

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT FISH TRONG SÀNG LỌC MỘT SỐ LỆCH BỘI NHIỆM SẮC THỂ CHO CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ

Hoàng Thị Hương, Nguyễn Việt Tiến, Đặng Thu Hằng

Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Quốc gia, Bệnh viện Phụ sản Trung Ương

Tóm tắt

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ là thuật ngữ chỉ việc sàng lọc những phôi mang bất thường di truyền trước chuyển phôi hoặc sàng lọc trứng trước thụ tinh. Lệch bội NST là một trong những nguyên nhân gây dị dạng, để lại hậu quả nặng nề ở thai nhi, đặc biệt là các đối tượng có nguy cơ cao. Do vậy việc sàng lọc lệch bội hoặc các bất thường di truyền ở những đối tượng thụ tinh trong ống nghiệm góp phần không nhỏ vào việc ngăn chặn những rủi ro này. Trong nghiên cứu, FISH được sử dụng như một kỹ thuật nhằm phát hiện một số lệch bội NST (13, 18, 21, X và Y). Ở đây, 127 phôi ở giai đoạn phân chia 6-8 tế bào ngày 3 được tiến hành sinh thiết. Kết quả cho thấy, 53,6% phôi bình thường về số lượng các cặp NST đem lai, và trong tổng số 46,4% phôi mang bất thường NST có 10% mang hội chứng Patau, 4,1% mang hội chứng Edwards, 18,4% mang hội chứng Down, 4,1%: Turner, 2%: Klinefelter, 20,4%: monosomy và khoảng 41% là các bất thường khác.

Từ khóa: FISH, IVF, lệch bội NST, chẩn đoán di truyền tiền làm tổ.

Abstract

APPLICATION OF FISH IN SCREENING CHROMOSOME ANEUPLOIDY FOR PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS

Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) refers to genetic profiling of embryos prior to implantation, and sometimes even of oocytes prior to fertilization. In this study, FISH was used as a technique to screen some aneuploidies of PGD with the aim to stop the congenital disorders in babies like Patau syndrome, Edwards syndrome and Down syndrome as well as others. Here we carried out biopsy totally 127 embryos and the report showed that rate of normal embryos is 53,6%. And in the total 46,4% of abnormal embryos, trisomy 13 (Patau syndrome) is 10%, trisomy 18 (Edwards syndrome): 4,1%, and trisomy 21 (Down syndrome) is up to 18,4%, Turner syndrome: 4,1%, Klinefelter syndrome: 2%, monosomy: 20,4% and other aneuploidies like XYY, XXX ... is about ~41%.

Key words: FISH, IVF, chromosome aneuploidy, preimplantation genetic diagnosis.

1. Đặt vấn đề

Vào năm 1967, Robert Edwards và Richard Gardner là hai tác giả khởi đầu đưa ra báo cáo thành công về công trình xác định giới tính trên các phôi bào thú [1]. Tiếp đến, vào đầu những năm 80, khi ngành hỗ trợ sinh sản đã thực sự phát triển cùng với tiền bộ của công nghệ khuếch đại gen (PCR), Handyside và các cộng sự cũng đã thử nghiệm thành công một lần nữa với một em bé PGD (chẩn đoán di truyền tiền làm tổ) đầu tiên chào đời vào năm 1990 [2]. Từ đó, cùng với sự phát triển không ngừng của ngành công nghệ sinh học như sự ra đời của các kỹ thuật mới trong PCR, FISH, Whole genome amplification, CGH ... PGD bắt đầu trở thành một kỹ thuật phổ biến cho việc xác định các rối loạn di truyền nghiêm trọng như Hội chứng hồng cầu hình liềm, bệnh Tay Sachs, bệnh teo cơ Duchenne, bệnh Beta-Thalassemia ... ở những đối tượng bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm [3][4][5].

Trong những rối loạn di truyền đã, đang và tiếp tục được nghiên cứu, xác định này, lệch bội nhiễm sắc

thể là một trong những rối loạn di truyền -mất hoặc thêm nhiễm sắc thể do bất thường trong quá trình phân chia của tế bào- gây ra những dị dạng nặng nề cho thai nhi, hoặc sảy thai ... [6][7]. Do vậy, việc sàng lọc lệch bội NST đối với các bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm là cần thiết góp phần giảm thiểu tỷ lệ trẻ sinh mang các dị dạng bẩm sinh, chậm phát triển trí tuệ, ... như hội chứng Patau, Edwards, Down, Turner ... do lệch bội NST 13, 18, 21 và cặp NST giới tính như vậy cũng góp phần giảm bớt gánh nặng cho gia đình và xã hội. Bên cạnh đó, việc sàng lọc các lệch bội NST trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ còn góp phần không nhỏ vào việc nâng cao tỷ lệ làm tổ của phôi mà nhiều nghiên cứu trên thế giới đã đưa ra [8][9][10].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

