CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH LOẠN DƯỠNG CƠ DUCHENNE

Đinh Thuý Linh[1], Trần Văn Khánh[1], Trần Huy Thịnh[2], Nguyễn Đức Hinh[2]
(1) Đại học Y Hà Nội, (2) Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội

DOI: 10.46755/vjog.2018.1.695

Từ khóa: loạn dưỡng cơ Duchenne, chẩn đoán trước sinh, Microsatellite DNA.
Keywords: Duchenne muscular dystrophy, prenatal diagnosis, Microsatellite DNA.

Tóm tắt

Xuất hiện với tần suất 1/3500 trẻ trai, loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất trong nhóm bệnh lý loạn dưỡng cơ. Đây là bệnh lý di truyền liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, do đột biến gen dystrophin.Hiện bệnh DMD chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu, do đó chẩn đoán trước sinh các trường hợp thai phụ là người mang gen bệnh sẽ giúp phát hiện các trường hợp thai mắc DMD, giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng.

Mục tiêu: *Mô tả kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh DMD bằng các kỹ thuật di truyền phân tử.*

Đối tượng nghiên cứu: *10thai phụ mang thai từ 17 –22 tuần có nguy cơ cao sinh con mắc DMD.*

Phương pháp nghiên cứu: *Nghiên cứu mô tả loạt bệnh. Sử dụng các kỹ thuật MLPA, PCR, giải trình tự gen và Microsatellite-DNA chẩn đoán trước sinh bệnh DMD.*

Kết quả: *1/10 thai nhi được chẩn đoán là thai nhi bệnh lý, thai phụ đã được tư vấn và quyết định đình chỉ thai nghén. 9/10 thai nhi được chẩn đoán là bình thường, tiếp tục theo dõi thai kỳ.*

Kết luận: *Ứng dụng thành công các kỹ thuật di truyền phân tử trongchẩn đoán trước sinh bệnh DMD.*

Từ khoá: *loạn dưỡng cơ Duchenne, chẩn đoán trước sinh, Microsatellite DNA.*

Abstract

PRENATAL DIAGNOSIS OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

With the rate of 1/3500, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common genetical neuromuscular dissease among muscular dystrophy diseases male children. DMD is resulted from the mutation of dystrophin gene on X chromosome. Prenatal diagnosis on pregnant women carrying the gene will provide the chance to diagnose DMD case among fetus.

Tác giả liên hệ (Corresponding author):
Đinh Thuý Linh,
email: DrDinhLinhobgyn@gmail.com
Ngày nhận bài (received): 02/04/2018
Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised): 02/04/2018
Ngày bài báo được chấp nhận đăng (accepted): 27/04/2018

Objective: *Describe results of DMD prenatal diagnosis by using molecular biology techniques.*

Subject: *10pregnant women during 17 – 22 weeks of gestation, whom fetus is high risk of DMD.*

Method: *Serial cases report. Implementing sequencing, MLPA, Microsatellite-DNA technique in DMD prenatal diagnosis.*

Result:*1/10fetus was diagnosed with the disease, the mother decided to determine pregnancy. 9/10 fetus were diagnosed to be normal and continued with.*

Conclusion: *Successful in using molecular biology techniques in DMD prenatal diagnosis.*

Keywords: *Duchenne muscular dystrophy, prenatal diagnosis, Microsatellite DNA.*

1. Đặt vấn đề

Trong các bệnh lý di truyền thần kinh cơ hiện nay, loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý hay gặp nhất với tần suất 1/3500 trẻ trai [1]. Bệnh được mô tả lần đầu tiên vào giữa thế kỷ XIX nhưng đến cuối thế kỷ XX, nguyên nhân của bệnh mới được xác định là do đột biến gen dystrophin trên nhiễm sắc thể giới tính X. Đây là bệnh lý di truyền gen lặn, kiên kết với NST giới tính X tuy nhiên có 30% các trường hợp là đột biến mới phát sinh [1],[2]. Trong trường hợp người mẹ mang gen bệnh, mặc dù không có biểu hiện lâm sàng nhưng lại có khả năng truyền gen bệnh cho con và gây biểu hiện bệnh ở con trai với tỉ lệ 50% [2],[3].

