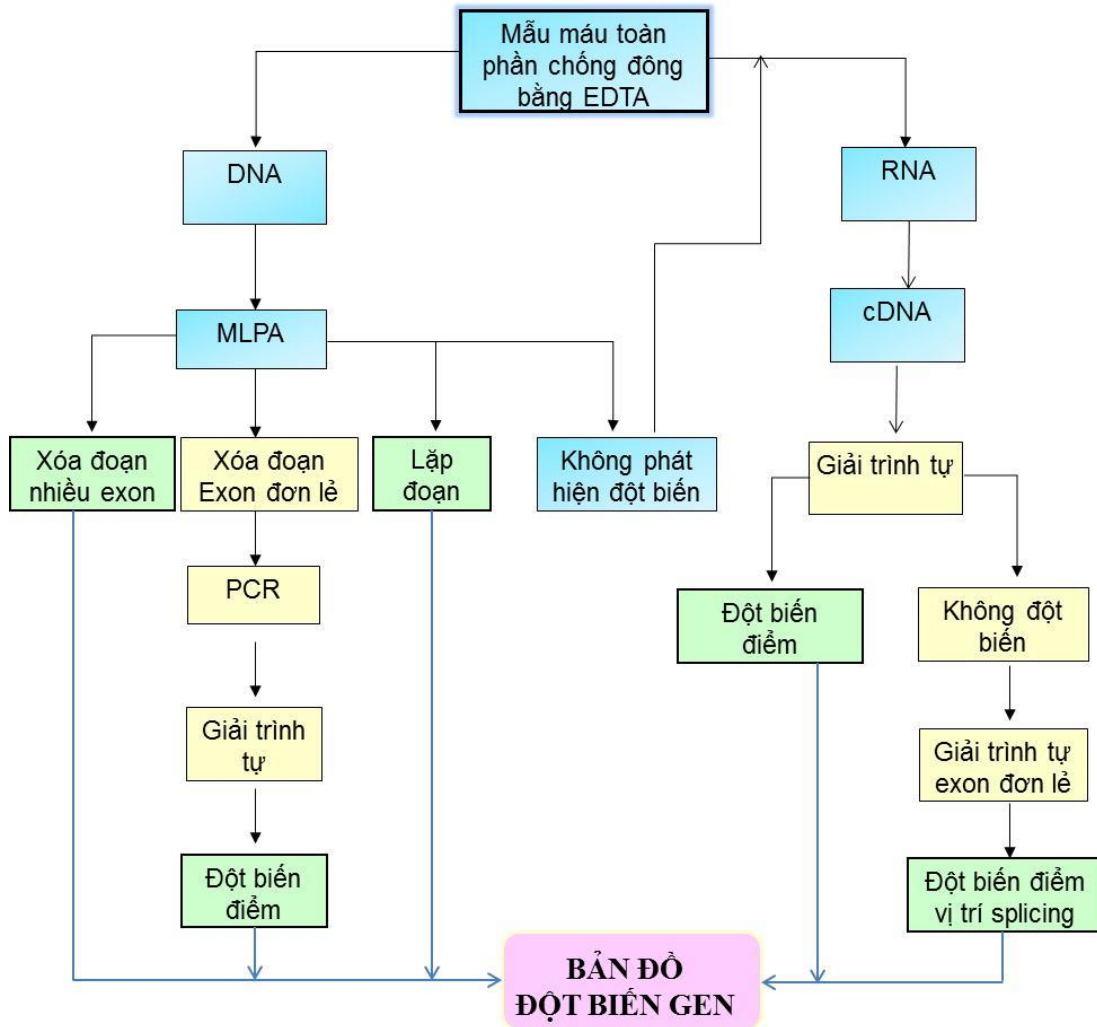
#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lựa chọn 201 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne/Becker tại Bệnh viện Nhi Trung ương theo tiêu chuẩn đã được mô tả trước đây [2, 3].

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu.

Thiết kế nghiên cứu: mô tả loạt ca

##### \* *Thiết kế nghiên cứu*



**Quy trình xác định đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD/BMD**

## **2.3. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất nghiên cứu**

### **2.3.1. Dụng cụ**

- Ống Eppendorf 1,5 mL; 0,5 ml; 0,2 ml
- Ống lấy máu chống đông EDTA
- Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA)
- Pipet, đầu côn các loại
- Tủ lạnh sâu: -30°C; -80°C (SANYO)
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản)
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA)
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức)
- Lò vi sóng
- Máy đọc trình tự gen ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Hoa Kỳ)

### **2.3.2. Hoá chất**

\* Hóa chất dùng để tách chiết DNA, RNA:

- Dung dịch Lysis buffer
- Dung dịch SDS 10%
- Dung dịch K
- Proteinase K
- Dung dịch phenol: chloroform: isoamyl (tỷ lệ 25 : 24 : 1)
- Dung dịch chloroform: isoamyl ( tỷ lệ 24 : 1)
- Sodium acetate 3M, pH=5,2
- Ethanol 100%; ethanol 70%
- Môi trường Mono-polyresolving
- Isogen

\* Hoá chất để thực hiện kỹ thuật PCR

- Buffer 10x
- dNTP 10 mM

- Taq polymerase
- Các cặp mồi
- \* Hoá chất để thực hiện tổng hợp cDNA
  - Random primer
  - PCR buffer 5X:
  - DTT 0,1M (ức chế enzym proteinase)
  - HPRI (ức chế enzym RNAase)
  - MMLV – RT (enzym reverse transcriptase)
- \* Hoá chất để điện di sản phẩm PCR
  - + Agarose
  - + Dung dịch TBE 10X
  - + Loading buffer 10X
  - + Ethidium bromide
- \* Hoá chất để đọc trình tự gen
 

*BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) gồm BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP và dUTP), BigDye buffer, cặp mồi đặc hiệu, dung dịch formamide.
- \* Hóa chất để tinh sạch DNA
  - Dung dịch phenol: chloroform : isoamyl với tỷ lệ 25 : 24 : 1
  - Dung dịch chloroform : isoamyl với tỷ lệ 24 : 1
  - Ethanol 100%; ethanol 70%
  - Hòa tan bằng nước tinh khiết
- \* Hóa chất để thực hiện phản ứng MLPA:
  - *SALSA MLPA Kit P034-A2 / P035-A2 DMD/Becker*
  - Hãng MRC – Holland, Amsterdam, Hà Lan.

- Bộ hóa chất chứa 80 đoạn dò (probe) cho 79 exon đích và exon DP427c, chia đều vào hai hỗn hợp probe P034 và P035.

- Thành phần hóa chất:

*SALSA MLPA Buffer*: KCl, Tris-HCl, EDTA và PEG-6000, pH 8.5

*SALSA Ligase-65*: Glycerol, BRIJ 0.05%, EDTA, KCl, Tris-HCl, Beta-Mercaptoethanol 0.1%, pH 7.5, Ligase-65 enzyme (từ vi khuẩn).

*Ligase buffer A*: NAD (nguồn gốc vi khuẩn), pH 3.5

*Ligase buffer B*: Tris-HCl, non-ionic detergents, MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5

*SALSA PCR Primer Mix*: chứa oligonucleotides tổng hợp có gắn huỳnh quang Cy5, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ 0.04%, pH 8.0

*SALSA Polymerase*: Glycerol, BRIJ 0.5%, EDTA, DTT 0.1%, KCl, Tris-HCl, Polymerase enzyme (nguồn gốc vi khuẩn), pH 7.5

*Probemix*: chứa oligonucleotides tổng hợp, oligonucleotides tinh chế từ vi khuẩn, Tris-HCl, EDTA, pH 8.0

Bảo quản: hóa chất được bảo quản ở nhiệt độ -25<sup>0</sup>C đến -15<sup>0</sup>C, bảo quản trong hộp và tránh ánh sáng.

*Thành phần hỗn hợp probe (probemix)*:

Probemix P034-A2 chứa 45 probe khác nhau với sản phẩm khuếch đại có độ dài từ 129 đến 490nt và có 10 đoạn chứng tạo ra những sản phẩm khuếch đại có kích thước nhỏ hơn 120nt [có 2 probe đặc hiệu cho NST Y (105-118 nucleotid)].

Probemix P035-A2 chứa 45 probe khác nhau với sản phẩm khuếch đại có độ dài từ 129 đến 490nt và có 9 đoạn chứng tạo ra những sản phẩm khuếch đại có kích thước nhỏ hơn 120nt [có 1 probe đặc hiệu cho NST Y (105 nucleotid)].

## **2.4. Quy trình nghiên cứu**

### **2.4.1. Lấy mẫu**

Bệnh nhân được lấy máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA, tiến hành tách DNA, RNA trong vòng 24 giờ.

### **2.4.2. Địa điểm nghiên cứu**

Bệnh viện Nhi Trung ương; Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

### **2.4.3. Quy trình**

#### **2.4.3.1. Tách chiết DNA từ máu ngoại vi**

- Cho 0,5ml máu toàn phần chống đông EDTA vào ống eppendorf 1,5 ml sau đó cho thêm vào 0,5 ml dung dịch lysis buffer rồi để trên đá 10 phút, ly tâm 8000 v/p trong 10 phút ở 4<sup>0</sup>C, bỏ dịch và thu cặn. Lặp lại quá trình này 4 lần.

- Thêm 0,5ml dung dịch K (gồm NaOH, EDTA), ly tâm 8000 v/p trong 10 phút ở 4<sup>0</sup>C, loại bỏ dịch và thu cặn.

- Cho 0,5ml lysis buffer, 12,5µl SDS 10%, 10 µl Protease K, ủ ở 56<sup>0</sup>C/2-3giờ.

- Cho vào 0,5 ml hỗn dịch Phenol : Chloroform : Isoamyl, ly tâm 10000 v/p trong 10 phút ở 4<sup>0</sup>C , hỗn hợp được chia làm 3 phần:

- Lớp dung dịch phía trên có chứa DNA
- Lớp ở giữa là cặn tế bào
- Lớp dưới cùng là dịch chiết

Hút lấy phần dịch chứa DNA phía trên cùng và tiến hành lặp lại bước trên một lần nữa sẽ đảm bảo không còn tạp chất trong mẫu,

- Cho 0,5 ml hỗn dịch Chloroform : Isoamyl (24 : 1), ly tâm mẫu ở 10000 v/p trong 10 phút ở 4°C. Hút lấy phần dịch trên cùng và tiến hành lặp lại 1 lần nữa.

- Tủa DNA bằng 1ml cồn tuyệt đối, để qua đêm ở -20°C.

- Ly tâm 13000 v/p trong 20 phút ở 4°C, đổ dịch trên, thu tủa.

- Rửa tủa bằng cồn 70°. Tủa DNA được hoà tan bằng 50 ml nước tinh khiết.

DNA thu được sẽ được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng đo mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm, đạt yêu cầu khi độ tinh sạch trên 1,7.

#### 2.4.3.2. Tách chiết RNA từ máu ngoại vi

- Máu toàn phần chống đông bằng EDTA được tách trong vòng 24 giờ.

- Tách tế bào bạch cầu trong môi trường Mono-polyresolving: Cho 7ml dung dịch Mono-polyresolving vào ống nghiệm, cho tiếp vào ống nghiệm 7ml máu toàn phần mới lấy, không được lắc.

- Quay ly tâm 2600 v/p ở 4°C hoặc ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hút phần cặn lắng chứa tế bào bạch cầu, rửa tế bào bạch cầu bằng nước muối sinh lý 0.5%. Cho 1ml dung dịch isogen vào phần tế bào bạch cầu vừa thu được, isogen có tác dụng phá vỡ màng tế bào, giải phóng ra acid nucleic.

- Dịch thu được cho vào ống Eppendorf để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm 15.000 v/p ở 4°C trong 10 phút. Sau ly tâm, hút lấy phần dịch ở giữa ống, loại bỏ phần trên cùng là lớp lipid, và phần cặn xác tế bào ở đáy ống. Cho 200µl chloroform vào phần dịch giữa, lắc nhẹ trong 15 giây, tủa DNA xuất hiện, để ở nhiệt độ phòng 2-3 phút.

- Ly tâm 15.000 v/p ở 4°C trong 15 phút. Dịch sau ly tâm được chia làm 3 lớp: lớp trên cùng chứa RNA tổng số (lấy phần này), lớp giữa chứa

DNA, lớp dưới chứa protein. Dùng pipet hút phần dịch trên cùng và chuyển sang ống Eppendorf sạch. Thêm 500 $\mu$ l isopropanol và lắc nhẹ, tủa RNA sẽ xuất hiện, để 5-10 phút ở nhiệt độ phòng.

- Ly tâm 15.000 v/p ở 4°C trong 5 phút. Sau ly tâm, RNA tổng số nằm ở đáy ống. Gạn bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng. Rửa cặn bằng 1000 $\mu$ l dung dịch ethanol 75%, tiếp tục ly tâm 10.000 v/p ở 4°C trong 5 phút.

- Loại bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng, mở nắp ống để khô tự nhiên, phần cặn chính là RNA tổng số đã được rửa sạch.

- Hòa tan cặn bằng 20 $\mu$ l nước cất có DEPC (DEPC-water). Lắc nhẹ cho cặn tan, dung dịch thu được là dung dịch RNA tổng số, cất giữ ở -70°C.

Sau khi tách chiết, kiểm tra độ tinh sạch của RNA bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop.

#### 2.4.3.3. Kỹ thuật RT-nested PCR

Tổng hợp cDNA sử dụng phương pháp MMLV-RT [66]:

Những mẫu RNA đạt được nồng độ tối ưu và có độ tinh sạch giao động 1,8-2,0 sẽ được sử dụng để tổng hợp cDNA.

**Bước 1:** Giai đoạn biến tính (*denaturation*).

- Sử dụng 2-3  $\mu$ g RNA tổng số, thêm nước DEPC cho đủ 6  $\mu$ l/1 ống.
- Để ở nhiệt độ 65°C trong vòng 5 phút để biến tính chuỗi RNA.
- Đặt trên đá lạnh 1 phút để làm lạnh ống PCR.

**Bước 2:** Giai đoạn gắn mồi (*annealing*).

- Thêm vào 2 $\mu$ l Random primer (đã được pha loãng 20 lần),
- dNTP 10mM: 5 $\mu$ l.
- Để ở nhiệt độ 25°C trong 10 phút, để primer gắn với RNA khuôn, sau đó để vào đá lạnh 1 phút.

**Bước 3:** Giai đoạn tổng hợp cDNA (*extention*).

- Tiếp tục cho thêm:

+ PCR buffer 5X:	4 $\mu$ l
+ DTT 0,1M (ức chế enzym proteinase):	1 $\mu$ l
+ HPRI (ức chế enzym RNAase):	1 $\mu$ l
+ MMLV – RT (enzym reverse transcriptase):	1 $\mu$ l

- Trộn đều dung dịch bằng pipet, đưa vào ly tâm thật nhanh khoảng 10-15 giây để kéo toàn bộ dung dịch xuống. Đưa vào máy PCR, đặt chương trình tổng hợp với nhiệt độ và thời gian như sau: 37°C trong 55 phút, 70°C trong 15 phút, 4°C bảo quản tạm thời.

- cDNA sẽ được cất giữ ở tủ lạnh -20°C cho đến khi đem ra sử dụng.

Kiểm tra chất lượng cDNA được tổng hợp:

- Sau khi tách chiết, kiểm tra độ tinh sạch, chất lượng của cDNA bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop.

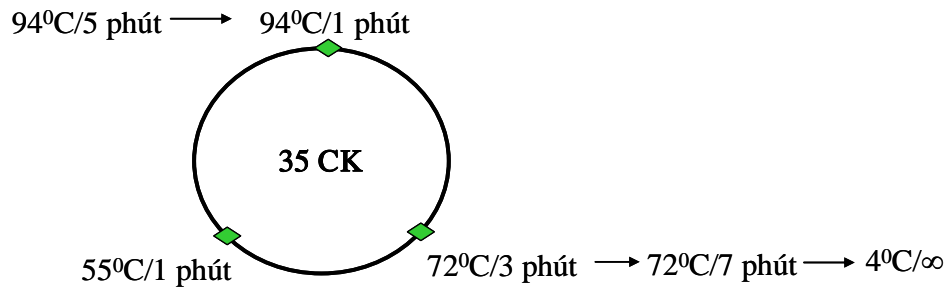
Kỹ thuật RT-nested PCR :

- **Phản ứng PCR lần 1:** thành phần của phản ứng:

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>
10 x buffer	2,0
2,5 mM dNTP	2,0
Taq polymerase (Takara, Japan)	0,2
10 pmol mỗi xuôi	1,0
10 pmol mỗi ngược	1,0
cDNA	5,0
Nước cất	8,8
<b>Tổng số</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau:

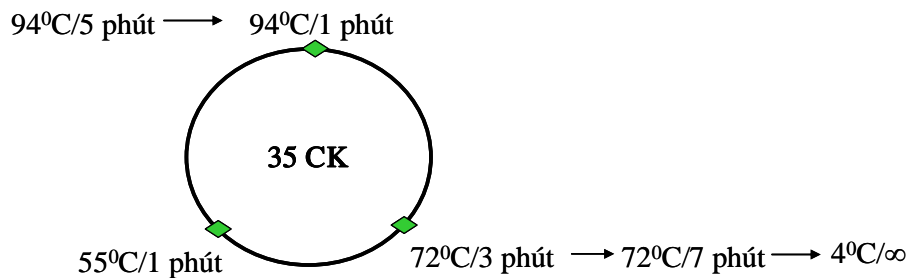




**Phản ứng PCR lần 2:**

Thành phần	Thể tích (μl)
10 x buffer	2,0
2,5 mM dNTP	2,0
Taq polymerase (Takara, Japan)	0,2
10 pmol mỗi xuôi	1,0
10 pmol mỗi ngược	1,0
Sản phẩm PCR lần 1	1,0
Nước cất	12,8
<b>Tổng số</b>	<b>20</b>

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau:



Sản phẩm sau PCR lần 2 được điện di 10 μl trên gel agarose 1,5%.

**2.4.3.4. Kỹ thuật MLPA xác định đột biến xóa đoạn và lặp đoạn**

- Bước 1: Biến tính DNA

Cho 5μl dung dịch DNA ( chứa khoảng 60 ng DNA ) cần phân tích vào ống PCR, biến tính ở 98°C trong 5 phút, chuyển về giữ ở 25°C.

- Bước 2: Gắn (lai) probe vào gen đích

+ Chuẩn bị Master mix:

Thành phần	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
MLPA buffer	1,5 $\mu\text{l}$
Probemix	1,5 $\mu\text{l}$
<b>Tổng</b>	<b>3 <math>\mu\text{l}</math></b>

+ Cho 3  $\mu\text{l}$  master mix vào mẫu DNA đã biến tính ở trên, nâng nhiệt độ lên 95°C trong 1 phút để biến tính probe, hạ nhiệt độ xuống 60°C ủ qua đêm (12-24h). Đây là nhiệt độ để probe gắn đặc hiệu vào đoạn gen đích.

- Bước 3: Nối 2 đầu probe

+ Chuẩn bị **ligase buffer mix**: hóa chất lấy ra cần vortex nhẹ cho đều

Thành phần	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
Ligase 65 buffer A	3 $\mu\text{l}$
Ligase 65 buffer B	3 $\mu\text{l}$
Nước	25 $\mu\text{l}$
Ligase 65	1 $\mu\text{l}$
<b>Tổng</b>	<b>32<math>\mu\text{l}</math></b>

+ Cho 32 $\mu\text{l}$  **ligase buffer mix** vào hỗn hợp lai ủ qua đêm ở trên khi mẫu ở 54°C, tiếp tục chạy theo chu trình nhiệt sau:

54°C:	15 phút
98°C:	5 phút
4°C:	$\infty$ (được sản phẩm lai)

Sản phẩm lai này sẽ lưu trữ được 1 tuần/4°C, hoặc lâu hơn ở -20°C

- Bước 4: Khuếch đại sản phẩm lai (probe)

+ Chuẩn bị **PCR buffer mix**

PCR buffer mix	PCR buffer	4 $\mu$ l	30 $\mu$ l
	Nước	26 $\mu$ l	
Sản phẩm lai			10 $\mu$ l
<b>Tổng</b>			<b>40<math>\mu</math>l</b>

Cho hỗn hợp vào máy giữ ở 60°C

+ Mix PCR khuếch đại probe: chuẩn bị **PCR master mix**

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Primer (có gắn huỳnh quang)	2 $\mu$ l
Enzyme dilution buffer	2 $\mu$ l
Nước	5,5 $\mu$ l
Tag polymerase	0,5 $\mu$ l (cho sau khi đã vortex nhẹ hỗn hợp trên)
<b>Tổng</b>	<b>10<math>\mu</math>l</b>

Cho 10 $\mu$ l **PCR master mix** vào hỗn hợp đang trong máy giữ ở 60°C, tiếp tục chu trình nhiệt sau:

95°C:	30 giây	} x 35 ck
60°C:	30 giây	
72°C:	1 phút	
72°C:	20 phút	
4°C:	$\infty$ (bảo quản tạm thời)	

Sản phẩm khuếch đại probe sẽ được điện di mao quản huỳnh quang trên máy giải trình tự để phân tích kết quả. Nếu có đột biến xóa đoạn, probe không gắn được vào gen đích, sẽ không xuất hiện đỉnh tương ứng tại exon đột biến.

Với đột biến lặp đoạn, kết quả được tính toán dựa vào tỉ lệ RPA (Relative Peak Area) tương ứng với từng exon so với mẫu chứng, RPA của mỗi exon được tính bằng cường độ tín hiệu tương ứng ( $A_s$  – Peak area) chia cho tổng cường độ tín hiệu của 45 đỉnh trong probemix ( $\Sigma A_s$ ), exon lặp đoạn khi mà tỉ lệ RPA lớn hơn 1,5 [44].

