

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ HAI DẠNG ĐỘT BIẾN TRÊN NGƯỜI DÂN TỘC GIA RAI THIẾU HỤT GENE G6PD HỒNG CẦU

ĐỖ THỊ TUYẾN, NGUYỄN THỊ THU THÙY,
QUÁCH XUÂN HINH, NGUYỄN THỊ NGỌC DAO
Viện Công nghệ sinh học

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu hụt enzyme G6PD là bệnh liên quan đến các enzyme ở hồng cầu thường gặp nhất, là nguyên nhân gây tán huyết khi sử dụng thuốc chống sốt rét. Bệnh thiếu hụt enzyme G6PD là bệnh di truyền liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính, là bệnh thường gặp nhất trong các bệnh sai lệch di truyền của tế bào hồng cầu người. Hiện nay có khoảng hơn 150 dạng đột biến trên thế giới đã được công bố (Beutler., 1994). Một số các dạng chủ yếu là G6PD_{A-}, G6PD_{A+}, G6PD_B và G6PD_{Med} (G6PD địa trung hải), G6PD_{Đông Nam á}... Tổ chức Y tế thế giới WHO đã chia các biến thể của G6PD thành 4 lớp: Lớp 1: Gây thiếu máu tan huyết hồng cầu bất thường; Lớp 2: thiếu hụt G6PD nặng; Lớp 3: thiếu hụt G6PD nhẹ; Lớp 4: không thiếu G6PD. Trong đó lớp 2 là nguy hiểm nhất, thường có biến chứng tan máu cấp tính. Các dạng đột biến thường gặp ở lớp này đã được xác định là Gaohe (exon

2), Kaiping (exon 12), Viangchan (exon 9) (Beutler., 1994; Nuchprayooy *et al.*, 2002).

Bằng phương pháp PCR, đã xác định được số lượng và trình tự các bazơ nitơ trên DNA. Gene cấu trúc của G6PD gồm 20114bp, trong đó có 1548bp được mã hóa (Beutler., 1994). Hsia và cộng sự (1993) khi nghiên cứu trên 4948 người Trung Quốc, Lào, Philipin ở Hawaii đã tìm ra 11 đột biến trên DNA của người thiếu hụt G6PD hồng cầu trong đó có hai dạng đột biến Gaohe 95 A→G (exon 2), 1003 Catham G→A (exon 9). Liu và cộng sự (2000) đã công bố nghiên cứu so sánh các dạng đột biến giữa hai nhóm người Dao và Hán ở Guangxi Trung Quốc. Kết quả cho thấy ở nhóm người Dao, các đột biến thường gặp là 41,2% Canton (1376 GT), 26,5% Catham 1388 G →A, 14,7% Gaohe 95A→G, ngoài ra còn phát hiện ra đột biến mới ở vị trí nucleotid 1311 C→T. Trong khi đó ở

người Hán tỉ lệ các dạng đột biến tương ứng là 16,2%, 40,6% và 5,4%.

Nuchprayoon và cộng sự (2002) khi nghiên cứu trên 522 người dân tộc ở Bangkok, Thái Lan đã tìm ra tỷ lệ thiếu hụt G6PD là 11,1% ở nam giới (n=350) và 5,8% ở nữ (n= 172). Các dạng đột biến điển hình là 54% Viangchan, 10% Canton, 8% Mahidol, 5% Kaiping, 2,6% Union, 2,6% Chinese-5. Yoshida và cộng sự (2005) khi nghiên cứu ở người Campuchia cho thấy có tới 97,9% số thiếu hụt G6PD thuộc dạng Viangchan 871 G→A và 2,1 % Union 1360 C→T. Wang và cộng sự 2008 khi nghiên cứu các nhóm người dân tộc người Malaysian bao gồm các tộc người Mã lai, Trung Quốc, ấn Độ và người Orang Asli (Thổ dân Malaysian), các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện được 27 dạng đột biến G6PD khác nhau. Một số dạng đột biến phổ biến hay gặp ở người Campuchia, Myanmar là Viangchan (871G→A, 1311C→T, IVS11 nt93TC) và G6PD Mahidol (487G→A).