Đột biến gen dystrophin gây ra sự thiếu hụt tổng hợp protein tương ứng, dẫn đến biểu hiện lâm sàng ở người bệnh: yếu cơ tiến triển từ gần đến xa, phì đại bắp chân, tăng sinh các tổ chức trong cơ và chậm phát triển trí tuệ. Triệu chứng yếu cơ bắt đầu biểu hiện khi trẻ ở tuổi tập đi. Bệnh nhân mất khả năng đi lại và phụ thuộc xe lăn ở lứa tuổi 11-12 và thường tử vong ở lứa tuổi 20 do suy hô hấp và các biến chứng tim mạch [1],[3].

Hiện nay vẫn chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, vì vậy sàng lọc người mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh vẫn đóng một vai trò quan trọng giúp giảm tỷ lệ mắc bệnh. Có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng để phát hiện các đột biến gen dystrophin với những ưu, nhược điểm riêng và phù hợp với đặc điểm đột biến của từng bệnh nhân. Kỹ thuật MLPA với khả năng khảo sát toàn bộ 79 exon của gen dystrophin đã phát hiện được cả đột biến xóa đoạn và lặp đoạn, chiếm khoảng 60-65% đột biến [4],[5]. 35-40% các trường hợp là đột biến điểm cần phải sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để xác định, mặc dù kỹ thuật này thường cần nhiều thời gian với giá thành cao [6],[7]. Trong chẩn đoán trước sinh thường thực hiện các kỹ thuật phát hiện đột biến trực tiếp trên gen dystrophin dựa vào đột biến chỉ điểm của bệnh nhân như giải trình tự gen, MLPA, PCR [6],[8]. Tuy nhiên một số trường hợp không xác định được đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân và thai phụ là người mang gen do cấu trúc gen lớn thì kỹ thuật phân tích gián tiếp Microsatellite DNA có thể xác định được allele đột biến mà không cần có đột biến chỉ điểm. Hơn nữa, kỹ thuật Microsatellite DNA cũng đáp ứng được yêu cầu của chẩn đoán trước sinh với thời gian trả lời kết quả nhanh sau 48 – 72h và giá thành xét nghiệm thấp hơn các kỹ thuật khác, giảm gánh nặng kinh tế cho bệnh nhân [6],[9],[10].

Mục tiêu nghiên cứu: Mô tả kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng các kỹ thuật di truyền phân tử.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

10 thai phụ mang thai từ 17 tuần – 22 tuần đã

được xác định là người mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne hoặc có tiền sử sinh con mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả loạt ca bệnh.

2.2.1. Chọc hút nước ối

Kỹ thuật chọc hút nước ối được thực hiện ở tuổi thai 17-22 tuần dưới hướng dẫn của siêu âm, tại Bệnh viện Phụ Sản Trung ương và Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội.

Lượng dịch ối được lấy ra ở mỗi thai phụ là 15ml: 05 ml sử dụng để thực hiện chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, 10 ml được sử dụng để xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ của thai nhi.

2.2.2. Kỹ thuật di truyền phân tử chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne từ dịch ối

2.2.2.1. Kỹ thuật Microsatellite DNA

Kỹ thuật microsatellite DNA sử dụng các cặp mồi có gắn huỳnh quang để khuếch đại các STR này và phân tích kích thước của chúng thông qua điện di mao quản trên máy máy giải trình tự gen. Đối với gia đình loạn dưỡng cơ Duchenne cần khuếch đại 20 vùng STR đặc hiệu để xác định ít nhất 2-3 marker dị hợp tử trên mẫu mẹ. Sử dụng các cặp mồi đã xác định marker dị hợp tử từ đó xác định kiểu gen và kiểu hình thai nhi.

Sản phẩm khuếch đại PCR được điện di trên hệ thống sequencing - Beckman coulter. Kết quả được phân tích bằng phần mềm GeneMapper v3.2 software.

2.2.2.2. Kỹ thuật MLPA

Kỹ thuật MLPA sử dụng 79 đoạn dò gen dystrophin. Mỗi DNA lai (probe) gồm hai chuỗi oligonucleotid lai đặc hiệu với 79 exon. Kết quả điện di cho 79 đỉnh có kích thước tương ứng 79 probe đặc hiệu với 79 exon:

- Với đột biến xoá đoạn, exon bị xoá đoạn khi đỉnh exon không phát hiện được.

