

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *COL7A1* GÂY BỆNH LY THƯỢNG BÌ BÓNG NƯỚC BẨM SINH ỨNG DỤNG TRÊN TẾ BÀO PHÔI

Triệu Tiến Sang¹, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Thị Trang², Nguyễn Thanh Tùng¹,
Dương Đình Hiếu¹, Trần Ngọc Thảo My³, Nguyễn Thị Hạnh⁴, Vũ Văn Tâm⁵

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Ly thượng bì bóng nước bẩm sinh (Epidermolysis bullosa - EB) là nhóm bệnh di truyền hiếm gặp, đặc trưng bởi tổn thương dẫn đến phỏng rộp trên da và niêm mạc. Một thể bệnh hay gặp ở bệnh nhân (BN) mắc ly thượng bì là loạn dưỡng, di truyền trội hoặc lặn trên nhiễm sắc thể thường, gây ra bởi khiếm khuyết trên gen *COL7A1*. 90% BN do di truyền lặn, không có tiền sử thành viên trong gia đình mắc bệnh. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen *COL7A1* gây bệnh EB ứng dụng trên tế bào phôi, qua đó giúp chẩn đoán bệnh sớm, đồng thời tư vấn di truyền giúp các cặp vợ chồng hạn chế tối đa xác suất sinh con mắc bệnh ly thượng bì bẩm sinh. **Đối tượng và phương pháp:** Một đột biến trên gen *COL7A1* được phát hiện ở một BN mắc EB. Dựa vào vị trí đó thiết kế đoạn mồi cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mang đột biến trên 10 mẫu phôi sinh thiết của gia đình BN. Kết hợp giải trình tự Sanger trong chẩn đoán tiền làm tổ giúp sàng lọc phôi khỏe mạnh để chuyển vào mẹ. **Kết quả:** Trong tổng số 10 tế bào phôi sinh thiết, 2 phôi mang bệnh có kiểu gen đồng hợp tử đột biến, 3 phôi bình thường có kiểu gen dị hợp mang alen đột biến và 5 phôi khỏe mạnh có kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại, được chọn để chuyển vào mẹ. **Kết luận:** Quy trình nghiên cứu có ý nghĩa và vai trò quan trọng trong phát hiện đột biến gen *COL7A1* giúp chẩn đoán sớm bệnh EB từ giai đoạn tiền làm tổ, sàng lọc phôi khỏe mạnh tham gia thụ tinh nhân tạo.

* Từ khóa: Ly thượng bì bóng nước bẩm sinh; Bệnh bong biểu bì bullosa; Gen *COL7A1*; Đột biến gen.

Establishing a Procedure to Detect COL7A1 Gene Mutations Relating to Epidermolysis Bullosa in Biopsied Embryonic Cells

Summary

Background: Epidermolysis bullosa (EB) is a family of inherited blistering skin disorders characterized by blister formation in response to mechanical trauma of the skin and mucous membranes. 90% of cases are autosomal recessive, and there is no evident history of the disease in the family members. **Objectives:** To establish a procedure to detect gene mutation of *COL7A1* causing EB in biopsied embryonic cells, thus contributing to early diagnosis of EB and minimizing the probability of having a baby with EB among the couples through genetic counselors.

¹Học viện Quân y

²Đại học Y Hà Nội

³Đại học Sorbonne, Pháp

⁴Đại học Khoa học Tự nhiên

⁵Bệnh viện Phụ sản Hải Phòng

Người phản hồi: Trần Văn Khoa (tvkhoabio@gmail.com)

Ngày nhận bài: 04/6/2021

Ngày được chấp nhận đăng: 17/6/2021

Subjects and methods: A mutation in the COL7A1 gene was detected in a patient with congenital EB. Based on the mutation, primers were designed for PCR reaction to amplify the gene fragment carrying a mutation on 10 biopsied embryo samples of the patient's family. Combined Sanger sequencing in pre-implantation diagnosis helps to screen for healthy embryos to be transferred into the mother's uterus. **Results:** In a total of 10 biopsied embryonic cells, 2 embryos were detected to have the homozygous mutation, 3 embryos had heterozygous genotype carrying the mutant allele and 5 healthy embryos had the homozygous wild-type genotype that would be selected for transfer into the mother. **Conclusion:** Research process is meaningful and has an important role in detecting COL7A1 gene mutations to help early diagnosis of pathological congenital epidermolysis bullosa at the pre-implantation stage to screen for healthy embryos.