- Phôi bào ngày 3: 26 phôi bào
- Dung dịch nhuộm tương

- Dung dịch cố định
- Kit lai huỳnh quang tại chỗ (MultiVysion-Vysis)
- Đĩa lai ổn nhiệt
- Kính hiển vi thường
- Kính hiển vi huỳnh quang và một số vật dụng khác

2.2 Phương Pháp

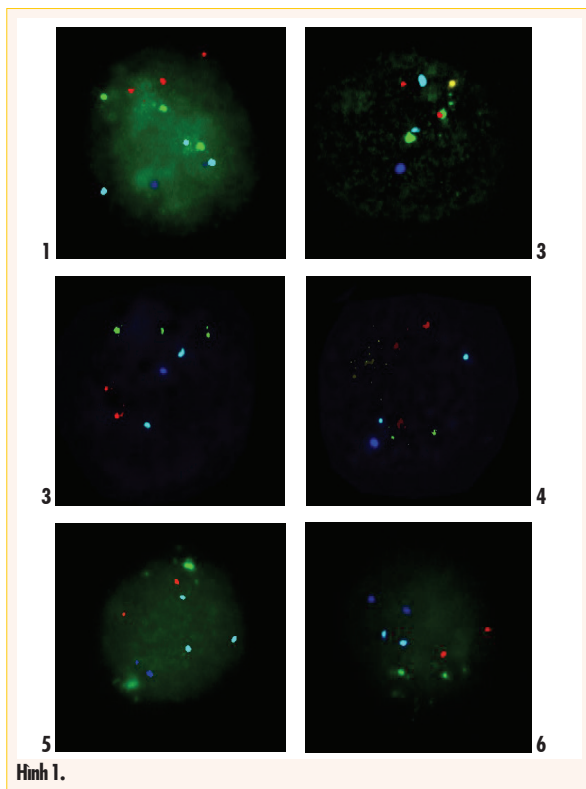
- Cố định phôi bào: phôi bào được cố định trên lam kính đã chuẩn bị sẵn sau khi ủ trong dung dịch nhuộm tương 5-10 phút để phá vỡ màng tế bào, bộc lộ nhân còn nguyên màng nhân gian kỳ. Xác định vị trí nhân và làm khô tiêu bản mẫu ở nhiệt độ phòng trước khi lai.

- Lai huỳnh quang tại chỗ (FISH): nhỏ 3ul kit lai của MultiVysion lên vị trí mẫu cố định, phủ lamen, cement và tiến hành lai trên đĩa lai ổn nhiệt của ThermoBrite theo chu trình: 73°C-5 phút, 37°C-4 giờ.

- Xử lý mẫu sau lai: Bỏ lamen gắn trên lam kính, ủ mẫu trong dung dịch rửa 0,4 x SSC ở 74°C trong 5 phút. Sau đó ủ tiếp trong dung dịch rửa 2 x SSC, 1 phút ở nhiệt độ phòng. Để mẫu khô hoàn toàn và tiến hành nhỏ 6-10ul Antifade II, phủ lamen và đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang.

3. Kết quả

Dưới đây (Hình 1) là một số hình ảnh mà chúng tôi đưa ra trong nghiên cứu về lệch bội NST (1) thể tam



bội được tiến hành lai như mẫu chứng. (2)(6) phôi bào bình thường về số lượng các cặp NST 13, 18, 21 và cặp NST giới tính. (3) phản ánh hiện tượng lệch bội của cặp NST 21 (hội chứng Down), ảnh (4) hiện thị 3 tín hiệu huỳnh quang màu đỏ cho hiện tượng lệch bội NST 13 (hội chứng Patau) và ảnh (5) cho thấy sau kết quả lai huỳnh quang xuất hiện 3 tín hiệu xanh Aqua của NST số 18 (HC Edwards).

Hình 1: (1) Phôi bào mang bộ NST tam bội (mẫu chứng), (2) Phôi bào bình thường về số lượng cặp NST 13, 18, 21, X và Y. (3) Phôi bào mang bất thường về số lượng cặp NST 21 (trisomy 21-HC Down), (4) Phôi bào mang bất thường về số lượng cặp NST 13 (trisomy 13-HC Patau)

Trên tổng số 127 phôi được tiến hành xét nghiệm, tỷ lệ phôi bình thường chiếm 53,6%. Trong số những phôi bất thường, hội chứng Patau chiếm 10%, hội chứng Edwards 4,1%, hội chứng Down chiếm 18,4%, Turner chiếm 4,1%, Klinefelter chiếm 2%, monosomy chiếm 20,4% và các hội chứng khác như thể không nhiễm, hội chứng XYY, XXX ... chiếm ~41% [Bảng 1].

