

HOÀN CHỈNH KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH ADN TỪ TẾ BÀO ỒI VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH

LƯƠNG THỊ LAN ANH, HOÀNG THỊ NGỌC LAN,
TRẦN THỊ THANH HƯƠNG, PHAN THỊ HOAN
Đại học Y Hà Nội

TÓM TẮT

ADN trong tế bào ối rất cần thiết trong chẩn đoán trước sinh để phát hiện các bất thường ở mức độ phân tử. Tuy nhiên tế bào trong dịch ối rất ít nhưng phải sử dụng cho rất nhiều kỹ thuật khác nhau trong chẩn đoán trước sinh. Để thu thập được nhiều ADN của thai từ tế bào ối mà không cần đến nhiều dịch ối, cần hoàn chỉnh kỹ thuật chiết tách ADN từ tế bào ối. Mục tiêu: 1. Chiết tách được ADN từ các loại tế bào ối. 2. ứng dụng phát hiện gen FMR1 từ ADN của thai nhi. Đối tượng và phương pháp: chiết tách ADN từ 3 loại dịch ối: dịch ối nguyên không nuôi cấy (tế bào ối nguyên), dịch ối gồm các tế bào ối và thành phần tế bào bong trong quá trình nuôi cấy (tế bào ối bong), dịch ối gồm các tế bào ối nuôi cấy (tế bào ối bám). Sử dụng kỹ thuật PCR nhân gen FMR1. Kết quả và kết luận: Chiết tách được ADN từ các loại tế bào ối. ứng dụng thành công trong việc nhân gen FMR1 đối với ADN của thai nhi chiết tách từ tế bào ối.

Từ khóa: tế bào ối, chiết tách, ADN, chẩn đoán trước sinh.

SUMMARY

DNA in amniotic fluid is very necessary for prenatal diagnosis to detect molecular genetic abnormally. However, little amounts of cells appear in amniotic fluid also using for many prenatal techniques. Our research focus on detecting fetal DNA with using less or economizing on amniotic fluid as much as possible. Objectives: successfully in extracting DNA from amniotic fluid cells, detection FMR1 gene in fetal DNA. Methods: Extracted DNA from 3 kinds of amniotic fluid cells beginning at 17 weeks gestation, one is not cultured, the other is cultured and peeled at the culture medium, the remain is peeled by trypsination. Using polymerase chain reaction technique to detect FMR1 gene. Conclusions: successfully in extracting DNA from amniotic fluid cells with large amounts and pure DNA and successfully in detecting FMR1 gene from fetal DNA.

Keywords: amniotic fluid cells, DNA extraction, prenatal diagnosis.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch ối là mẫu vật được sử dụng chủ yếu trong chẩn đoán trước sinh. Các tế bào có trong dịch ối hay còn gọi là tế bào ối hầu hết có nguồn gốc từ thai nhi. Thành phần trong dịch ối là các tế bào bong của thai nhi, nên số lượng thường rất ít. Tuy nhiên lượng tế bào này rất quan trọng, vì đây là sản phẩm dành cho các kỹ thuật chẩn đoán trước sinh, được sử dụng để

xét nghiệm sinh hoá, di truyền tế bào, di truyền phân tử... Vì vậy sau khi chọc hút dịch ối, dịch ối cần phải tiến hành nuôi cấy ngay để làm tăng lượng tế bào. Khi trải qua quá trình nuôi cấy khoảng 6 ngày, các tế bào ối phân chia sẽ bám vào thành chai nuôi cấy (gọi là tế bào ối bám), những tế bào này sẽ tiếp tục được duy trì nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cho đến lúc thu hoạch tế bào, còn lại một số ít tế bào không phân chia hoặc các thành phần của tế bào sẽ bong vào trong môi trường (gọi là tế bào ối bong). Các tế bào ối bám dùng để làm tiêu bản nhiễm sắc thể trong kỹ thuật di truyền tế bào, những tế bào bong và thành phần của tế bào bong thường bị bỏ đi khi thay môi trường trong quá trình nuôi cấy tế bào. Đề tài này sử dụng kỹ thuật chiết tách ADN từ 3 loại dịch ối: dịch ối nguyên chưa nuôi cấy, dịch ối qua nuôi cấy với 2 phương pháp xử lý không dùng trypsin (để thu tế bào ối bong) và dùng trypsin để làm bong tế bào (thu tế bào ối bám). Từ đó so sánh và rút ra được hiệu quả tốt nhất trong việc thu thập ADN của thai nhi từ tế bào ối trong nghiên cứu di truyền phân tử, đồng thời việc chẩn đoán trước sinh có thể tiến hành một cách hiệu quả. Đề tài hoàn chỉnh kỹ thuật chiết tách ADN từ tế bào ối với hai mục tiêu:

