

TẠO THƯ VIỆN CHỨNG DƯƠNG CHO XÉT NGHIỆM SINH HỌC PHÂN TỬ CHẨN ĐOÁN BỆNH BETA THALASSEMIA

Bạch Thị Như Quỳnh^{1,✉}, Nguyễn Hải Bằng¹, Hà Thị Thu²

Nguyễn Văn Thành¹, Dương Quốc Chính³

¹Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

²Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

³Viện Huyết học và truyền máu Trung ương

Beta Thalassemia là bệnh thiếu máu tan máu bẩm sinh gây ra bởi sự bất thường về di truyền trên gen beta-globin (HBB) để lại hậu quả nghiêm trọng về sức khỏe, ảnh hưởng tới giống nòi và là gánh nặng cho gia đình và xã hội. Xét nghiệm phát hiện sớm người mang gen bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử hiện nay sử dụng chứng dương tách chiết từ máu của người mang đột biến, dẫn tới sự không đồng nhất về chất lượng, sự thiếu hụt nguồn chứng dương đặc biệt là những đột biến hiếm. Mục tiêu: tạo thư viện chứng dương cho 8 đột biến trên gen HBB. Đối tượng và phương pháp: 1456 bệnh nhân tiến hành sàng lọc phát hiện người mang gen bệnh. Gen bệnh sau khi phát hiện được tạo dòng gen trong tế bào E. Coli với chủng DH5α, nuôi cấy tăng sinh để tạo thư viện chứng dương. Kết quả: áp dụng công nghệ DNA tái tổ hợp, từ mẫu DNA hiện có của bệnh nhân dương tính với beta thalassemia, nghiên cứu đã tạo ra nguồn thư viện gồm các mẫu đối chứng dương tính của 8 đột biến trên gen HBB bao gồm: CD17, CD41/42, CD26, CD71/72, CD95, -28, IVS1.1 và IVS1.5.

Từ khóa: Beta Thalassemia, Thư viện chứng dương, Công nghệ DNA tái tổ hợp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Beta Thalassemia (còn được gọi là bệnh tan máu bẩm sinh), là một bệnh lý huyết học di truyền liên quan đến sự bất thường của hemoglobin (một protein cấu trúc trong hồng cầu có chức năng vận chuyển oxy). Bệnh Beta Thalassemia xuất hiện khi xảy ra đột biến gen *HBB* phân bố trên NST 11 với chiều dài khoảng 45kb. Ở bệnh nhân Thalassemia, các hồng cầu bị phá vỡ quá mức dẫn đến tình trạng thiếu máu gây ra những hậu quả nghiêm trọng đến giống nòi. Theo thống kê hiện có khoảng 380 dạng đột biến gen β globin liên quan tới bệnh Beta Thalassemia, được chia thành 2 trường hợp: một là đột biến làm giảm tổng hợp số

lượng chuỗi β cho kiểu hình β^+ và hai là đột biến mất đoạn gen làm mất khả năng tổng hợp chuỗi β cho kiểu hình β^0 . Tại Hải Phòng, từ năm 2018 đến nay đã áp dụng quy trình multiplex PCR trong chẩn đoán đột biến gen gây bệnh thalassemia (2; 3). Trong quy trình này 8 loại đột biến phổ biến gây bệnh hoặc liên quan đến bệnh β -Thalassemia tại khu vực Đông Nam Á cũng như Việt Nam đã được lựa chọn bao gồm: CD17 (A→T), CD41/42 (-TTCT), CD26 (G→A) (HbE), CD71/72 (+A), -28 (A→G), CD95 (+A), IVSI-1 (G→T), IVSI-5 (G→C), IVSI-1, IVSI-5 và -28.¹⁻⁵ Theo tiêu chuẩn của xét nghiệm đột biến gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử, chứng dương (positive control) chạy kèm trong mỗi xét nghiệm là yếu tố bắt buộc phải có để kiểm soát độ tin cậy của kết quả. Vậy nguồn chứng dương sẽ được thu thập từ đâu và bằng cách nào luôn là một vấn đề mà những người làm xét nghiệm chẩn đoán thực sự quan tâm. Những yêu cầu

