



ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HCM  
217 Hồng Bàng, Q.5, Tp.HCM  
ĐT: 028 3855 8411

PHÒNG XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TẾ BÀO  
Trung Tâm Y Sinh Học Phân Tử  
Lầu 10 tòa nhà 15 tầng



## Chuyên đề

# CÁC KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN

**Đối tượng:** sinh viên đăng ký thi nội trú

**TS. BS. Bùi Võ Minh Hoàng**



# Mục tiêu

Trình bày chỉ định và nguyên lý kỹ thuật của các kỹ thuật sau:

- Kỹ thuật nhuộm sắc thể đồ
- Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (Fluorescent In Situ Hybridization)
- Kỹ thuật PCR
- Kỹ thuật giải trình tự gen



# Kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ (1)

## Chỉ định

- Chậm phát triển thể chất và / hoặc trí tuệ.
- Mơ hồ giới tính
- Sảy thai liên tiếp
- Hiếm muộn – vô sinh
- Bệnh sử gia đình có người đã được xác định có bất thường NST
- Thai có nguy cơ mang bất thường NST
- Ung thư (bạch cầu)
- Nghi ngờ hội chứng NST dễ gãy

# Kỹ thuật nhuộm sắc thể đồ (2)



## Nguyên lý kỹ thuật

- Bắt giữ NST ở kỳ giữa bằng Colchicine và làm phồng tế bào bằng dung dịch nhược trương, cố định tế bào ở trạng thái này sẽ tạo thuận lợi cho việc quan sát NST dễ dàng.



# Kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ (4)

## Ưu điểm

- Thể hiện được bộ NST của cá thể, đánh giá được cả về số lượng và cấu trúc.
- Chi phí XN vừa phải.

## Nhược điểm

- Cần thời gian để nuôi cấy tế bào.
- Cần thời gian để phân tích NST trong trường hợp thể khảm.
- Chỉ phát hiện bất thường cấu trúc NST  $\geq 10$  Mb.

# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) (1)