Peak Table							
Software Package: SoftGenetics GeneMarker 1.95							
Date/Time: 3/12/2013 2:30:38 PM							
Project: C:\Users\DH-YHN\Desktop\Hai-MLPA\MLPA - Panel P34-35\2011.10.11 MLPA P34.SGF							
Panel: P034_A2_DMD_Vs20							
Size: CEQ_600							
Analysis Type: Fragment (Animal)							
Sample: 1: P34 An.scf							
Sample	Dye	Size	Height	Ht_Ratio	Area ( Peak Area)	Ar_Ratio	Marker
P34 An.scf	Blue	85.7	23346		235156		
P34 An.scf	Blue	91.3	24369		230233		
P34 An.scf	Blue	96.2	27105		262532		
P34 An.scf	Blue	100.6	14597	0.57	142550	0.58	P034_A2
P34 An.scf	Blue	105.5	25766	1	244928	1	P034_A2
P34 An.scf	Blue	115.6	12753	0.49	126862	0.52	P034_A2
P34 An.scf	Blue	127.5	8575	0.33	86218	0.35	P034_A2
P34 An.scf	Blue	137.2	11182	0.43	105903	0.43	P034_A2
P34 An.scf	Blue	144.3	8814	0.34	77917	0.32	P034_A2
P34 An.scf	Blue	153.2	9945	0.39	85543	0.35	P034_A2
P34 An.scf	Blue	160.2	4606	0.18	40633	0.17	P034_A2
P34 An.scf	Blue	168	8028	0.31	73617	0.3	P034_A2

**Hình 2.1. Hình ảnh minh họa cách tính toán exon lặp đoạn tương ứng với phần mềm GeneMarker**

#### 2.4.4. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm

Sản phẩm RT-nested PCR sau khi được khuếch đại bằng những cặp môi đặc hiệu sẽ được làm nguyên liệu cho kỹ thuật giải trình tự gen [55, 67].

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

Master mix cho phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Nước cất PCR	13
2	GA 10x buffer/EDTA	3,0
3	Big Dye V3.1	2,0
4	Môi đơn (5pmol/ $\mu$ l)	1,0
5	Sản phẩm PCR cDNA (DNA) gen dystrophin đã được tinh sạch qua gel	1,0
	<b>Tổng thể tích</b>	<b>20</b>

+ Phản ứng PCR giải trình tự:

Chu trình nhiệt của phản ứng:

96<sup>0</sup>C : 1 phút

96<sup>0</sup>C : 10 giây

50<sup>0</sup>C : 5 giây

60<sup>0</sup>C : 4 phút

Giữ ở 4 - 15<sup>0</sup>C

} x 25 chu kỳ

+ Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự:

Sản phẩm PCR giải trình tự gen dystrophin được tinh sạch bằng cồn ethanol:

- Thêm vào ống hỗn hợp phản ứng:

60  $\mu$ l cồn tuyệt đối lạnh (giữ trong tủ  $-30^{\circ}\text{C}$ )

5  $\mu$ l EDTA 0,125M pH8

- Trộn đều rồi để ở nhiệt độ phòng 15 phút .
- Ly tâm 15000 vòng/phút x 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Hút bỏ dung dịch giữ lại tủa DNA ở đáy ống
- Thêm 200  $\mu$ l Ethanol 70% lạnh ( $-30^{\circ}\text{C}$ ).
- Ly tâm 15000 vòng/phút x 10 phút ở nhiệt độ phòng, hút bỏ dung dịch, giữ lại tủa ở đáy ống.
- Để khô hoàn toàn.
- Thêm 20  $\mu$ l Hi-Di. Trộn đều

+ Điện di sản phẩm PCR giải trình tự gen dystrophin bằng hệ thống giải trình tự ABI Prism 3100 (Applied Biosystems)

Sau khi thêm 20  $\mu$ l Hi-Di. Nếu chưa điện di ngay thì bọc kín mẫu bằng giấy bạc rồi bảo quản ở  $-20$  đến  $-30^{\circ}\text{C}$  tránh ánh sáng. Khi nào điện di thì thực hiện các bước sau:

- Trộn đều rồi Ủ ở  $95^{\circ}\text{C}$  trong 2 phút (trong block nhiệt)
- Làm lạnh tức thời trên nước đá.
- Trộn đều hỗn hợp
- Chuyển vào máy chạy theo trình tự

+ 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.

### **2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

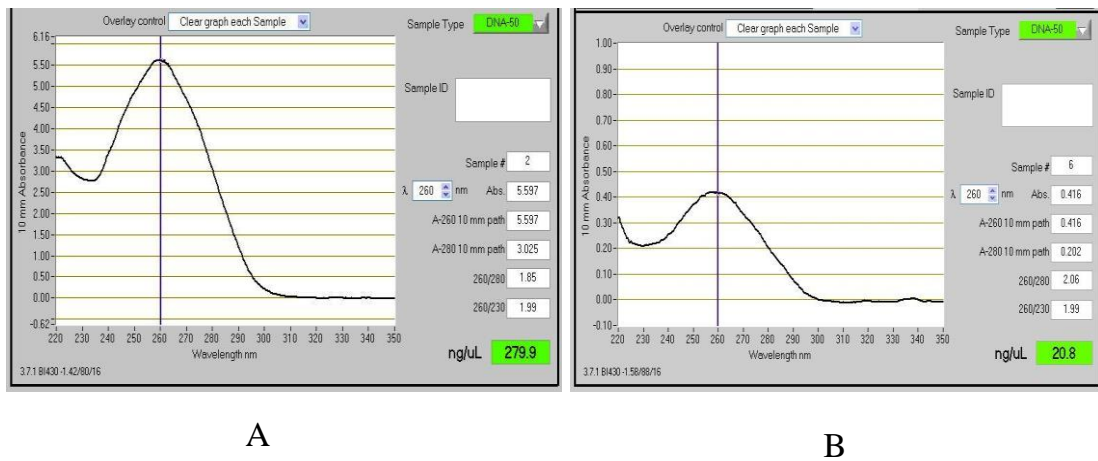
- Bệnh nhân sẽ được thông báo kết quả xác định vị trí đột biến gen thông qua bác sĩ điều trị.
- Bệnh nhân có trách nhiệm cung cấp đầy đủ các thông tin liên quan đến tình hình bệnh tật của mình.
- Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của bệnh nhân.
- Các thông tin về bệnh nhân, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả tách chiết DNA, RNA, tổng hợp cDNA

DNA của bệnh nhân được tách chiết theo quy trình phenol/chloroform. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy nanodrop ở bước sóng 260/280 nm. Từ nồng độ DNA ban đầu sẽ được chuẩn nồng độ về 20ng mẫu này sẽ dùng trong kỹ thuật MLPA.

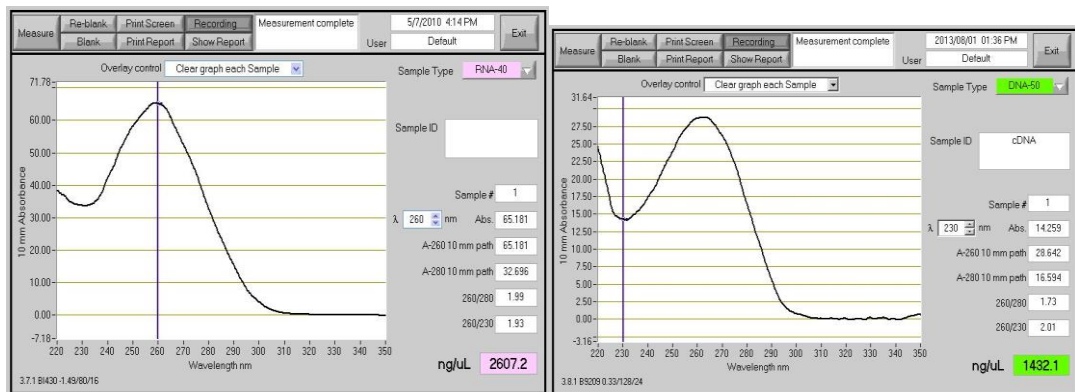


**Hình 3.1. Kết quả đo nồng độ DNA bằng máy Nanodrop của bệnh nhân MS33: (A) Nồng độ DNA sau tách chiết. (B) Nồng độ DNA chuẩn về 20 ng**

**Nhận xét:** Kết quả cho thấy tất cả các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm nằm trong khoảng 1,8-2,0. Mẫu chuẩn hóa về nồng độ 20ng đạt được độ tinh sạch tốt, đảm bảo cho kỹ thuật MLPA thực hiện thành công.

Những bệnh nhân không tìm được đột biến xóa đoạn, lặp đoạn gen bằng kỹ thuật MLPA được tách RNA, tổng hợp cDNA để xác định đột biến điểm. Sau khi tách RNA, chất lượng của các mẫu RNA tổng số và cDNA được kiểm tra bằng cách đo mật độ quang trên máy Nanodrop. Những mẫu cDNA được tổng hợp từ mẫu RNA trên cũng sẽ được kiểm tra chất lượng và nồng độ bằng máy Nanodrop.





A

B

**Hình 3.2. Kết quả đo nồng độ RNA và cDNA bằng máy Nanodrop của bệnh nhân MS28: (A). Nồng độ RNA , (B). Nồng độ cDNA.**

**Nhận xét:** Nồng độ RNA tổng số tách được có giá trị từ 800 ng/μl trở lên và độ tinh sạch đạt yêu cầu với tỷ lệ đo được ở bước sóng 260/280 nm luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0. Với độ tinh sạch, và nồng độ này, các mẫu RNA đã đạt yêu cầu để sử dụng để tổng hợp cDNA. Đối với những mẫu cDNA trên hình ảnh ta thấy mẫu có độ tinh sạch tốt, Đường đo mẫu có một đỉnh duy nhất tại bước sóng 260nm như vậy chứng tỏ chất lượng sản phẩm cDNA tốt, không bị đứt gãy và có thể sử dụng để phân tích xác định đột biến.

### 3.2. Kết quả xác định đột biến gen dystrophin

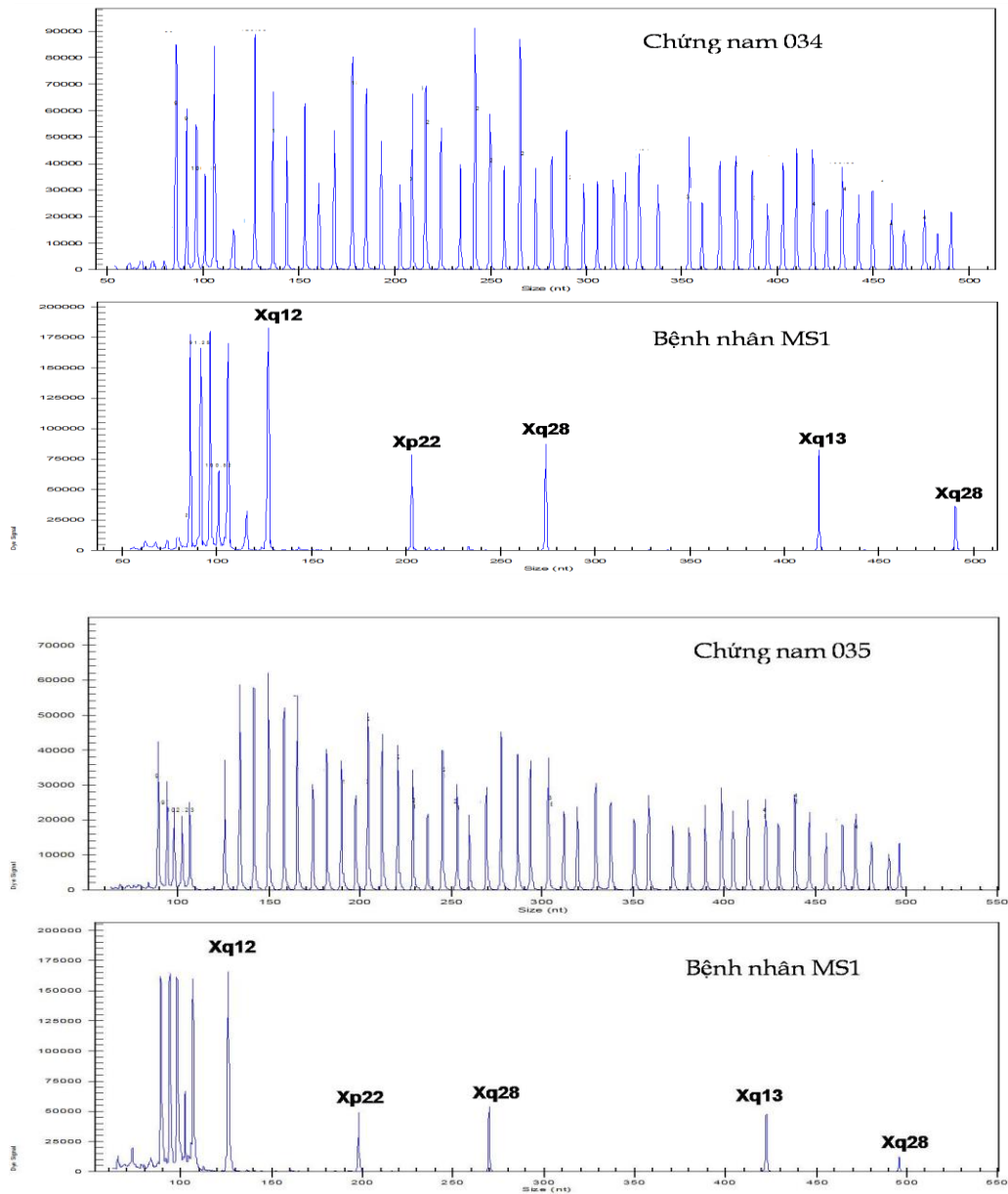
Nghiên cứu phát hiện được 182/201 trường hợp bệnh nhân có đột biến gen dystrophin gây bệnh DMD/BMD, chiếm tỷ lệ 91%. Số bệnh nhân chưa phát hiện được 19/201 trường hợp, chiếm tỷ lệ 9%.

#### 3.2.1. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA

##### 3.2.1.1 Kết quả xác định đột biến xóa đoạn gen

Trong nghiên cứu này tất cả 201 mẫu DNA đều được xác định đột biến gen bằng kỹ thuật MLPA. DNA của bệnh nhân được phân tích toàn bộ 79 exon tìm đột biến xóa đoạn và lặp đoạn bằng 2 probemix P34 và P35. Mỗi phản ứng MLPA đều chạy kèm mẫu đối chứng là người nam bình thường không mang gen dystrophin đột biến.

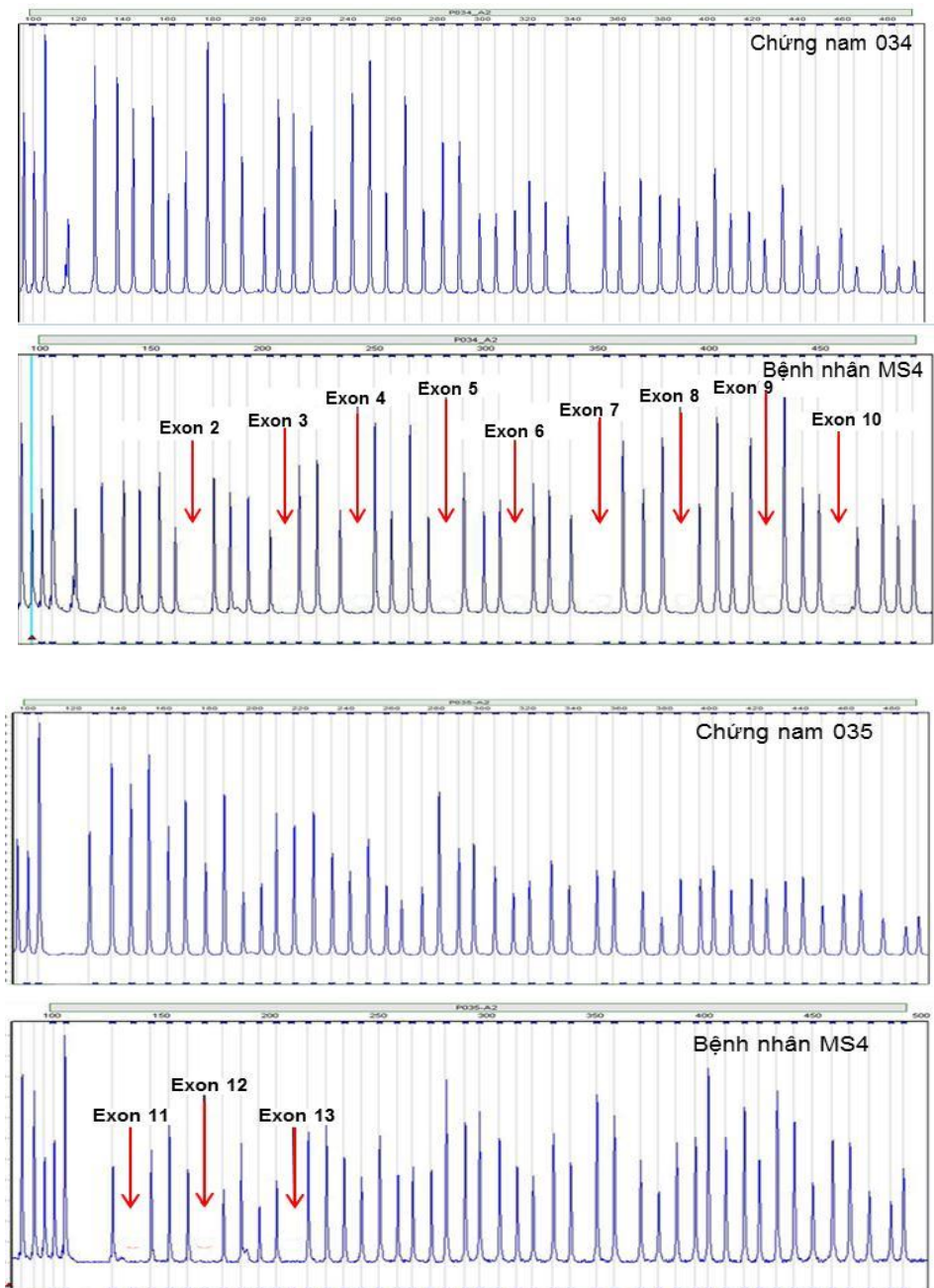
## Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa toàn bộ gen dystrophin



**Hình 3.3. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS1.**

*Nhận xét:* Kết quả MLPA hình 3.3 cho thấy, so với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 1-79 ở mẫu bệnh nhân bị mất hoàn toàn, trong khi đó các sản phẩm PCR của gen nội chuẩn (Xq12, Xp22, Xq28, Xq13) vẫn xuất hiện đỉnh cho thấy chất lượng DNA đạt yêu cầu. Điều đó chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn toàn bộ 79 exon trên gen dystrophin

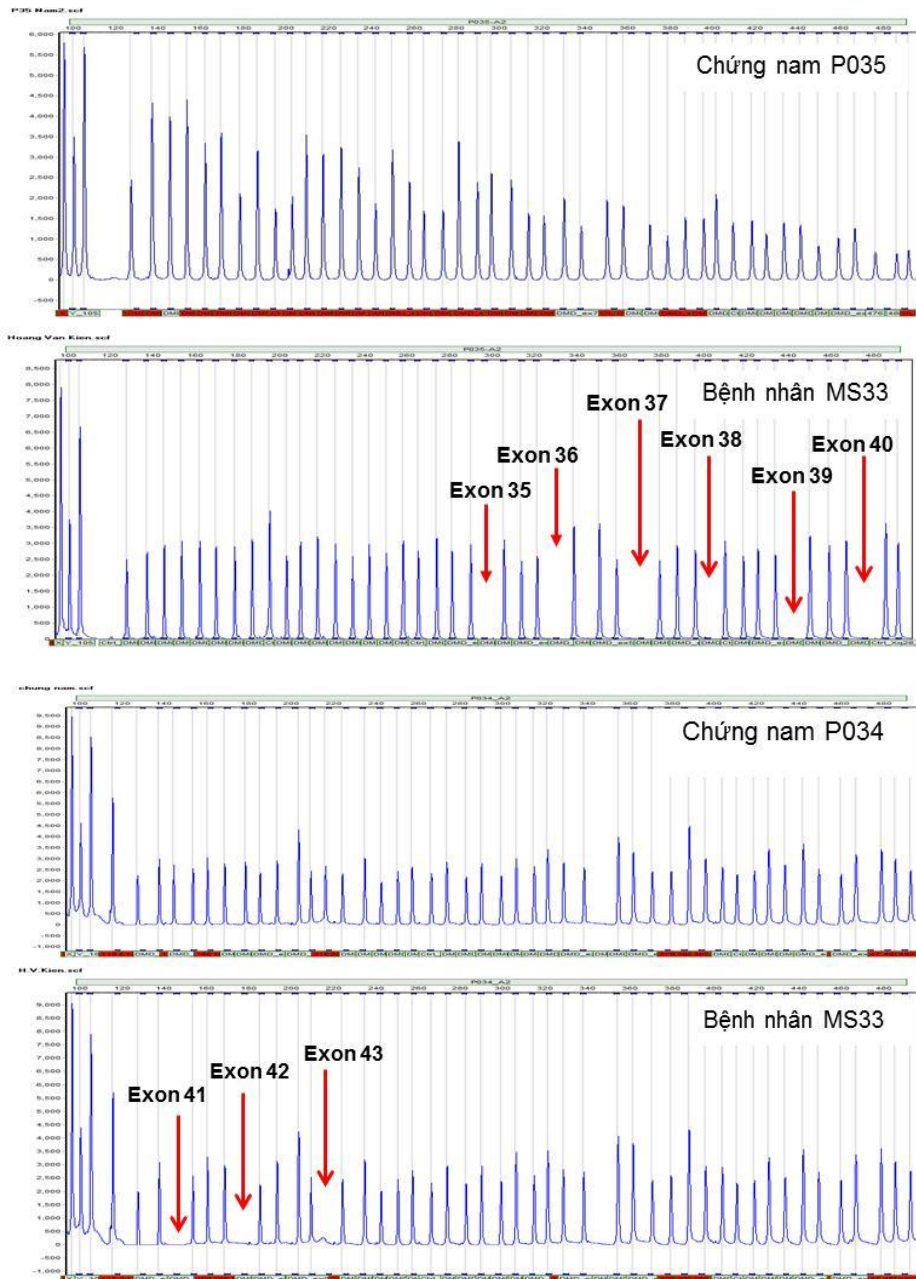
## Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn vùng tận 5' tận gen dystrophin



**Hình 3.4. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS4.**

*Nhận xét:* Kết quả MLPA hình 3.4 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 2-13 của bệnh nhân bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 2 đến exon 13 trên gen dystrophin.

