

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT TẾ BÀO PHÔI THAI TRONG MÁU NGOẠI VI CỦA MẸ, ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH DI TRUYỀN

Triệu Tiến Sang; Trần Văn Khoa**

TÓM TẮT

Trong máu mẹ tồn tại rất ít tế bào hồng cầu có nhân lưu hành tự do. Dựa vào tách chiết vật liệu di truyền của các tế bào này để chẩn đoán dị tật di truyền trước sinh bằng biện pháp không can thiệp. Để xác định sự tồn tại của các tế bào phôi thai tự do trong máu mẹ, chúng tôi nghiên cứu 35 bà mẹ mang thai ở tuần thứ 8 đến tuần thứ 12 của thai kỳ. Trong đó, 30 phụ nữ mang thai trai và 5 phụ nữ mang thai gái. Kết quả xác định chính xác 30 phụ nữ mang thai trai và 5 phụ nữ mang thai gái. Sử dụng kháng thể đơn dòng CD71 để tách tế bào phôi. Khuếch đại ADN của tế bào bằng phản ứng PCR trên nhiễm sắc thể (NST) Y. Việc bắt được các gen trên NST Y là bằng chứng chứng tỏ quá trình tách chiết tế bào phôi thành công. Bước đầu ứng dụng chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và thai nhi cho 10 ca.

* Từ khóa: Tế bào phôi thai; Máu ngoại vi; Tách chiết; Chẩn đoán trước sinh; Bệnh di truyền.

PROCESS OF ISOLATION OF FETAL CELLS FROM ERYTHROCYTES IN MATERNAL PERIPHERAL BLOOD AND ITS APPLICATION IN PRENATAL DNA DIAGNOSIS

SUMMARY

Nucleated fetal cells circulate in maternal blood was rare. Noninvasive prenatal diagnosis was done by isolation and genetic analysis of these cells. A study on 35 pregnant women from 8th to 12th week gestation was carried out to identify circulation of fetal cells in maternal blood. The results showed that 30 pregnant women had male fetus and 5 pregnant women had female fetus. Mononuclear cells were sorted by flow cytometry using antibodies to CD antigens 71. DNA within sorted cells, amplified by PCR for Y chromosome sequences, was considered predictive of a male fetus or evidence of persistent male fetal cells. We diagnosed 10 cases of disagreement blood between mother and fetus.

* *Key words: Fetal cells; Peripheral blood; Isolation; Prenatal diagnosis; Genetic disease.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, siêu âm, test bộ ba, chọc dò dịch ối hay sinh thiết gai rau là những phương pháp đang được sử dụng rộng rãi để chẩn

đoán trước sinh, mang lại hiệu quả cao trong công tác nghiên cứu và chẩn đoán dị tật bẩm sinh. Tuy vậy, khoa học vẫn đang hướng tới

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Hoàng Văn Lương
PGS. TS. Quản Hoàng Lâm

những phương pháp có thể chẩn đoán sớm, ít can thiệp với độ chính xác cao hơn. Việc phát hiện sự tồn tại của tế bào phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ đã mở ra một hướng đi mới cho việc chẩn đoán sớm các dị tật bẩm sinh bằng phương pháp không can thiệp. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm:

- Xây dựng quy trình tách chiết tế bào phôi thai trong máu ngoại vi của mẹ từ tuần thứ 8 của thai kỳ.
- Sử dụng ADN từ tế bào phôi thai để sàng lọc và chẩn đoán sớm bệnh di truyền.

ĐỐI TƯỢNG, HOÁ CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

35 mẫu máu lấy từ tĩnh mạch ngoại vi của 35 phụ nữ mang thai từ tuần thứ 8 đến tuần thứ 12, đến khám trước sinh tại Trung tâm Sinh Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y. Trong đó: 30 mẫu được xác định thai mang bộ NST 46, XY; 5 mẫu xác định thai mang bộ NST 46, XX theo phương pháp xét nghiệm ADN tự do và siêu âm hình thái thai vào tháng thứ 4 của thai kỳ.