- 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 của người bình thường, exon lặp đoạn khi mà tỉ lệ RPA lớn hơn 1,5.

2.2.2.3. Kỹ thuật Multiplex PCR

PCR cho phép tổng hợp một số lượng lớn các gen trong thời gian ngắn. Phản ứng PCR bao gồm ba bước được lặp đi lặp lại nhiều lần. Kỹ thuật multiplex PCR sử dụng nhiều cặp mồi phát hiện các đột biến mất đoạn gen dystrophin ở 25 exon tập trung tại hai vùng "hot spot" hay xảy ra đột biến.

Các exon bị mất đoạn được thể hiện bằng sự vắng mặt của các band tương ứng trên gel agarose.

2.2.2.4. Kỹ thuật giải trình tự gen

Máy giải trình tự gen tự động sử dụng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP, sử dụng hệ thống 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 màu huỳnh quang tương ứng, máy sẽ ghi nhận màu sắc 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, xác định chính xác các đột biến gen.

2.2.3. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào ối xác định nhiễm sắc thể đồ thai nhi

Nuôi cấy theo phương pháp hở tủ ấm 37°C với 5% CO^2 và 95% không khí cùng nguồn ẩm. Thời gian trung bình nuôi cấy là từ 7-15 ngày. Các tế bào ối thai nhi thu được với số lượng tương đối sau khi nuôi cấy được tách DNA theo phương pháp phenol-chloroform và phân tích gen. Tế bào ối cũng được sử dụng để nhuộm băng G và phân tích karyotype của thai.

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Gia đình và bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu, được tư vấn và giải thích cụ thể về mục đích, qui trình nghiên cứu, quyền được tự do rút khỏi nghiên cứu, được đảm bảo bí mật cá nhân cũng như kết quả nghiên cứu. Các thông tin về bệnh nhân, người nhà bệnh nhân và kết quả chẩn đoán hoàn toàn được giữ bí mật, đặc biệt đối với thông tin về giới tính của thai nhi.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne cho thai nhi

Bảng 1. Các dạng đột biến gen dystrophin gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne ở 10 thai phụ

Dạng đột biến	Số lượng	Tỷ lệ %
Xoá đoạn	6	60
Lặp đoạn	1	10
Đột biến điểm	2	20
Không xác định được đột biến	1	10
Tổng	10	100

Trong 10 thai phụ được chẩn đoán trước sinh, có 9 thai phụ được xác định có mang gen

đột biến gây bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trong đấy đột biến xoá đoạn chiếm tỷ lệ cao nhất với 6/10 thai phụ (chiếm 60%). Đột biến điểm phát hiện ở 2 thai phụ, 1 thai phụ được xác định mang đột biến lặp đoạn. 1 trường hợp thai phụ chưa tìm thấy đột biến, tuy nhiên thai phụ này đã sinh 2 con trai mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, vì vậy vẫn được đưa vào nghiên cứu.

Bảng 2. Kết quả chẩn đoán trước sinh 10 thai phụ có nguy cơ cao sinh con mắc bệnh DMD

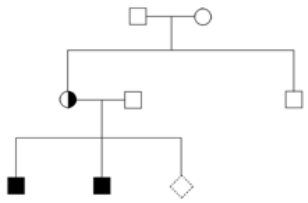
STT	Mã số	Dạng đột biến phát hiện ở thai phụ	Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai nhi
1	DMD10	Xóa đoạn exon 46-50	Thai nhi không mắc bệnh
2	DMD11	Xóa đoạn exon 49-50	Thai nhi không mắc bệnh
3	DMD12	Xóa đoạn exon 51	Thai nhi không mắc bệnh
4	DMD13	Đột biến điểm: c.3022A>T (p.Cys1008Stop)	Thai nhi không mắc bệnh
5	DMD15	Xóa đoạn exon 35-43	Thai nhi không mắc bệnh
6	DMD 17	Xóa đoạn exon 19-47	Thai nhi không mắc bệnh
7	DMD 18	Lặp đoạn 19-43	Thai nhi mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne
8	DMD20	Xóa đoạn exon 49-52	Thai nhi không mắc bệnh
9	DMD 22	Không phát hiện đột biến	Thai nhi không mắc bệnh
10	DMD33	Đột biến điểm c.6640C>A (p.S2214X)	Thai nhi không mắc bệnh

1/10 thai nhi được được chẩn đoán là thai nhi mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, 9/10 thai nhi được chẩn đoán là bình thường.