* **Keywords:** Epidermolysis bullosa; COL7A1 gene; Gene mutation.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ly thượng bì bóng nước bẩm sinh là một nhóm rối loạn di truyền đặc trưng bởi sự không toàn vẹn của cấu trúc lớp biểu bì, biểu hiện chung là sự hình thành bóng nước sau những sang chấn nhẹ trên da và niêm mạc [1]. Triệu chứng lâm sàng của bệnh rất đa dạng, từ phỏng rộp trên da mang tính cục bộ ở bàn tay, bàn chân đến toàn thân, bề mặt niêm mạc và tổn thương nhiều cơ quan nội tạng. Nguyên nhân phát sinh từ các đột biến bên trong các gen mã hóa cho các protein khác nhau, mỗi loại có liên quan mật thiết đến việc duy trì sự ổn định cấu trúc tế bào biểu bì hoặc sự kết dính của bề mặt da với các lớp hạ bì bên dưới [2]. Theo thống kê cho thấy, với tỷ lệ mắc bệnh từ 8 - 10 trên 1.000.000 trẻ sinh ra, EB được xếp vào nhóm các bệnh hiếm gặp [2, 3]. Trên thực tế, tỷ lệ này cao hơn con số thống kê vì các trường hợp nhẹ hầu như chưa được chẩn đoán chính xác. Trẻ mắc bệnh này luôn phải chống chọi với nỗi đau thể xác và ước tính rằng trên 80% trong số đó tử vong trước 2 tuổi. Ở Việt Nam tỷ lệ này còn cao hơn do điều kiện về môi trường, khí hậu và điều kiện chăm sóc.

Ly thượng bì bóng nước bẩm sinh được chia thành bốn nhóm chính: EB đơn giản - Epidermolysis bullosa simplex (EBS), EB tiếp nối - Junctional epidermolysis bullosa (JEB), EB loạn dưỡng - Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) và hội chứng Kindler được phân loại theo tình trạng tổn thương trên da, vị trí, mức độ của triệu chứng và phương thức di truyền của chúng [2, 4]. Trong đó, EBS là dạng hay gặp nhất, chiếm 92% tổng số trường hợp mắc, hầu hết di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường gây ra bởi các gen mã hóa cho keratin 5 và 14. Vị trí bóng nước nằm ở lớp trong thượng bì, thường biểu hiện ở bàn tay, bàn chân và có xu hướng giảm dần theo tuổi [3, 5]. Ở mức độ nặng hơn, JEB gây ra các tổn thương giữa lớp biểu bì và hạ bì, chiếm khoảng 1% trường hợp EB, vị trí bóng nước nằm ở chỗ tiếp nối thượng bì và trung bì, có xu hướng lan rộng, khi ma sát các bóng nước vỡ kèm theo chảy máu. BN mắc JEB thường bị suy dinh dưỡng và suy giảm miễn dịch. Tỷ lệ tử vong đạt gần 100% trong những năm đầu đời do nhiễm trùng huyết, viêm phổi, tắc nghẽn khí quản. Bệnh do đột biến trên 3 gen *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* mã hóa cho polypeptide của laminin 5 [3].

DEB có thể di truyền trội và lặn trên nhiễm sắc thể thường, chiếm 5% tổng số các ca mắc EB. DEB gây ra các tổn thương lớp hạ bì, có thể dẫn đến các triệu chứng nghiêm trọng và để lại vết thương mãn tính. Bệnh ảnh hưởng đến bề mặt da và niêm mạc, gây tổn thương nhiều cơ quan nội tạng, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, làm giảm tuổi thọ người bệnh. DEB thường gặp ở dạng di truyền lặn, các tổn thương xuất hiện trên da ngay sau đẻ: dính ngón tay, ngón chân như một bọc, gây ra bởi đột biến trên gen *COL7A1* mã hóa cho collagen loại VII [5]. Hội chứng Kindler có biểu hiện lâm sàng gần giống với EB, đặc trưng da nhạy cảm với ánh sáng, được phân loại như một dạng phụ của ly thượng bì bóng nước vào năm 2007 [6].