Trong bài báo này chúng tôi dùng phương pháp PCR kết hợp với xác định trình tự để phát hiện ra các dạng đột biến gaohe 95A→G ở exon 2 và đột biến viangchan 871G→A ở exon 9 của gene G6PD hồng cầu người. Trên thế giới đã có một số tác giả sử dụng kỹ thuật này, tuy nhiên vẫn còn hạn chế. Hầu hết các đột biến gene gây thiếu hụt G6PD đều là đột biến điểm, đột biến mất đoạn hoặc mất 2 nucleotid rất ít gặp.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Đối tượng nghiên cứu là người bình thường, khỏe mạnh không có dị tật bẩm sinh, không có bệnh mạn tính, trạng thái thần kinh ổn định, tâm sinh lý bình thường. Tiêu chuẩn loại trừ: loại trừ các đối tượng bị thiếu máu cấp và mạn tính. Xác định dân tộc của đối tượng dựa trên phiếu điều tra. Đối tượng phải có thời gian định cư tại nơi nghiên cứu từ 10 năm trở lên. Các đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các đối tượng thiếu hụt G6PD sẽ được thông báo trực tiếp và được nhận tài liệu tư vấn về phòng và điều trị bệnh. Đồng thời họ được tư vấn về theo dõi, chăm sóc trẻ sơ sinh, phụ nữ có thai, những chú ý khi kết hôn, khi sinh sản, khi truyền máu ở các đối tượng bị thiếu hụt G6PD.

2. Hóa chất.

Các hóa chất được dùng trong thí nghiệm như saccharose, tris base; MgCl₂ tritonX-100, proteinaza K, G6PNa₂, NADP⁺, MTT, PMS, MgCl₂, EDTA, SDS... (sigma), enzyme *Taq* polymerase, dNTP được mua từ Fermentas....

3. Phương pháp nghiên cứu.

Phương pháp formaran (Kaoru et al., 1997)

Dựa trên nguyên tắc: sản phẩm của phản ứng là formazan có màu xanh tím. Diện tích và độ đậm của vòng màu sản phẩm sau một thời gian nhất định tỷ lệ với hoạt tính của enzyme trong mẫu thử. Vòng màu có màu xanh tím với đường kính D ≥ 7mm, là mẫu bình thường (âm tính). Vòng màu có màu xanh tím với

đường kính D (5mm<D<7mm) là mẫu dương tính (+). Vòng màu có màu xanh tím với đường kính D<5mm), là mẫu dương tính 2⁺. Vòng màu không có màu xanh tím hoặc màu xanh tím rất nhạt chỉ có gel hoặc màu của Hb, là mẫu dương tính 3⁺.

Tách DNA từ máu toàn phần

1ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA để đông lạnh được cho vào nồi ổn nhiệt 37^o làm ấm nhanh sau đó thêm 1ml lysis buffer (saccharose 0,3M; trisHCl 0,01M pH 7,5; MgCl₂ 0,005M và triton X-100 1%) và giữ ở trong đá. Sau khi máu tan hết, lắc nhẹ nhàng khoảng 10 phút trong đá. Dung dịch được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để tủa nhân tế bào xuống. Tủa được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút một lần nữa với 1ml lysis buffer. Nhân tế bào thu được sẽ hòa tan trong 0,45ml dung dịch đệm giữ nhân (dung dịch K (NaCl 0,075M, EDTA 0,024M, pH 8,0)). Bổ sung thêm 12,5µl SDS (10%), 10µl proteinase K (từ proteinase K gốc 10 mg/ml). Hỗn hợp được ủ ở 55^oC trong 3-5 giờ cho đến dung dịch nhân trở lên trong cùng thể tích. Sau đó chiết bằng 0,25 ml hỗn hợp (phenol: chloroform: isopropanol, tỉ lệ 25:24:1), lắc dung, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch trong (lặp lại 2 lần). Bổ sung 0,2ml hỗn hợp (chloroform: isopropanol, tỉ lệ 24:1), để loại phenol, sau đó ly tâm 13.000vòng/phút trong 10 phút thu dịch trong (lặp lại 2 lần). Bổ sung 2 thể tích ethanol tuyệt đối, 1/10 thể tích CH₃COONa 3M giữ ở -20^oC trong 30 phút để tủa DNA. Li tâm 13000vòng /phút, trong 5 phút thu tủa. Tủa DNA được rửa bằng ethanol 70^o. Sấy khô tủa, bổ sung thêm 20µl nước cất, bảo quản ở 4^oC hoặc bảo quản lâu dài ở -80^oC.