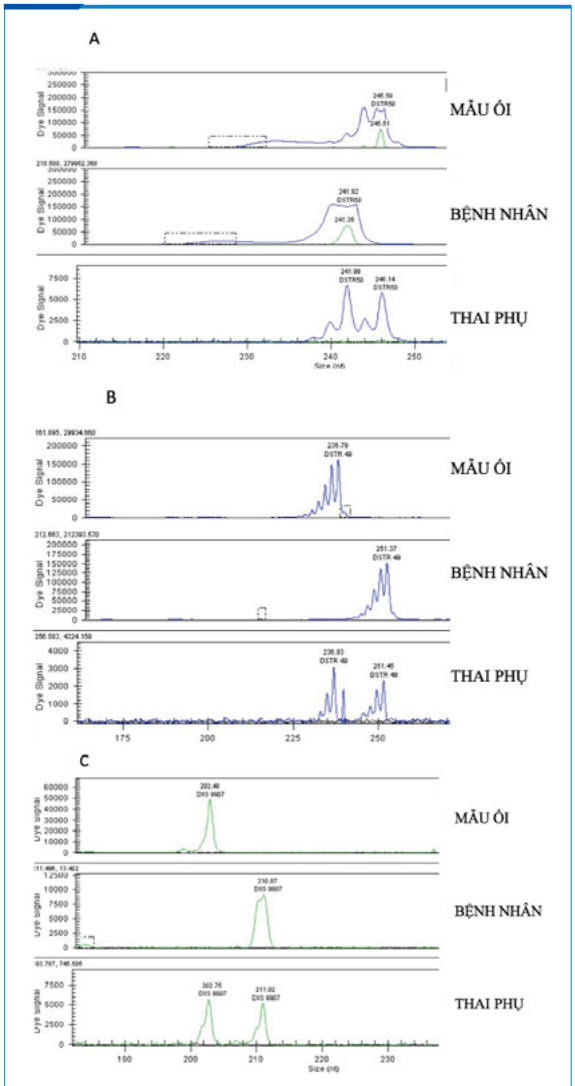
Trường hợp thai được chẩn đoán là mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, bệnh nhân và gia đình quyết định đình chỉ thai nghén. 9 trường hợp thai bình thường được tư vấn giữ thai.

Kết quả chẩn đoán trước sinh thai phụ DMD 22 (ứng dụng kỹ thuật Microsatellite DNA):

Phả hệ gia đình bệnh nhân mã số DMD22: thai phụ có 2 con trai bị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, cho thấy thai phụ là người mang gen dị hợp tử bắt buộc. Thai phụ và 2 con trai đã được xét nghiệm tìm đột biến gen dystrophin, tuy nhiên chưa xác định được đột biến.



Hình 1. Phả hệ gia đình thai phụ mã số DMD22



Hình 2. Kỹ thuật Microsatellite trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ DMD22

Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ DMD22 tìm thấy 3 marker dị hợp tử là DXS9907, DSTR 49 và DSTR50.

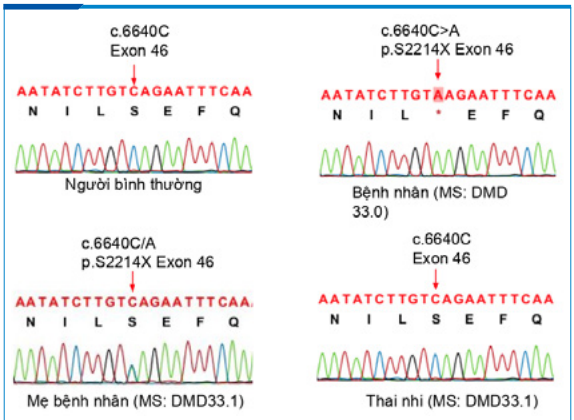
Với marker DSTR50, ở thai phụ xuất hiện 2 đỉnh có kích thước 241bp và 246bp (hình A), tương ứng với 2 alen nằm trên 2 nhiễm sắc thể X (X^BX^b). Ở con trai mắc loạn dưỡng cơ Duchennechỉ xuất hiện 1 đỉnh kích thước 241bp tương ứng với 1 alen trên nhiễm sắc thể X (X^bY), trùng khớp với kích thước 1 đỉnh ở mẫu của thai phụ. Từ kết quả trêncho thấy đỉnh kích thước 241bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 246bp là đỉnh alen bình thường.