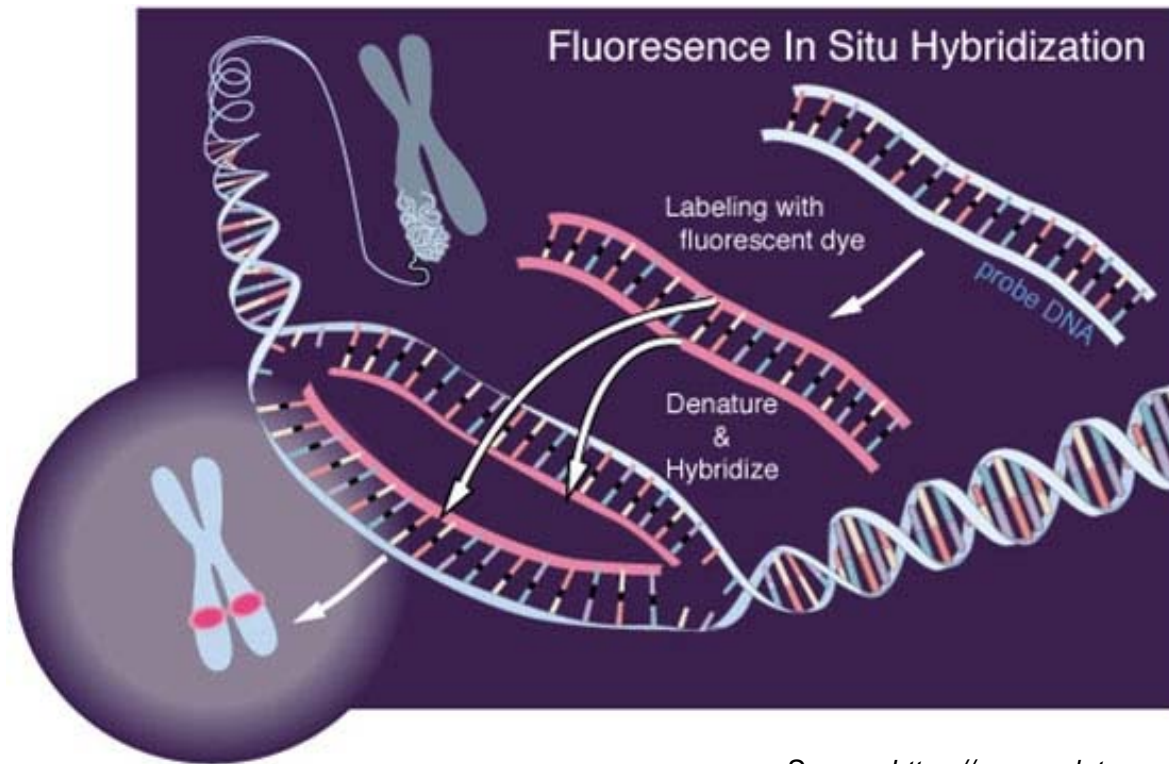
## Chỉ định

- Hội chứng vi mất đoạn (DiGeorge, Prader-Willi, Cri-du-chat, ...)
- Biểu hiện gen ung thư đặc trưng trong bệnh lý ác tính huyết học (Bcr-Abl trong CML), ung thư vú (Her-2 neu), ...
- Chẩn đoán nhanh trong chẩn đoán tiền sản
- Kiểm định các nghi ngờ bất thường cấu trúc của kết quả NST đồ

# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) (2)



## Nguyên lý kỹ thuật

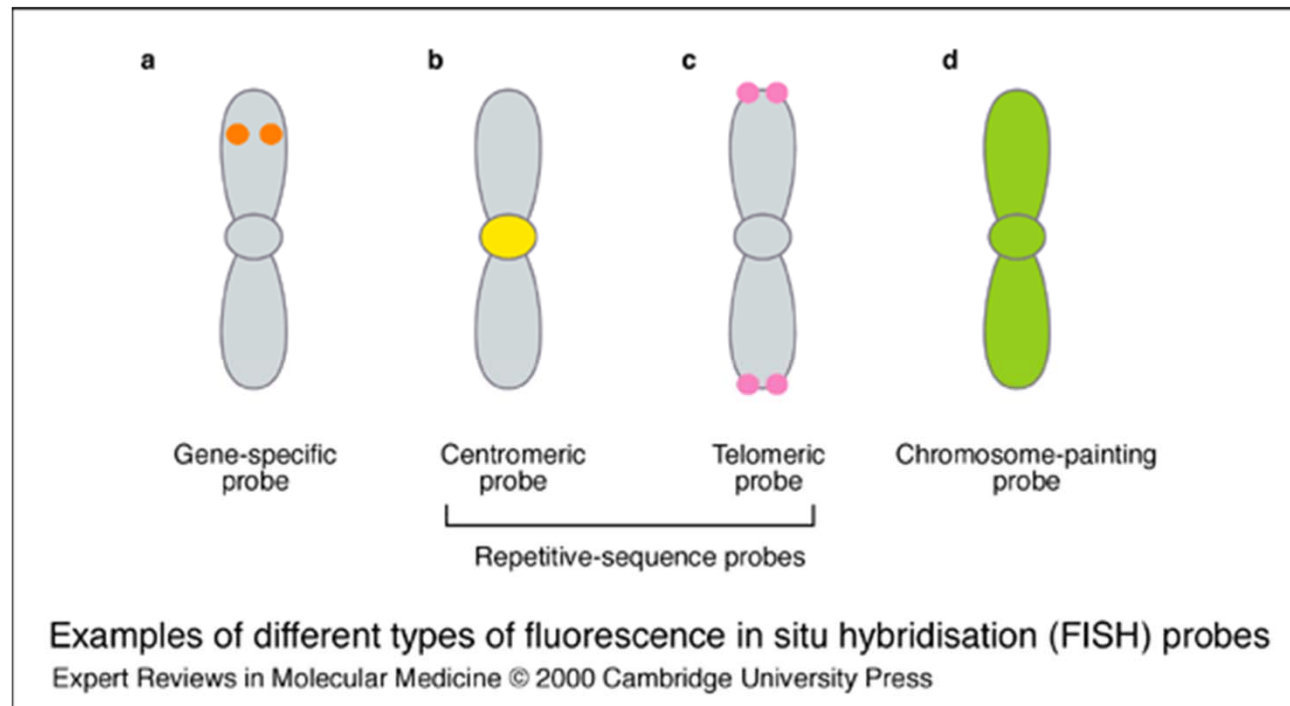


Source: [https://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/microscopy/fish.html](https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fish.html)

# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) (3)



## Các loại đoạn dò (probes)





# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) (4)



## Ưu điểm

- Có thể thực hiện được trên metaphase, hay interphase.
- Xác định nhanh bất thường nghi ngờ
- Hỗ trợ khi kỹ thuật NST đồ không thành công hoặc trường hợp thể khảm.
- Thời gian trả kết quả nhanh (trong vòng 24 giờ).

## Nhược điểm

- Không phát hiện được bất thường đi kèm (nếu có).
- Cần trang bị kính hiển vi huỳnh quang
- Chi phí XN khá cao.