1. Chiết tách được ADN từ các loại tế bào ối.
2. ứng dụng phát hiện gen FMR1 từ ADN của thai nhi.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

10 mẫu dịch ối được chọc dò từ các thai phụ là đối tượng của chẩn đoán trước sinh, tại Bộ môn Y sinh học - Di truyền trường Đại học Y Hà Nội. Các mẫu dịch ối được chọc dò đồng nhất ở tuổi thai 17 tuần.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Xử lý dịch ối

Mỗi mẫu dịch ối được xử lý thành 3 phần:

- Dịch ối được giữ nguyên sau khi chọc dò (tế bào ối nguyên).

- Một phần đem nuôi cấy các tế bào dịch ối trong chai bằng môi trường amniomax trong khoảng thời gian 06 ngày, thu các tế bào lơ lửng trong môi trường, không bám thành chai nuôi cấy (tế bào ối bong).

- Phần còn lại dùng dung dịch trypsin (1 - 2ml/5 - 10 phút/37°C) làm bong các tế bào bám vào thành chai nuôi cấy (là các tế bào đã phân chia trong môi trường nuôi cấy sẽ bám vào thành chai - tế bào ối bám).

Như vậy tổng số mẫu có tế bào chiết tách ADN là

30 mẫu.

Thu các tế bào ối trong 30 mẫu trên bằng phương pháp:

- Ly tâm 1000 vòng trong 5 phút.
- Loại bỏ dịch nổi, lấy cặn tế bào cho vào tuýp eppendorf 1,5ml:

- Rửa cặn tế bào bằng dung dịch PBS (Phospho Buffered Salin) từ 1 đến 2 lần.

2.2. Kỹ thuật chiết tách ADN Nguyên lý chung:

- Phá vỡ tế bào
- Loại bỏ protein
- Hấp phụ ADN bằng chất Silica
- Rửa ADN

Quy trình:

- Cho 200µl PBS vào cặn tế bào ối, bổ xung thêm 20µl Proteinase K và RNase, trộn đều.

- Thêm vào 200µl Binding Buffer, trộn đều.

- Ủ 55°C trong 10 phút.

- Bổ xung 200µl Ethanol 96 -100°, trộn đều.

- Chuyển toàn bộ mẫu đã được thực hiện ở các bước trên sang cột, ly tâm 10000 vòng trong 1 phút, chuyển cột sang một tuýp sạch khác.

- Thêm 500µl dung dịch rửa 1 (Wash buffer 1) vào cột, ly tâm 10000 vòng trong 1 phút, chuyển cột sang một tuýp sạch khác.

- Thêm 500µl dung dịch rửa 2 (Wash buffer 2) vào cột, ly tâm 14000 vòng trong 3 phút.

- Đặt cột sang tuýp vô trùng 1,5 ml, thêm 100µl - 200µl TE (Elution buffer), để nhiệt độ phòng trong 1 phút, ly tâm 14000 vòng trong 1,5 phút, thu ADN.

Sản phẩm chiết tách từ tế bào ối được điện di trên gel Agarose 0,8%, dưới điện thế 100V trong vòng 30 phút. ADN được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch bằng quang phổ kế trên máy Biomate. Phương pháp này dựa vào sự hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm của các base purine và pyrimidine. Một đơn vị OD_{260nm} tương ứng với 50µg/ml cho một dung dịch ADN sợi đôi và 40µg/ml cho một dung dịch ADN sợi đơn. Để tính độ tinh sạch ADN căn cứ vào sự hấp thụ của protein ở bước sóng 280nm. Một dung dịch ADN được coi là tinh sạch khi tỷ số OD_{260nm/280nm} = 1,8 ÷ 2.