Tác giả liên hệ: Bạch Thị Như Quỳnh

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

Email: btnquynh@hpmu.edu.vn

Ngày nhận: 25/10/2021

Ngày được chấp nhận: 03/11/2021

này đã dẫn đến sự thiếu hụt nghiêm trọng về các mẫu DNA dương tính đặc biệt là những mẫu đột biến hiếm do những chứng dương được sử dụng tại Việt Nam hiện nay đều được tách chiết từ máu của các bệnh nhân mang đột biến gen beta thalassemia. Xuất phát từ lý do trên chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu nhằm tạo ra thư viện gồm các mẫu đối chứng dương tính của tám loại đột biến trên gen *HBB* bằng công nghệ DNA tái tổ hợp.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

Tám loại đột biến: CD17, CD41/42, CD26, CD71/72, CD95, IVS1-1, IVS1-5 và -28 thu thập từ 1456 bệnh nhân được chẩn đoán mắc Thalassemia dựa trên các dấu hiệu lâm sàng, chỉ số hóa sinh, huyết học, điện di huyết sắc tố điển hình của bệnh. Không thu nhận những mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nữ nhi dưới 6 tháng tuổi và những mẫu bệnh phẩm có chỉ số hoá sinh, huyết học cũng như điện di huyết sắc tố không điển hình; bệnh nhân không đồng ý chấp thuận tham gia nghiên cứu.

Nghiên cứu được tiến hành tại Labo công nghệ cao - Trường Đại học Y Dược Hải Phòng - 72A Nguyễn Bình Khiêm - Ngô Quyền - Hải Phòng. Thời gian nghiên cứu từ tháng 12/2019 đến tháng 3/2021.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu

Phương pháp lấy mẫu thuận tiện, 2 mL máu ngoại vi của bệnh nhân nghi ngờ mang đột biến gen beta-thalassemia được thu thập vào ống chống đông EDTA.

Phương pháp tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết từ máu toàn phần theo kit Blood DNA Mini Kit (OMEGA). Tất cả các mẫu sau tách chiết được tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Nanodrop. Chỉ những mẫu có tỷ số A260/A280 \geq 1,8 mới đạt yêu cầu về độ tinh sạch và

được sử dụng để phân tích.

Phương pháp khuếch đại gen

Phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu được thừa hưởng từ nghiên cứu: "Xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen Thalassemia tại Hải Phòng dựa trên kỹ thuật multiplex PCR". Trong số đó 5 cặp mồi phát hiện các đột biến CD17; CD95; CD71/72; -28 và IVS1.1 được nhóm nghiên cứu thiết kế, cải biên từ công trình nghiên cứu trước. Các cặp mồi còn lại: CD41/42; IVS1.5; CD26 sử dụng trình tự đã công bố của Liên đoàn Thalassemia thế giới.

Thành phần phản ứng PCR (thể tích 20 μ L) gồm: GoTaq Hot Start Master Mix 2X, 5 pmol primer, 100 - 150 ng DNA khuôn. Chu trình nhiệt: 94°C/5 phút, 37 chu kỳ [94°C/30 giây - Tgm/30 giây - 72°C/30 giây], 72°C/5 phút. Bảo quản 4°C. Nhiệt độ gắn mồi (Tm) là 62°C cho các đột biến CD17, CD41/42, IVS1.1, IVS1.5 và CD95 và 63°C cho các đột biến CD26, CD71/72 và -28. Sản phẩm sau phản ứng được tiến hành điện di trên gel agarose 2,5%, 100 Vol trong vòng 30 phút.⁶

Tạo dòng gen

Sản phẩm gen đột biến được gắn vào vector tách dòng PCR2.1 biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng *DH5* - α . Các dòng tế bào được sàng lọc bằng kỹ thuật enzyme cắt giới hạn; kỹ thuật PCR và thực hiện giải trình tự gen trên hệ thống ABI 3500 để khẳng định dòng tế bào tái tổ hợp chứa các đột biến gen mong muốn. Kỹ thuật cấy chuyển sau 10 lần nuôi cấy và sau 3 tháng lưu giữ tại nhiệt độ -80° được thực hiện để kiểm tra tính bảo toàn của gen trong dòng tế bào tái tổ hợp. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen bằng phần mềm BioEdit.

Ngoại kiểm

Từ các dòng tế bào tái tổ hợp được bảo quản tại nhiệt độ -80°, chứa 8 loại đột biến trên gen *HBB*, lựa chọn ngẫu nhiên đại diện cho 8 dạng đột biến để tách chiết thu nhận DNA plasmid. DNA plasmid được sử dụng làm đối

chứng dương cho quy trình chẩn đoán đột biến gen gây bệnh thalassemia bằng kỹ thuật multiplex PCR. Quy trình có sử dụng các mẫu DNA là mẫu máu của các bệnh nhân mang các đột biến trên gen *HBB* tương ứng với 8 loại đột biến trên để đối sánh. Kết quả được phân tích so sánh giữa nguồn chứng dương từ mẫu máu bệnh nhân và nguồn chứng dương tái tổ hợp về độ đặc hiệu và nồng độ sản phẩm PCR sau khi thực hiện phản ứng multiplex PCR. Nồng độ DNA được đo bằng phương pháp quang phổ kế. Độ đặc hiệu của phản ứng được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel Agarose.