Đột biến trên gen *COL7A1* được xác định là nguyên nhân chính dẫn đến kiểu hình DEB. Gen *COL7A1* nằm ở cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 3: vị trí 3p21.31, có độ dài 32 kb (31.132 bp) bao gồm 118 exon, mã hóa cho protein collagen loại VII là thành phần chính của các sợi liên kết, tham gia vào vai trò neo giữ giúp ổn định cấu trúc biểu bì và gắn kết với các lớp hạ bì bên dưới [7, 8]. Đột biến trên gen này làm giảm và mất chức năng kết dính giữa các lớp biểu bì, gây bệnh ly thượng bì được đặc trưng bởi tổn thương do ma sát dẫn đến trợt loét trên da và hình thành bóng nước. Bệnh có thể di truyền trội hoặc lặn trên nhiễm sắc thể thường. Hầu hết các đột biến trội dẫn đến sai sót gây ra sự thay thế acid amin làm thay đổi kiểu hình, trong khi đột biến lặn được phát hiện là những đột biến vô nghĩa hoặc sự chèn hoặc xóa gen nhỏ dẫn đến lệch khung và chấm dứt dịch mã sớm, có xu hướng tạo thành kiểu hình nghiêm trọng hơn [5].

Đặc biệt, đột biến thay thế glycine trên gen này dẫn đến nhầm nghĩa trên chuỗi acid amin là loại đột biến hay gặp ở đa số BN EB. Hiện nay, việc chẩn đoán bệnh EB đa số dựa vào sinh thiết da, tuy nhiên phương pháp này còn nhiều hạn chế do phát hiện muộn, xâm lấn dễ để lại biến chứng và việc phân tích mô bệnh học nhiều khi chưa thể chẩn đoán chính xác. Do đó, quy trình nghiên cứu dựa vào phương pháp giải trình tự Sanger nhằm chẩn đoán bệnh sớm từ giai đoạn tiền làm tổ, cho kết quả nhanh, chính xác, khảo sát đồng thời nhiều vị trí gây bệnh kể cả các đột biến mới, tuân theo quy luật di truyền trội, lặn hay các đột biến *de novo*. Từ đó, tư vấn di truyền cho các cặp vợ chồng sinh con khỏe mạnh, hạn chế nỗi đau thể xác và tinh thần mà BN EB bẩm sinh phải đối mặt [9, 10, 11].

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu của một gia đình 3 người gồm: bố (31 tuổi), mẹ (27 tuổi) đều bình thường sinh con trai (5 tuổi) được chẩn đoán mắc bệnh EB được lấy từ tĩnh mạch vào ống chứa chất chống đông EDTA và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. ADN tách từ mẫu máu của con được giải trình tự thế hệ mới (NGS) và phát hiện đột biến c.8279G>A (p.G2760E) nằm trên exon 113 của gen *COL7A1*. 10 mẫu phôi thụ tinh nhân tạo của gia đình đó được sinh thiết từ 3 - 5 tế bào vào ngày 5 tại Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông, sau đó rửa bằng dung dịch PBS 1X + 1% PVP.

2. Phương pháp nghiên cứu

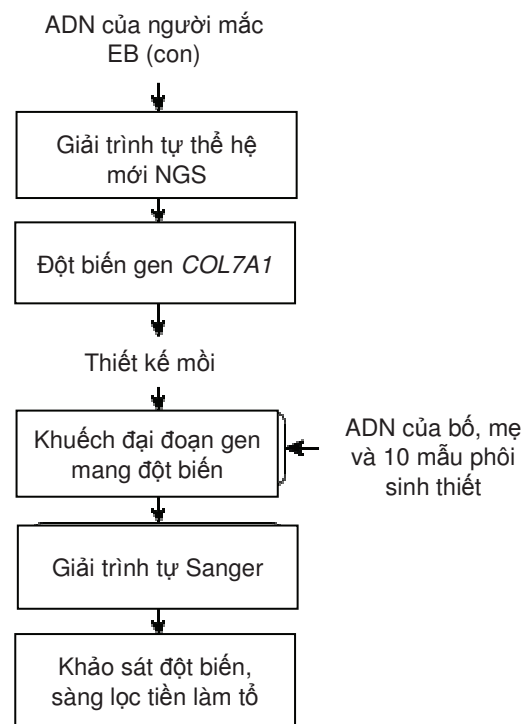
* Tách chiết ADN từ máu toàn phần và khuếch đại hệ gen từ phôi sinh thiết: ADN được tách chiết từ mẫu máu toàn phần