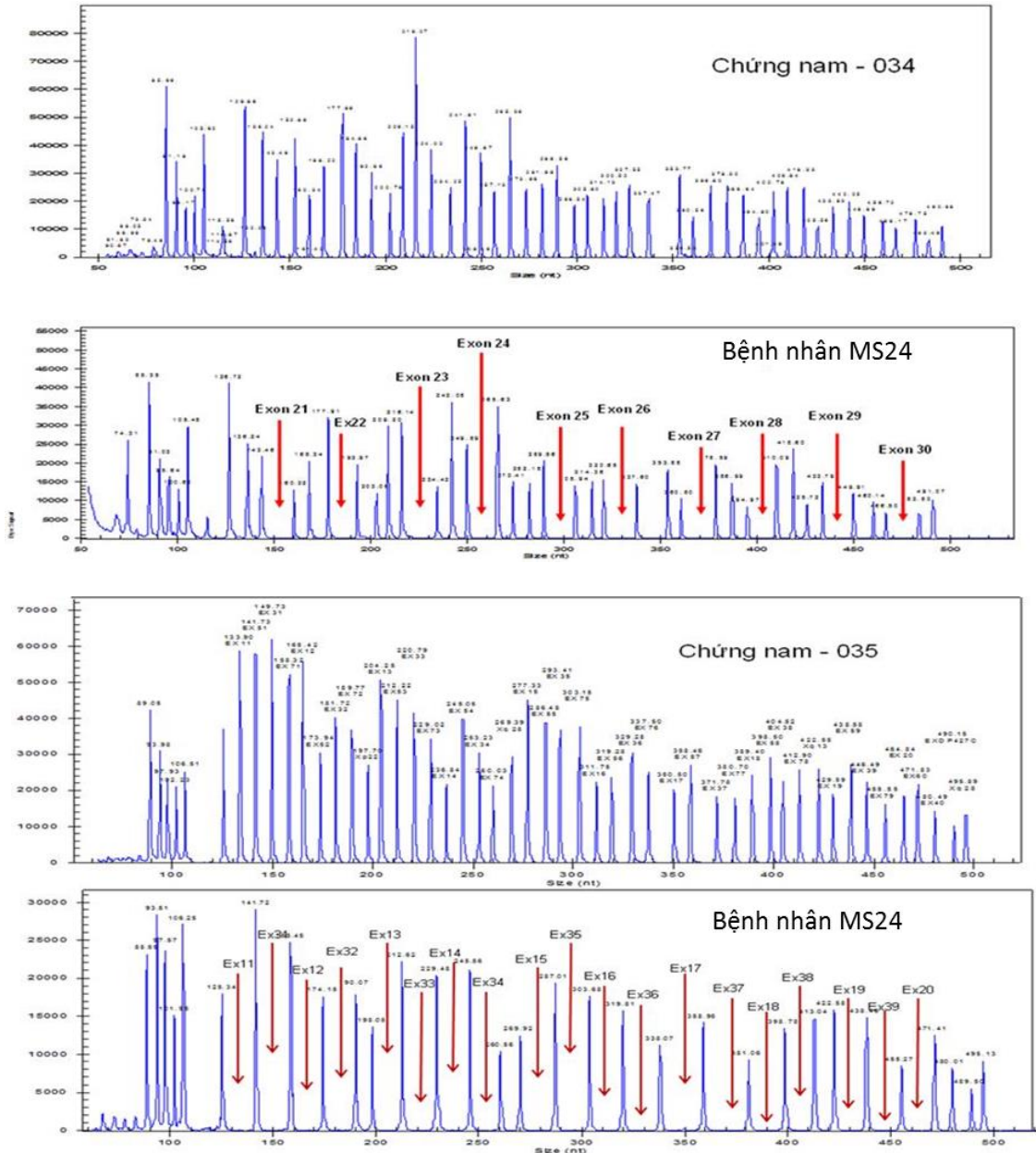
## Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn vùng trung tâm gen dystrophin



**Hình 3.5. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS33.**

*Nhận xét:* Kết quả MLPA hình 3.5 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 35-43 bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 35 đến exon 43.

## Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn dài từ vùng tận 5' đến vùng trung tâm gen dystrophin

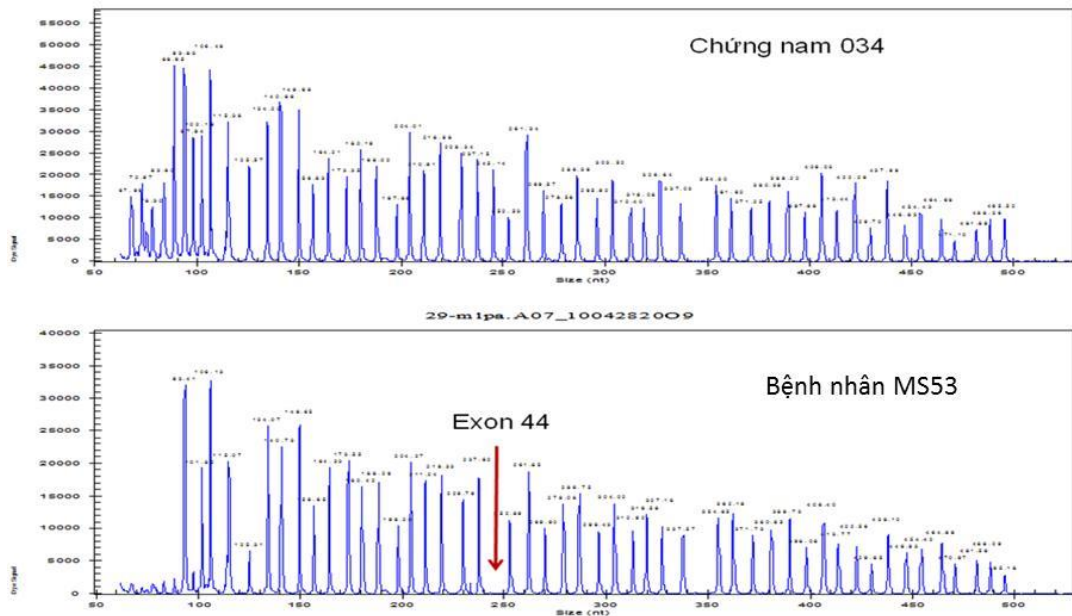


**Hình 3.6. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS24.**

*Nhận xét:* Kết quả MLPA hình 3.6 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 11-39 bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 11 đến exon 39. Đây

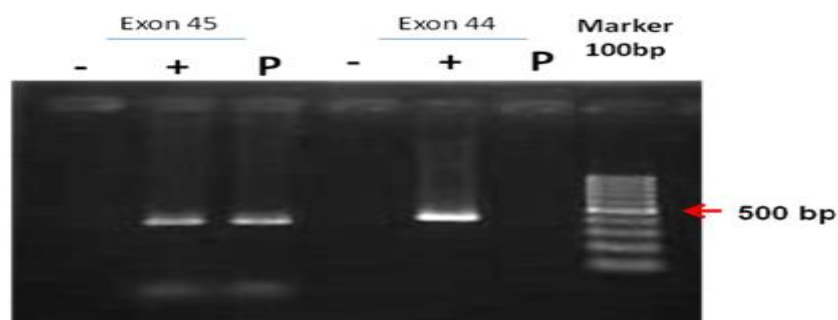
là một đột biến xóa đoạn dài (29 exon), xóa đoạn này kéo dài từ vùng tận 5' đến vùng trung tâm gen dystrophin.

### Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn đơn lẻ 1 exon gen dystrophin



**Hình 3.7. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS53.**

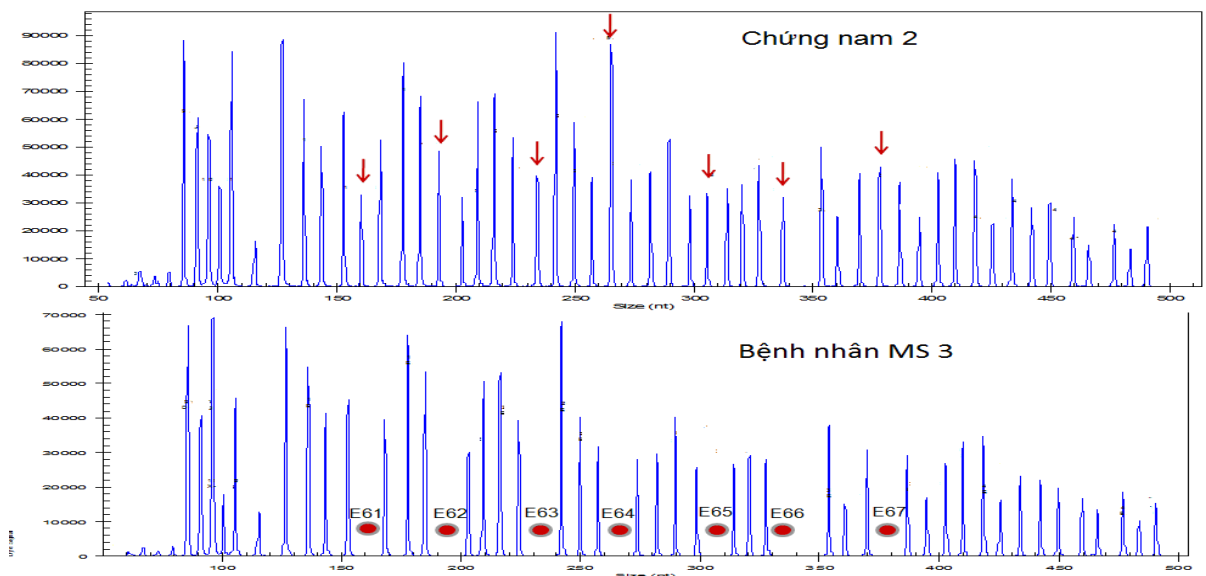
**Nhận xét:** Kết quả MLPA hình 3.7 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon 44 bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn exon 44. Đây là trường hợp mất đỉnh đơn lẻ nên phải kết hợp với kỹ thuật PCR để khẳng định.



**Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR của DNA bệnh nhân MS53 với cặp mồi 44,45. (-) đối chứng âm, (+) đối chứng dương, (P) mẫu bệnh nhân**

**Nhận xét:** Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 44, exon 45 cho thấy, ở mẫu đối chứng xuất hiện vạch PCR ở cả 2 exon 44 và 45 trong khi đó ở bệnh nhân chỉ xuất hiện vạch PCR ở exon 45 mà không xuất hiện vạch PCR ở exon 44, chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon 44.

### **Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn vùng 3' ngoài vùng hotspot gen dystrophin**



**Hình 3.9. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS3.**

**Nhận xét:** Kết quả MLPA hình 3.9 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 61-67 bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 61 đến exon 67. Đột biến này nằm ngoài vùng hotspot (vùng 5' tận và vùng trung tâm).

**Bảng 3.1. Kết quả phát hiện đột biến xóa đoạn gen dystrophin**

<b>Exon xóa đoạn</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Thể bệnh (phenotype)</b>	<b>Kiểu gen (genotype)</b>	<b>Exon xóa đoạn</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Thể bệnh (phenotype)</b>	<b>Kiểu gen (genotype)</b>
Exon 1-79	1	DMD	Out of frame	Exon 40-43	1	DMD	Out of frame
Exon 1-34	1	DMD	Inframe	Exon 42-43	1	DMD	Out of frame
Exon 2-13	2	DMD	Out of frame	Exon 43-52	1	DMD	Out of frame
Exon 3	1	BMD	Inframe	Exon 44	6	DMD	Out of frame
Exon 3-7	4	DMD	Out of frame	Exon 45	1	DMD	Out of frame
Exon 3-13	1	DMD	Inframe	Exon 45-46	1	BMD	Inframe
Exon 3-17	1	DMD	Out of frame	Exon 45-47	4	BMD	Inframe
Exon 3-21	1	DMD	Out of frame	Exon 45-48	1	BMD	Inframe
Exon 3-43	1	DMD	Out of frame	Exon 45-50	7	DMD	Out of frame
Exon 3-44	1	DMD	Inframe	Exon 45-52	7	DMD	Out of frame
Exon 3-45	1	DMD	Out of frame	Exon 45-55	1	BMD	Inframe
Exon 3-47	1	DMD	Inframe	Exon 46-47	1	DMD	Out of frame
Exon 5-27	1	DMD	Inframe	Exon 46-49	1	DMD	Out of frame
Exon 5-37	1	DMD	Inframe	Exon 46-50	6	DMD	Out of frame
Exon 8	1	DMD	Out of frame	Exon 46-51	4	DMD	Out of frame
Exon 8-9	4	DMD	Out of frame	Exon 46-52	1	DMD	Out of frame
Exon 8-12	1	DMD	Out of frame	Exon 46-55	2	DMD	Out of frame
Exon 8-13	1	DMD	Out of frame	Exon 47	4	BMD	Inframe
Exon 8-43	1	DMD	Out of frame	Exon 47-48	1	BMD	Inframe
Exon 8-46	1	DMD	Out of frame	Exon 48-50	11	DMD	Out of frame
Exon 10-17	1	DMD	Out of frame	Exon 48-52	2	DMD	Out of frame
Exon 11-39	1	DMD	Inframe	Exon 49-50	6	DMD	Out of frame
Exon 11-41	1	DMD	Inframe	Exon 49-52	8	DMD	Out of frame
Exon 12-34	1	DMD	Out of frame	Exon 49-54	1	DMD	Out of frame
Exon 15-19	1	DMD	Out of frame	Exon 50-52	3	DMD	Out of frame



Exon 16-17	1	DMD	Out of frame	Exon 51	5	DMD	Out of frame
Exon 16-19	1	DMD	Out of frame	Exon 51-52	1	BMD	Inframe
Exon 17	1	DMD	Out of frame	Exon 51-53	1	DMD	Out of frame
Exon 19-50	1	DMD	Out of frame	Exon 51-55	1	DMD	Out of frame
Exon 30-43	1	DMD	Out of frame	Exon 52	4	DMD	Out of frame
Exon 31-43	1	DMD	Out of frame	Exon 56-62	1	DMD	Out of frame
Exon 32	1	BMD	Inframe	Exon 61-67	1	DMD	Inframe
Exon 38-43	1	DMD	Out of frame				

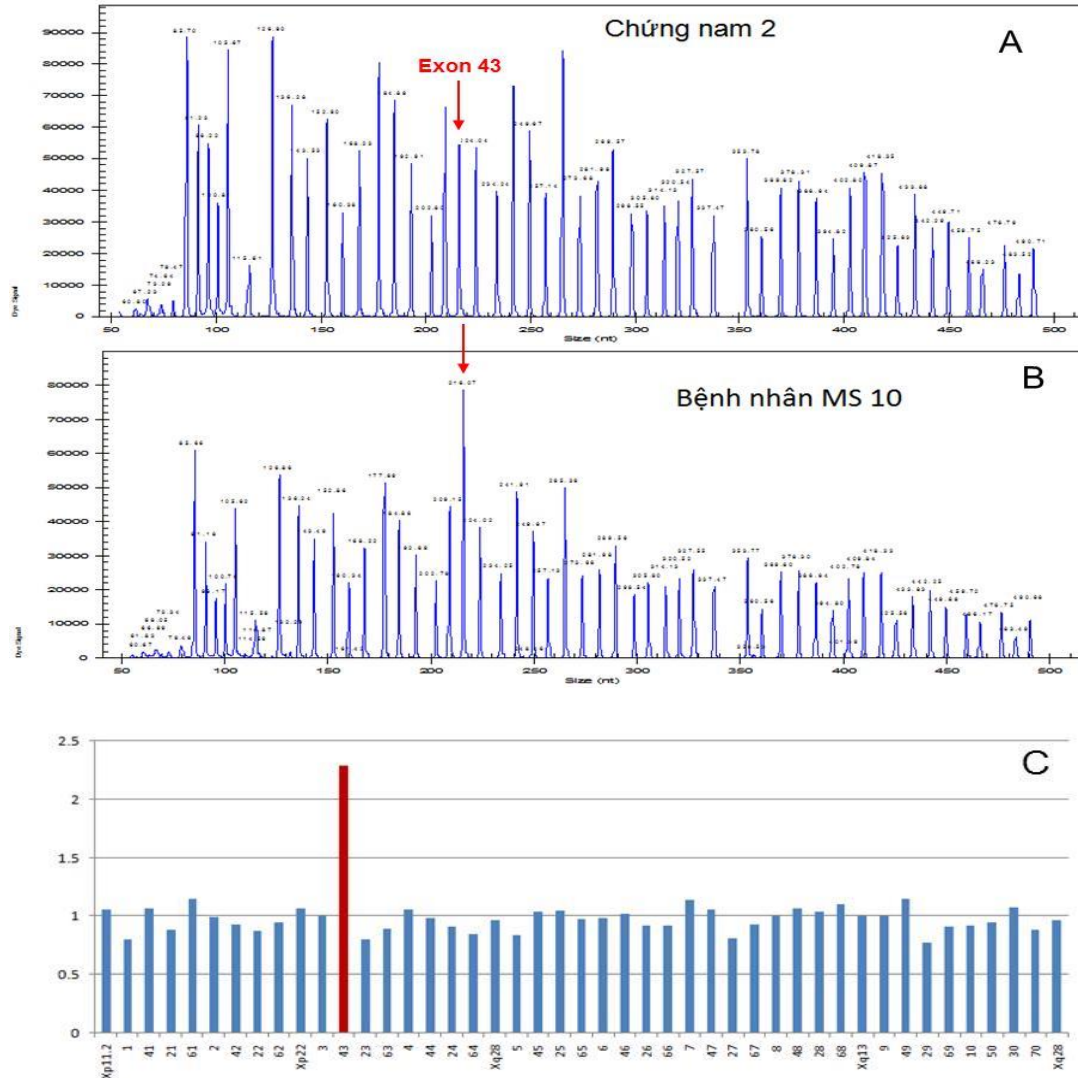
*Out of frame: Đột biến gây lệch khung dịch mã; Inframe: Đột biến không gây lệch khung dịch mã*

*Nhận xét:* Bằng kỹ thuật MLPA đã phát hiện được 137/201 bệnh nhân BMD/DMD có đột biến xóa đoạn, trong đó có 24/137 bệnh nhân có đột biến xóa đơn lẻ một exon, 2/137 bệnh nhân có đột biến nằm ngoài vùng hotspot. Phát hiện 1/137 bệnh nhân có đột biến xóa toàn bộ 79 exon, có 24 đột biến xóa đoạn nhưng không làm lệch khung dịch mã (inframe), 113 đột biến gây lệch khung dịch mã (out of frame).

### 3.2.1.2 Kết quả xác định đột biến lặp đoạn gen

Tất cả bệnh nhân không có đột biến xóa đoạn đều được phân tích dựa trên RPA để tìm đột biến lặp đoạn theo công thức của tác giả Lai K.K và cộng sự [44].

## Kết quả bệnh nhân bị đột biến lặp đoạn đơn lẻ 1 exon trên gen dystrophin



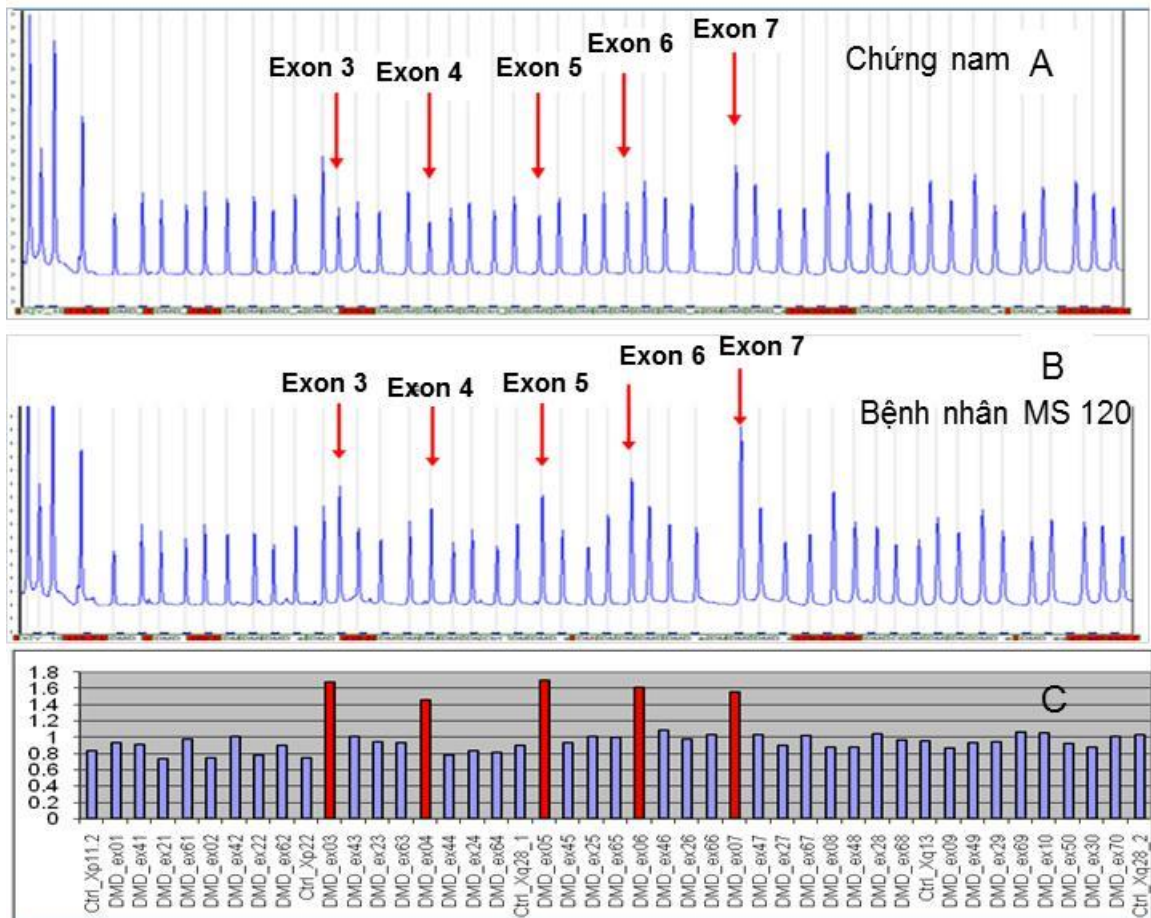
**Hình 3.10. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS10**

(A) chứng nam P034 (B) Bệnh nhân MS10 với probmix P034

(C) Kết quả phân tích dựa trên RPA.

**Nhận xét:** Đối với bệnh nhân MS10 hình ảnh MLPA tại probe tương ứng với exon 43 thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn so với chứng nam. Sau khi phân tích dựa trên RPA có tỉ lệ RPR tại exon 43 của bệnh nhân so với chứng nam lớn hơn 2 trong khi tỉ lệ RPR của các exon khác giao động xung quanh 1. Chứng tỏ bệnh nhân có đột biến lặp đoạn đơn lẻ exon 43.

### Kết quả bệnh nhân bị đột biến lặp đoạn nhiều exon của gen dystrophin



**Hình 3.11. Kết quả MLPA của bệnh nhân mã số MS120**  
 (A) chứng nam P34 (B) Bệnh nhân MS120 với probmix P034  
 (C) Kết quả phân tích dựa trên RPA.