2. Hoá chất và thiết bị máy móc.

Bảng 1: Hóa chất dùng cho nghiên cứu.

HOÁ CHẤT TÁCH CHIẾT ADN	HÓA CHẤT DÙNG CHO PCR	HÓA CHẤT DÙNG CHO ĐIỆN DI	HÓA CHẤT DÙNG CHO NHUỘM
- Hạt từ tính đã gắn streptavidin - Kháng thể CD71 đã biotyn hóa - Buffer AL - PBS 1x - Ethanol 70%, Ethanol 100% - Proteinase K - Nước cất	- PCR Reaction Mix - DNA Polymerase - Reverse primer - Forward primer - Nước cất khử ion và vô trùng	- Agarose 2% Đệm dùng cho điện di 0,5X TBE: tris-base - Axit boric - EDTA 0,5 M	- Nhuộm gel agarose: ethidium bromide 10 mg/ml

* *Thiết bị máy móc:*

Máy lắc ổn nhiệt (Eppendorf-Đức); bộ điện di (Biorad, Mỹ); máy PCR ABI 9700 (Applied Biosystem); máy định lượng ADN (Nano Drop, Mỹ); đèn soi UV (Biorad, Mỹ); máy li tâm cao tốc (Hettich, Đức); giá từ tính (Eppendorf, Đức); tủ hốt hoá chất (Hàn Quốc); buồng thao tác PCR (Mỹ)

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Nguyên tắc tách hồng cầu nhân bằng hạt từ tính gắn streptavidin:*

- Kháng thể CD71 được biotyn hóa sẽ tạo phức hợp với hạt từ đã gắn streptavidin. Sau đó, phức hợp này bắt cặp với hồng cầu nhân theo nguyên tắc miễn dịch.

- Dưới tác dụng của lực từ trường, phức hợp hồng cầu nhân-hạt từ bị hút về 1 cực của nam châm.

- Rửa nhiều lần để thu phức hợp cầu nhân-hạt từ.

- Dùng hóa chất, nhiệt độ để tách ADN ra từ hồng cầu nhân.

* *Tách chiết ADN tế bào phôi thai qua các công đoạn:*

- Lấy mẫu máu.

- Tạo phức hợp hạt từ - hồng cầu nhân.

- Tách phức hợp hạt từ - hồng cầu nhân.

- Tách ADN từ hồng cầu nhân.

- Kiểm tra kết quả thu được.

Sau khi tách chiết ADN phôi thai bằng hạt từ tính, tiến hành kiểm tra kết quả thông qua đo nồng độ, độ tinh sạch trên máy quang phổ Nanodrop, nhân đoạn gen bằng kỹ thuật PCR, điện di trên gel, đồng thời kiểm chứng bằng các phương pháp khác như siêu âm thai tháng thứ tư và tách chiết ADN tự do.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**1. Kết quả kiểm tra chất lượng bằng máy quang phổ.**

Sau khi tách chiết thành công ADN từ hạt từ tính, xác định nồng độ của dung dịch axit nucleic bằng cách đo độ hấp thụ tại bước sóng 260 nm (A_{260}), tương đương với nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ của ADN. Nếu giá trị hấp thụ bước sóng 280 nm (A_{280}) được xác định là bước sóng ở đó có protein có mức hấp thụ cao nhất, tỷ số A_{260}/A_{280} là chỉ số cho thấy độ nhiễm của các chất như phenol hoặc protein. Tỷ lệ A_{260}/A_{280} : 1,8 - 2,0; nghĩa là ADN đạt độ tinh khiết theo tiêu chuẩn quốc tế (Lê Đình Lương, 2004).

Bảng 2: Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch.