theo quy trình của bộ kit G-spin™ Total ADN Extraction Kit (iNtRON Biotechnology - Hàn Quốc, 10 mẫu phôi sinh thiết được khuếch đại toàn bộ hệ gen (WGA) bằng bộ REPLI-g® Single Cell (QIAGEN - Đức). Kiểm tra nồng độ mẫu ADN thu được và độ tinh sạch bằng máy đo SpectraMax QuickDrop, điều kiện cần sẽ pha loãng về nồng độ ~10 ng/μl dùng trong phản ứng nghiên cứu và được bảo quản ở nhiệt độ -20⁰.

* *Tiến hành phản ứng khuếch đại PCR (Polymerase Chain Reaction):* Dựa vào vị trí đột biến đã phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự NGS ở con mang bệnh, thiết kế cặp mồi đặc hiệu nhằm khuếch đại đoạn gen chứa exon 113 mang vị trí đột biến trên gen COL7A1 bằng cách sử dụng phần mềm Primer-BLAST. Kết quả thu được trình tự như sau: mồi xuôi F: 5'-CGCCCCTATGTGCAACAGA-3'; ngược R: 5'-AACCTGCCTGACTCTGATCC-3' có nhiệt độ nóng chảy lần lượt là 60⁰C và 62⁰C khuếch đại đoạn gen có kích thước 241 bp chứa vị trí đột biến trên exon 113 của gen COL7A1. Tối ưu hóa nhiệt độ gắn mồi trên dải nhiệt từ 54⁰ - 64⁰, lặp lại phản ứng này 3 lần đều thu được nhiệt độ tại 60⁰ là phù hợp nhất. Sau đó, tiến hành phản ứng PCR trên cặp mồi này áp dụng lên đối tượng là ADN của bố mẹ và 10 tế bào phôi sinh thiết, với thành phần phản ứng bao gồm 12.5 μl GoTaq Green Mastermix 2X, 7,5 μl nước, 0,5 μl mỗi mồi, 4,0 μl ADN mix đều được dung dịch đồng nhất có tổng thể tích là 25 μl. Chu trình nhiệt sử dụng trong phản ứng là: 95⁰C - 5 phút; 94⁰C - 40 giây, 60⁰C - 40 giây, 72⁰C - 40 giây trong 35 chu kỳ và 72⁰C 5 phút. Sản phẩm PCR được mang đi điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra kết quả.

Việc thu được băng điện di đúng kích thước nghiên cứu chứng tỏ khuếch đại thành công đoạn gen mong muốn là điều kiện tiên quyết để tiến hành giải trình tự Sanger khảo sát đột biến. Trong nghiên cứu này, mẫu con đã xác định mang đột biến gây bệnh EB, do đó có thể dùng làm chứng dương cho phản ứng PCR cũng như trong giải trình tự Sanger.

* *Giải trình tự Sanger:* Sau khi khuếch đại thành công đoạn gen COL7A1 bằng phản ứng PCR, tiến hành giải trình tự theo nguyên lý Sanger để tìm vị trí đột biến c.8279G>A ở exon 113 của gen COL7A1 trên bố mẹ nhằm xác định yếu tố gây bệnh và tìm ra quy luật di truyền, đồng thời sàng lọc tiền làm tổ trên 10 phôi sinh thiết. Quy trình của nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.