Phản ứng PCR

Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích là 25µl) bao gồm: 2,5µl đệm PCR; 1,5µl 25 mM MgCl₂; 2µl 2,5 mM dNTP; 1µl DNA khuôn; 16,75µl nước cất; 1µl mỗi loại; 0,5µl *Taq* polymerase 1 U. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95^oC/10'; 35x (95^oC/30"; 58^oC/30"; 72^oC/2'); 72^oC/10'. Mỗi exon cần khuếch đại có các cặp mỗi tương ứng đặc hiệu.

Bảng 1. Trình tự mỗi của exon 2 và exon 9 trên gene G6PD

Exon	Primer	Trật tự chuỗi nucleotid	Số cặp base (bp)
2	F 2-a	5'-cccagaggaactctcaagaaa	288
	R 2-b	5'-aacaattagttggaaaagctga	
9	F E9FN	5'-agctctcaggggtgtgga	537
	R E9RN	5'-tgaccaggggaaggccattg	

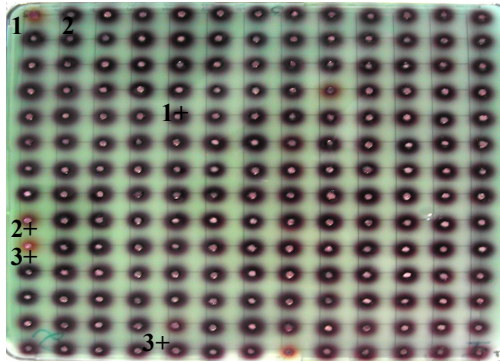
Phân tích trình tự gene

Các mẫu DNA thu được sau khi tách chiết từ máu, được tiến hành PCR để câu các exon 2 và exon 9, sản phẩm PCR là các exon của gene G6PD tương ứng với từng môi. Các exon được tinh sạch bằng điện di DNA, cắt và thổi gene trước khi tiến hành đọc trình tự. Các exon được đọc trình tự theo phương pháp dideoxy và so sánh với các mẫu chuẩn trên ngân hàng gene thế giới bằng phần mềm DNAStar.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc thiếu hụt G6PD trên dân tộc Gia rai

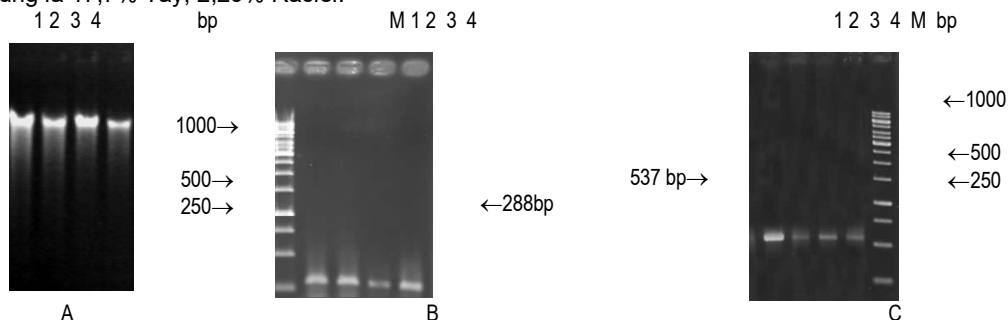
Áp dụng phương pháp formazan chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu trên 182 đối tượng ở trường phổ thông dân tộc nội trú tỉnh Gia lai, phát hiện được 04 đối tượng có kết quả formazan dương tính (02 mẫu dương tính 3+; 01 mẫu dương tính 2+; 01 mẫu dương tính 1+) (Hình 1).