MẪU	NỒNG ĐỘ ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A_{260}/A_{280}	MẪU	NỒNG ĐỘ ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A_{260}/A_{280}
1	1,89	1,67	19	3,05	2,17
2	2,66	1,45	20	1,50	1,72
3	3,42	2,23	21	4,15	1,91
4	2,33	1,89	22	1,09	1,33
5	4,09	1,78	23	2,68	2,17
6	3,66	1,72	24	4,44	1,85
7	4,75	1,83	25	2,56	1,77
8	4,45	2,08	26	1,24	2,18
9	2,22	1,99	27	3,80	1,61
10	3,78	1,70	28	4,20	1,65
11	5,02	1,54	29	3,75	1,86
12	1,99	1,88	30	3,45	2,13
13	4,53	2,16	31	5,05	2,07
14	3,37	1,40	32	4,13	1,47
15	3,03	1,65	33	3,67	1,67
16	4,56	1,70	34	3,03	2,45
17	3,95	1,95	35	3,77	1,78
18	4,55	1,90			

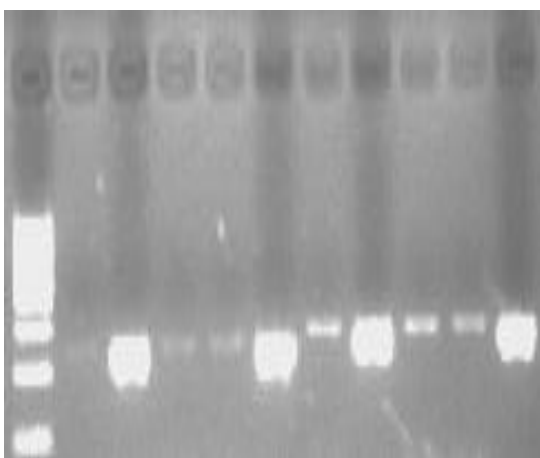
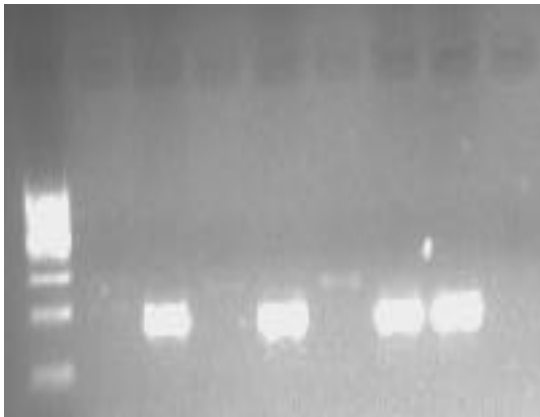
Kết quả kiểm tra độ tinh sạch ADN tách bằng lysis buffer có tỷ lệ A_{260}/A_{280} trung bình: 1,84.

2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm

PCR nhân gen SRY.

Ngoài phương pháp đo quang phổ, xác định nồng độ ADN thông qua độ phát sáng huỳnh quang khi ADN liên kết với ethidium bromid (Lê Đình Lương, 2004).

Kết quả điện di trên gel kiểm chứng ADN phôi thai:



M (-) (+) 7 8 9 10 11 12 13 14

Hình 1: Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%.

(Chú thích: M: Thang ADN chuẩn. (-): chứng âm; (+) Chứng dương; 1→14: ADN của các mẫu ký hiệu 1 - 14).

3. Kết quả kiểm chứng bằng những phương pháp khác.

* Kết quả xác định giới tính:

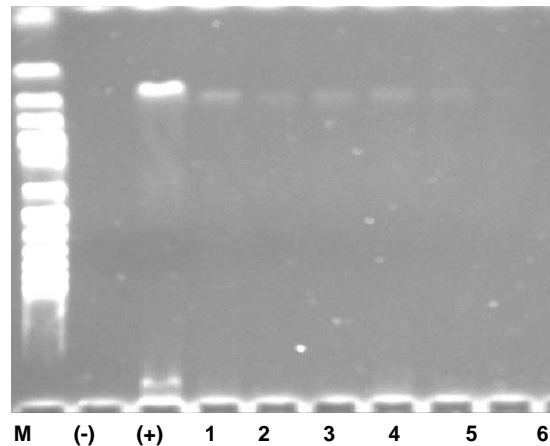
Phương pháp tách ADN tự do luôn xác định được sự tồn tại của ADN thai nhi trong máu mẹ.