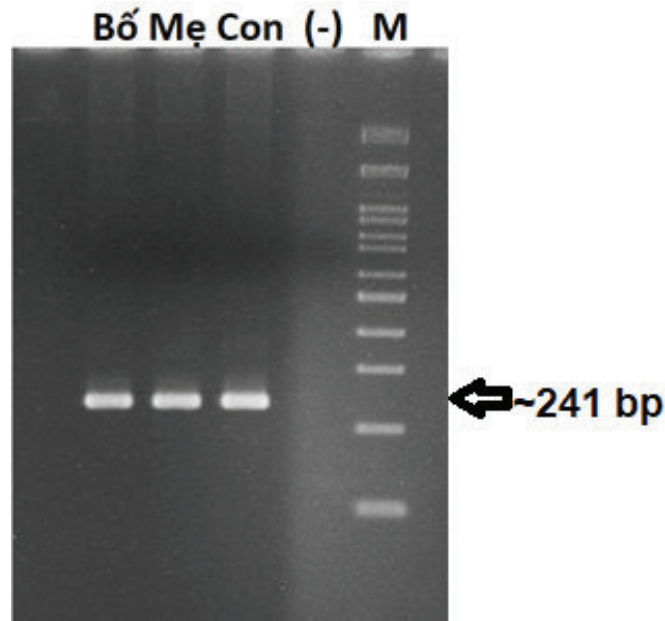


Hình 1: Quy trình phát hiện đột biến gen COL7A1 ứng dụng trên tế bào phôi.

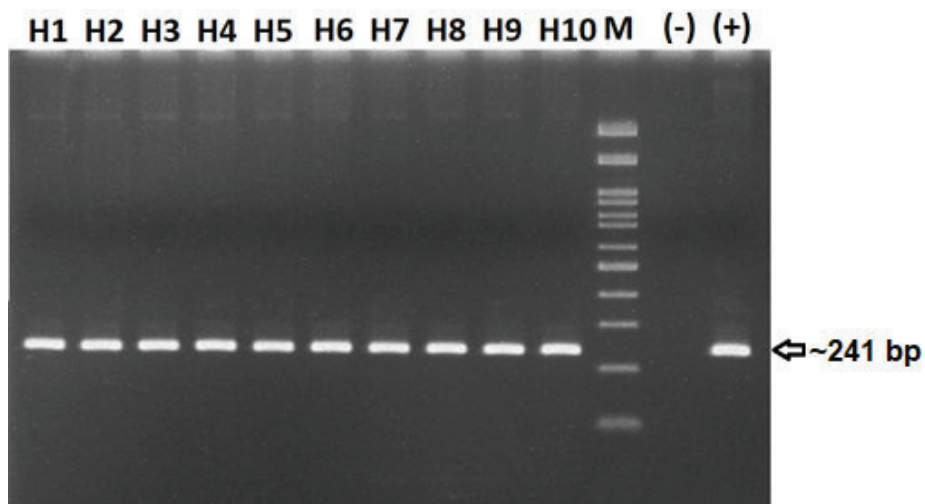
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen COL7A1 mang đột biến c.8279G>A

Lặp lại 3 lần phản ứng với thành phần và chu trình nhiệt đã được nêu trên đều thu được kết quả đồng nhất. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2% và quan sát dưới hệ thống chụp gel sử dụng tia UV cho kết quả như sau:



Hình 2: Ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR với ADN của bố và mẹ BN mắc EB.
(M: thang chuẩn marker (100 bp); mẫu con mắc bệnh là đối chứng dương).