3. Đạo đức trong nghiên cứu

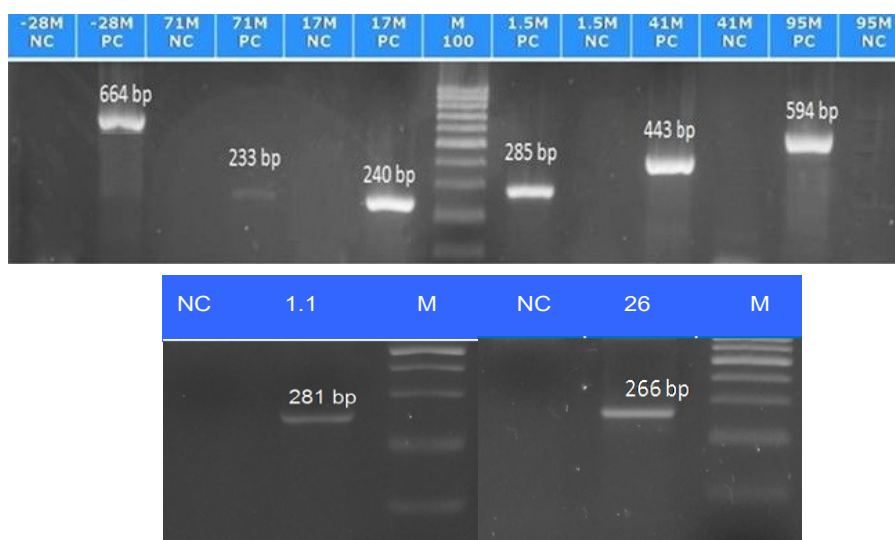
Nghiên cứu tuân thủ tuyệt đối các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và hoàn toàn có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia. Bệnh nhân được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sĩ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

1. Sàng lọc 8 đột biến trên gen *HBB* bằng kỹ thuật Multiplex-PCR

Từ 200 mẫu DNA thu được từ 200 bệnh nhân được chẩn đoán mang gen bệnh thalassemia tại bệnh viện Trường Đại học Y dược Hải Phòng và bệnh viện Phụ sản Hải Phòng, chúng tôi thực hiện phản ứng multiplex PCR. Kết quả có 59 bệnh nhân mang gen β -thalassemia gồm 6 loại đột biến. Trong số các đột biến, Cd26 chiếm tỉ lệ cao nhất: 45,7%, kế tiếp là các đột biến CD17, CD71/72, CD41/42 với tỉ lệ tương ứng lần lượt là: 17,0%, 15,2%, 11,9%. Đối với Đột hai loại đột biến hiếm IVS1.1, IVS1.5, chúng tôi đã phối hợp cùng với Viện Huyết học Truyền máu Trung ương để tiến hành sàng lọc trên 1256 bệnh nhân. Với 1256 bệnh nhân đã sàng lọc, chúng tôi ghi nhận 1 trường hợp mang đột biến IVS1.1 và 1 trường hợp mang đột biến IVS1.5 với tỉ lệ 0,08%.

2. Kết quả tổng hợp đoạn gen chứa đột biến gây bệnh bằng kỹ thuật PCR



Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại các đột biến trên gen *HBB*

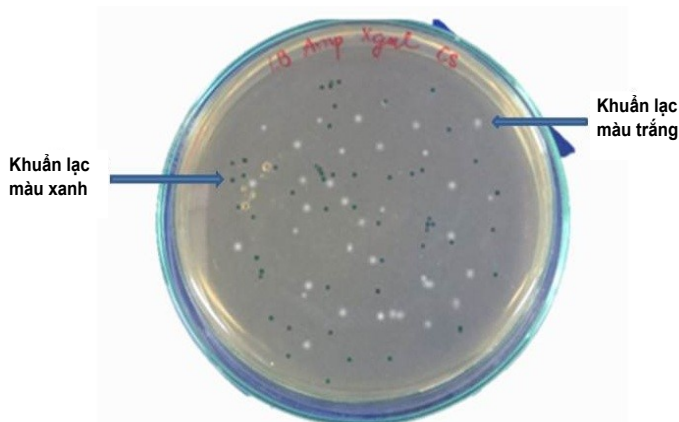
M100: Maker 100bp, NC: Negative Control, 1.1: đột biến IVS1.1, 26: đột biến CD26