Phương pháp tách chiết tế bào phôi trong 30 trường hợp chứng dương, 5 trường hợp âm tính do không tách chiết được tế bào phôi thai, do vậy, bằng kỹ thuật nhân gen SRY không phát hiện được tế bào phôi tồn tại trong dịch tách chiết.

Tần số thành công của phương pháp tách chiết tế bào phôi là 25/30.

4. Ứng dụng xác định nhóm máu Rh.

* Kết quả điện di xác định nhóm máu Rh của thai nhi:



M (-) (+) 1 2 3 4 5 6

Hình 2: Hình ảnh kết quả điện di trên gel sản phẩm PCR xác định nhóm máu Rh.

M: Thang chuẩn; (-): chứng âm; (+): chứng dương; 1-6: Ký hiệu các mẫu.

* Kết quả kiểm tra nhóm máu Rh bằng những phương pháp khác:

Sau khi tách chiết tế bào phôi và ứng dụng để chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và thai nhi.

Ứng dụng chẩn đoán trên 10 trường hợp nhằm xác định bất đồng nhóm máu giữa mẹ và con, kết quả cho thấy 1 trường hợp không thấy xuất hiện bất đồng nhóm máu

giữa mẹ và con. 9 trường hợp còn lại cho kết quả dương tính, nghĩa là có sự bất đồng nhóm máu giữa mẹ và thai nhi.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu phương pháp tách chiết tế bào phôi từ 35 mẫu máu ngoại vi của 35 phụ nữ mang thai từ tuần thứ 8 đến tuần thứ 12, kiểm tra và phân tích, so sánh kết quả, chúng tôi đã hoàn thiện và áp dụng thành công quy trình tách chiết ADN tế bào phôi thai từ máu ngoại vi sử dụng hạt từ tính. Quy trình tách chiết đơn giản, thời gian tách chiết nhanh, có thể áp dụng vào thực tiễn. Kết quả thu được có nồng độ và độ tinh sạch cao, đảm bảo cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định bệnh tật di truyền từ giai đoạn sớm của thai kỳ, góp phần giảm bớt gánh nặng cho gia đình và xã hội. Bước đầu ứng dụng chẩn đoán bất đồng nhóm máu giữa mẹ và thai nhi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aali Bibi Shahnaz, Malepour Reza, Sedig Fatemeh et al. Comparison of maternal and cord blood nucleated red blood cell count between pre-eclamptic and healthy women. Journal of Obstetrics and Gynecology Research. 2007.
2. Diana W. Bianchi. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. 1990.
3. Dr Maitreyee. Use of fetal nucleated red blood cells in maternal circulation, for noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal and single gene disorders.
4. Ikeya Miki, Shinya Masaru, Kitagawa Michihiro. Basic investigation of the lectin method for separation and recovery of nucleated red blood cells in maternal blood, and a study into the frequency of nucleated red blood cells in fetomaternal disorders. Congenital Anomalies. 2005.
5. J. Buschm P. Huber, E. Plugger, ST. Milteny, J. Holtz, A. Radbruch. Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. 1994.
6. M.C Hermansen. Nucleated red blood cells in the fetus and newborn.
7. Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A et al. Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: A second step in screening for fetal aneuploides and pregnancy complications. Prenatal Diagnosis. 2006.
8. Robbert J.P. Rijnders, MD. Godelive C.M.I. Christiaens. MD. PhD, Bernadette Bosers. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma.
9. Sekizawa Akihiko, Purwosunu Yuditiya, Matsuoka Ryu et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. The Journal of Obstetrics and Gynecology Research. 2007.
10. Young Ho Yang, Sung Hoon Kim, Eun Suk Yang, Sei Kwang Kim, In Kyu Kim, Yong Won Park, Jae Sung Cho, Yoon Holee. Prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 from maternal peripheral blood. 2003.

Ngày nhận bài: 16/5/2012

Ngày giao phản biện: 26/7/2012

Ngày giao bản thảo in: 31/8/2012