**Nhận xét:** Hình ảnh phân tích MLPA tại probe tương ứng với các exon 3, 4, 5, 6, 7 của bệnh nhân MS120 thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn nhiều so với chứng. Sau khi phân tích dựa trên RPA ta có tỉ lệ RPR tại các exon từ 3 đến 7 của bệnh nhân so với chứng lớn hơn 1,5 trong khi của các exon khác chỉ giao động xung quanh 1. Như vậy, chứng tỏ bệnh nhân có đột biến lặp đoạn các exon 3-7.

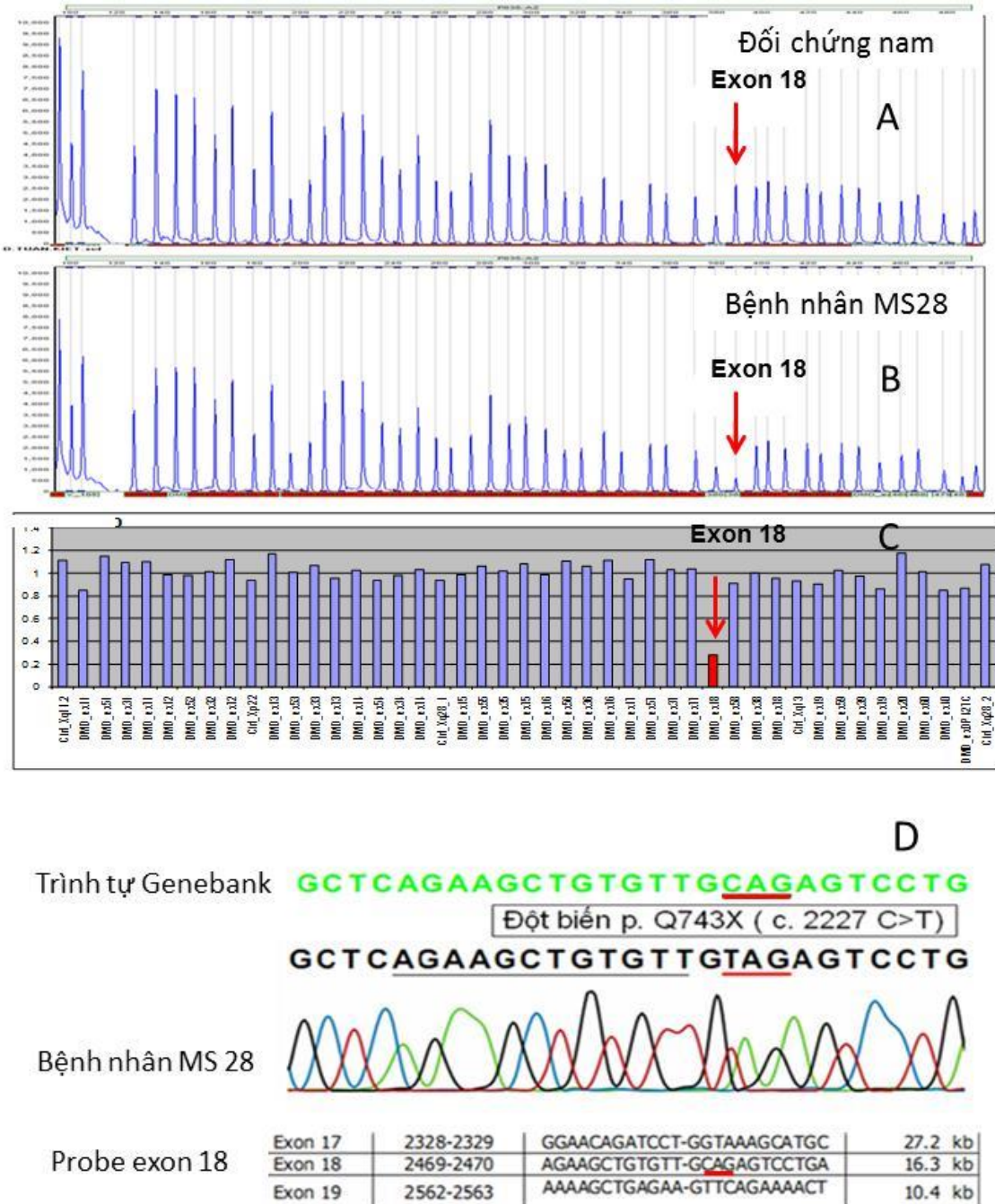
**Bảng 3.2. Kết quả phát hiện đột biến lặp đoạn trên gen dystrophin**

Exon lặp đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)	Exon lặp đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)
Exon 2	1	DMD	Out of frame	Exon 19	1	DMD	Out of frame
Exon 2-4	1	DMD	Out of frame	Exon 19-34	1	DMD	Out of frame
Exon 3-9	1	BMD	Inframe	Exon 31-34	1	DMD	Inframe
Exon 3-17	1	DMD	Out of frame	Exon 43	1	DMD	Out of frame
Exon 3-7	1	DMD	Out of frame	Exon 61-63	1	DMD	Out of frame
Exon 11-20, Exon 51-60	1	DMD	Out of frame	Exon 62	1	DMD	Out of frame
Exon 14-17	1	DMD	Out of frame	Exon 5-7	1	DMD	Out of frame

*Outframe: Đột biến gây lệch khung dịch mã; Inframe: Đột biến không gây lệch khung dịch mã*

*Nhận xét:* Bảng phân tích dựa trên RPA và trên cường độ tín hiệu của sản phẩm PCR tương ứng với mỗi exon so với chứng đã phát hiện được 14 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn, trong đó có 5/14 đột biến lặp đoạn exon đơn lẻ, 1/14 bệnh nhân có lặp đoạn 2 vùng, 8/14 đột biến lặp đoạn nhiều exon.

### Kết quả bệnh nhân có đột biến điểm ở vùng probe của exon 18



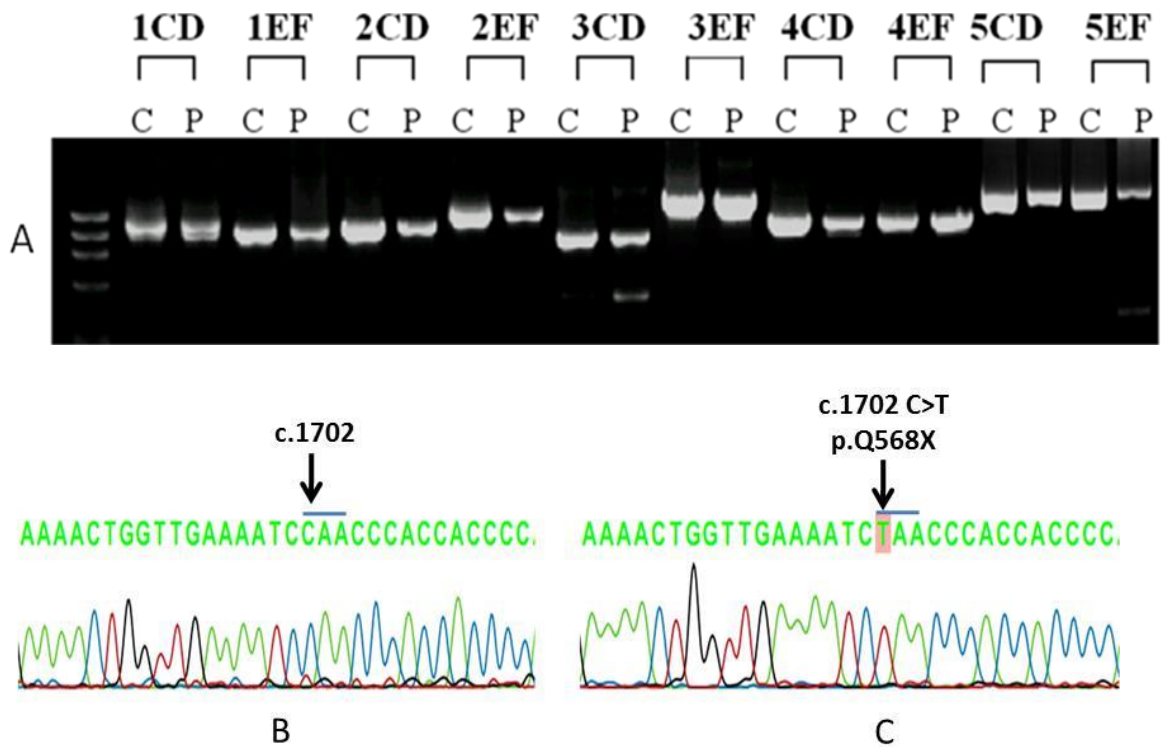
**Hình 3.12. Kết quả xác định đột biến gen của bệnh nhân mã số MS28**  
A) chứng nam P034, (B) Bệnh nhân MS28 với probmix P034, (C) Kết quả phân tích dựa trên RPA, (D) Kết quả giải trình tự so với trình tự Genebank (exon 18) và probe exon 18 cho phản ứng MLPA. Vạch màu đỏ dưới các trình tự nucleotid là vị trí của bộ 3 acid amin bị đột biến.

*Nhận xét:* Trên hình ảnh MLPA của bệnh nhân MS28, sản phẩm PCR tương ứng với đỉnh của exon 18 có xuất hiện đỉnh nhưng tín hiệu rất thấp, kết quả này cho thấy có thể bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon 18. Chúng tôi kiểm tra xem exon 18 có thực sự bị xóa đoạn hay không bằng kỹ thuật PCR, kết quả cho thấy xuất hiện vạch PCR tương ứng với sản phẩm của exon 18 chứng tỏ bệnh nhân không bị xóa đoạn exon 18. Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự gen, kết quả cho thấy xuất hiện đột biến điểm tại vị trí c.2227C>T, đột biến này nằm tại vị trí gắn probe của exon 18 nên đã làm ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại exon 18 của phản ứng MLPA, làm cho đỉnh tín hiệu thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng.

### ***3.2.2. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen***

#### **Kết quả bệnh nhân bị đột biến thay thế 1 nucleotid tạo stop codon**

Những bệnh nhân không phát hiện đột biến xóa đoạn, lặp đoạn được tiến hành giải trình tự ở mức độ cDNA. Sử dụng kỹ thuật RT-nested PCR để khuếch đại toàn bộ chiều dài cDNA của gen dystrophin tương ứng với 10 đoạn gen khác nhau. Sản phẩm RT-nested PCR sẽ được giải trình tự gen.



**Hình 3.13. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân mã số MS123**

(A) Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của bệnh nhân mã số MS123; (B) Kết quả giải trình tự cDNA của mẫu chứng; (C) Kết quả giải trình tự cDNA mẫu bệnh nhân.

*Nhận xét:* Hình ảnh điện di RT-nested PCR cho thấy sản phẩm rõ nét, đặc hiệu theo như kích thước đã tính toán và bằng với mẫu đối chứng. Sản phẩm RT-PCR được giải trình tự, so sánh với trình tự GeneBank cho thấy có đột biến thay thế nucleotid C thành T tại vị trí 1702 trên cDNA, làm thay đổi bộ ba mã hóa CAA thành TAA tạo nên mã kết thúc sớm. Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến c.1702C>T ( p.Q568X) tại exon 14 của gen dystrophin.





**Bảng 3.3. Kết quả đột biến điểm trên gen dystrophin**

<b>STT</b>	<b>MSNC</b>	<b>Đột biến trên c.DNA</b>	<b>Exon</b>	<b>Biến đổi protein</b>	<b>Thể bệnh</b>
1	MS127	c.184ins C	Exon 3	p.Leu61profsX27	DMD
2	MS134	c.433C>T	Exon 6	p.Arg145X	DMD
3	MS189	c.724C>T	Exon 8	p.Gln252X	DMD
4	MS138	c.1062G>A	Exon 10	p.Trp345X	DMD
5	MS129	c.2797C>T	Exon 11	p.Gln933X	DMD
6	MS132	c.1201C>T	Exon 11	p.Gln401X	DMD
7	MS137	c.1492G>T	Exon 13	p.Glu498X	DMD
8	MS123	c.1702C>T	Exon 14	p.Gln568X	DMD
9	MS126	c.1827A>T	Exon 16	p.Lys613X	DMD
10	MS28	c.2227C>T	Exon 18	p.Gln743X	DMD
11	MS176	c.2365G>T	Exon 19	p.Glu789X	DMD
12	MS144	c.2302C>T	Exon 19	p.Arg768X	DMD
13	MS122	c.2569C>T	Exon 20	p.Gln856X	DMD
14	MS196	c.2887delT	Exon 22	p.Ser963Pfsx40	DMD
15	MS200	c.3151C>T	Exon 23	p.Arg1051X	DMD
16	MS141	c.3347-3350delAGAA	Exon 25	p.Lys1116MetfsX15	DMD
17	MS159	c.3580C>T	Exon 26	p.Gln1194X	DMD
18	MS131	c.3715InsTAAATAG	Exon 27	p.Glu1438X	DMD
19	MS139	c.3767InsT	Exon 27	p.Gly1256ValfsX15	DMD
20	MS162	c.3766,3767InT	Exon 27	p.Gly1256Valfs15X15	DMD
21	MS184	c.3940C>T	Exon 29	p.Arg1314X	DMD
22	MS130	c.4212,4213 del TC	Exon 30	p.Gln1405fsX11	DMD
23	MS146	c.4186InA	Exon 30	p.Tyr1396Xfs	DMD
24	MS180	c.4729C>T	Exon 34	p.Arg1577X	DMD
25	MS171	c.5530C>T	Exon 39	p.Arg1844X	DMD

26	MS187	c.5899C>T	Exon 41	p.Arg1967X	DMD
27	MS121	c.6274 Ins TA	Exon 43	p.Tyr2092LeufsX22	DMD
28	MS124	c.6237,6238 del CC	Exon 43	p.Ser2079Serfs2X	DMD
29	MS128	c.6224InsTGTA	Exon 43	p.Leu2075LeufsX10	DMD
30	MS125	c.7522G>T	Exon 51	p.Glu2508X	DMD
31	MS207	9361+1 G>A	intron 64		BMD

### 3.3 Bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam

#### 3.3.1. Phân bố các dạng đột biến gen dystrophin

Sử dụng kỹ thuật MLPA, RT-nested PCR và giải trình tự gen để xác định đột biến xoá đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm trên toàn bộ 79 exon của gen dystrophin. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen dystrophin được chỉ ở bảng 3.4.

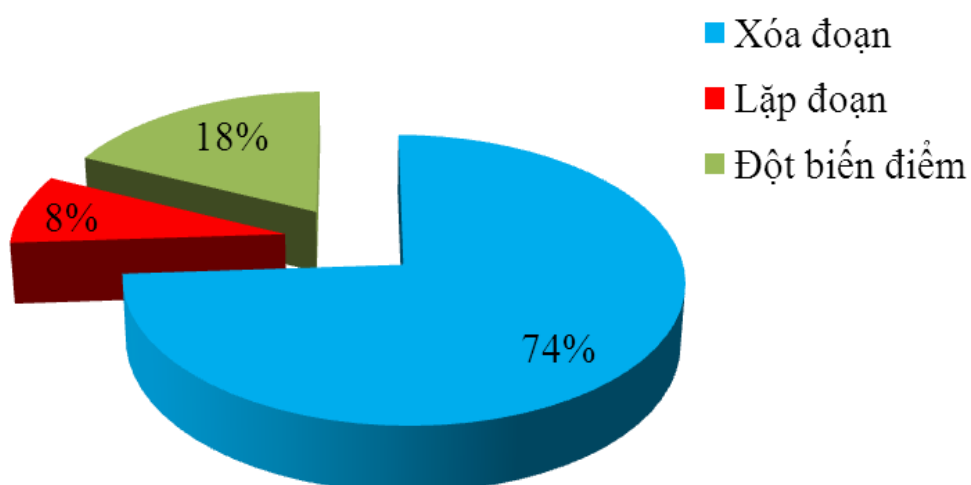
**Bảng 3.4. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen dystrophin**

Loại đột biến	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Xóa đoạn	137	75,3
Lặp đoạn	14	7,7
Đột biến điểm	31	17,0
<b>Tổng số</b>	<b>182</b>	<b>100</b>

*Nhận xét:* 182/201 bệnh nhân DMD/BMD có đột biến gen dystrophin, trong đó đột biến xoá đoạn 137/182 chiếm 75,3%, đột biến lặp đoạn 14/182 (7,7%), đột biến điểm 31/182 (17%).

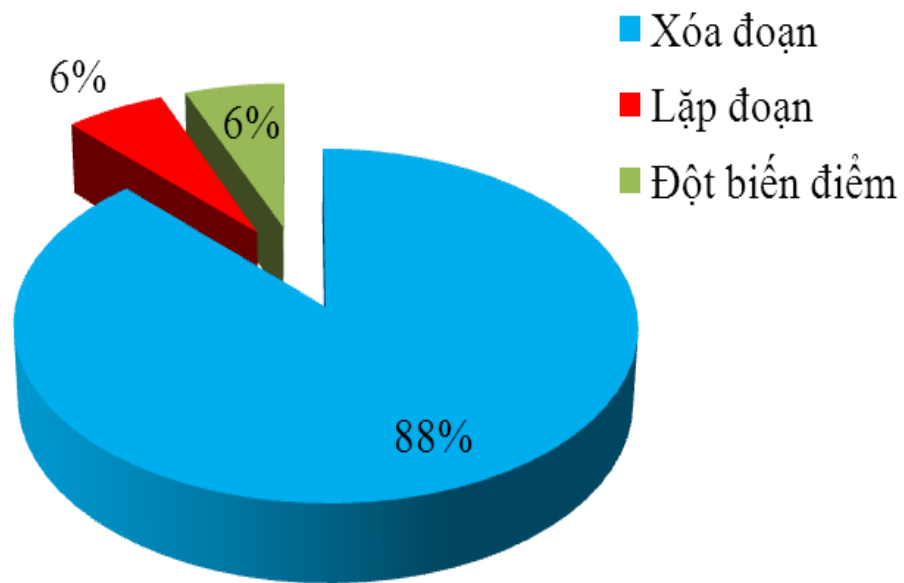
**Bảng 3.5. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen trên bệnh nhân DMD và BMD**

Loại đột biến	Thể bệnh			
	DMD		BMD	
	n	%	n	%
Xóa đoạn	122	74	15	88
Lặp đoạn	13	8	1	6
Đột biến điểm	30	18	1	6
<b>Tổng số</b>	<b>165</b>	<b>100</b>	<b>17</b>	<b>100</b>



**Biểu đồ 3.1. Các dạng đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD**

*Nhận xét:* Số lượng bệnh nhân DMD được phát hiện đột biến là 165 trường hợp chiếm tỷ lệ 91%. Trong đó 122/165 trường hợp xóa đoạn chiếm 74%. Đột biến lặp đoạn 13/165 trường hợp chiếm 8% và đột biến điểm 30/165 trường hợp chiếm 18%.



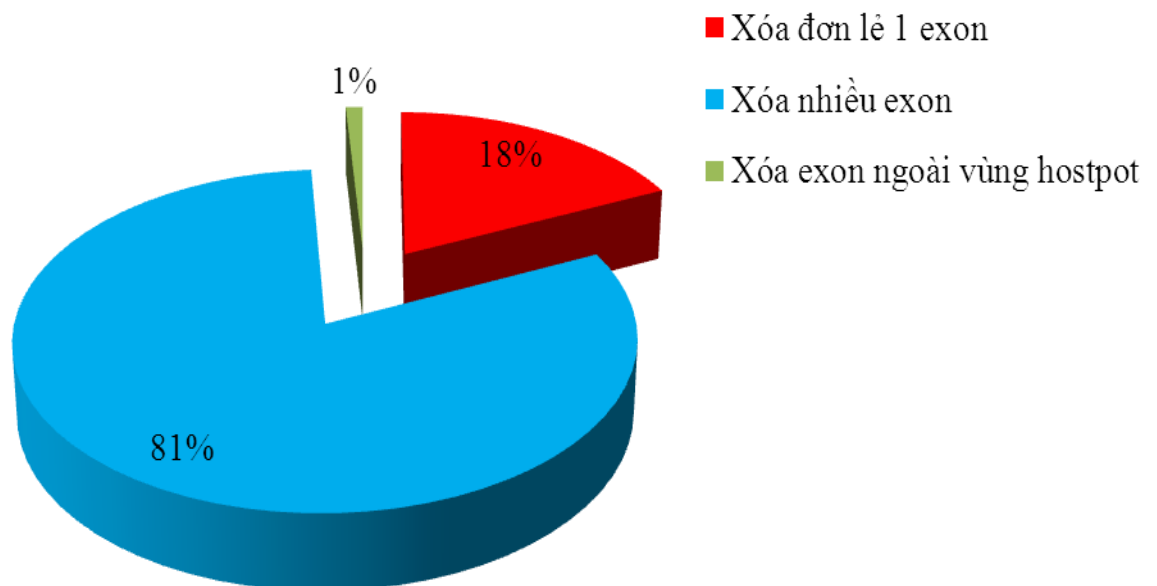
### **Biểu đồ 3.2. Các dạng đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân BMD**

Nhận xét: Số lượng bệnh nhân BMD được phát hiện đột biến là 17 trường hợp. Trong đó đột biến xóa đoạn chiếm đa số với 15/17 trường hợp chiếm 88%, còn lại đột biến lặp đoạn 1/17 trường hợp chiếm 6%, đột biến điểm 1/17 (6%).

### 3.3.2. Phân bố các dạng đột biến xóa đoạn gen dystrophin

**Bảng 3.6. Tỷ lệ các dạng đột biến xóa đoạn**

Loại đột biến	Số lượng (n=137)	Tỷ lệ (%)
Xóa đơn lẻ 1 exon	24	17.5
Xóa nhiều exon	111	81.0
Xóa exon ngoài vùng hotspot	2	1.5



**Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ các dạng đột biến xóa đoạn**

*Nhận xét:* Với 137 trường hợp đột biến xóa đoạn: có 24/137 xóa đơn lẻ một exon, 2/137 xóa đoạn ngoài vùng hotspot, 111/137 trường hợp xóa đoạn nhiều exon.