2.3. Kỹ thuật phát hiện gen FMR1

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) nhân đoạn gen FMR1 với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen FMR1 thuộc ngân hàng gen (GenBank - NCBI).

Mồi xuôi 5'-gtcaccgacctcagcctccgccctccaccaa-3'

Mồi ngược 5'-agggtggctgcggcgctcgaggcccag-3'

Hóa chất thực hiện kỹ thuật PCR bao gồm các hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử được cung cấp từ các hãng Sigma, Applied Biosystems, Bio Rad, Roche Diagnostics.

Thành phần phản ứng PCR bao gồm:

Thành phần	Thể tích(#)
ADN	5
Mồi xuôi	1
Mồi ngược	1

dNTPs	0,5
Đệm	3
MgCl ₂	2
Taq polymerase	0,15
Nước cất	17,35
Tổng số	30

Quy trình PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt Eppendorf (Eppendorf thermocycler) với chương trình: 96°C - 4 phút; [95°C - 30 giây, 65°C, 72°C - 90 giây] x30 chu kỳ; 72°C - 10 phút; 4°C - ∞.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% với thang ADN chuẩn 100bp trong đệm TBE 1x, thời gian 45 phút trong điện thế 110 volts. Nhuộm gel bằng ethidium bromide, sau đó đọc và phân tích gel. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 221bp.

KẾT QUẢ

1. Độ tinh sạch và hàm lượng của ADN chiết tách từ tế bào ối.

30 mẫu bao gồm 10 mẫu dịch ối nguyên chưa nuôi cấy (tế bào ối nguyên); 10 mẫu dịch ối đã qua nuôi cấy thu các tế bào và thành phần tế bào ối bong vào môi trường nuôi cấy, gọi chung là tế bào ối bong; 10 mẫu dịch ối đã qua nuôi cấy sử dụng trypsin để làm bong các tế bào bám, hay gọi là các tế bào ối bám. Kết quả trung bình về độ tinh sạch và hàm lượng ADN chiết tách từ các mẫu được đo bằng máy quang phổ kế thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Độ tinh sạch và hàm lượng của ADN chiết tách từ tế bào ối

Mẫu	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260/280}	ADN µg/ml
Tế bào ối nguyên	0,245	0,137	1,82	13,99
Tế bào ối bong	0,201	0,112	1,81	10,60
Tế bào ối bám	0,698	0,365	1,87	65,10

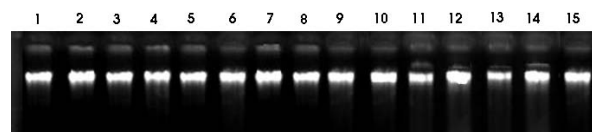
Các tế bào ối trong 3 loại trên đều được tiến hành thử nghiệm trong quy trình xử lý tế bào ối: rửa PBS 1 lần, rửa PBS 2 lần. Kết quả đo hàm lượng và độ tinh sạch liên quan đến quy trình xử lý tế bào ối thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Mối liên quan độ tinh sạch và hàm lượng ADN với quy trình xử lý tế bào ối

Độ tinh sạch và hàm lượng ADN	Rửa PBS 1 lần	Rửa PBS 2 lần
OD _{260/280}	1.83	1.89
ADN (µg/ml)	29.74	30.01

2. Điện di ADN

Tất cả các mẫu ADN sau khi chiết tách đều được điện di trên gel Agarose 0,8% với thể tích như nhau. Kết quả thu được sau khi nhuộm ethidium bromide và soi đèn tử ngoại. Hình 1 biểu diễn kết quả điện di ADN chiết tách từ tế bào ối.