Bằng phản ứng PCR sử dụng 8 cặp mồi đặc hiệu tương ứng cho đột biến CD17, CD41/42, CD26, CD71/72, CD95, -28, IVS1.1 và IVS1.5 để khuếch đại DNA của bệnh nhân mang đột biến. Kết quả PCR khuếch đại một số loại đột biến beta-thalassemia được minh họa ở Hình 1.

Kết quả điện di trên gel agarose 2,5% cho thấy sản phẩm PCR thu được (tương ứng với mỗi loại đột biến) là một băng sáng duy nhất, rõ nét, kích thước đúng với kích thước giữa 2 mồi khuếch đại; mẫu chứng âm không có vạch chứng tỏ phản ứng không bị nhiễm DNA ngoại lai. Các sản phẩm PCR đảm bảo chất lượng cho các kỹ thuật tiếp theo.

3. Kết quả tạo dòng các plasmid tái tổ hợp mang các đột biến

Sản phẩm PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng của 8 loại đột biến trên gen *HBB* được gắn vào vector tách dòng pCR 2.1/TA cloning (Invitrogen) và biến nạp vào tế bào *E.coli* - DH5 α . Tế bào *E.coli* - DH5 α sau biến nạp phát triển trên môi trường LB lỏng. Dịch nuôi cấy được cấy trải trên môi LB agar (100 μ l/đĩa) có bổ sung Amp; Xgal và IPTG (Hình 2).

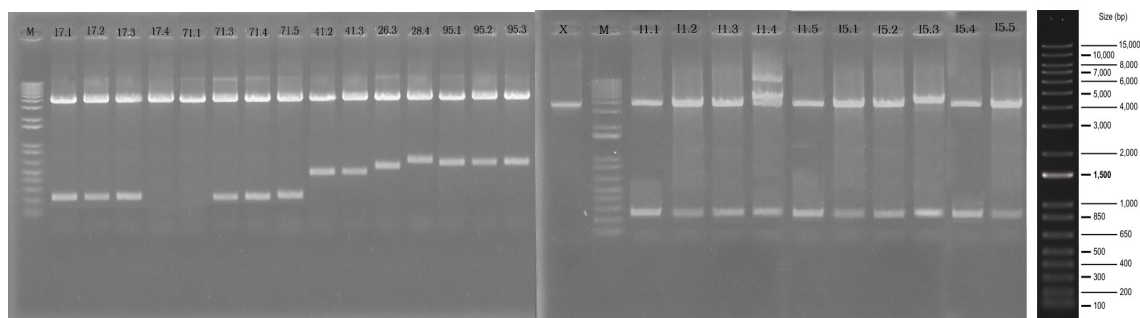


Hình 2. Kết quả cấy chọn lọc trên môi trường LB^{Amp=Xgal = IPTG}

Khuẩn lạc xanh: các tế bào không nhận được gen đột biến;

Khuẩn lạc trắng: những tế bào có khả năng nhận được gen đột biến

Lựa chọn các khuẩn lạc màu trắng và một khuẩn lạc màu xanh trên mỗi đĩa môi trường tương ứng với mỗi loại đột biến để tiến hành tách DNA plasmid và sử dụng enzyme cắt giới hạn để chọn lọc các plasmid mang đột biến gen mong muốn. Sản phẩm sau đó được điện di trên gel agarose 1,5% (Hình 3).



Hình 3. Kết quả cắt chọn lọc DNA plasmid bằng enzyme giới hạn

Đường chạy M: Maker 100bp; X: khuẩn lạc xanh; 17.1-17.4: các dòng tế bào mang plasmid pP/CD17; 71.1-71.5: các dòng tế bào mang plasmid pB/CD71/72; 41.2-41.3: các dòng tế bào mang plasmid pB/CD41/42; 26.3: dòng tế bào mang plasmid pB/CD26; 28.4: dòng tế bào mang plasmid pB/-28; 95.1-95.4: dòng tế bào mang plasmid pB/CD95; 11.1-11.5: các dòng tế bào mang plasmid pB/IVS-I.1; 15.1-15.5: các dòng tế bào mang plasmid pB/IVS.I.5

Quan sát ảnh điện di chúng ta thấy rằng, DNA plasmid sau khi cắt tại đường chạy: 17.1-17.3; 71.3-71.5; 41.2-41.3; 26.3; 28.4; 95.1-95.3; 11.1-11.5; 15.1-15.5 xuất hiện 1 băng rõ rệt có kích thước tương ứng với kích thước của đoạn gen đích được gắn vào vectơ.