**Bảng 3.7. Tỷ lệ phân bố vùng đột biến xóa đoạn**

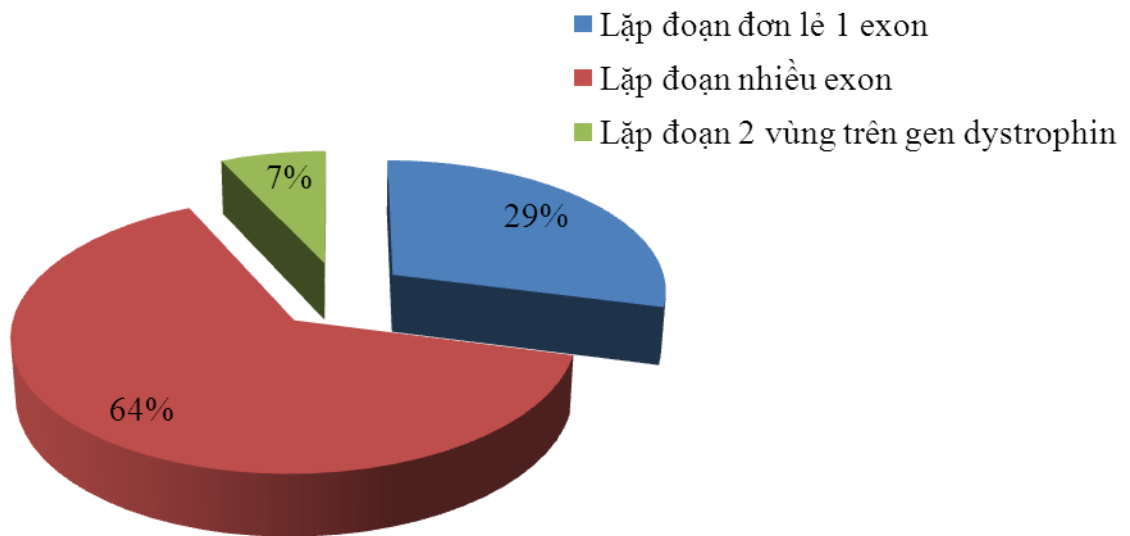
<b>Vùng đột biến xóa đoạn</b>	<b>Số lượng (n=137)</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>
Xóa đoạn vùng 5' tận (Exon 1-20)	25	18.2
Xóa đoạn vùng trung tâm (Exon 40-53)	97	70.8
Xóa đoạn dài 5' tận – Vùng trung tâm	12	8.8
Xóa vị trí khác	3	2.2

*Nhận xét:* Trong số 137 trường hợp đột biến xóa đoạn phát hiện được: Xóa đoạn vùng trung tâm chiếm phần lớn 97/137 chiếm tỷ lệ 70.8%, tiếp theo là vùng 5' 12/137 chiếm tỷ lệ 18%, xóa đoạn dài từ vùng 5' tới vùng trung tâm 12/137 chiếm tỷ lệ 12%, còn lại là các đột biến xóa đoạn ở vùng khác.

### 3.3.3. Phân bố các dạng đột biến lặp đoạn gen dystrophin

**Bảng 3.8. Tỷ lệ các dạng đột biến lặp đoạn**

<b>Loại đột biến lặp đoạn</b>	<b>Số lượng (n=14)</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>
Lặp đoạn đơn lẻ 1 exon	4	29
Lặp đoạn nhiều exon	9	64
Lặp đoạn 2 vùng trên gen dystrophin	1	7



**Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ các dạng đột biến lặp đoạn**

*Nhận xét:* Với 14 trường hợp đột biến lặp đoạn: có 4/14 lặp đoạn đơn lẻ một exon, 1/14 lặp đoạn hai vùng, 9/14 trường hợp lặp đoạn nhiều exon.

**Bảng 3.9. Tỷ lệ phân bố vùng đột biến lặp đoạn**

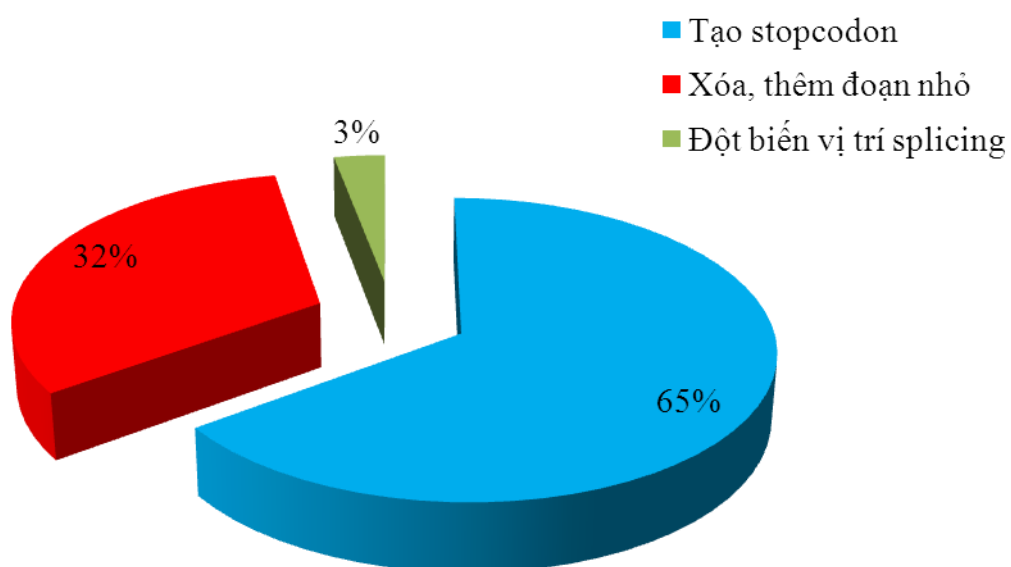
Vùng đột biến lặp đoạn	Số lượng (n=14)	Tỷ lệ (%)
Lặp đoạn vùng 5' tận (Exon 1-20)	8	57
Lặp đoạn vùng trung tâm (Exon 40-53)	1	7
Lặp đoạn dài 5' tận – vùng trung tâm	1	7
Lặp đoạn vị trí khác	4	29

*Nhận xét:* Trong số 14 trường hợp đột biến lặp đoạn phát hiện được: Lặp đoạn vùng 5' tận chiếm phần lớn 8/14 chiếm tỷ lệ 57%, tiếp theo là lặp đoạn ở ngoài vùng 5' tận và vùng trung tâm 4/14 chiếm tỷ lệ 29%, 1/14 (7%) trường hợp có đột biến lặp đoạn ở vùng trung tâm và 1/14 (7%) trường hợp có đột biến lặp đoạn dài từ vùng 5' tới vùng trung tâm.

### 3.3.4. Phân bố các dạng đột biến điểm gen dystrophin

**Bảng 3.10. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến điểm**

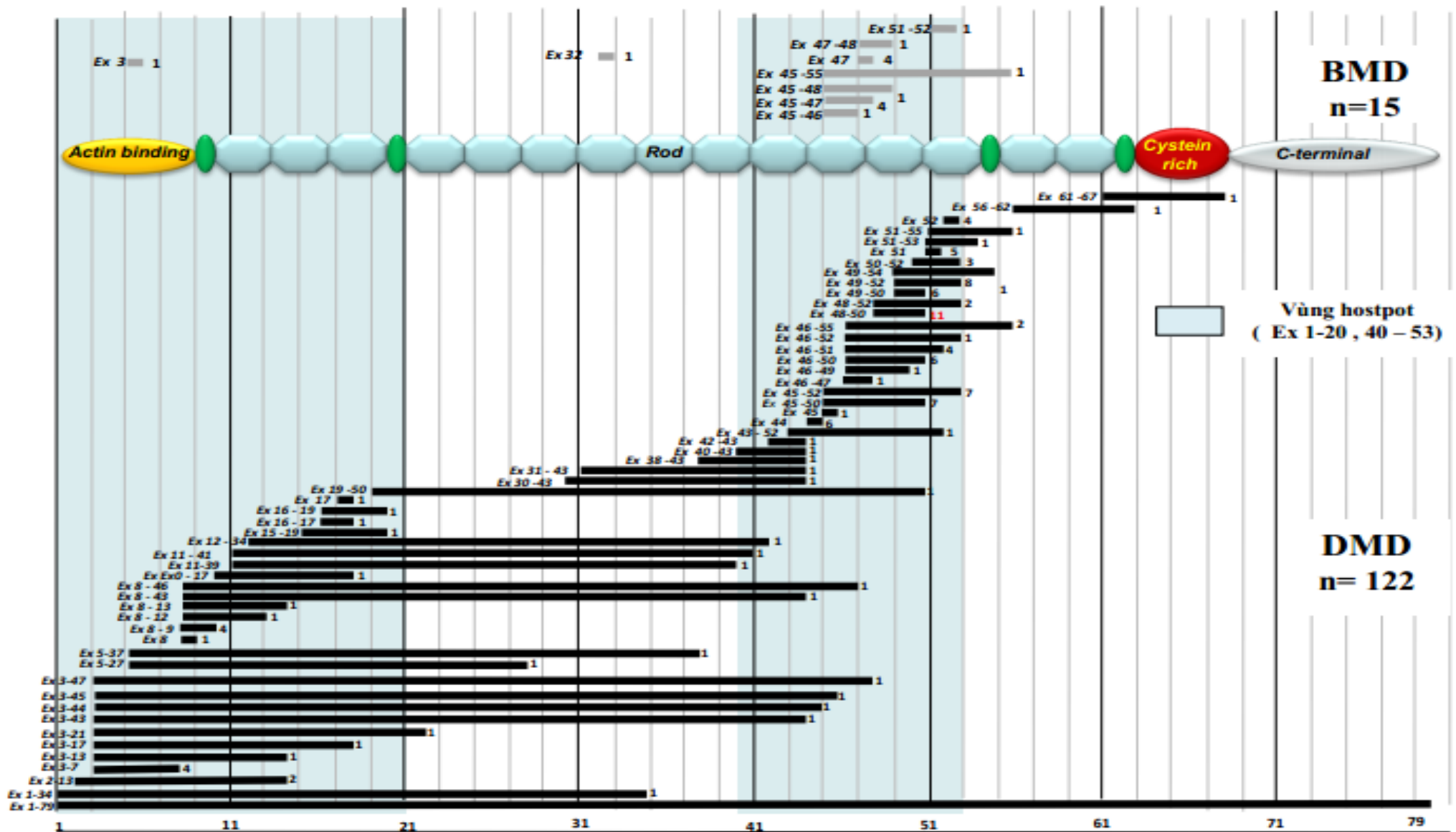
Loại đột biến	Số lượng (n=31)	Tỷ lệ (%)
Tạo stop codon	20	65
Xóa, thêm nucleotid	10	32
Đột biến tại vị trí splicing	1	3



**Biểu đồ 3.5. Các dạng đột biến điểm trên gen dystrophin**

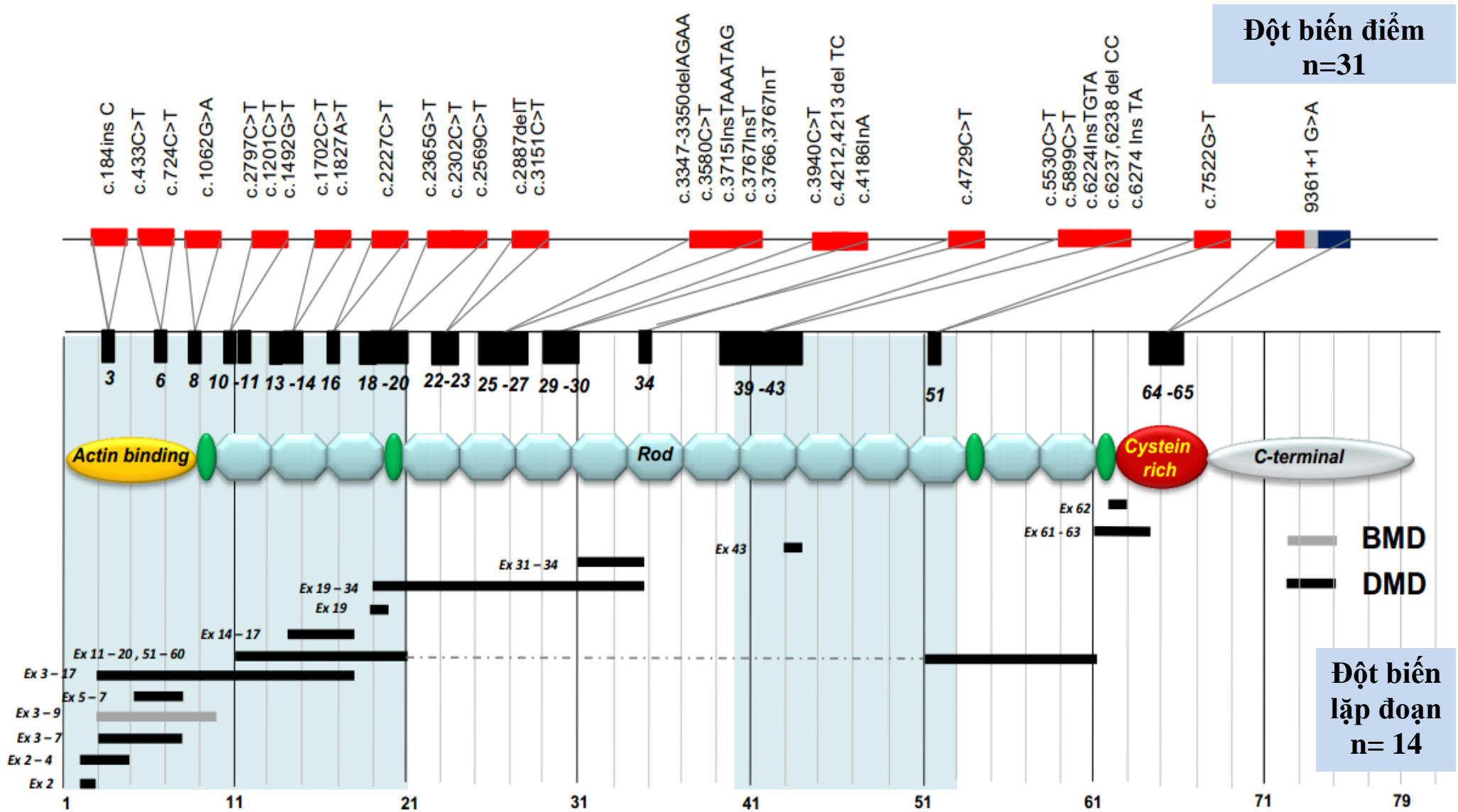
*Nhận xét:* Với kỹ thuật giải trình tự trực tiếp chúng tôi đã phát hiện được 31 trường hợp đột biến điểm trong đó đột biến tạo stop codon chiếm ưu thế với 20 trường hợp. Đột biến thêm và xóa nucleotid là 10 trường hợp. 1 trường hợp có đột biến tại vị trí splicing.





**Hình 3.16. Bản đồ đột biến xóa đoạn gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam**

Ghi chú: Đường kẻ ngang thể hiện vùng exon bị đột biến - số bên phải thể hiện số lượng bệnh nhân



**Hình 3.17. Bản đồ đột biến lặp đoạn, đột biến điểm gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam**

Ghi chú: Đường kẻ ngang thể hiện vùng exon bị đột biến.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

Loạn dưỡng cơ Duchenne và Becker là một bệnh lý di truyền lặn liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X với tần suất mắc bệnh khá cao (1/3500 trẻ trai), biểu hiện bệnh nặng, trẻ thường chết sớm để lại hậu quả nặng nề cho gia đình và xã hội. Từ những năm 1993 nghiên cứu của Roland G. Roberts, Andrew.H đã cho thấy những hiểu biết đầy đủ về cấu trúc gen dystrophin, protein dystrophin và vai trò quan trọng của nó trong quá trình vận hành cơ [68, 69]. Các nghiên cứu về các dạng đột biến gen dystrophin của các quốc gia khác nhau trên thế giới cũng đã và đang được triển khai rộng rãi. Xác định vị trí các đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD/BMD cung cấp nhiều lợi ích cho khoa học cơ bản và ứng dụng lâm sàng. Đối với những bệnh nhân bị bệnh DMD/BMD, xác định được vị trí đột biến là một tiêu chuẩn vàng để khẳng định chính xác chẩn đoán bệnh, ngoài ra nó cũng hỗ trợ trong việc tiên lượng mức độ nghiêm trọng của bệnh và diễn biến lâm sàng để từ đó có phương pháp điều trị thích hợp. Hơn nữa, xác định được vị trí đột biến của bệnh nhân sẽ giúp cho chẩn đoán trước sinh những phụ nữ mang gen bệnh. Thiết lập bản đồ đột biến gen dystrophin còn là tiền đề hết sức quan trọng cho việc áp dụng liệu pháp điều trị gen trong tương lai. Vì tính chất nặng nề và phổ biến nên bệnh Duchenne đã được quan tâm nghiên cứu ở nước ta từ nhiều năm nay. Đó là nghiên cứu về tần suất mắc bệnh, mối liên quan giữa chẩn đoán lâm sàng và xét nghiệm CK, ứng dụng của xét nghiệm CK trong chẩn đoán người mang gen bệnh. Đặc biệt trong vài năm trở lại đây đã có một số nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán bệnh, chẩn đoán người mang gen và chẩn đoán trước sinh. Nghiên cứu này đã áp dụng kỹ

thuật MLPA, kỹ thuật RT-nested PCR và giải trình tự gen để phát hiện toàn bộ đột biến trên 79 exon của gen dystrophin. Đây là một nghiên cứu khá toàn diện để xây dựng bản đồ đột biến gen cho bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam và hướng tới liệu pháp điều trị gen cho bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne Việt Nam.

#### **4.1. Quy trình tách chiết DNA, RNA và tổng hợp cDNA**

Việc phát hiện cấu trúc chuỗi xoắn kép của DNA bởi hai nhà bác học Watson và Crick vào năm 1953 chính thức đánh dấu sự ra đời của Sinh học phân tử. Kể từ đó đến nay, sinh học phân tử phát triển không ngừng về cả lý thuyết và thực tiễn. Trong lĩnh vực y học, các kỹ thuật sinh học phân tử ngày càng hoàn thiện giúp chẩn đoán nhiều bệnh lý trong đó có bệnh di truyền. Muốn áp dụng được các kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện đột biến gen, bước đầu tiên là tách chiết RNA, DNA. Quá trình tách chiết RNA, DNA là một trong những khâu quan trọng nhất quyết định sự thành công của các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo, đặc biệt là với những kỹ thuật cao như MLPA cần phải định lượng để xác định đột biến lặp đoạn, hay kỹ thuật RT-nested PCR và giải trình tự gen. Nếu các phân tử acid nucleic được tách tốt, không bị đứt gãy, không bị tạp nhiễm thì các phản ứng tiếp theo mới có độ chính xác cao. Trong nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp tách chiết DNA theo quy trình phenol/chloroform. Quy trình gồm nhiều bước và được lặp lại nhiều lần để loại bỏ những chất không cần thiết giúp DNA có độ tinh sạch cao. Theo Adeli (1990), quy trình phenol/chloroform mất nhiều thời gian và công sức, tuy nhiên các phân tử DNA thu được có độ tinh sạch rất cao [70]. Điều này được khẳng định khi chúng tôi tiến hành đo độ tinh sạch của

các phân tử DNA, tỷ lệ mật độ quang của các mẫu DNA ở bước sóng 260/280nm luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0.

So với quá trình tách chiết DNA, quy trình tách chiết RNA khó và phức tạp hơn bởi vì các phân tử RNA dễ đứt gãy và dễ phân huỷ. Sau khi lấy máu, cần tiến hành tách chiết RNA tổng số càng sớm càng tốt, thông thường là phải tách RNA trong vòng 24 giờ sau khi lấy máu. Các phân tử RNA không bền, dễ bị phân huỷ bởi các enzym ribonuclease (RNase). Các enzym RNase tồn tại ở khắp nơi, có hoạt tính rất cao và bền vững với các tác nhân thường dùng để loại bỏ enzym (việc xử lý nhiệt ở 90°C trong 1 giờ không làm mất hoạt tính RNase). Vì các lý do đó, việc tách chiết RNA đòi hỏi thận trọng để tránh mọi tạp nhiễm bởi các RNase từ môi trường: thao tác trong điều kiện vô trùng; tất cả dụng cụ, hoá chất đều được khử trùng bằng nhiệt hay hóa chất; tránh mọi tiếp xúc với dụng cụ bằng tay trần không mang găng...

Nghiên cứu này đã thử nghiệm tách chiết RNA tổng số theo nhiều quy trình và đã chọn lựa được phương pháp sử dụng isogen vì quy trình này thường cho RNA có nồng độ và độ tinh sạch cao. Năm 2006, Tay et al tiến hành xác định đột biến gen dystrophin ở các bệnh nhân DMD thuộc vùng Đông Nam Á. Tác giả đã tách chiết phân tử RNA của bệnh nhân theo quy trình của nghiên cứu này và đã thu được RNA có chất lượng tốt [71]. Sau khi tách được RNA tổng số, độ tinh sạch của phân tử RNA đã được xác định bằng các chỉ số hấp thụ quang phổ, dựa vào tỉ lệ  $A_{260}/A_{280}$ . Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm ( $A_{260}$ ) của các mẫu RNA cho phép xác định nồng độ RNA trong dung dịch. Protein có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm ( $A_{280}$ ) và độ hấp thụ thấp ở bước sóng 260 nm. Do vậy, tỉ lệ  $A_{260}/A_{280}$  biểu thị

mức độ protein còn sót lại trong dịch chiết. RNA được coi là tinh sạch khi giá trị  $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ . RNA tách chiết thu được trong nghiên cứu đều có nồng độ và độ tinh sạch tốt. Như vậy, có thể khẳng định rằng quy trình tách RNA tổng số của trong nghiên cứu này đạt yêu cầu và có thể tiếp tục tổng hợp cDNA để xác định đột biến.

Quá trình tổng hợp cDNA từ RNA được thực hiện bởi enzym sao mã ngược. Qua nhiều lần thí nghiệm, chúng tôi đã đưa ra quy trình phù hợp để tổng hợp cDNA của bệnh nhân DMD trong điều kiện nghiên cứu tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội. Sau mỗi lần tổng hợp cDNA, chất lượng cDNA được kiểm tra bằng đo nồng độ và độ tinh sạch trên máy Nanodrop. Kết quả trên hình ảnh cho thấy sản phẩm cDNA thu được có nồng độ và độ tinh sạch cao, sản phẩm cDNA không bị đứt gãy. Như vậy, có thể chứng minh quy trình tổng hợp cDNA là phù hợp và tối ưu, sản phẩm cDNA đạt chất lượng để tiến hành giải trình tự tìm đột biến điểm ở mức độ RNA.