Hình 1. Vòng phản ứng formazan của 182 mẫu máu người dân tộc Gia rai (1: mẫu đối chứng dương; 2: mẫu đối chứng âm; 3+: mẫu dương tính 3+; 2+: mẫu dương tính 2+; 1+: mẫu dương tính 1+)

Kết quả ở hình 1 cho thấy tỷ lệ thiếu hụt G6PD ở các đối tượng đạt 3%. Trong nghiên cứu này mục đích của chúng tôi là phát hiện ra những đối tượng thiếu hụt G6PD để từ đó tìm các dạng đột biến chứ không nghiên cứu về tần suất của thiếu hụt G6PD ở các dân tộc khác nhau. Tuy nhiên để có kết luận chính xác về tỷ lệ thiếu hụt G6PD ở các dân tộc khác nhau thì cần phải sàng lọc trên số lượng mẫu nhiều.

Nguyễn Thị Ngọc Dao và cộng sự (2003) đã nghiên cứu tỷ lệ thiếu hụt G6PD trên người Kinh khu vực xung quanh Hà Nội là 1,75% (Nguyễn Thị Ngọc Dao *et al.*, 2003). Trần Thị Chính và cộng sự đã nghiên cứu trên 802 người thuộc dân tộc Tày và Raclei ở Khánh Trung, Khánh Hòa, tỷ lệ thiếu hụt tương ứng là 17,7% Tày, 2,29% Raclei.



Hình 2. Sản phẩm DNA tổng số (A) (1: mẫu đối chứng; 2- 4 mẫu DNA của bệnh nhân thiếu hụt G6PD); Điện di đồ của (B) sản phẩm PCR cấu exon 2 của 4 bệnh nhân thiếu hụt G6PD; (C) sản phẩm PCR cấu exon 9 của 4 bệnh nhân thiếu hụt G6PD.

Theo nghiên cứu của Quách Xuân Hinh (2009) cho thấy khi tác giả sàng lọc trên 3113 đối tượng thuộc 5 dân tộc tại 4 khu vực cho thấy: tại Điện Biên tỷ lệ thiếu hụt ở dân tộc Thái là 7,17%, dân tộc Dao: 1,77%, dân tộc Kinh 1,47%, dân tộc Hmông 0,6%. Tại Sơn la tỷ lệ thiếu hụt G6PD ở dân tộc thái là 7,62%, Kinh 1,99%. Tại Gia lai tỷ lệ thiếu hụt ở dân tộc Gia rai là 3,07%, Kinh 1,56%. Tại Hà Nội tỷ lệ thiếu hụt dân tộc Kinh là 1,77% (Quách Xuân Hinh., 2009).

Tỷ lệ thiếu hụt G6PD hồng cầu ở các tỉnh Hà Giang, Sơn La, Hòa Bình, Thanh Hóa, cho thấy tỷ lệ thiếu hụt ở một số dân tộc: 31% dân tộc Mường, 22,6% dân tộc Thổ, 19,3% dân tộc Thái, 9,7% dân tộc Dao, 0,5% dân tộc Kinh và rất thấp ở dân tộc H'Mông chỉ đạt 0,3% (Đoàn Hạnh Nhân *et al.*, 1996).