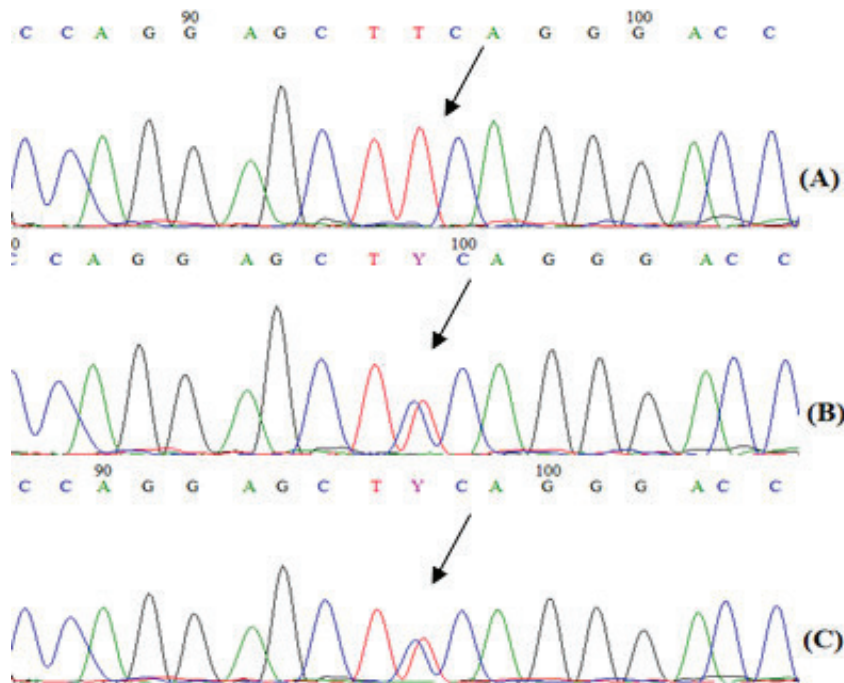


Hình 3: Ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 tế bào phôi sinh thiết.
(M: thang chuẩn (100 bp)).

Hình ảnh cho thấy khuếch đại thành công đoạn gen *COL7A1* chứa exon 113 mang đột biến *c.8279G>A* ở tất cả đối tượng nghiên cứu. Đối chứng âm không xuất hiện băng thể hiện quá trình tiến hành phản ứng không bị tạp nhiễm, kết quả mẫu nghiên cứu thu được giống với đối chứng dương là mẫu mang bệnh. Băng điện di rõ nét và không có sản phẩm phụ, khuếch đại đoạn mỗi có kích thước ở vị trí ~241 bp đúng với lý thuyết, đủ điều kiện tham gia giải trình tự Sanger ở bước tiếp theo trong nghiên cứu nhằm phát hiện đột biến trên exon 113 của gen *COL7A1*.

2. Kết quả giải trình tự Sanger

Kết quả giải trình tự Sanger trên mẫu bố và mẹ phát hiện cả hai đều mang alen đột biến *c.8279G>A* ở trạng thái dị hợp tử, được xác định là yếu tố gây bệnh, tuân theo quy luật di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, bố mẹ bình thường mang alen gây bệnh sinh con mang cả 2 alen đột biến được nhận từ cả bố và mẹ, có kiểu gen đồng hợp tử lặn mắc bệnh EB.



Hình 4: Kết quả giải trình tự Sanger. (A): mẫu ADN của con - BN mắc EB; (B): mẫu ADN của bố - bình thường; (C): mẫu ADN của mẹ - bình thường.

Theo quy luật di truyền, trong gia đình này, cặp vợ chồng sinh con tự nhiên sẽ mang xác suất 25% sinh con khỏe mạnh, 25% con mắc bệnh, 50% sinh con bình thường mang alen đột biến có nguy cơ biểu hiện bệnh ở đời sau. Do đó, chẩn đoán tiền làm tổ giúp sàng lọc phôi khỏe mạnh là vô cùng cần thiết, con sinh ra không bị ảnh hưởng về các bệnh di truyền từ bố mẹ.

Kết quả giải trình tự Sanger trên 10 mẫu phôi sinh thiết thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả sàng lọc phôi mang đột biến bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Kiểu hình	Phôi	Kết luận
Phôi bệnh	H3, H5	Không phù hợp
Phôi bình thường mang alen đột biến	H2, H8, H9	Không phù hợp
Phôi khỏe mạnh	H1, H4, H6, H7, H10	Phù hợp
Tổng	10	

Trong tổng số 10 mẫu phôi sinh thiết, phát hiện 2 phôi (20%) mang kiểu gen đồng hợp tử đột biến - mắc bệnh, 3 phôi (30%) dị hợp tử đột biến - bình thường mang gen gây bệnh và 5 phôi đồng hợp kiểu dại, phôi khỏe mạnh không mang đột biến c.8279G>A đủ yêu cầu để chuyển vào mẹ.