## **4.2. Xác định đột biến gen dystrophin**

### ***4.2.1. Xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA***

Hiện nay có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định đột biến gen dystrophin như kỹ thuật single PCR, multiplex PCR, Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), Fluorescence in situ Hybridization (FISH), Southern blot, Kỹ thuật khuếch đại đa đoạn dò (MLPA). Mỗi kỹ thuật đều có các ưu nhược điểm riêng. Trước đây khi kỹ thuật MLPA chưa ra đời thì kỹ thuật Multiplex PCR được sử dụng để xác định đột biến xóa đoạn ở 2 vùng đột biến trọng điểm là vùng 5' tận và vùng trung tâm của gen dystrophin. Kỹ thuật Southern

blot có thể xác định được cả đột biến xóa đoạn và đột biến lặp đoạn nhưng mất nhiều thời gian và cần phải sử dụng phóng xạ nên ít được sử dụng rộng rãi. Kỹ thuật RT-PCR có thể phát hiện được toàn bộ đột biến xóa đoạn trên 79 exon của gen nhưng kỹ thuật này khó và cũng cần ít nhất 2 tuần để phát hiện được đột biến xóa đoạn gen. Trong những năm gần đây, kỹ thuật MLPA được áp dụng khá rộng rãi trong xác định đột biến gen dystrophin vì có thể phát hiện được cả đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen trong thời gian 2-3 ngày với độ chính xác cao.

Kỹ thuật MLPA là kỹ thuật có thể khuếch đại về sự đa dạng trong số lượng các bản sao ở một vài gen khác nhau. Dựa vào ưu điểm này, MLPA thường được sử dụng trong chẩn đoán ở cấp độ phân tử một vài bệnh lý di truyền mà nguyên nhân gây bệnh là do hiện tượng bị xóa bỏ hay bị nhân đôi của các gen đặc hiệu.

Mặc dù phần lớn các bệnh di truyền đều liên quan đến những bất thường trong trình tự DNA của các gen đặc hiệu, tuy nhiên sự xóa bỏ hay nhân lên của gen chiếm một tỷ lệ tương đối trong số tất cả những đột biến có thể gây bệnh, và trong một số trường hợp là nguyên nhân thường gặp nhất của một bệnh di truyền nào đó, chẳng hạn như bệnh Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) hay thoái hóa cơ tủy (SMA) [72, 73]. Đặc tính về xóa bỏ hay nhân lên của các gen là điểm cốt yếu để nhận biết sự tương quan về mặt kiểu hình và kiểu gen. Trong thực tế, sự nhân lên hay xóa bỏ một phần hay toàn bộ gen có thể tạo ra những kiểu hình hoàn toàn rất khác biệt. Sự nhân lên hoàn toàn hoặc sự nhân lên một phần nào đó của gen có thể dẫn đến việc mất đi chức năng của bản gen được nhân lên, ở bệnh DMD trong đó sự nhân lên ảnh

hưởng đến một số các exon trên gen, nhưng không phải toàn bộ gen. Hơn thế, việc mất đi hẳn một protein hay sự xuất hiện của một protein không hoàn thiện, trường hợp đầu dẫn đến bệnh DMD, và trường hợp thứ 2 dẫn đến bệnh BMD. Sự phân tích di truyền tế bào thông thường hay giải trình tự DNA đều không thể xác định được sự nhân lên hay bị xóa bỏ của một exon. Điều này dẫn đến việc, các đột biến này phải được nghiên cứu bằng cách sử dụng các kỹ thuật riêng. Ban đầu, việc xác định sự nhân lên hay xóa bỏ gen chủ yếu dựa trên kỹ thuật Southern Blot, FISH hoặc multiplex PCR bán định lượng. Tuy nhiên, các kỹ thuật này đều rất tốn thời gian, hiệu quả và độ nhạy không cao, và thường không xác định được những tái sắp xếp nhỏ diễn ra trong cùng một gen.

Trong số các kỹ thuật khác nhau được sử dụng trong những năm gần đây để xác định sự nhân lên hay xóa bỏ gen, do có những ưu điểm nổi trội mà kỹ thuật MLPA được ưu tiên áp dụng. Kỹ thuật này có thể phân tích trong một phản ứng PCR hơn 50 vùng DNA và xác định được số lượng bản sao khác nhau của các gen đặc hiệu, bao gồm cả những sự tái sắp xếp nhỏ trong nội bộ của 1 gen. Hơn nữa, hiện nay có trên 300 mẫu dò mang tính thương mại có thể được cung cấp bởi MRC Holland, đặc hiệu cho lượng lớn các bệnh di truyền phổ biến và hiếm gặp. Phương pháp MLPA trong vài năm gần đây là một kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu về di truyền để chẩn đoán ở mức độ phân tử một số bệnh [74].



**Bảng 4.1. Ưu và nhược điểm của kỹ thuật MLPA so với một số kỹ thuật sinh học phân tử thông dụng khác**

<b>Phương pháp</b>	<b>Ưu điểm</b>	<b>Nhược điểm</b>
MLPA	Xác định được những sự tái sắp xếp nhỏ. Trên 40 đích cho một phản ứng. Giá thành thấp.	Không xác định được việc mất các bản sao trung tính ở trạng thái dị hợp. Gặp nhiều vấn đề với các thể khảm, trạng thái dị hợp của các khối u hay sự nhiễm với các tế bào bình thường.
FISH	Xác định được những sự tái sắp xếp đã được cân bằng. Xác định được thể khảm. Xác định được dị hợp khối u Có thể định lượng nhiều bản sao.	Không xác định được việc mất các bản sao trung tính ở trạng thái dị hợp. Không thể xác định sự tái sắp xếp nhỏ (vd, xóa trình tự < 100 kb hay nhân lên > 500 kb). Số lượng giới hạn các đích và dữ liệu đầu vào.
Định lượng /Sq PCR	Xác định được những tái sắp xếp nhỏ, thậm chí là các đột biến điểm. Có thể định lượng nhiều bản sao. Giá thành thấp.	Tối ưu hóa và hiệu quả là một vấn đề đáng quan tâm Số lượng giới hạn các đích Gặp nhiều vấn đề với các thể khảm, trạng thái dị hợp của các khối u hay sự nhiễm với các tế bào bình thường.
Southern blot	Xác định được những tái sắp xếp nhỏ. Xác định được thể khảm.	Không xác định được việc mất các bản sao trung tính ở trạng thái dị hợp. Không định lượng được Tốn thời gian và công sức Số lượng các đích và dữ liệu đầu vào bị giới hạn.
CGH array	Có thể xác định được những tái sắp xếp nhỏ. Có thể dò được toàn bộ hệ gen. Giá thành cho mỗi điểm dữ liệu không cao.	Không xác định được việc mất các bản sao trung tính ở trạng thái dị hợp. Hóa chất và máy móc đắt. Dữ liệu vào thấp.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật MLPA đã sử dụng với bộ kit đã được thương mại hóa là **SALSA MLPA KIT P034-A2/P035-A2** của công ty MRC Hà Lan. Probemix P034/P035 DMD này chứa các probe cho mỗi exon của gen DMD trên vị trí Xp21.2 của nhiễm sắc thể. Ngoài ra, có một probe cho exon DP427c. Bộ Kit gồm 80 probe được chia thành 2 probemix: P034 và P035. Như vậy, với việc thực hiện hai phản ứng MLPA, đủ để khảo sát số lượng bản sao của tất cả 79 exon trên gen dystrophin.

Probemix P034-A2 chứa 40 probe khác nhau với các sản phẩm khuếch đại từ 129-490 bp để khuếch đại 40 exon khác nhau trên gen dystrophin. Kèm trong probemix này là 10 probe tương ứng được thiết kế kèm theo để khuếch đại 10 sản phẩm PCR có kích thước nhỏ hơn 120bp, bao gồm 7 sản phẩm PCR có kích thước nhỏ hơn 100 bp, 2 sản phẩm PCR đặc hiệu cho NST Y và một sản phẩm PCR đặc hiệu cho NST X; các sản phẩm PCR kèm theo này dùng để kiểm tra chất lượng DNA có trong phản ứng MLPA.

Các probemix P035-A2 DMD chứa 39 probe khác nhau với các sản phẩm khuếch đại từ 129-490bp để khuếch đại 39 exon khác nhau trên gen dystrophin. Tương tự, kèm theo trong probemix này là 9 probe tương ứng để khuếch đại 9 sản phẩm PCR có kích thước nhỏ hơn 120bp, bao gồm 7 sản phẩm PCR có kích thước nhỏ hơn 100 bp, một sản phẩm PCR đặc hiệu cho NST Y và một sản phẩm PCR đặc hiệu cho NST X; các sản phẩm PCR kèm theo này cũng dùng để kiểm tra chất lượng DNA có trong phản ứng MLPA.

Trong mỗi probemix, ngoài 40 probe đặc hiệu cho 40 exon của gen dystrophin còn có 5 probe tham chiếu đóng vai trò như chứng nội đảm bảo kiểm soát chất lượng cho mỗi phản ứng MLPA. Probemix P034-A2/P035-A2

có 5 probe tham chiếu là: Xq12, Xp22, Xq28\_1, Xq13 và Xq28\_2. MLPA là một kỹ thuật mới tại Việt Nam với nhiều ưu điểm vượt trội, chỉ cần 2 phản ứng PCR với thời gian là 2 ngày kỹ thuật MLPA có thể kiểm tra được toàn bộ 79 exon trên gen dystrophin để phát hiện đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen là chiếm 65-75%. Trong nghiên cứu này, toàn bộ 201 bệnh nhân được áp dụng kỹ thuật MLPA để xác định đột biến gen. Kết quả thu được sau khi chạy bằng máy điện di mao quản sẽ được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng để xác định bệnh nhân có đột biến xóa đoạn hay lặp đoạn gen.

Bằng kỹ thuật MLPA, đã phát hiện 152 trường hợp có đột biến xóa đoạn và lặp đoạn chiếm tỉ lệ 75%. Trong đó xóa đoạn là 137/201 trường hợp chiếm tỉ lệ 68%, lặp đoạn 14 trường hợp chiếm tỉ lệ 7%. Kỹ thuật MLPA có ưu điểm là phát hiện được toàn bộ đột biến xóa đoạn trên 79 exon của gen dystrophin mà các kỹ thuật như multiplex PCR cổ điển không phát hiện được. Với kỹ thuật multiplex PCR, hai tác giả là chamberlain và Begg đã thiết kế từ năm 1988 và 1990 dùng để phát hiện các đột biến phổ biến ở 2 vùng đột biến trọng điểm là vùng 5' tận (exon 1-20) và vùng trung tâm (exon 40-53), và như vậy chỉ phát hiện được 19 exon mà không phát hiện được các đột biến ở ngoài vùng này. Trong nghiên cứu này, ngoài những đột biến xóa đoạn hay gặp được phát hiện nghiên cứu còn phát hiện được 14 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn và 2 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn nằm ngoài vùng hotspot. Với ưu điểm như vậy MLPA được xem như là một kỹ thuật hữu dụng nhất trong việc xác định đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen dystrophin. Theo nghiên cứu của Tanja Latic và cộng sự năm 2005, áp dụng kỹ thuật MLPA trên 133 trường hợp tác giả phát hiện được 88 trường hợp đột biến chiếm tỉ lệ 66%

[75]. Theo một nghiên cứu khác của tác giả Sakthivel Murugan và cộng sự, khi áp dụng kỹ thuật multiplex PCR trên 150 bệnh nhân BMD/DMD chỉ phát hiện được 103 trường hợp có đột biến xóa đoạn, 47 trường hợp còn lại khi áp dụng kỹ thuật MLPA phát hiện thêm 9 trường hợp có đột biến nữa, trong đó có 8 trường hợp lặp đoạn và một trường hợp xóa đoạn ở ngoài 2 vùng đột biến trọng điểm [52]. Sự tương đồng về kết quả giữa nghiên cứu này với tác giả Sakthivel (2010) đã khẳng định tính ưu việt, hợp lý của kỹ thuật MLPA đã áp dụng trong nghiên cứu này.

Trong số các bệnh nhân có đột biến xóa đoạn, kết quả thu được ở bệnh nhân MS1 cho thấy có sự vắng mặt tất cả các sản phẩm khuếch đại của các probe tương ứng với 79 exon của gen dystrophin. Trong khi đó, các sản phẩm khuếch đại tương ứng với các probe tham chiếu và nội chuẩn vẫn có mặt. Điều này chứng tỏ chất lượng DNA tách chiết từ máu ngoại vi của bệnh nhân đảm bảo yêu cầu và quy trình kỹ thuật MLPA là diễn ra bình thường. Điều này chứng tỏ rằng bệnh nhân MS1 có đột biến xóa đoạn toàn bộ 79 exon của gen dystrophin. Đây là đột biến gây bệnh cảnh lâm sàng nặng vì protein dystrophin hoàn toàn không được tổng hợp. Kết quả phân tích gen cũng hoàn toàn tương đồng với đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân: Bệnh nhân xuất hiện yếu cơ ngay từ khi còn nhỏ lúc 3 tuổi, dấu hiệu giả phi đại cơ cẳng chân rõ, khó khăn khi leo cầu thang, nồng độ CK trong máu tăng rất cao (15.000 UI/l) và bệnh nhân đã hoàn toàn mất khả năng đi lại từ năm 9 tuổi, sớm hơn so với các bệnh nhân DMD khác là thường mất khả năng đi lại lúc 12 hoặc 13 tuổi.

So sánh về chiều dài đoạn gen bị mất trên gen dystrophin cho thấy, ở bệnh nhân có mã số nghiên cứu MS53 khi phân tích bằng kết quả MLPA

và PCR cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon 44, đột biến này đã gây lệch khung dịch mã (out of frame) và gây nên thể bệnh nặng DMD. Trong khi đó ở bệnh nhân mã số MS 39 kết quả MLPA cho thấy bệnh nhân bị xóa đoạn từ exon 45-47, đột biến này không gây lệch khung dịch mã (inframe) gây nên thể bệnh nhẹ; Bệnh nhân này hiện nay ngoài 30 tuổi, vẫn còn khả năng đi lại, đã tốt nghiệp đại học và lấy vợ sinh con. Điều này đã chứng minh được “Giả thuyết về khung dịch mã trong bệnh loạn dưỡng cơ Becker và Duchenne” của Monaco và cộng sự năm 1998. Chiều dài của đột biến nhiều khi không tương xứng với kiểu hình của bệnh. Nếu đột biến xóa đoạn nhỏ nhưng đã tạo ra mã kết thúc sớm (stop codon) hoặc gây lệch khung dịch mã (out of frame) thì sẽ tạo ra protein dystrophin không có chức năng và gây nên bệnh cảnh nặng của bệnh DMD; nếu đột biến xóa đoạn dài hơn nhưng vẫn duy trì được bộ ba mã hóa và không gây lệch khung dịch mã (in frame) thì protein dystrophin sẽ vẫn được tổng hợp ở dạng bán chức năng và gây ra bệnh cảnh lâm sàng nhẹ hơn là thể bệnh BMD.

Ở bệnh nhân mã số nghiên cứu MS3, kết quả phân tích MLPA cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 61-67. Tương tự như bệnh nhân có mã số nghiên cứu MS24, đột biến này cũng không gây lệch khung dịch mã, và theo như lý thuyết sẽ gây nên thể bệnh nhẹ BMD, tuy nhiên trên lâm sàng bệnh nhân có biểu hiện ở thể bệnh nặng DMD. Điều này có thể giải thích là do bệnh nhân bị đột biến ở vùng C tận, đây là vùng có chức năng rất quan trọng đối với protein dystrophin, vùng liên kết màng tế bào, vì vậy đột biến ở vùng này sẽ làm mất khả năng liên kết gây nên thể bệnh nặng.

Như đã bàn luận ở trên, dựa trên “Giả thuyết về khung dịch mã trong bệnh loạn dưỡng cơ Becker và Duchenne” của Monaco và cộng sự năm 1998 có thể giải thích hầu hết được sự tương quan kiểu gen và kiểu hình trong nghiên cứu này [39]. Tuy nhiên, có một số trường hợp không có sự tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình như theo thuyết chuyển mã. Đó là các bệnh nhân có đột biến xóa đoạn dài như xóa đoạn từ exon 1-34, exon 3-44 hoặc exon 3-47.... Những bệnh nhân này có đột biến xóa đoạn trên kiểu gen là inframe tức là không làm lệch khung dịch mã, theo như lý thuyết thì đột biến kiểu này sẽ gây nên thể bệnh nhẹ BMD, tuy nhiên trên bệnh cảnh lâm sàng của các bệnh nhân này là bệnh thể nặng. Giải thích điều này có thể là do số lượng exon bị xóa đoạn quá lớn làm mất vùng có chức năng quan trọng, nên protein dystrophin tuy được tổng hợp nhưng chức năng không còn và gây nên bệnh cảnh nặng trên lâm sàng [76].

Đối với các trường hợp đột biến xóa đoạn exon đơn lẻ, do một trong những hạn chế của kỹ thuật MLPA là các probe không bắt cặp hoặc bắt cặp kém với exon tương ứng khi tại vị trí bắt cặp có đột biến điểm. Vì vậy, trên hình ảnh MLPA thu được sẽ mất hoặc giảm độ cao của đỉnh tương ứng, giống với hình ảnh xóa đoạn một exon. Cho nên, đối với những đột biến xóa đoạn đơn lẻ một exon thu được bằng kỹ thuật MLPA, phải kiểm tra lại bằng PCR cổ điển với cặp mồi tương ứng để tránh trường hợp đột biến xóa đoạn giả.

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật MLPA và kỹ thuật PCR cổ điển, đã phát hiện được 24 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon đơn lẻ, chiếm tỉ lệ 17.5 % trong tổng số bệnh nhân có đột biến xóa đoạn. Trong đó xóa đoạn exon đơn lẻ tập trung vào 4 exon 44, 47, 51, 52 với 19 trường hợp trên tổng

số 24 bệnh nhân có xóa đoạn exon đơn lẻ. Nghiên cứu của Sakthivel trên bệnh nhân DMD/BMD Ấn Độ cho thấy, 21 trường hợp có xóa đoạn exon đơn lẻ, trong đó phổ biến nhất là exon 44 với 7 trường hợp, tiếp theo đó là exon 45 với 6 trường hợp, exon 52 có 4 trường hợp và exon 51 có 2 trường hợp, chiếm 19/21 tổng số bệnh nhân xóa đoạn đơn lẻ. Trong nghiên cứu khác của Antonella (2010) xóa đoạn đơn lẻ một exon tập trung vào 4 exon 44, 45, 48, 51 với tổng số 14/19 trường hợp. Các đột biến này đều nằm vùng trung tâm gen dystrophin.

Trong số 24 trường hợp phát hiện bằng kỹ thuật MLPA, một trường hợp xóa đoạn đơn lẻ exon 18. Kết quả này không phù hợp với kết quả kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR khi khuếch đại exon 18. Tiến hành giải trình tự exon 18 đã phát hiện ra bệnh nhân có đột biến điểm c.2227C>T (p.Q743X). Đột biến này nằm tại vị trí gắn probe của exon 18 trong phản ứng MLPA, nên đã ngăn cản sự bắt cặp của probe này hoặc làm ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại exon 18 của phản ứng MLPA, làm cho định tính hiệu thu được không rõ ràng. Điều này diễn giải kết quả thu được bằng kỹ thuật MLPA. Nghiên cứu của Tanja Latic và cộng sự cũng phát hiện một trường hợp tương tự ở exon 15, nhóm tác giả cũng tiến hành phản ứng PCR khuếch đại exon 15, cho thấy không có hiện tượng xóa đoạn exon 15, kết quả giải trình tự gen sản phẩm PCR của exon 15 cho thấy cũng có một đột biến tạo mã kết thúc sớm tại vị trí bắt của probe khuếch đại exon 15 trong phản ứng MLPA làm ngăn cản quá trình bắt cặp của probe này [75]. Đây chính là lý do chúng ta cần thiết phải kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR trong trường hợp phát hiện được các đột biến mất đơn lẻ exon bằng kỹ thuật MLPA.

Về tỉ lệ đột biến xóa đoạn, trong nghiên cứu này đã đạt được là 68%, so với các nghiên cứu khác trên thế giới có sự khác biệt. Trong nghiên cứu của tác giả Trimarco (2008) trên quần thể Italia tỉ lệ xóa đoạn là 74.5%. So sánh với một số nước ở khu vực châu Á cho thấy: Nghiên cứu trên bệnh nhân DMD/BMD Trung quốc với cỡ mẫu là 249, Zeng và cộng sự (2008) đã đưa ra tỉ lệ đột biến xóa đoạn là 65%. Nghiên cứu của tác giả Hwa (2007) trên bệnh nhân DMD/BMD Đài loan thì tỉ lệ đột biến xóa đoạn thấp với 36%. Trong khi đó nghiên cứu trên bệnh nhân DMD/BMD Mỹ của 3 tác giả Gaudio (2008) với cỡ mẫu 97 bệnh nhân và Hegde (2008) White (2002) với cỡ mẫu 102 bệnh nhân tỉ lệ xóa đoạn cũng thấp hơn so với nghiên cứu này, tỉ lệ tìm thấy lần lượt là 17.5%, 40% và 36%. Một nghiên cứu của Takeshima và cộng sự (2010) trên 442 bệnh nhân DMD/BMD Nhật bản đã phát hiện được 61% bệnh nhân có đột biến xóa đoạn gen dystrophin [55]. Một nghiên cứu khác của Zimowski JG và cộng sự (2014) nghiên cứu trên 180 bệnh nhân DMD/BMD đã phát hiện được trên 60% bệnh nhân có đột biến xóa đoạn gen dystrophin bằng kỹ thuật MLPA [77]. Tương tự một số nghiên cứu khác của Italia, Canada trên bệnh nhân DMD/BMD bằng kỹ thuật MLPA cũng phát hiện thấy đột biến xóa đoạn từ 60-73% [78, 79]. Các kết quả này cũng khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Tổng hợp các nghiên cứu trên cho thấy, có sự khác biệt về tỉ lệ đột biến xóa đoạn gây bệnh DMD/BMD trên các quần thể và chủng tộc khác nhau.

Về phân bố vùng đột biến xóa đoạn trong nghiên cứu này cho thấy, đột biến xóa đoạn tập trung chủ yếu vùng trung tâm với 97 trường hợp chiếm tỉ lệ 70.8%, tiếp theo là vùng 5' với tỉ lệ 18.2 %, đột biến xóa đoạn dài từ vùng 5'



tận tới vùng trung tâm là 12 trường hợp chiếm tỉ lệ 8.8 %. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu ở một số quốc gia khác như Đức với tỉ lệ đột biến vùng trung tâm lên tới 92.5% tiếp theo là các quốc gia Nhật Bản, Nga, Thổ Nhĩ Kỳ, Israel, Hy Lạp, Tây Ban Nha và Nam Ấn Độ với tỉ lệ giao động trong khoảng từ lần lượt là 76.6-81% [80-85]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chaudhary năm 2009 [86]. Tuy nhiên, kết quả này không có sự tương đồng với tác giả Soong và cộng sự (1991) trên 29 bệnh nhân Trung Quốc. Sự khác biệt này có thể do trong nghiên cứu của tác giả này so với nghiên cứu này và các nghiên cứu khác là do cỡ mẫu quá thấp. Sự tập trung đột biến vào vùng trung tâm trong nghiên cứu này cũng phù hợp nghiên cứu của Prior và cộng sự (2005) về cấu trúc gen dystrophin [5]. Theo tác giả này vùng trung tâm đặc biệt vùng chứa Intron 44, exon 45, intron 45 (vùng dài khoảng 200Kb) là vùng hay xảy ra điểm đứt gãy nhất.