Phân tích gene bằng phương pháp PCR và đọc trình tự

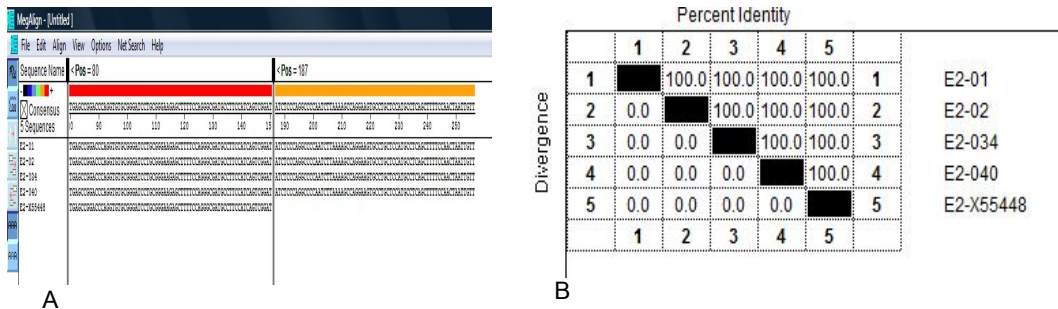
Bảng 2. Danh sách bệnh nhân người dân tộc Gia rai

Họ và tên	Mã	Nơi cung cấp mẫu	Dân tộc	Thiếu hụt G6PD
Rơ Mạnh Đ	01	Bệnh viện 108	Gia rai	-
Ksor C	02	nt	-	2+
Rơ Ô X	034	nt	-	3+
Nay B	040	nt	-	3+

Thiếu hụt enzyme G6PD là do đột biến gene, chủ yếu là đột biến điểm dạng thay thế một nucleotid này bằng một nucleotid khác. Đồng thời các đột biến ở người bệnh Việt Nam thường xảy ra ở các exon 2, exon 9. Do đó chúng tôi tiến hành phản ứng PCR cấu các exon 2 và exon 9 để tìm các điểm đột biến của các bệnh nhân thiếu hụt G6PD. Đối với exon 9, chúng tôi dùng cặp mồi đặc hiệu cấu đoạn gene của exon 9 có chiều dài là 537bp thường xảy ra 2 đột biến là đột biến Viangchan (871 G>A) và đột biến Chatam (1003 G>A). Trên exon 2, chúng tôi dùng cặp mồi đặc hiệu cấu đoạn gene của exon 2 có chiều dài là 288bp (Hình 2). Trên exon 2 thường xảy ra đột biến Gaohe (95 A>G).

Phân tích trình tự ở exon 2

Các mẫu DNA thu được sau khi tách chiết từ máu, được tiến hành PCR lần 1 để cắt các exon, sản phẩm PCR được thổi gel bằng kit của Promega. Sản phẩm PCR sau thổi gel được tiến hành đọc trình tự.



Hình 3. (A) So sánh trình tự của 4 mẫu exon 2 trên MegAlign với mẫu chuẩn X55448; (B): Độ tương đồng của 4 mẫu exon 2 so với mẫu chuẩn X55448