Với marker DSTR49 (hình B), đỉnh mang kích thước 251bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 236bp là đỉnh alen bình thường.

Với marker D DXS9907 (hình C), đỉnh mang kích thước 211bp là đỉnh alen bệnh, đỉnh kích thước 202bp là đỉnh alen bình thường

Phân tích kết quả mẫu ối của thai nhi: mỗi marker DSTR50, DSTR 49 và DXS9907 đều chỉ xuất hiện 1 đỉnh có kích thước tương ứng lần lượt là 202bp, 236bp, 246bp là các alen bình thường. Kết quả này có thể khẳng định đây là trường hợp thai nam không mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.

Kết quả chẩn đoán trước sinh thai phụ DMD33 (ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen):

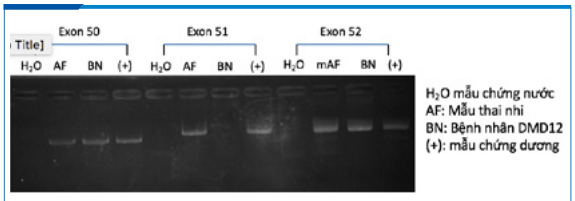


Hình 3. Kỹ thuật giải trình tự gen trong chẩn đoán trước sinh bệnh DMD của thai phụ DMD33

Giải trình tự gen phát hiện đột biến thay thế nucleotide C thành A tại vị trí c.6640 trên exon 46 của gen dystrophin. Đây là dạng đột biến tạo mã kết thúc sớm (S2214X), từ đó tạo nên protein dystrophin không hoàn chỉnh.

Mẹ bệnh nhân cũng phát hiện thấy đột biến trên ở trạng thái dị hợp tử. Thai nhi không phát hiện thấy đột biến, được chẩn đoán không mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne.

Kết quả chẩn đoán trước sinh thai phụ DMD12 (ứng dụng kỹ thuật PCR):



Hình 4. Kết quả chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne của thai phụ DMD12

Thai phụ được xác định là người mang gen đột biến xoá đoạn exon 51 của gen dystrophin. Thai nhi được chẩn đoán trước sinh bằng kỹ thuật PCR, xác đinh là không mang đột biến xoá đoạn giống mẹ (không mắc loạn dưỡng cơ Duchenne).

3.2. Kết quả xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ của thai nhi

Bảng 3. Kết quả nhiễm sắc thể đồ từ dịch ối

	Số lượng	Tỷ lệ %
Bất thường NST	0	0
Không bất thường NST	10	100
Tổng	10	100

Trong 10 trường hợp thai nhi được xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ, không phát hiện trường hợp nào có bất thường NST qua nuôi cấy tế bào ối.

4. Bàn luận

Loạn dưỡng cơ Duchennelà một bệnh di truyền thần kinh cơ hay gặp nhất trong nhóm các bệnh lý di truyền thần kinh cơ với bệnh cảnh lâm sàng nặng nề và chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu. Hiện nay có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng để xác định các đột biến gen dystrophin. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen trực tiếp được ứng dụng trong chẩn đoán trước sinh với các trường hợp có đột biến chỉ điểm ở thai phụ. Kỹ thuật PCR có khả năng khảo sát 25 exon, phát hiện các đột biến xoá đoạn nằm trong 2 vùng "hot spot", trong khi kỹ thuật MLPA lại có khả năng khảo sát cả 79 exon, phát hiện cả đột biến xoá đoạn và lặp đoạn. Tuy nhiên với các đột biến điểm, việc xác định hiện chỉ có thể dựa vào kỹ thuật giải trình tự gen.