Hình 1. Điện di ADN chiết tách từ tế bào ối

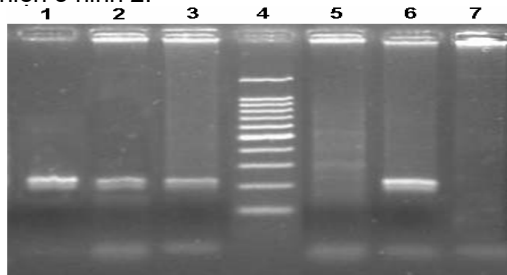
Giếng 1 - 5: ADN chiết tách từ mẫu tế bào ối chưa nuôi cấy (tế bào ối nguyên)

Giếng 6 - 10: ADN chiết tách từ mẫu tế bào ối bong

Giếng 11 - 15: ADN chiết tách từ mẫu T tế bào ối bám

3. Kết quả phát hiện gen FMR1 từ ADN thai nhi

3 mẫu ADN của thai nhi chiết tách từ tế bào ối theo kết quả trên được chọn ngẫu nhiên từ 3 mẫu tế bào ối nguyên, tế bào ối bong và tế bào ối bám để thực hiện kỹ thuật PCR phát hiện gen FMR1, kết quả thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Sản phẩm PCR gen FMR1 được phát hiện từ ADN của thai nhi chiết tách từ tế bào ối

Giếng 1 - 3: sản phẩm PCR gen FMR1 của 3 mẫu ADN thai nhi

Giếng 4: thang ADN chuẩn 100bp

Giếng 5: Chứng: đột biến gen FMR1 (không có sản phẩm PCR)

Giếng 6: Chứng: người bình thường, gen FMR1 không đột biến

Giếng 7: Chứng âm (không có ADN)

BÀN LUẬN

1. Chất lượng của ADN chiết tách từ tế bào ối.

Theo kết quả ở bảng 1, hàm lượng ADN khi được chiết tách từ các loại tế bào ối thu được khá nhiều, từ 10 $\mu\text{g/ml}$ đến > 60 $\mu\text{g/ml}$ và sạch, với $1.8 < OD_{260/280} < 2$. Hình ảnh điện di cho thấy các băng sáng, và gọn, đặc biệt đối với các mẫu tế bào ối bám (hình 1). Phương pháp chiết tách có sử dụng chất hấp phụ ADN là Silica, Silica thực chất là axit silixic ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ở dạng hạt cứng và xốp, cấu tạo bao gồm có vô số khoang rỗng li ti trong hạt, đây là một chất hấp phụ ADN rất tốt. Cady (2003) nhận thấy sự ưu việt khi sử dụng màng silica gel trong chiết tách ADN từ các loại tế bào [2], [4]. Trong quy trình này, số lượng dịch ối yêu cầu chỉ với 200 μl trong 1 lần chiết tách nhưng đã thu lượng ADN khá nhiều từ các mẫu tế bào ối.

Đối với việc xử lý tế bào ối trước khi chiết tách ADN bằng 2 cách là rửa PBS 1 lần hoặc 2 lần thì ít ảnh hưởng đến độ tinh sạch và số lượng ADN thu được. Cụ thể ở bảng 2, lượng ADN thu được khi chiết tách từ tế bào ối được rửa 1 lần và 2 lần tương ứng là 29.74 $\mu\text{g/ml}$ và 30.01 $\mu\text{g/ml}$, độ tinh sạch của ADN đạt tiêu chuẩn ($1.8 < OD_{260/280} < 2$). Như vậy để tiết kiệm thời gian, không cần thiết phải rửa dịch ối nhiều lần trước khi chiết tách ADN.

2. Về thu thập và chiết tách ADN từ các loại tế bào ối nguyên, tế bào ối bong và tế bào ối bám.

Dịch ối có nguồn gốc chủ yếu từ nội sản mạc của rau thai, thành phần trong dịch ối là các tế bào bong của thai nhi, nên số lượng thường rất ít. Hầu hết các kỹ thuật chẩn đoán trước sinh có sử dụng tế bào ối thì cần thiết phải nuôi cấy dịch ối để làm tăng lượng tế bào.