4. Giải trình tự các dòng tế bào mang đột biến

Sản phẩm phản ứng PCR từ DNA plasmid đã tách chiết từ các dòng tế bào tái tổ hợp được tiến hành xác định trình tự. Kết quả giải trình tự bằng máy ABI 3500 cho thấy tín hiệu giải trình tự gen đặc hiệu, rõ nét, không xuất hiện tín hiệu nhiễu. Từ các trình tự gen thu nhận được, tiến hành phân tích bằng phần mềm BioEdit.

Homo sapiens voucher Yoruba_13_0 hemoglobin subunit beta (HBB) gene, complete cds

Sequence ID: [MK476491.1](#) Length: 1824 Number of Matches: 1

Range 1: 457 to 699 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
444 bits(240)	2e-120	243/244(99%)	1/244(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CATGGCAAGAAAGTGC	TCGGTGCCTTTAAGT	GATGGCCTGGCTCAC	CTGGACAACCTCAA	60
Sbjct 457	CATGGCAAGAAAGTGC	TCGGTGCCTTT-AGT	GATGGCCTGGCTCAC	CTGGACAACCTCAA	515
Query 61	GGGCACCTTTGCC	CACACTGAGTGAGCT	GCACGTGACAAGCTG	CACGTGGATCCTGAGAA	120
Sbjct 516	GGGCACCTTTGCC	CACACTGAGTGAGCT	GCACGTGACAAGCTG	CACGTGGATCCTGAGAA	575
Query 121	CTTCAGGGTGAGTCT	ATGGGACGCTTGATG	TTTTCTTTCCCTTCT	TTTTCTATGGTTAAG	180
Sbjct 576	CTTCAGGGTGAGTCT	ATGGGACGCTTGATG	TTTTCTTTCCCTTCT	TTTTCTATGGTTAAG	635
Query 181	TTCATGTGCATAGGA	AGGGGATAAGTAAC	CAGGGTACAGTTTAG	AATGGGAAACAGACGAAT	240
Sbjct 636	TTCATGTGCATAGGA	AGGGGATAAGTAAC	CAGGGTACAGTTTAG	AATGGGAAACAGACGAAT	695
Query 241	GATT	244			
Sbjct 696	GATT	699			

Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB) gene, complete cds

Sequence ID: [GU324922.1](#) Length: 19006 Number of Matches: 1

Range 1: 1892 to 2131 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
433 bits(234)	3e-117	238/240(99%)	0/240(0%)	Plus/Plus	
Query 6	ACCTCACCTGTGGAG	CACACCCTAGGGT	TGGCCAATCTACTCC	CAGGAGCAGGGAGGG	65
Sbjct 1892	ACCTCACCTGTGGAG	CACACCCTAGGGT	TGGCCAATCTACTCC	CAGGAGCAGGGAGGG	1951
Query 66	CAGGAGCCAGGGCT	TGGGCATAAAAAGT	CAGGGCAGAGCCAT	CTATTGCTTACATTTGCTTC	125
Sbjct 1952	CAGGAGCCAGGGCT	TGGGCATAAAAAGT	CAGGGCAGAGCCAT	CTATTGCTTACATTTGCTTC	2011
Query 126	TGACACAACCTGTG	TCTACTAGCAACCT	CAAACAGACACCAT	TGGTGCATCTGACTCCTGAG	185
Sbjct 2012	TGACACAACCTGTG	TCTACTAGCAACCT	CAAACAGACACCAT	TGGTGCATCTGACTCCTGAG	2071
Query 186	GAGAAGTCTGCCGT	TACTGCCCTGTGGG	GCTAGCTGAACGT	TGGATGAAGTTGGTGGTGAG	245
Sbjct 2072	GAGAAGTCTGCCGT	TACTGCCCTGTGGG	GCAAGGTGAACGT	TGGATGAAGTTGGTGGTGAG	2131

Hình 4. Đại diện kết quả phân tích trình tự gen đột biến CD71/72 trên phần mềm Bio Edit