BÀN LUẬN

Ly thượng bì bóng nước bẩm sinh là một bệnh đơn gen nhưng kiểu hình có thể hình thành do đột biến trên nhiều gen khác nhau. Do đó, chẩn đoán bệnh cần thực hiện đồng thời trên nhiều gen cùng tham gia chức năng đảm bảo toàn vẹn và tính thống nhất của các lớp biểu bì. Cơ sở và nguyên lý của phương pháp giải trình tự NGS cho phép phân tích đồng thời một vài đến vài trăm gen có khả năng gây bệnh trong khoảng thời gian ngắn, phát hiện các yếu tố liên quan đến hình thành thể bệnh. Công nghệ này đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện các đột biến khi chưa có nhiều thông tin về mặt di truyền. Hơn nữa, công nghệ giải trình tự toàn bộ exon phân tích toàn bộ thông tin di truyền đã góp phần đáng kể vào việc chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh, giải quyết những hạn chế mà các phương pháp lâm sàng khác chưa thực hiện được. Đặc biệt, đối với các gen liên quan đến EB có kích thước lớn, như gen *COL7A1* hay *COL17A1*, phương pháp giải trình tự NGS được

ưu tiên sử dụng trong chẩn đoán. Do đó, nghiên cứu đưa ra quy trình đáp ứng đủ nhu cầu chẩn đoán sớm bệnh EB ở giai đoạn tiền làm tổ mang lại ý nghĩa to lớn và hạn chế tối đa những mất mát mà căn bệnh EB gây ra.

Qua những thông tin thu được từ phương pháp giải trình tự thế hệ mới NGS, chúng tôi đã nghiên cứu xây dựng quy trình kết hợp giữa PCR truyền thống và giải trình tự Sanger nhằm phát hiện yếu tố gây bệnh. Ngoại trừ các trường hợp đột biến *de novo*, quy trình sẽ giúp tìm ra đột biến ở thế hệ con được di truyền từ bố mẹ, từ đó mở rộng ứng dụng trên đối tượng là các tế bào phôi sinh thiết nhằm sàng lọc phôi khỏe mạnh để chuyển vào cơ thể người mẹ. Ứng dụng của phương pháp Sanger giúp phân tích và tìm ra vị trí đột biến một cách cụ thể, chính xác. Như vậy, quy trình này mang lại ý nghĩa to lớn trong chẩn đoán và ứng dụng đặc biệt quan trọng trong sàng lọc tiền làm tổ ở những gia đình có nguy cơ mang đột biến hay có tiền sử bệnh có mong muốn sinh con khỏe mạnh.

KẾT LUẬN

Xây dựng quy trình nghiên cứu đã phát hiện được đột biến *c.8279G>A* nằm trên exon 113 của gen *COL7A1*. Đồng thời, ứng dụng phát hiện đột biến nhằm sàng lọc các phôi khỏe mạnh tham gia thụ tinh nhân tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Has, C., J. Fischer. Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostics and new clinical phenotypes. *Experimental Dermatology* 2019; 28(10):1146-1152.

2. Fine, J.-D., et al. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2014; 70(6):1103-1126.

3. Järvikallio, A., L. Pulkkinen, J. Uitto. Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: Mutations in the type VII collagen gene (*COL7A1*). *Human Mutation* 1997; 10(5):338-347.

4. Fine, J.-D., Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010; 5(1):1-17.

5. Galehdari, H., et al., A novel *COL7A1* gene mutation in an Iranian individual suffering dystrophic epidermolysis bullosa.

The Journal of Molecular Diagnostics 2010; 12(3):377-379.

6. Karsdal, M. *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers* 2019: Academic Press.

7. Chung, H.J., J. Uitto. Type VII collagen: The anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatologic Clinics* 2010; 28(1):93-105.

8. Mariath, L.M., et al. Inherited epidermolysis bullosa: Update on the clinical and genetic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2020; 95(5):551-569.

9. Dang, N., et al. Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel *COL7A1* variants. *Journal of Dermatological Science* 2007; 46(3):169-178.

10. Mariath, L.M., et al. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: Discovery of novel and recurrent disease - causing variants. *Clinical Genetics* 2019; 96(3):189-198.

11. Takeichi, T., et al. Whole-exome sequencing improves mutation detection in a diagnostic epidermolysis bullosa laboratory. *British Journal of Dermatology* 2015; 172(1):94-100.