Ở bảng 1 cho thấy đều thu được ADN từ 3 loại tế bào ối. Lượng ADN ở tế bào ối chưa nuôi cấy và tế bào ối bong (13,99 $\mu\text{g/ml}$ và 10,60 $\mu\text{g/ml}$) ít hơn so với lượng ADN thu được từ tế bào ối bám (65,10 $\mu\text{g/ml}$). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Điều này rõ ràng bởi các tế bào bám là các tế bào phân chia rất nhiều trong thời gian nuôi cấy.

Tuy nhiên, điều quan trọng ở đây là đã chiết tách được ADN từ tế bào và thành phần của tế bào ối bong với số lượng là 10,60 $\mu\text{g/ml}$. Tuy số lượng ADN ít nhất so với số lượng ADN chiết tách từ hai loại tế bào ối còn lại (tế bào ối nguyên và tế bào ối bong), nhưng với số lượng này cũng đã cần và đủ để thực hiện các kỹ thuật di truyền phân tử thường quy [1], [3].

Từ đó cho thấy, nếu cần lượng lớn ADN trong chẩn đoán cũng như nghiên cứu thì nên chiết tách ADN từ tế bào ối nuôi cấy. Có thể chiết tách ADN ngay từ tế bào ối trong dịch ối nguyên chưa nuôi cấy cũng đã thu được lượng ADN khá nhiều (>10 $\mu\text{g/ml}$). Đặc biệt, có thể tiết kiệm lượng tế bào ối bằng việc chỉ sử dụng các tế bào ối bong và chiết tách ADN từ các tế bào này. Tế bào ối bong và thành phần của tế bào ối bong thường "bị" bỏ đi trong quá trình nuôi cấy ối nay có thể tiết kiệm lại.

3. ứng dụng phát hiện gen FMR1 từ ADN của thai nhi.

Gen FMR1 nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X. Sản phẩm của gen là FMRP, thành phần cấu tạo chủ yếu của tổ chức não. Đột biến gen FMR1 thường là lặp đoạn hay mất đoạn gen sẽ gây chậm phát triển tâm thần có tính gia đình [4], [5]. Bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã nhân được gen FMR1 ở ADN của thai nhi (giếng 1, 2, 3 - hình 2). Kết quả cho thấy ADN của thai nhi được chiết tách tốt và được ứng dụng thành công trong việc nhân đoạn gen. Trong trường hợp gen FMR1 bị đột biến mất đoạn hay lặp đoạn nhiều lần thì không nhân được gen, kết quả không có sản phẩm PCR (giếng 5 - hình 2). ứng dụng này góp phần cho chẩn đoán trước sinh, sàng lọc nhanh trường hợp đột biến gen gây chậm phát triển tâm thần.

KẾT LUẬN

Đã chiết tách được ADN từ các loại tế bào ối: tế bào ối nguyên, tế bào ối bong và tế bào ối bám. ADN sạch và khối lượng nhiều khi được chiết tách ở tất cả các loại tế bào ối. Để tiết kiệm tế bào ối (hay dịch ối), chỉ cần chiết tách ADN từ tế bào ối và thành phần của tế bào ối bong trong quá trình nuôi cấy.

Ứng dụng thành công trong việc nhân gen FMR1 đối với ADN của thai nhi chiết tách từ tế bào ối.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bianchi D., LeShane E., Cowan J. (2001), "Large Amounts of Cell-free Fetal DNA Are Present in Amniotic Fluid", *Clinical Chemistry*, 47, pp. 1867-1869.

2. Cady et al. (2003), "Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures", *Biosensors and Bioelectronics*, 19, pp. 59-66.

3. Lê Hoàn (2003), "Giới thiệu một số phương pháp tách ADN từ máu toàn phần", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 23(3), tr. 3-6.

4. O'Donnell W., Warren S. (2002), "A decade of molecular studies of Fragile X syndrome", *Annu. Rev. Neurosci.*, 25, pp. 315-338.

5. Oostra B., Willemsen R. (2003), "A fragile balance: FMR1 expression levels", *Human Molecular Genetics*, 12(2), pp. 249-257.

6. Rogstad S. (2003), "Plant DNA Extraction Using Silica", *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, pp. 463a-463g.