5. Kết quả kiểm tra tính bảo toàn của gen đột biến đổi

Chọn ngẫu nhiên một dòng tế bào tái tổ hợp cho mỗi loại đột biến để tiến hành hoạt hóa trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Sau đó thực hiện cấy chuyển các dòng tế bào trong môi trường LB lỏng đến lần thứ 10. Sau mỗi lần cấy chuyển sẽ tiến hành đo mật độ phát triển tế bào tại bước sóng 600 nm để đánh giá khả năng phát triển của tế bào sau mỗi lần nuôi cấy. Kết quả sau mỗi lần cấy chuyển, mật độ tế bào

đạt OD₆₀₀ trong khoảng 5,9 - 6,3 sau thời gian 2,5h - 3h. Và sau mỗi lần cấy chuyển, tế bào được thu lại để tiến hành kiểm tra bằng kỹ thuật PCR. Các tế bào sau 10 lần nuôi cấy đều chứa những đột biến tương ứng đưa vào ban đầu.

6. Kết quả ngoại kiểm các chứng dương tái tổ hợp

Các dòng tế bào tái tổ hợp sau đó được chuyển đến Viện Huyết học và Truyền máu Trung Ương để đánh giá. Kết quả ngoại kiểm được thể hiện tại Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả ngoại kiểm các chứng dương tái tổ hợp bằng kỹ thuật Multiplex-PCR

STT	Mã số	Nồng độ DNA (ng/mL)				Độ đặc hiệu của phản ứng	
		Trước phản ứng		Sau phản ứng		Mẫu máu bệnh nhân	Tế bào tái tổ hợp
		Mẫu máu bệnh nhân	Tế bào tái tổ hợp	Mẫu máu bệnh nhân	Tế bào tái tổ hợp		
1	CD17-R	63	1,8	831,6	1247	+++	++++
2	CD41/42-R	86	1,8	867	1201	++	++++
3	CD26-R	106,3	1,8	846,6	1519	+	++++
4	CD71/72-R	100	1,8	831	1256	++	++++
5	-28-R	89	1,8	790	1198	+	++++
6	CD95-R	124	1,8	824	1255	++	++++
7	IVS1.1-R	69	1,8	810	1220	+	++++
8	IVS1.5-R	65	1,8	819	1230	+	++++

("+", "++", "+++", "++++": mức độ đặc hiệu của phản ứng multiplex-PCR)

Có sự đồng nhất về kết quả xác định đột biến giữa DNA tách chiết từ mẫu máu của bệnh nhân và DNA tái tổ hợp, DNA tái tổ hợp cho kết quả ổn định và đặc hiệu hơn.

IV. BÀN LUẬN

Từ 200 mẫu bệnh phẩm thu nhận tại Hải Phòng chỉ sàng lọc được các mẫu bệnh phẩm mang 6 loại đột biến CD17; CD41/42; CD95; CD71/72; -28 và CD26. Để sàng lọc được 2 loại đột biến IVS.11 và IVS.15, phải thực hiện trên

số lượng mẫu tương đối lớn là 1246 mẫu và tỉ lệ dương tính là 0,08%. Với tỉ lệ dương tính thấp của hai loại đột biến này trong cộng đồng, việc tạo ra các nguồn chứng dương bằng con đường tái tổ hợp là hết sức cần thiết.

Các đột biến được tổng hợp bằng kỹ thuật PCR được sử dụng các cặp mồi đặc hiệu và các quy trình cũng đã được tối ưu hoá từ đề tài nghiên cứu trước của chính nhóm tác giả, do đó các sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu.⁵

Sự hình thành cả hai loại khuẩn lạc xanh

và trắng trên môi trường chọn lọc có bổ sung Amp, Xgal và IPTG là do sự tồn tại cả hai loại tế bào: loại nhận được gen đột biến và loại không nhận được gen đột biến. Theo thiết kế, vector vector pCR[®]2.1 mang gen *lac-Z* tổng hợp nên β -galactosidase có khả năng chuyển hóa X-gal thành hợp chất có màu xanh. Do đó, những tế bào nhận vector pCR[®]2.1 tự động vòng sẽ có gen *lac-Z* hoạt động thường tạo ra enzyme β -galactosidase chuyển hóa X-gal nên khuẩn lạc có màu xanh. Những khuẩn lạc trắng là do nhận được plasmide tái tổ hợp có đoạn DNA ngoại lai xen vào giữa *lac* promoter và gen cấu trúc *lac-Z* của operon Lac nên *lac* promoter bị bất hoạt.⁷ Chọn lọc các plasmid tái tổ hợp (chứa đột biến mong muốn) bằng kỹ thuật sử dụng enzyme cắt giới hạn đã cho hiệu suất khá cao từ tổng số các khuẩn lạc màu trắng thu được cho mỗi loại đột biến (Bảng 1). Vector tách dòng pCR 2.1, sau vị trí promoter là đoạn *lacZ α* mã hóa cho 146 axit amin đầu tiên của enzym β -galactosidase, vùng cắt gần đa vị được thiết kế trên đoạn này với 15 vị trí cắt duy nhất của các enzym hạn chế, trong đó