# Kỹ thuật PCR (1)

## Chỉ định

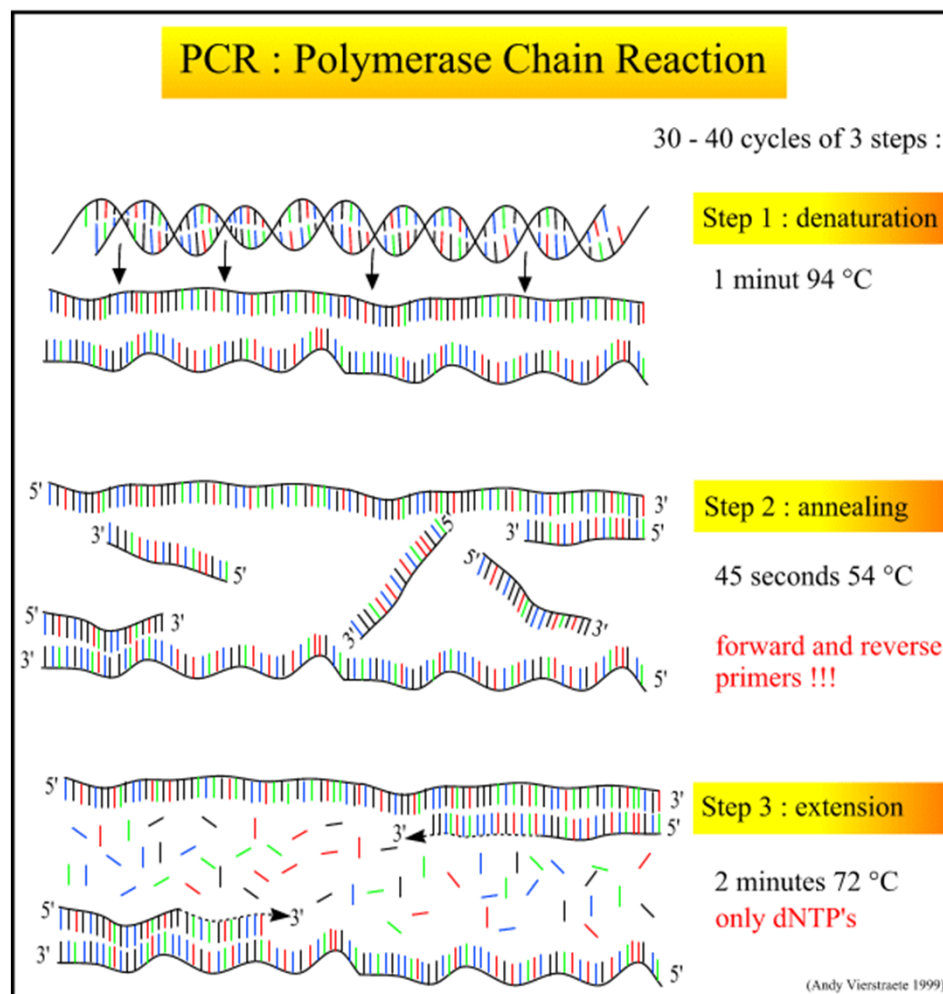
- Chẩn đoán bệnh di truyền.
- Chẩn đoán đột biến gen trong ung thư.
- Phát hiện khuyết đại gen.
- Theo dõi đáp ứng với thuốc điều trị.

# Kỹ thuật PCR (2)

## Nguyên lý

### Reagent

10X buffer	2.5 uL	5 uL
dNTP	0.5	1
Forward primer	1	2
Reverse primer	1	2
Taq polymerase	0.15	0.3
water	18.85 uL	38.7 uL
DNA (30-50 ng)	1	1
Total volume	25 uL	50 uL



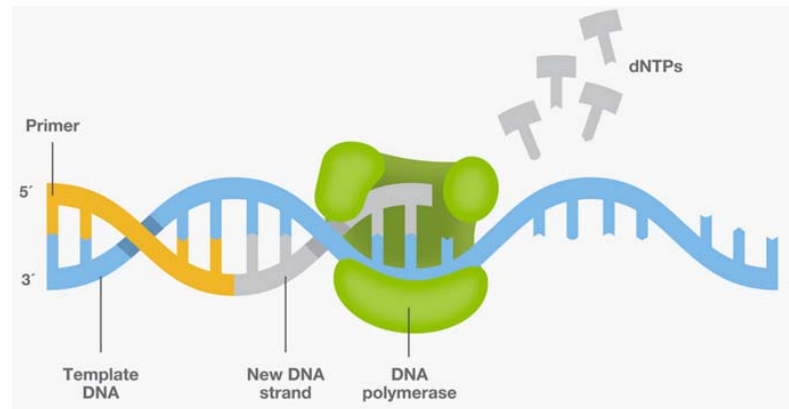
Source: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

# Kỹ thuật PCR (3)



## DNA polymerase

- 1 thành phần thiết yếu trong phản ứng PCR với vai trò trong tổng hợp chuỗi ADN mới.
- Taq DNA polymerase được phân lập từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* sống ở suối nước nóng 72°C.