**Bảng 4.2 : So sánh vùng đột biến xóa đoạn với các nghiên cứu khác**

Quốc gia	Tỉ lệ xóa đoạn	Xóa đoạn vùng 5'tận (exon 1-20)	Xóa đoạn vùng trung tâm (exon 42-53)	Tài liệu tham khảo
Trung Quốc	45%	46%	54%	[87]
Đức	59.7%	7.5%	92.5%	[88]
Nhật Bản	43%	21.3%	76.6%	[80]
Nga	41%	36.7%	73.5%	[81]
Thổ Nhĩ Kỳ	45.6%	10.8%	89.2%	[89]
Israel	37%	22%	78%	[82]
Hy Lạp	54.4%	26.5%	73.5%	[83]
Tây Ban Nha	38.5%	20%	80%	[84]
Nam Ấn Độ	72.7%	15.9%	81.8%	[85]
Việt Nam	68%	18.2%	70.8%	Trong nghiên cứu này

Trong nghiên cứu này khi phân tích lặp đoạn, chúng tôi sử dụng công thức của tác giả Lai và cộng sự (2006) như đã được nêu ở phần phương pháp nghiên cứu. Ở bệnh nhân mã số MS120, trên hình ảnh MLPA thu được đỉnh tương ứng với exon 62 cao hơn đỉnh của exon 62 của mẫu chứng, trong khi đó chiều cao các đỉnh tương ứng với các exon khác tương đối bằng nhau. Sau khi tính toán tỉ lệ RPR exon 62 của bệnh nhân so với mẫu chứng, tỉ lệ RPR exon 62 của bệnh nhân gần bằng 2. Điều này chứng tỏ có sự lặp đoạn exon 62 ở bệnh nhân mã số MS120. Trên bệnh nhân khác có mã số 110, dựa trên hình ảnh MLPA thu được và sau khi tính toán tỉ lệ RPR cũng đi đến kết luận bệnh nhân có lặp đoạn exon 3-7. Với ưu điểm kỹ thuật MLPA đã phát hiện được thêm 14 trường hợp có đột biến lặp đoạn trên tổng số 201 bệnh nhân phân

tích chiếm tỉ lệ 7%. Tỉ lệ này tương đồng với một số nghiên cứu khác trên thế giới. Nghiên cứu của Casanar (2010) và Latic (2005) tỉ lệ phát hiện thấy đột biến lặp đoạn là 7.3%. Nghiên cứu trên bệnh nhân Trung Quốc của tác giả Wang (2008) và Zeng (2008) lần lượt phát hiện được đột biến lặp đoạn là 6.2% và 5%. Một nghiên cứu khác của tác giả Takeshima (2010) và cộng sự trên 442 bệnh nhân Nhật tỉ lệ phát hiện đột biến lặp đoạn là 8% [55]. Tuy nhiên, tỉ lệ đột biến lặp đoạn lại khá cao trên quần thể Mỹ với các tỉ lệ lần lượt là 26.4%, 25%, 14.4% của các tác giả White (2002), Hegde (2008), Gaudio (2008). Đây là điểm mới trong nghiên cứu của này so với các nghiên cứu trước đó ở Việt Nam.

Về phân bố vùng đột biến lặp đoạn trong nghiên cứu này cho thấy, đột biến lặp đoạn tập trung chủ yếu vùng 5' tận với 8 trường hợp chiếm tỉ lệ 57%, vùng trung tâm chiếm tỉ lệ thấp với 1 trường hợp, chiếm tỉ lệ 7% và 1 trường hợp bệnh nhân có đột biến kéo dài từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm chiếm tỉ lệ 7%. Ngoài ra 4 bệnh nhân có đột biến ở ngoài vùng 5' tận và vùng trung tâm chiếm tỉ lệ 29%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu ở một số quốc gia khác [78, 90-93].

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được 9 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn nhiều exon chiếm tỉ lệ 64%. Đột biến lặp đoạn 1 exon chiếm tỉ lệ thấp hơn là 29% với 4 trường hợp. Chúng tôi phát hiện được 1 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn ở 2 vị trí exon 11-20 và exon 51-60 chiếm tỉ lệ 7%. Đột biến lặp đoạn 2 vùng trên gen dystrophin cũng đã được phát hiện trong một số nghiên cứu trước đây [77, 94].

**Bảng 4.3: So sánh tỉ lệ đột biến lặp đoạn và xóa đoạn**

Quốc gia	Số lượng bệnh nhân	Xóa đoạn	Lặp đoạn	Tổng số	Tài liệu tham khảo
Italy	164	73.8%	7.3%	81.1%	[78]
Italy	506	74.5%	10.1%	84.6%	[90]
Serbia	123	63.4%	7.3%	70.7%	[75]
Trung Quốc	179	66.2%	6.2%	69.2%	[92]
Trung Quốc	249	65.0%	5.0%	70.0%	[91]
Canada	165	60.1%	9.1%	69.2%	[79]
Đức	150	42.0%	7.3%	49.3%	[48]
Mỹ	72	36.0%	26.4%	62.4%	[95]
Mỹ	102	40.0%	25.0%	65.0%	[96]
Mỹ	97	17.5%	14.4%	31.9%	[93]
Đài Loan	89	36 %	24.7%	60.7%	[97]
Nhật Bản	442	61%	9%	70%	[55]
Ba Lan	180	61.1 %	12.2 %	73.3%	[77]
Việt Nam	201	68%	7%	75%	Trong nghiên cứu này

Trong nghiên cứu này tỉ lệ lặp đoạn và xóa đoạn thu được là 75% gần với nghiên cứu của Antonella Carsana ( 81.1%) của Trimarco ( 84.6 % trong tổng số 506 bệnh nhân nghiên cứu. Cao hơn nhiều so với các nghiên cứu ở Mỹ, Đức và Đài Loan. Ở Việt Nam, các nghiên cứu đa số mới chỉ dừng ở mức độ xác định đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật Multiplex PCR như các nghiên cứu của Nguyễn Thị Phượng năm 2002, Nguyễn Thị Phương Mai năm 2007 [58, 63]. Tuy nhiên, các nghiên cứu bằng kỹ thuật Multiplex PCR với 19 cặp mồi chỉ xác định được các đột biến hay gặp ở vùng hotspot và không

xác định được vị trí kết thúc của đột biến (deletion end point) đối với những đột biến xóa đoạn nhiều exon. Một kỹ thuật nữa có nhiều ưu điểm hơn đó là xác định đột biến xóa đoạn ở mức độ mRNA của tác giả Nguyễn Thị Băng Sương và cộng sự áp dụng [65]. Với kỹ thuật này tác giả đã phát hiện được 20 trên tổng số 40 bệnh nhân nghiên cứu chiếm tỉ lệ 50%. Tỉ lệ này thấp hơn nhiều so với 68% đột biến xóa đoạn trong nghiên cứu này. Tuy là một kỹ thuật mới có nhiều ưu điểm hơn so với kỹ thuật PCR cổ điển hay Multiplex PCR nhưng kỹ thuật này cũng mới chỉ dừng lại ở mức phát hiện đột biến xóa đoạn và người mang gen xóa đoạn. So với kỹ thuật MLPA không những có thể phát hiện xóa đoạn, người mang gen xóa đoạn mà còn có thể phát hiện đột biến lặp đoạn và người mang gen lặp đoạn.

#### ***4.2.2. Đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen***

Những bệnh nhân không phát hiện được đột biến bằng kỹ thuật MLPA sẽ được tiến hành giải trình tự toàn bộ 79 exon ở mức độ cDNA. Kết quả đã phát hiện được 31/201 (15%) bệnh nhân có đột biến điểm. Trong đó, 20 bệnh nhân có đột biến vô nghĩa (nonsense mutation) còn lại là các đột biến thêm nucleotid, mất nucleotid. Tỉ lệ về đột biến điểm trong nghiên cứu này so với tác giả Yasuhiro Takeshima và cộng sự khi nghiên cứu trên 442 bệnh nhân DMD Nhật bản là khá tương đồng. Tỉ lệ phát hiện được đột biến điểm trong nghiên cứu của Yasuhiro Takeshima và cộng sự là 16%. Trong 20 đột biến vô nghĩa có 14 đột biến thay thế nucleotid C>T, 1 đột biến thay thế nucleotid A>T và 3 đột biến thay thế nucleotid G>T, một đột biến G>A như trong các nghiên cứu khác trên số lượng bệnh nhân lớn ví dụ như của Kevin M. Flanigan năm 2009 và Yasuhiro Takeshima năm 2010 [55, 94]. Đối với bệnh nhân có đột biến vô nghĩa, quá trình tổng hợp protein dystrophin sẽ bị dừng lại khi xuất hiện bộ 3 kết thúc này. Như vậy, cấu trúc protein sẽ bị cắt ngắn và

bị thay đổi làm mất chức năng, gây nên bệnh DMD. Trong nghiên cứu này đột biến thay thế nucleotid C bằng T là hay gặp nhất. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Takeshima và cộng sự (2010) với 33/40 trường hợp đột biến vô nghĩa. Các đột biến nằm rải rác các exon. Riêng ở exon 43 gặp 3 trường hợp bao gồm đột biến xóa đoạn và thêm đoạn nhỏ. Đột biến mất và thêm đoạn nhỏ đa số làm lệch khung dịch mã gây nên bệnh DMD. Những đột biến này làm lệch khung dịch mã và tạo ra mã kết thúc sớm (stop codon). Ví dụ, đột biến c.6274 InsTA trên bệnh nhân MS121, đột biến này là đột biến thêm 2 nucleotid TA vào vị trí nucleotide 6274 trên cDNA. Đột biến này làm lệch khung dịch mã khi biến đổi bộ 3 TAC mã hóa acid amin Tyrosine (Y) thành bộ 3 TTA mã hóa acid amin Leucine (L). Không những vậy, đột biến này còn tạo ra stop codon ở vị trí acid amin 2114 (sau vị trí đột biến 22 acid amin). Đột biến này làm thay thế hoàn toàn cấu trúc và chức năng protein dystrophin gây lên bệnh DMD. Ở đột biến khác trên bệnh nhân MS146 có đột biến c.4186InsA, đột biến này tạo lên stop codon ngay tại vị trí đột biến.

Về tỉ lệ các dạng đột biến điểm. Đột biến tạo mã kết thúc sớm (stop codon) chiếm ưu thế với 20/201 (10%) trường hợp, đột biến thêm hay xóa nucleotid chiếm tỉ lệ ít hơn với 10/201 (5%) trường hợp. Tỉ lệ này tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Takeshima (2010) [55].

Nghiên cứu cũng đã phát hiện được 1 bệnh nhân có đột biến tại vị trí splicing site làm ảnh hưởng đến quá trình phiên mã gen.

Tổng hợp lại kết quả cho thấy, đã phát hiện được 91% bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne có đột biến gen dystrophin và 9% bệnh nhân DMD/BMD chưa phát hiện thấy đột biến gen dystrophin, điều này có thể do một số đột biến nằm ở vùng intron mà nghiên cứu này chưa tìm thấy. Có thể nói đây là

một nghiên cứu toàn diện nhất về phát hiện đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne Việt Nam. Đây là cơ sở quan trọng giúp phát hiện người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh để có những tư vấn di truyền thích hợp, nhằm làm giảm tỉ lệ mắc bệnh. Kết quả này cũng là tiền đề quan trọng để hướng tới liệu pháp điều trị gen cho bệnh nhân DMD Việt Nam trong tương lai.

#### **4.3 Một số ứng dụng của bản đồ đột biến trong điều trị và chẩn đoán người mang gen**

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh di truyền gây hậu quả nặng nề với bản thân bệnh nhân, gia đình và xã hội. Do chưa có thuốc điều trị triệt để nên việc điều trị bằng liệu pháp gen, chẩn đoán người mang gen và tư vấn di truyền sẽ giúp phần nâng cao chất cuộc sống cho bệnh nhân, gia đình.

Trong nghiên cứu này, với kết quả đột biến trên bệnh nhân, các nghiên cứu tiếp theo đã được tiến hành để xác định sự mang gen bệnh cho các người nhà bệnh nhân. Với sự biết trước các đột biến, việc xác định mang gen bệnh cho người nhà bệnh nhân trở nên dễ dàng và thuận tiện hơn nhiều.

Việc phát hiện được số lượng lớn bệnh nhân có đột biến gen dystrophin sẽ là nguồn dữ liệu di truyền quan trọng giúp cho việc xác định người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh, trên cơ sở đó sẽ có những tư vấn di truyền thích hợp nhằm giảm tỉ lệ mắc bệnh trong cộng đồng. Hơn nữa, với sự phát triển của các liệu pháp điều trị gen, nguồn dữ liệu di truyền này sẽ làm tiền đề cho việc áp dụng các liệu pháp điều trị phù cho những ca bệnh riêng biệt. Điều này thật sự có ý nghĩa to lớn khi mà tại nước ta hiện nay các phương pháp điều trị mới dừng lại ở điều trị nội khoa.

Một ý nghĩa quan trọng nữa của việc xác định đột biến gen là sẽ giúp cho việc lập bản đồ đột biến gen để có thể áp dụng các liệu pháp điều trị gen thích hợp cho mỗi bệnh nhân. Nhóm nghiên cứu của Barton và cộng sự đã tiến hành các thử nghiệm đánh giá hoạt tính readthrough của gentamicin trên mô hình chuột *mdx* bị đột biến mang mã dừng ở codon 23 gen dystrophin. Kết quả cho thấy gentamicin có khả năng tăng cường sự tổng hợp dystrophin lên tới 20% và phục hồi phức hợp DGC (Dystrophin-Glycoprotein-complex) tại màng tế bào cơ [56]. Đây là tiền đề dẫn tới những thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân DMD bị đột biến vô nghĩa (chiếm 16% tổng số các bệnh nhân DMD) nhằm đánh giá hiệu quả của gentamicin giúp phục hồi khả năng tổng hợp dystrophin. Những nghiên cứu về mối liên quan giữa đột biến gen và thể bệnh tương ứng không những mang lại hiểu biết sâu sắc hơn về cấu trúc gen dystrophin mà còn giúp các nhà khoa học tìm ra sự khác biệt về cơ chế gây bệnh giữa DMD và BMD. Thống kê cho thấy dạng đột biến phổ biến nhất ở cả hai nhóm bệnh nhân này đều là đột biến xóa đoạn, tuy nhiên ảnh hưởng của những đột biến này lên quá trình dịch mã dystrophin là hoàn toàn khác nhau. Nếu như đột biến ở bệnh nhân DMD làm sai lệch khung dịch mã (out of frame), gây rối loạn quá trình tổng hợp dystrophin thì ở bệnh nhân BMD khung dịch mã vẫn được bảo toàn (inframe) [98]. Các tế bào vẫn sản xuất được một lượng nhất định protein dystrophin có chức năng, do đó bệnh nhân BMD thường biểu hiện bệnh nhẹ hơn nhiều so với bệnh nhân DMD. Phát hiện này giúp các nhà khoa học hướng tới ý tưởng: chủ động gây xóa exon cần thiết trên gen dystrophin nhằm khôi phục lại khung dịch mã ở các bệnh nhân DMD, giúp chuyển từ thể bệnh nặng sang thể bệnh nhẹ. Điều này được thực hiện thông qua việc tác động trực tiếp vào các yếu tố điều khiển



quá trình cắt nối exon-intron. Có nhiều kết quả nghiên cứu đã chứng minh bằng việc gây xóa đoạn exon nhằm phục hồi khung dịch mã, các nhà khoa học đã thành công trong việc tăng cường quá trình tổng hợp dystrophin ở các mô hình tế bào và động vật thực nghiệm, áp dụng cho các dạng đột biến xóa đoạn, lặp đoạn, vô nghĩa chiếm 86% tổng số các dạng đột biến gen dystrophin [55]. Theo nghiên cứu của tác giả Takeshima và cộng sự trong số các đột biến tìm được có 260 bệnh nhân có triển vọng áp dụng liệu pháp điều trị gen bao gồm 66 bệnh nhân đột biến vô nghĩa và 194 bệnh nhân DMD có đột biến xóa đoạn. Đối với bệnh nhân đột biến vô nghĩa áp dụng liệu pháp gen làm bất hoạt hay bỏ qua các stop codon nhờ đó quá trình tổng hợp protein dystrophin vẫn diễn ra bình thường [56, 99]. Các đột biến xóa đoạn có thể điều trị bằng phương pháp gây skipping exon chuyển thể bệnh nặng DMD sang thể bệnh nhẹ BMD. Trong các đột biến xóa đoạn có thể gây skipping thì tỉ lệ skip exon 51 thường cao nhất như trong nghiên cứu của Takeshima và cộng sự. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra tỉ lệ là đột biến tạo stop codon chiếm 12%, số bệnh nhân có thể gây skip exon 51 là 35 trường hợp với 35,7%, exon 53 là 22 trường hợp với 22,4% và exon 45 là 21 trường hợp với 21,4%, và exon 44 là 5 trường hợp với 5,1%. Các tỉ lệ này so với tỉ lệ mà tác giả Takeshima và một số nghiên cứu trước đây đã công bố là có sự tương đồng [55, 100, 101].

## KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi đưa ra kết luận sau:

### **1. Xác định đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD**

Đã phát hiện được 182/201 bệnh nhân DMD/BMD có đột biến gen dystrophin chiếm tỉ lệ 91%.

Các dạng đột biến được phát hiện bao gồm: Đột biến xóa đoạn chiếm tỉ lệ cao nhất với 75,3%, đứng thứ hai là đột biến điểm chiếm tỉ lệ 17%, đột biến lặp đoạn chiếm tỉ lệ thấp nhất với 7,7%.

### **2. Xây dựng bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam**

Bước đầu đã xây dựng thành công bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam.

Đột biến xóa đoạn chủ yếu tập trung ở vùng trung tâm (70,8%) và vùng 5' tận (18,2%).

Đột biến lặp đoạn chủ yếu tập trung ở vùng 5' tận, chiếm tỉ lệ 57%.

Đột biến điểm không tập trung ở vùng đột biến trọng điểm mà nằm rải rác trên các exon từ exon 3-51. Trong đó, đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm tỉ lệ cao nhất (65%), tiếp theo là đột biến thêm và mất nucleotid (32%), phát hiện một đột biến ở vị trí splicing (3%).

## **KIẾN NGHỊ**

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam.
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về người mang gen bệnh DMD/BMD.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những người mang gen bệnh trước - trong quá trình mang thai.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC  
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Đỗ Ngọc Hải, Trần Văn Khánh, Tạ Minh Hiếu, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn (2012), “Xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen dystrophin trên bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne”, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 80(3C), tr 8-14.
2. Đỗ Ngọc Hải, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn, Trần Văn Khánh (2012), “Phân tích đột biến gen Dystrophin trên bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne”, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 80(4), tr. 1 - 6.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kliegman, Robert, et al. (2012), *Nelson textbook of pediatrics*, Elsevier/Saunders.
2. Bushby, K., et al. (2010), "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care", *Lancet Neurol.* 9(2), pp. 177-89.
3. Kneppers, A. L., Ginjaar, I. B., and Bakker, E. (2004), "Duchenne and Becker muscular dystrophy", *Methods Mol Med.* 92, pp. 311-41.
4. Den Dunnen, J. T., et al. (1992), "Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination", *Hum Mol Genet.* 1(1), pp. 19-28.
5. Prior, T. W. and Bridgeman, S. J. (2005), "Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy", *J Mol Diagn.* 7(3), pp. 317-26.
6. Tạ Thành Văn (2011), *Bệnh loạn dưỡng cơ Duchene và Becker*, Bệnh học phân tử, Nhà xuất bản Y học.
7. Meryon, E. (1852), "On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles", *Med Chir Trans.* 35, pp. 73-84 1.
8. Behrman J, Kliegman L, and Arvin E (1998), *Neuromuscular Disorders*, 15 ed, Nelson textbooks of pediatrics.
9. Clarke, J. L. and Gowers, W. R. (1874), "On a Case of Pseudo-hypertrophic Muscular Paralysis", *Med Chir Trans.* 57, pp. 247-260 5.

10. Zatz, M., et al. (1991), "Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy", *J Neurol Sci.* 102(2), pp. 190-6.
11. Bodrug, S. E., et al. (1987), "Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy", *Science.* 237(4822), pp. 1620-4.
12. Hoffman, E. P., Brown, R. H., and Kunkel, L. M. (1987), "Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus", *Cell.* 51, pp. 919-928.
13. Emery, A. E. (1993), "Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease", *Neuromuscul Disord.* 3(4), pp. 263-6.
14. Emery, A. E. (2002), "The muscular dystrophies", *Lancet.* 359(9307), pp. 687-95.
15. Ozawa, E., Hagiwara, Y., and Yoshida, M. (1999), "Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy", *Mol Cell Biochem.* 190(1-2), pp. 143-51.
16. Sabatelli, Patrizia, et al. (2012), *Cytoskeletal and extracellular matrix alterations in limb girdle muscular dystrophy 2I muscle fibers.*
17. Drachman, D. B., Toyka, K. V., and Myer, E. (1974), "Prednisone in Duchenne muscular dystrophy", *Lancet.* 2(7894), pp. 1409-12.
18. Balaban, B., et al. (2005), "Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect", *Am J Phys Med Rehabil.* 84(11), pp. 843-50.

19. Yilmaz, O., Karaduman, A., and Topaloglu, H. (2004), "Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis", *Eur J Neurol.* 11(8), pp. 541-4.
20. Fabb, S. A., et al. (2002), "Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice", *Hum. Mol. Genet.* 11, pp. 733-741.
21. van Deutekom, Judith C. T. and van Ommen, Gert-Jan B. (2003), "Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy", *Nat Rev Genet.* 4(10), pp. 774-783.
22. Palmer, Edward, Wilhelm, James M., and Sherman, Fred (1979), "Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics", *Nature.* 277(5692), pp. 148-150.
23. Dunckley, M. G., et al. (1998), "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides", *Hum. Mol. Genet.* 7, pp. 1083-1090.
24. Blencowe, B. J. (2000), "Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases", *Trends Biochem Sci.* 25, pp. 106-110.
25. Cartegni, Luca, Chew, Shern L., and Krainer, Adrian R. (2002), "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing", *Nat Rev Genet.* 3(4), pp. 285-298.
26. Mullard, Asher (2013), "Make or break for first splice-modulating agents", *Nat Rev Drug Discov.* 12(11), pp. 813-815.