chứa 2 hai vị trí cắt giới hạn của *EcoR* I.⁸ Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng enzyme cắt giới hạn *E.coRI*, là enzyme có vị trí cắt sát ở 2 bên với sản phẩm PCR (trình tự khuếch đại của gen đích) được chèn. Vị trí cắt ở hai đầu của gen đích chỉ cách gen đích khoảng 5bp, vì thế khi gen đích được cắt ra khỏi vector tách dòng, kích thước gen đích gần như không thay đổi trên hình ảnh điện di. Khác với nghiên cứu của Wen Wang và cs, họ đã sử dụng vector T pBluescrip (Stratagen) trong quá trình tách dòng gen khi thực hiện tạo chứng dương cho 7 đột biến gen alpha Thalassemia. Sở dĩ như vậy bởi vì các đột biến alpha thường là các đột biến xoá đoạn với kích thước lớn, do đó phù hợp với việc sử dụng vector pBluescrip (Stratagen) hơn là những đột biến điểm trên gen *HBB*.⁹

Chúng tôi cũng sử dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc cho các dòng tế bào tái tổ hợp. Kết quả đã không có sự sai khác giữa hai phương pháp PCR và cắt bằng Enzyme giới hạn (Bảng 2). Hiệu suất chọn lọc được tính bằng số khuẩn lạc trắng mang gen đột biến trên tổng số khuẩn lạc trắng thu được cho mỗi loại đột biến.

Bảng 2. So sánh hiệu suất chọn lọc các dòng tế bào tái tổ hợp bằng kỹ thuật sử dụng Enzyme cắt giới hạn và PCR

STT	Plasmide	Hiệu suất chọn lọc bằng enzyme cắt giới hạn (%)	Hiệu suất chọn lọc bằng PCR (%)
1	pB/ CD17	35	35
2	pB/ CD41/42	34	34
3	pB/ CD26	20	20
4	pB/ CD71/72	22	22
5	pB/ -28	18	18
6	pB/ CD95	44	44
7	pB/ IVSI-1	48	48
8	pB/ IVSI-5	50	50

Kết quả giải trình tự gen từ các dòng tế bào tái tổ hợp đã khẳng định các dòng tế bào tái tổ hợp thu được có chứa các đột biến mong muốn. Phân tích kết quả giải trình tự gen bằng phần mềm BioEdit, so sánh với trình tự gen đột biến trên NCBI nhận được độ tương đồng cao: 99 - 100% (Bảng 3)

Bảng 3. So sánh trình tự gen của 8 đột biến trên gen HBB

STT	Tên đột biến	Mã số trên Genbank	Độ tương đồng với gene nghiên cứu
1	CD41/42	EU 760925	100%
2	CD95	KR 028331	99%
3	CD71/72	MK 476941	99%
4	-28	MK 476491	100%

STT	Tên đột biến	Mã số trên Genbank	Độ tương đồng với gene nghiên cứu
5	CD17	GU 324922	99%
6	CD26	MK 476504	99%
7	IVS.I1	AH 001475	100%
8	IVS.I5	MK 476464	99%

Các dòng tế bào tái tổ hợp khi thực hiện tăng sinh 10 lần liên tục và không xảy ra hiện tượng đào thải gen nhận đã khẳng định sự thành công trong nghiên cứu này. Bernacki S. H. và cộng sự đã nghiên cứu tạo các dòng tế bào mang chứng dương cho các đột biến rối loạn di truyền cũng thực hiện tăng sinh tế bào qua 20 lần để loại trừ những dòng tế bào bị đào thải gen đột biến. Kết quả phần lớn các dòng tế bào có tính ổn định cao. Tuy nhiên vẫn có một số phần trăm nhỏ các dòng tế bào không đảm bảo sức sống và không đảm bảo tính ổn định của gen đột biến đã được loại bỏ.⁹ Đối với các dòng tế bào chứa 8 loại đột biến trên gen HBB, chúng tôi tiếp tục kiểm tra tính bảo toàn của gen sau thời gian bảo quản tại nhiệt độ -80° C và kết quả thật khả quan là tất cả các dòng tế bào đó hoàn toàn không xảy ra hiện tượng đào thải gen nhận.