Với các trường hợp không thể phát hiện đột biến do kích thước gen quá lớn hay bệnh nhân không đủ điều kiện kinh tế để thực hiện các xét nghiệm giải trình tự gen, kỹ thuật chẩn đoán gián tiếp Microsatellite DNA có thể được ứng dụng. Không những có khả năng phát hiện cả những trường hợp thai nhi mang đột biến từ mẹ mà kỹ thuật Microsatellite DNA còn đáp ứng được những yêu cầu của chẩn đoán trước sinh với thời gian trả lời kết quả nhanh và chính xác (chỉ sau 48 – 72h) so với kỹ thuật giải trình tự gen phải mất đến hàng tuần. Đồng thời chi phí cho xét nghiệm thấp giúp giảm gánh nặng kinh tế cho bệnh nhân. Mỗi bệnh nhân sẽ được lựa chọn ít nhất 2-3 marker dị hợp tử.

Tuỳ vào đặc điểm của từng gia đình bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne có thể ứng dụng

các kỹ thuật di truyền phân tử khác nhau trong chẩn đoán trước sinh. Việc lựa chọn kỹ thuật di truyền phân tử để chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne cần dựa vào từng loại đột biến chỉ điểm cụ thể cũng như từng phả hệ của gia đình bệnh nhân. Với các trường hợp xác định được đột biến của người mẹ, có thể sử dụng kỹ thuật xác định đột biến trực tiếp trong chẩn đoán trước sinh như: kỹ thuật PCR trong xác định đột biến xoá đoạn, kỹ thuật MLPA trong xác dịnh đột biến xoá đoạn hoặc lặp đoạn, kỹ thuật giải trình tự gen trong xác định đột biến điểm. Trong trường hợp không xác định được đột biến của người mẹ, chẩn đoán trước sinh cần áp dụng phương pháp phát hiện đột biến gián tiếp Microsatellite DNA.

Việc xây dựng quy trình chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là rất cần thiết để phát hiện chính xác các trường hợp thai nhi mắc bệnh trong thời gian ngắn nhất.

Hiện nay các chương trình sàng lọc, chẩn đoán trước sinh đang tập trung vào phát hiện các rối loạn NST thường gặp như: hội chứng Down (3 nhiễm sắc thể 21), hội chứng Edwards (3 nhiễm sắc thể 18) hay hội chứng Patau (3 nhiễm sắc thể 13). Các hội chứng này gây ra tình trạng đa dị tật về hình thái và hiện không có biện pháp điều trị đặc hiệu. Chính vì vậy, khi chọc hút nước ối, song song với lấy dịch ối để chẩn đoán thai nhi mắc loạn dưỡng cơ Duchenne cũng cần lấy nước ối để chẩn đoán các bất thường nhiễm sắc thể ở thai nhi.

5. Kết luận

Ứng dụng thành công các kỹ thuật di truyền phân tử trong chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne: 1/10 thai nhi được chẩn đoán là thai nhi bệnh lý, thai phụ quyết định đình chỉ thai nghén, 9/10 thai nhi được chẩn đoán là bình thường, tiếp tục theo dõi và quản lý thai.

Tài liệu tham khảo

1. Bushby, K., et al.. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. Lancet Neurol, 9(2); 2010. 177-189.

2. Kneppers, A. L., Ginjaar, I. B., and Bakker, E. Duchenne and Becker muscular dystrophy. Methods Mol Med, 92; 2004. 311-41.

3. Hallwirth Pillay K.D., Bill P.L., Madurai S., Mubaiwa L., Rapiti P. Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients from KwaZulu Natal. J Neurol Sci 252(1); 2007. 1 – 3.

4. Hwa H.L., Chang Y.Y., Chen C.H. et al. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects. J Formos Med Assoc, 106; 2007. pp. 339-46.

5. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). Hum Genet, 117; 2005. pp.92-8.

6. Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophin. JMD, 7(3); 2005. 317-25.

7. Ta MH, Tran TH, Do NH, Pham le AT, Bui TH, Ta VT, Tran VK. Rapid method for targeted prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Vietnam.Taiwan J Obstet Gynecol, 52(4); 2013. 534-539.

8. Matsuo M. Duchenne and Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy. IUBMB Life, 53; 2002. pp. 147-52.

9. Hussey N.D., Donggui H., Froiland D.A., Hussey D.J., Haan E.A., Matthew C.D., Craig J.E. Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells. Mol Hum Reprod, 5(11); 1999. pp. 1089-94.

10. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res, 30(12); 2002. e57.