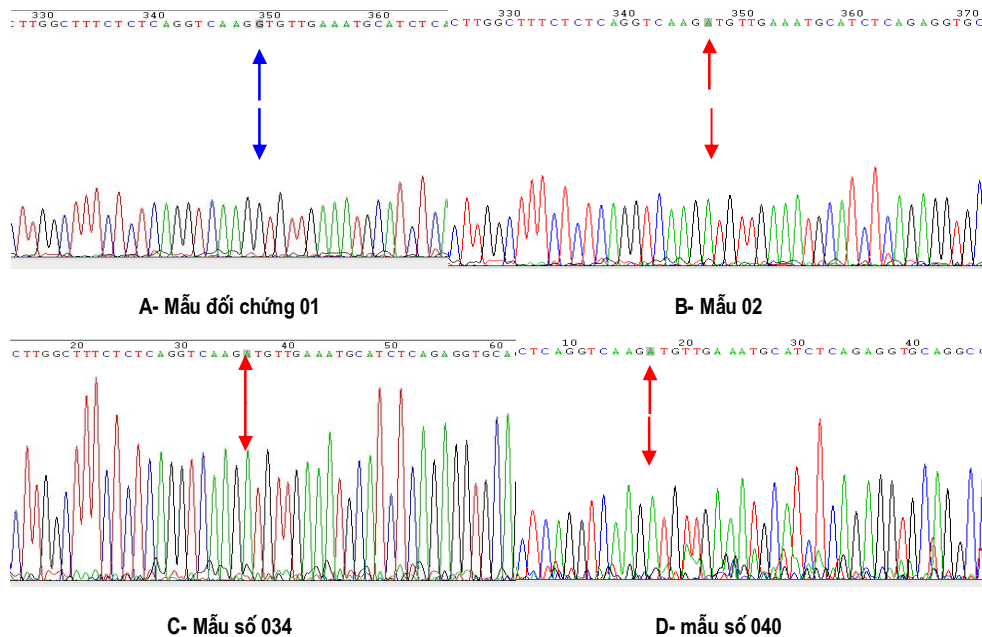
Kết quả so sánh trình tự của đoạn gene trên exon 2 của 3 mẫu dương tính (mã 02; 034; 040) của người thiếu hụt G6PD và 1 mẫu âm tính (mã 01). Những số liệu đã cho thấy khi so sánh với trình tự gene chuẩn của exon 2 trên ngân hàng gene có mã số X.55448, không có đột biến trên exon 2 của mẫu 4 mẫu DNA này.

Phân tích trình tự ở exon 9

Chúng tôi có sử dụng phần mềm DNASTar để phân tích trình tự của một đoạn gene trên exon 9 của người thiếu hụt G6PD không bị đột biến (mẫu đối chứng mã 01) khi so sánh với trình tự gene chuẩn của exon 9 có mã số DQ-832766 trên ngân hàng gene

thế giới, kết quả cho thấy không có đột biến trên exon 9 của mẫu bệnh nhân thiếu hụt này (Hình 4A).

Trình tự của 3 đoạn gene trên exon 9 của 3 mẫu (mã 02; 034 và 040) được xác định là có đột biến sau khi đọc trình tự. Tại vị trí nucleotid số 349 trên đoạn gene bình thường có đoạn trình tự: CAA.GGT.GTT (Hình 4A) tương ứng trên 3 mẫu gene có sự đột biến có 3 trình tự bị thay đổi 1 nucleotid từ G→A đó là CAA.GAT.GTT (Hình 4B; Hình 4C; Hình 4D). Đột biến được xác định là đột biến dạng Viangchan thuộc exon 9, vị trí nucleotid số 871 bị biến đổi từ G→A, dẫn đến biến đổi acid amin tại vị trí 291 từ Val→Met.



Hình 4: Kết quả đọc trình tự exon 9 ở người thiếu hụt G6PD có đột biến so với mẫu chuẩn DQ-832766 trên ngân hàng gene.

KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật formazan, chúng tôi đã xác định được 4 mẫu thiếu hụt G6PD hồng cầu người. Trong đó có 1 mẫu dương tính 2+ và 2 mẫu dương tính 3+ và 1 mẫu dương tính 1+ trên tổng số 182 mẫu máu ở người dân tộc Gia rai. Phân tích được 4 mẫu thiếu hụt G6PD bằng phương pháp đọc trình tự ở exon 2 và exon 9. khi so sánh với trình tự gene chuẩn của exon 9 có mã số DQ-832766 trên ngân hàng gene thế giới, kết quả cho thấy trình tự của 3 đoạn gene trên exon 9 được xác định là có đột biến: Tại vị trí nucleotid số 349 trên đoạn gene bình thường có đoạn trình tự: CAA.GGT.GTT tương ứng trên 3 mẫu gene có sự đột biến có 3 trình tự bị thay đổi 1 nucleotid từ G→A đó là CAA.GAT.GTT. Đột biến được xác định là đột biến dạng Viangchan thuộc exon 9, vị trí nucleotid số 871 bị biến đổi từ G→A, dẫn đến biến đổi acid amin tại vị trí 291 từ Val→Met.