Các dòng tế bào tái tổ hợp mang 8 loại đột biến trên gen *HBB* đã được gửi tới Labo xét

thử nghiệm Di truyền - Sinh học Phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương để đánh giá thử nghiệm. Kết quả cho thấy nguồn chứng dương được tạo ra bằng con đường tái tổ hợp ổn định và đặc hiệu hơn khi so sánh với đối chứng dương là mẫu máu người mang gen bệnh. Khi thực hiện phản ứng multiplex PCR, nồng độ DNA khuôn từ dòng tế bào tái tổ hợp đều rất thấp (1,8 ng/μL) so với nồng độ DNA khuôn tách chiết từ mẫu máu toàn phần của người mang gen bệnh (CD17- 63 ng/μL). Đặc biệt hơn là việc sử dụng các chứng dương tạo ra theo kỹ thuật tái tổ hợp đã loại bỏ được những sản phẩm không đặc hiệu thường xuất hiện từ các chứng dương là mẫu máu của người mang đột biến.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc tạo thư viện chứng dương của 08 loại đột biến trên gen *HBB*: CD17, CD41/42, CD26, CD71/72, CD95,

-28, IVS1.1 và IVS1.5. Đây là nguồn chứng dương ổn định, cần thiết để thay thế cho nguồn chứng dương từ các mẫu bệnh phẩm trong các phòng thí nghiệm chẩn đoán phân tử. Sản phẩm này cũng đưa ra một giải pháp thay thế nhanh chóng, chi phí thấp, cho các đột biến di truyền khác mà chưa được tạo bởi các dòng tế bào bắt tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kazazian HJ, Dowling C, Waber P, Huang S, Lo W. The spectrum of beta-thalassemia genes in China and Southeast Asia. *Blood*. 1986;68(4):964-966. doi:10.1182/blood.V68.4.964.964.
2. Nopparatana C, Panich V, Saechan V, et al. The spectrum of beta-thalassemia mutations in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1995;26 Suppl 1:229-234.
3. *Molecular analysis of β -thalassemia in South Vietnam*. Svasti 2002. American Journal of Hematology; Wiley Online Library. Accessed November 2, 2021. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.10193>.
4. Lê Hồng Thu. *Nghiên cứu đặc điểm gen*

đột biến trên bệnh nhân Beta-Thalassemia tại Hải Phòng. Published online 2017. Accessed October 18, 2021. http://125.212.201.8:6008/handle/DHKTYTHD_123/5220.

5. Lê Hồng Thu. Áp dụng kỹ thuật PCR để xác định đột biến gen trên bệnh nhân nghi ngờ beta-thalassemia tại Hải Phòng. 2017;458.
6. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed.
7. Addgene - Analyze Sequence. Accessed November 2, 2021. https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2283/.
8. Wang W, Tan ASC, Chong SS. "Reconstituted" α -Thalassemia Genomic Samples as Positive Controls for the Molecular Diagnostic Laboratory. *Clinical Chemistry*. 2002;48(6):952-955. doi:10.1093/clinchem/48.6.952.
9. Genetically Characterized Positive Control Cell Lines Derived from Residual Clinical Blood Samples. *Clinical Chemistry*. Oxford Academic. Accessed October 18, 2021. <https://academic.oup.com/clinchem/article/51/11/2013/5629754?login=true>.

Summary

GENETIC LIBRARY OF 8 MUTATIONS FOR BETA THALASSEMIA

Beta thalassemia is an inherited blood deficit disease caused by genetic disorders in beta-globin gene. It leads to severe health problems for infected individuals as well as the society. Early detection of genetic carriers is done by molecular analysis techniques that compare blood sample with positive control extracted from people with the rare genetic mutations. However, one drawback is the lack of homogeneity in quality and source of positive control, especially of rare mutations. The objective of this study was to create a genetic library of positive control of 8 mutations of *HBB* gene. A total of 1456 patients diagnosed with beta thalassemia were screened and tested for genetic carriers. Detected genes were inserted into *E. coli* cells with DH5 α strain for expansion to create positive control library. By using recombinant DNA technology using the available DNA of beta thalassemia positive patients, the study has created a positive control library for 8 mutations of *HBB* gene including: CD17, CD41/42, CD26, CD71/72, CD95, -28, IVS 1.1 and IVS 1.5.

Keywords: Beta Thalassemia, positive control material, recombinant DNA technology.