27. Foster, K., Foster, H., and Dickson, J. G. (2006), "Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy", *Gene Ther.* 13(24), pp. 1677-85.
28. Matsuo, M. (2002), "Duchenne and Becker muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy", *IUBMB Life.* 53(3), pp. 147-52.
29. Gussoni, E. (1999), "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation", *Nature.* 401, pp. 390-394.
30. Gussoni, E., Blau, H. M., and Kunkel, L. M. (1997), "The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients", *Nature Med.* 3, pp. 970-977.
31. Bar, S., et al. (1990), "A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution", *Biochem J.* 272(2), pp. 557-60.
32. Trần Văn Khánh (2005), "Đột biến ở vùng rod của gen dystrophin gây nên bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne", *Tạp chí Y học Việt Nam.* 6, pp. 33-9.
33. Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1993), "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin", *J. Cell. Biol.* 122, pp. 809-823.
34. Matsumura, K. and Campbell, K. P. (1994), "Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies", *Muscle Nerve.* 17(1), pp. 2-15.
35. Dickson, G. and Brown, S. C. (1995), "Duchenne muscular dystrophy", *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 5, pp. 261-80.
36. Bushby, K. M. (1992), "Recent advances in understanding muscular dystrophy", *Arch Dis Child.* 67(10), pp. 1310-2.



37. Blake, Derek J., et al. (2002), *Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle*, Vol. 82, 291-329.
38. Nguyễn Thị Hoàn, Nguyễn Thanh Liêm và cộng sự (2006), "Đột biến mất đoạn gene Dystrophin của các bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchene/Becker Việt Nam", *Tạp chí Nhi khoa*. tập 14 - số đặc biệt, pp. 202 – 208.
39. Monaco, A. P., et al. (1988), "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus", *Genomics*. 2(1), pp. 90-5.
40. Grimm, T., et al. (1994), "On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis", *J Med Genet*. 31(3), pp. 183-6.
41. Tuffery-Giraud, S., et al. (1999), "Point mutations in the dystrophin gene: evidence for frequent use of cryptic splice sites as a result of splicing defects", *Hum Mutat*. 14(5), pp. 359-68.
42. Korf, Bruce (1995), "Molecular diagnosis", *New England Journal of Medicine*. 332(22), pp. 1499-1502.
43. Nguyễn Thị Băng Sương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Hoàn và cộng sự (2008), "Phát hiện người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng phương pháp PCR định lượng", *Tạp chí Nghiên cứu y học*. 59(6), pp. 1 - 10.
44. Lai, K. K., et al. (2006), "Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)", *Clin Biochem*. 39(4), pp. 367-72.

45. Schouten, J. P., et al. (2002), "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification", *Nucleic Acids Res.* 30(12), p. e57.
46. Schwartz, M and Dunø, M (2005), "Multiplex ligation-dependent probe amplification is superior for detecting deletions/duplications in Duchenne muscular dystrophy", *Clin Genet.* 67(2), pp. 189-191.
47. Schwartz, Marianne and Dunø, Morten (2004), "Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method", *Genetic testing.* 8(4), pp. 361-367.
48. Janssen, B., et al. (2005), "MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls", *Neurogenetics.* 6(1), pp. 29-35.
49. Li, H., et al. (2009), "[Combining approach with multiplex PCR and MLPA to detect deletion and duplication in DMD patients, carriers, and prenatal diagnosis]", *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 26(3), pp. 318-22.
50. Marzese, D. M., et al. (2008), "Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families", *Genet Mol Res.* 7(1), pp. 223-33.
51. Shendure, Jay and Ji, Hanlee (2008), "Next-generation DNA sequencing", *Nat Biotech.* 26(10), pp. 1135-1145.
52. Sakthivel, Murugan SM, Chandramohan, Arthi, and Lakshmi, Bremadesam Raman (2010), "Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis".

53. Torella, Annalaura, et al. (2010), "One hundred twenty-one dystrophin point mutations detected from stored DNA samples by combinatorial denaturing high-performance liquid chromatography", *The Journal of Molecular Diagnostics*. 12(1), pp. 65-73.
54. Prior, Thomas W, et al. (1995), "Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region", *American journal of human genetics*. 57(1), p. 22.
55. Takeshima, Yasuhiro, et al. (2010), "Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center", *Journal of human genetics*. 55(6), pp. 379-388.
56. Barton-Davis, E. R., et al. (1999), "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice", *J. Clin. Invest.* 104, pp. 375-381.
57. Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thị Phương (1996), *Giá trị của CK trong chẩn đoán và phát hiện dị hợp tử của bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne*, Di truyền học và ứng dụng, Vol. 2, Hội di truyền học Việt Nam xuất bản.
58. Nguyễn Thị Phương, Vũ Chí Dũng (2002), "Kết quả bước đầu phát hiện đột biến gen gây bệnh DMD ở Việt Nam", *Tạp chí Nhi khoa*. 10(10), pp. 521-6.
59. Trần Văn Khánh và cộng sự (2004), "Chẩn đoán 85 bệnh nhân Việt Nam mắc bệnh nhược cơ Duchenne/Becker bằng phương pháp polymerase chain reaction", *Tạp chí Y học Việt Nam*. 12, pp. 33-8.

60. Nguyễn Thị Trang, Hoàng Hạnh Phúc và cộng sự (2004), "Định lượng creatine kinase phối hợp với lâm sàng và phân tích phá hệ góp phần chẩn đoán một số bệnh cơ di truyền", *Tạp chí Nghiên cứu y học*. 32(6), pp. 133-9.
61. Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thị Hoàn (2005), Phát hiện đột biến mất đoạn gen dystrophin ở một số bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Multiplex PCR, *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Báo cáo hội nghị toàn quốc 3/11/2005, pp. 1435-7.
62. Nguyễn Thị Trang và cộng sự (2006), "Phát hiện đột biến mất đoạn exon 46 và 51 gen dystrophin ở một số bệnh nhân DMD bằng kỹ thuật PCR", *Tạp chí nghiên cứu y học*. 45(5), pp. 18-23.
63. Nguyễn Thị Phương Mai, Vũ Chí Dũng, Hoàng Thị Thanh và cộng sự (2007), Áp dụng kỹ thuật multiplex PCR thay thế PCR cổ điển trong phân tích gen dystrophin ở các bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne, *Hội nghị nhi khoa Việt Úc*, Editor Editors, Bệnh viện Nhi đồng 1 TP HCM, p. 111.
64. Nguyễn Khắc Hân Hoan, Phạm Ngọc Khôi và cộng sự (2009), "Phát hiện đột biến mất đoạn gen gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchene và Becker bằng kỹ thuật MLPA", *Y học TP. Hồ Chí Minh*. 13(2), pp. 169 – 175.
65. Nguyễn Thị Băng Sương, Trần Vân Khánh và cộng sự (2009), "Xác định đột biến mất đoạn gen dystrophin ở mức độ mRNA", *Tạp chí Y học TP HCM*. 13(2), pp. 98 – 104.
66. Rappolee, Daniel A, et al. (1989), "Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells", *Journal of cellular biochemistry*. 39(1), pp. 1-11.

67. Bennett, R. R., et al. (2001), "Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing", *BMC Genet.* 2, p. 17.
68. Roberts, Roland G, et al. (1993), "Exon structure of the human dystrophin gene", *Genomics.* 16(2), pp. 536-538.
69. Ahn, Andrew H and Kunkel, Louis M (1993), "The structural and functional diversity of dystrophin", *Nature genetics.* 3(4), pp. 283-291.
70. Adeli, K and Ogbonna, G. (1990), "Rapid purification of human DNA from whole blood for potential application in clinical chemistry laboratories", *Clinical chemistry.* 36(2), pp. 261-264.
71. Tay, Stacey Kiat Hong, et al. (2006), "Diagnostic strategy for the detection of dystrophin gene mutations in asian patients and carriers using immortalized cell lines", *Journal of child neurology.* 21(2), pp. 150-155.
72. Armour, JAL, et al. (2002), "The detection of large deletions or duplications in genomic DNA", *Human mutation.* 20(5), pp. 325-337.
73. Den Dunnen, JT, et al. (1989), "Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications", *American journal of human genetics.* 45(6), p. 835.
74. Stuppia, Liborio, et al. (2012), "Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases", *International journal of molecular sciences.* 13(3), pp. 3245-3276.

75. Lalic, Tanja, et al. (2005), "Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA", *European journal of human genetics*. 13(11), pp. 1231-1234.
76. Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L. M. (1988), "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein", *Cell*. 53, pp. 219-226.
77. Zimowski, J. G., et al. (2014), "MLPA based detection of mutations in the dystrophin gene of 180 Polish families with Duchenne/Becker muscular dystrophy", *Neurol Neurochir Pol*. 48(6), pp. 416-22.
78. Carsana, Antonella, et al. (2010), "A 15-year molecular analysis of DMD/BMD: genetic features in a large cohort", *Front Biosci (Elite Ed)*. 2, pp. 547-58.
79. Stockley, Tracy L, et al. (2006), "Strategy for comprehensive molecular testing for Duchenne and Becker muscular dystrophies", *Genetic testing*. 10(4), pp. 229-243.
80. Hiraishi, Yoshiyuki, et al. (1992), "Quantitative Southern blot analysis in the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications", *Journal of medical genetics*. 29(12), pp. 897-901.
81. Baranov, VS, et al. (1993), "Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia", *Prenatal diagnosis*. 13(5), pp. 323-333.
82. Shomrat, Ruth, et al. (1994), "Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients", *American journal of medical genetics*. 49(4), pp. 369-373.

83. Florentin, Lina, et al. (1995), "Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece", *Journal of medical genetics*. 32(1), pp. 48-51.
84. Patiño, Ana, Narbona, Juan, and García-Delgado, Marina (1995), "Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in Spanish individuals: Deletion detection and familial diagnosis", *American journal of medical genetics*. 59(2), pp. 182-187.
85. Singh, Vinita, et al. (1997), "Proportion and pattern of dystrophin gene deletions in north Indian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients", *Human genetics*. 99(2), pp. 206-208.
86. Chaudhary, Adeel G, et al. (2008), "Mutation analysis in Saudi Duchenne and Becker muscular dystrophy patients using multiplex PCR", *ARCHIVES OF MEDICAL SCIENCE*. 4(1), p. 16.
87. Soong, Bing-Wen, et al. (1991), "DNA polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne–Becker muscular dystrophy gene in the chinese", *American journal of medical genetics*. 38(4), pp. 593-600.
88. Niemann-Seyde, Susanne, et al. (1992), "Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy", *Human genetics*. 90(1-2), pp. 65-70.
89. Gökgöz, Nalan, et al. (1993), "Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR", *Clinical genetics*. 43(5), pp. 261-266.
90. Trimarco, Amelia, et al. (2008), "Log-PCR: A New Tool for Immediate and Cost-Effective Diagnosis of up to 85% of Dystrophin Gene Mutations", *Clinical Chemistry*. 54(6), pp. 973-981.

91. Zeng, Fanyi, et al. (2008), "Array-MLPA: comprehensive detection of deletions and duplications and its application to DMD patients", *Human mutation*. 29(1), pp. 190-197.
92. Wang, Xiaozhu, et al. (2008), "Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global populations", *Behav Brain Funct*. 4(20), pp. 1-9.
93. Gaudio, Daniela del, et al. (2008), "Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy: enhanced detection of dystrophin gene rearrangements by oligonucleotide array-comparative genomic hybridization", *Human mutation*. 29(9), pp. 1100-1107.
94. Flanigan, Kevin M, et al. (2009), "Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort", *Human mutation*. 30(12), pp. 1657-1666.
95. White, Stefan, et al. (2002), "Comprehensive Detection of Genomic Duplications and Deletions in the DMD Gene, by Use of Multiplex Amplifiable Probe Hybridization", *The American Journal of Human Genetics*. 71(2), pp. 365-374.
96. Hegde, Madhuri R, et al. (2008), "Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene", *Human mutation*. 29(9), pp. 1091-1099.
97. Hwa, Hsiao-Lin, et al. (2007), "Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects", *Journal of the Formosan Medical Association*. 106(5), pp. 339-346.



98. Sherratt, T. G., et al. (1993), "Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene", *Am J. Hum. Genet.* 53, pp. 1007-1015.
99. Welch, Ellen M, et al. (2007), "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations", *Nature.* 447(7140), pp. 87-91.
100. Cirak, Sebahattin, et al. (2011), "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study", *The Lancet.* 378(9791), pp. 595-605.
101. Bérout, Christophe, et al. (2007), "Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy", *Human mutation.* 28(2), pp. 196-202.

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên cho phép tôi xin bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới TS. Trần Văn Khánh, Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội là người hướng dẫn khoa học, người Thầy đã hết lòng giúp đỡ, dìu dắt tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu, truyền đạt kiến thức và những kinh nghiệm quý báu, cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi để giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Tạ Thành Văn, Phó hiệu trưởng, Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã định hướng, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như tạo mọi thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án ngày hôm nay.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thị Hà, nguyên Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã giúp đỡ và truyền cho tôi những kinh nghiệm quý báu trong học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:

PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc, Trưởng Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội, Trưởng khoa Sinh hóa, Bệnh viện Bạch Mai đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Các Nghiên cứu viên tại Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ, tạo điều kiện, chia sẻ những kinh nghiệm quý báu để tôi thực hiện các kỹ thuật nghiên cứu và hoàn thành đề tài này.

Các Thầy, Cô trong Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội đã dạy dỗ và truyền đạt những kiến thức quý báu trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Các Bác sĩ, y tá Bệnh Viện Nhi Trung ương đã trực tiếp giúp đỡ tôi trong việc thu thập mẫu nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến:

- Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- Ban Giám đốc, các Phòng ban chức năng, các Cán bộ viên chức Khoa Sinh hóa Bệnh viện Hữu Nghị Việt Tiệp Hải Phòng đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

- Xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân đã giúp đỡ tôi có được số liệu trong luận án này.

- Xin cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên tôi rất nhiều trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của Cha mẹ tôi, cùng sự ủng hộ, giúp đỡ, động viên của vợ, con trai, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

*Hà Nội, ngày 3 tháng 11 năm 2015*

Đỗ Ngọc Hải

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Đặc điểm của bệnh DMD .....	3
1.1.1. Lịch sử phát hiện bệnh.....	3
1.1.2. Biểu hiện lâm sàng của DMD .....	5
1.1.3. Xét nghiệm cận lâm sàng.....	7
1.1.4. Điều trị bệnh DMD.....	11
1.1.5. Di truyền học của bệnh DMD .....	20
1.1.6. Bệnh học phân tử bệnh DMD.....	22
1.2. Các dạng đột biến cấu trúc của gen dystrophin.....	27
1.2.1. Đột biến xóa đoạn gen .....	27
1.2.2. Đột biến lặp đoạn gen.....	29
1.2.3. Đột biến điểm và những đột biến nhỏ khác.....	29
1.3. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen dystrophin .....	30
1.3.1. Kỹ thuật PCR.....	30
1.3.2. Kỹ thuật FISH.....	31
1.3.3. Kỹ thuật Southern blot.....	32
1.3.4. Kỹ thuật MLPA .....	33
1.3.5. Kỹ thuật giải trình tự gen bằng máy tự động.....	38
1.4. Tình hình nghiên cứu bệnh DMD .....	39
1.4.1. Trên thế giới.....	39
1.4.2. Tại Việt Nam .....	42
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>45</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	45
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	45
2.3. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất nghiên cứu.....	46
2.3.1. Dụng cụ.....	46
2.3.2. Hoá chất .....	46

2.4. Quy trình nghiên cứu.....	49
2.4.1. Lấy mẫu .....	49
2.4.2. Địa điểm nghiên cứu.....	49
2.4.3. Quy trình.....	49
2.4.4. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm.....	57
2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu .....	59
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>60</b>
3.1. Kết quả tách chiết DNA, RNA, tổng hợp cDNA .....	60
3.2. Kết quả xác định đột biến gen dystrophin.....	61
3.2.1. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA .....	61
3.2.2. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen .....	74
3.3 Bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam....	78
3.3.1. Phân bố các dạng đột biến gen dystrophin .....	78
3.3.2. Phân bố các dạng đột biến xoá đoạn gen dystrophin .....	81
3.3.3. Phân bố các dạng đột biến lặp đoạn gen dystrophin .....	82
3.3.4. Phân bố các dạng đột biến điểm gen dystrophin .....	84
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>87</b>
4.1. Quy trình tách chiết DNA, RNA và tổng hợp cDNA .....	88
4.2. Xác định đột biến gen dystrophin .....	90
4.2.1. Xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA.....	90
4.2.2. Đột biến điểm bằng kỹ thuật giải trình tự gen.....	105
4.3. Một số ứng dụng của bản đồ đột biến trong điều trị và chẩn đoán người mang gen .....	107
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>110</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>111</b>
<b>MỘT SỐ CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1.	Kiểu gen bố mẹ và tỷ lệ bị bệnh ở thế hệ con.....	21
Bảng 3.1.	Kết quả phát hiện đột biến xóa đoạn gen dystrophin .....	68
Bảng 3.2.	Kết quả phát hiện đột biến lặp đoạn trên gen dystrophin .....	72
Bảng 3.3.	Kết quả đột biến điểm trên gen dystrophin.....	77
Bảng 3.4.	Tỉ lệ phân bố các dạng đột biến gen dystrophin.....	78
Bảng 3.5.	Tỉ lệ phân bố các dạng đột biến gen trên bệnh nhân DMD và BMD .....	79
Bảng 3.6.	Tỉ lệ các dạng đột biến xóa đoạn .....	81
Bảng 3.7.	Tỉ lệ phân bố vùng đột biến xóa đoạn .....	82
Bảng 3.8.	Tỉ lệ các dạng đột biến lặp đoạn.....	82
Bảng 3.9.	Tỉ lệ phân bố vùng đột biến lặp đoạn .....	83
Bảng 3.10.	Tỉ lệ phân bố các dạng đột biến điểm.....	84
Bảng 4.1.	Ưu và nhược điểm của kỹ thuật MLPA so với một số kỹ thuật sinh học phân tử thông dụng khác .....	93
Bảng 4.2.	So sánh vùng đột biến xóa đoạn với các nghiên cứu khác .....	102
Bảng 4.3.	So sánh tỉ lệ đột biến lặp đoạn và xóa đoạn.....	104

## **DANH MỤC BIỂU ĐỒ**

Biểu đồ 3.1. Các dạng đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD .....	79
Biểu đồ 3.2. Các dạng đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân BMD .....	80
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ các dạng đột biến xóa đoạn .....	81
Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ các dạng đột biến lặp đoạn .....	83
Biểu đồ 3.5. Các dạng đột biến điểm trên gen dystrophin .....	84

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Dấu hiệu Gower .....	5
Hình 1.2.	Hình ảnh hóa mô miễn dịch của protein dystrophin khi nhuộm tiêu bản sinh thiết cơ .....	10
Hình 1.3.	Cấu trúc phân tử mRNA dystrophin trưởng thành và các mô hình micro và mini dystrophin .....	15
Hình 1.4.	Gentamicin giúp bộ máy dịch mã của tế bào vượt qua mã dừng đột biến bằng việc sử dụng axit amin glutamin cho mã dừng UAG. .	17
Hình 1.5.	Vai trò của vùng ESE trong quá trình cắt nối exon-intron .....	18
Hình 1.6.	Mô hình liệu pháp sử dụng AON gây xóa exon khôi phục lại khung dịch mã dystrophin .....	19
Hình 1.7.	Vị trí của gen DMD trên NST X .....	23
Hình 1.8.	Cấu trúc của gen Dystrophin .....	24
Hình 1.9.	Các vùng chức năng của protein dystrophin.....	25
Hình 1.10.	Cơ chế bệnh sinh của DMD do thiếu hụt dystrophin .....	26
Hình 1.11.	Giả thuyết về khung dịch mã trong bệnh Becker và Duchenne ...	28
Hình 1.12.	Xóa đoạn vùng trung tâm gen DMD .....	28
Hình 1.13.	Phân bố đột biến lặp đoạn gen của bệnh DMD/BMD bằng kỹ thuật Southern blot.....	29
Hình 1.14.	Nguyên tắc của kỹ thuật multiplex PCR .....	30
Hình 1.15.	Hình ảnh xác định đột biến gen dystrophin bằng kỹ thuật FISH .	32
Hình 1.16.	Kỹ thuật Southern blot xác định đột biến gen dystrophin .....	33
Hình 1.17.	Nguyên tắc của kỹ thuật MLPA .....	35
Hình 1.18.	Kết quả MLPA phát hiện xóa đoạn gen DMD ở exon 48-50.....	37
Hình 1.19.	Kết quả MLPA phát hiện đột biến lặp đoạn gen .....	37
Hình 1.20.	Nguyên tắc giải trình tự gen theo Sanger và CS.....	38
Hình 1.21.	Mô hình gây skip exon 19 chuyển từ thể bệnh DMD .....	42



Hình 2.1. Hình ảnh minh họa cách tính toán exon lặp đoạn tương ứng với phần mềm GeneMarker .....	56
Hình 3.1. Kết quả đo nồng độ DNA bằng máy Nanodrop của bệnh nhân MS33	60
Hình 3.2. Kết quả đo nồng độ RNA và cDNA bằng máy Nanodrop của bệnh nhân MS28 .....	61
Hình 3.3. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS1 .....	62
Hình 3.4. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS4 .....	63
Hình 3.5. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS33 .....	64
Hình 3.6. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS24 .....	65
Hình 3.7. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS53 .....	66
Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR của DNA bệnh nhân MS53 với cặp mồi 44,45. (-)đôi chứng âm, (+)đôi chứng dương, (P) mẫu bệnh nhân .....	66
Hình 3.9. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS3 .....	67
Hình 3.10. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS10 .....	70
Hình 3.11. Kết quả MLPA của bệnh nhân mã số MS120 .....	71
Hình 3.12. Kết quả xác định đột biến gen của bệnh nhân mã số MS28 .....	73
Hình 3.13. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân mã số MS123 .....	75
Hình 3.14. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân MS128 .....	76
Hình 3.15. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân MS121 .....	76
Hình 3.16. Bản đồ đột biến xóa đoạn gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam .....	85
Hình 3.17. Bản đồ đột biến lặp đoạn, đột biến điểm gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam .....	86