SUMMARY

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, one of the most common human enzymatic defects, is characterized by extreme molecular and biochemical heterogeneity. The underlying DNA changes associated with G6PD deficiency in Asian subjects have not been extensively investigated. Two gene mutations (G871A, A95G, corresponding amino acid change: Val291Met, His32Arg, respectively) were examined in 3 G6PD deficient subjects originating from Giarai ethnic in the central highlands of Vietnam using specific polymerase chain reaction and sequencing methods.

Of the 3 patients with G6PD deficiency, 3 were found to have the G871A mutation. There were no significant differences between the clinical manifestations caused by the former two gene mutations, which both cause acute hemolytic anemia and jaundice.

Keywords: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Hạnh Nhân và cộng sự (1991 - 1996), "Điều tra thiếu men Glucose - 6 Phosphat dehydrogenase hồng cầu ở một số dân tộc sống trong vùng sốt rét lưu hành tại miền Bắc Việt Nam." *Kỷ yếu công trình nghiên*

cứu khoa học, viện Sốt rét ký sinh trùng và côn trùng, tập I, tr.203-209.

2. Nguyễn Thị Ngọc Dao; Trần Thị Chính và cs (2003), "Các dạng đột biến gen G6PD ở một số trường hợp thuộc các dân tộc Mường, Raclei, Tày, Kátu và Kinh ở Hoà Bình, Khánh Hoà, Huế và Hà Nội". *Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần thứ hai, nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học, Hà Nội, tr.858-860.*

3. Quách xuân Hình (2009), Nghiên cứu các chỉ số sinh lý máu và những đột biến gene G6PD hồng cầu ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD trên một số dân tộc tại Việt Nam. *Luận án tiến sĩ y học.*

4. Trần Thị Chính, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Huỳnh Diễm Thúy và cs (2003), "Phát hiện thiếu hụt G6PD và phân tích các dạng đột biến gen của nó ở một số trường hợp thuộc các dân tộc Kinh, Mường, Raclei và Tày ở Hà Nội, Hòa Bình và Khánh Hòa." *Nghiên cứu y học, tập 23, số 3, tr.99-104.*

5. Beutler E. (1994), "G6PD deficiency", *Blood* 84(11); 3613-3636.

6. Hsia Y.E. et al.. (1993), "Frequency of G6PD mutation in Chinese, Filipinos and Latians from Hawaii", *Human genetics* 92; 470-476.

7. Liu J. et al. (2000), "Comparative study of three common G6PD gene mutations in Yao and Han people in Guangxi", *PubMed-indexed for Medline, Article in Chinese.*

8. Kaoru N, Taku S, Lai P (1997), Comprehensive method to scan for point mutations of the glucose 6 phosphate dehydrogenase gene. *Human genet, 42: 417-423.*

9. Nuchprayoooy I. et al. (2002), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Thai Lan: G6PD Viangchan (871G→A) is the most common deficiency variant in the Thai population", *Hum. Mutat Feb 19, Pubmed-indexed for Medline.*

10. Wang J, Luo E, Hirai M, Arai M, Abdul-Manan E, Mohamed-Isa Z, Hidayah N, Matsuoka H, (2008), Nine different glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in a Malaysian population with Malay, Chinese, Indian and Orang Asli (aboriginal Malaysian) backgrounds. *Acta Med Okayama* 62(5); 327-32.

11. Yoshida S, Matsuoka H, Nguon C et al (2005), Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871 G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *J Hum genet* 50: 468- 472.