Bảng 1. Tỷ lệ bất thường NST ở các cặp NST lai

Tổng Phôi X/No	Bất thường							Bình thường
	Patau	Edwards	Down	Turner	Klinefelter	Monosomy	Bất thường khác	
127	10%	4,1%	18,4%	4,1%	2%	20,4%	41%	53,6%

4. Bàn luận

Lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất cho xác định lệch bội NST của phôi. Khác với nhiễm sắc thể đồ, FISH sử dụng nhân gian kỳ nên chúng ta có thể xác định lệch bội ở trứng trên thể cực và phôi bào (blastomere) của phôi. Sau cố định trên lam kính nhân gian kỳ sẽ được lai với các đoạn DNA dò, mỗi đoạn này sẽ đặc hiệu với từng vùng trên NST cần xác định và đánh dấu bằng các tín hiệu màu huỳnh quang riêng. Ở đây, chúng tôi sử dụng kit mang DNA dò của hãng VysisMultiVysion (kit chuẩn được lựa chọn tại nhiều trung tâm nghiên cứu lớn trên thế giới), trong đó tín hiệu huỳnh quang màu xanh (green) hiển thị cho NST 21, đỏ (red) hiển thị cho NST 13, màu xanh dương (Aqua) hiển thị cho NST 18, màu xanh nước biển (blue) hiển thị cho NST X và màu vàng (gold) hiển thị cho NST Y.

Đối với kỹ thuật FISH, việc đánh giá kết quả lai cũng gặp một tỷ lệ nhỏ các tín hiệu chồng lên nhau, như vậy có thể dẫn đến kết luận sai trong một số trường hợp monosomy (mất 1 tín hiệu). Tuy nhiên dựa trên các kết quả nghiên cứu mà thể

giới đưa ra, ở đây, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp cố định tạo đường kính lớn cho nhân phôi bào ở giai đoạn gian kỳ nhằm giảm bớt các tín hiệu giả đưa ra kết luận âm tính giả. Để khắc phục hiện tượng này, một số trung tâm trên thế giới cũng đã lựa chọn việc chuyển phôi với các phôi mang thể monosomy do những phôi này không thể phát triển đến giai đoạn blastocyst (ngoại trừ monosomy X và 21).

Nhằm mục đích hiểu rõ hơn về chất lượng phôi ở mức độ di truyền cũng như ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiện tượng lệch bội trên phôi bào, chúng tôi sẽ tiếp tục tiến hành nghiên cứu, mở

rộng số lượng mẫu trên quy mô lớn để kết quả mang ý nghĩa thống kê hơn, cũng như góp phần quan trọng cho sự phát triển của ngành hỗ trợ sinh sản nước ta.

5. Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy tỷ lệ lệch bội NST trên phôi bào khá cao ở các dạng lệch bội mà chúng tôi nghiên cứu bằng kỹ thuật FISH đơn giản, dễ thực hiện và có độ chính xác cao. Do vậy, việc sàng lọc các bất thường này trước chuyển phôi là một yếu tố cần thiết nhằm hạn chế trẻ sinh mang dị tật bẩm sinh, đặc biệt là nhóm các đối tượng có nguy cơ cao.

Tài liệu tham khảo

1. Edwards Rober G, Gardner RL. Sexing of live rabbit blastocysts. May 1967; *Nature* 214 (5088): 576–7.
2. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* Sep 1992; 327 (13): 905–9.
3. Simoncelli, Tania. Pre-implantation Genetic Diagnosis: Ethical Guidelines for Responsible Regulation. CTA International Center for Technology Assessment. Retrieved on Nov. 19 2013.
4. Demko Z, Rabinowitz M, Johnson D. Current Methods for Preimplantation Genetic Diagnosis". *Journal of Clinical Embryology* 2010; 13 (1): 6–12.
5. Shkumatov A, Kuznyetsov V, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Obtaining metaphase spreads from single

- blastomeres for PGD of chromosomal rearrangements" *Reprod. Biomed. Apr* 2007; Online 14 (4): 498–503.
6. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Oncology.* January 2000; 12 (1): 82–8.
7. Driscoll DA, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *The New England Journal of Medicine.* June 2009; 360 (24): 2556–62.
8. Callahan, Tamara L., and Aaron B. Caughey. *Blueprints Obstetrics & Gynecology.* Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
9. Chen, MD, Harold. "Introduction to Trisomy 18". *EMedicine.* Retrieved 2008-07-24.
10. Opitz John M., Gilbert-Barnes Enid F. Reflections on the Pathogenesis of Down Syndrome. *American Journal of Medical Genetics.* 1990; 7: 38–51 (44).