Source: <https://www.thermofisher.com>



# Kỹ thuật PCR (4)

## Ưu điểm

- Độ nhạy & đặc hiệu cao
- Không yêu cầu thể tích mẫu lớn
- Có thể thực hiện nhiều mẫu cùng lúc
- Thời gian trả kết quả ngắn

## Nhược điểm

- Chi phí cao cho trang thiết bị và hóa chất
- Cần môi trường vô trùng để tránh nguy cơ nhiễm ADN từ mẫu khác.



# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (1)

## Chỉ định

- Phát hiện các đột biến ADN trong ung thư, bệnh lý thần kinh.
- Phát hiện các đột biến điểm trong chẩn đoán bệnh di truyền
- Xác định type và các allele kháng nguyên bạch cầu người HLA có liên quan đến bệnh.
- Định danh vi khuẩn, virus, nấm
- Kiểm định lại các đột biến ADN được phát hiện bằng các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS).

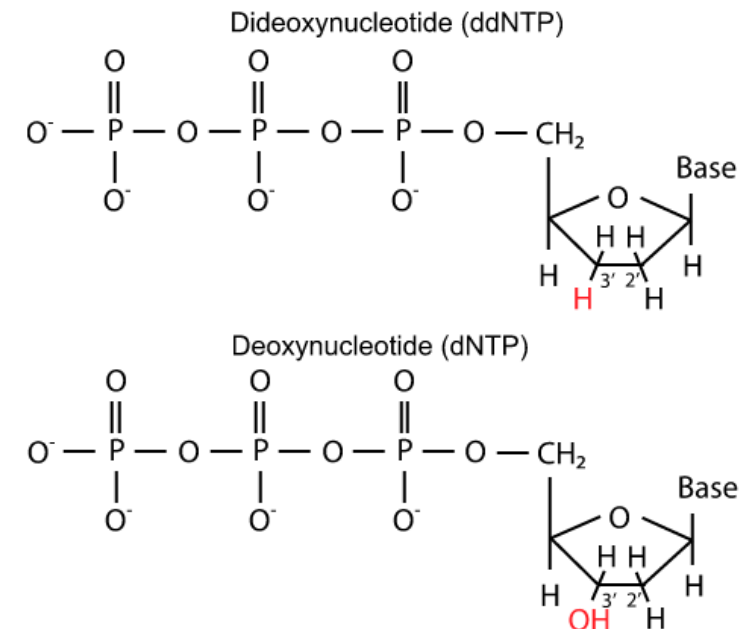
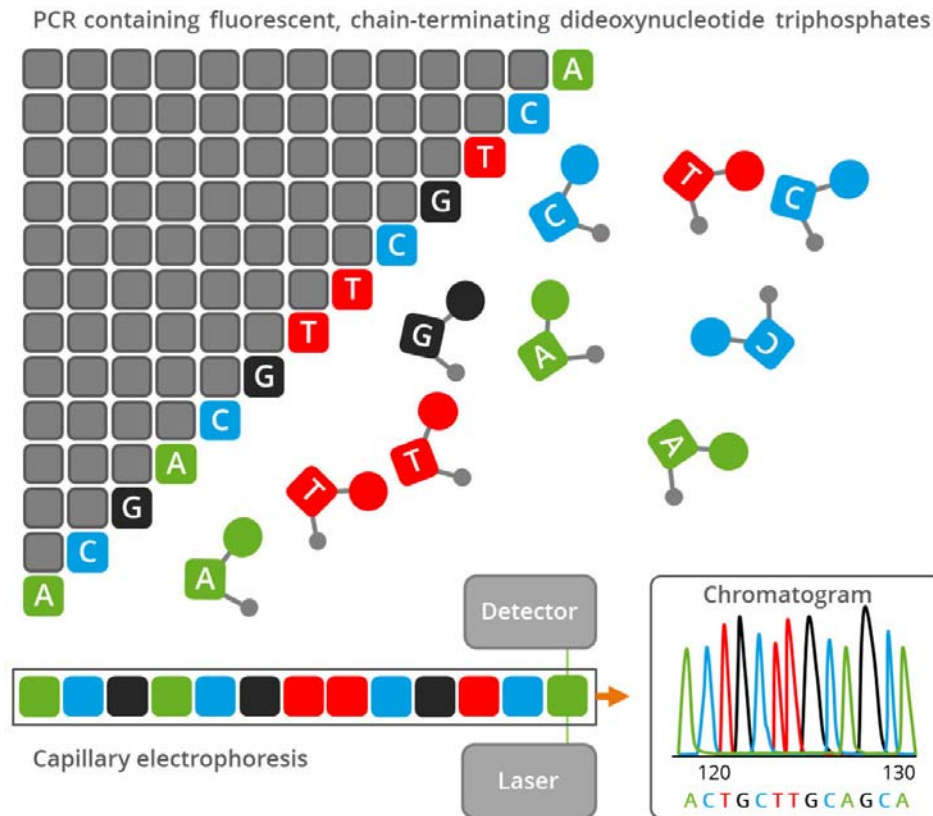


# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (2)

## Nguyên lý kỹ thuật

- Enzyme DNA polymerase xúc tác gắn các nucleotide vào đoạn ADN đơn đang tổng hợp ở vị trí 3' có nhóm –OH tự do, khi gặp nucleotide không có 3'-OH thì phản ứng tổng hợp dừng lại.
- Sử dụng các dideoxynucleotide (ddNTP) không có nhóm 3'-OH ở phân tử đường -> làm ngưng tổng hợp chuỗi ADN đơn ngẫu nhiên.
- Mỗi ddNTP được nhuộm màu huỳnh quang khác nhau.

# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (3)



Source: <https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/sanger-sequencing.html>



# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)





# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)

## Ưu điểm

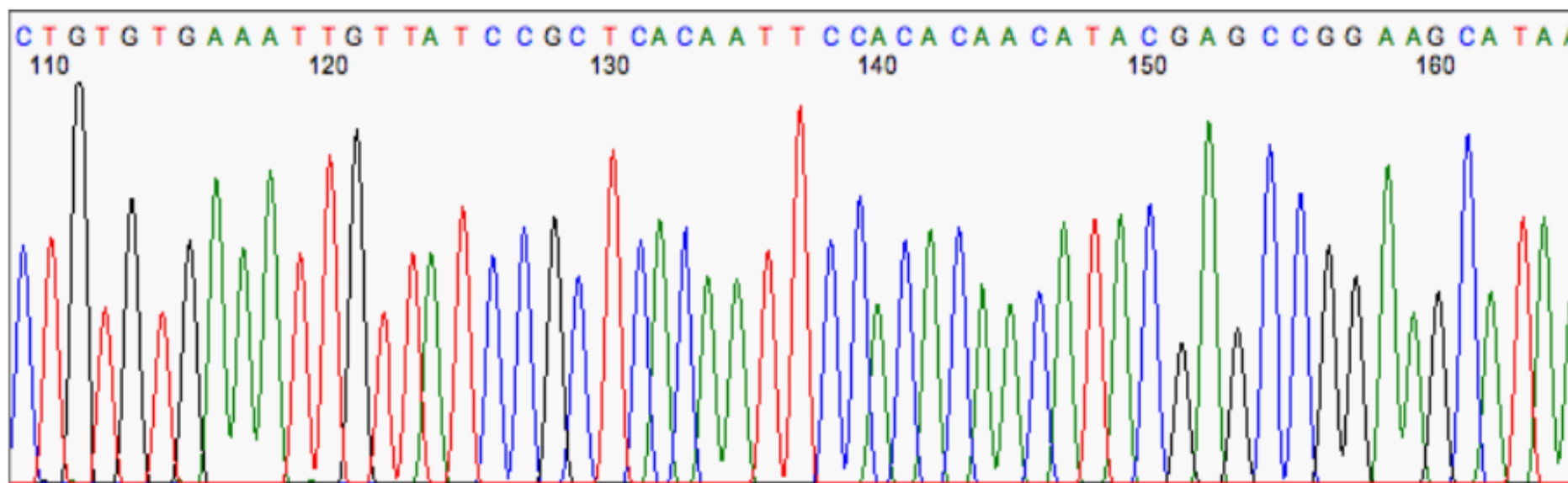
- Chiều dài phân mảnh ADN (read length) dài hơn so với kỹ thuật NGS.
- Độ chính xác cao
- Dùng kiểm định lại các đột biến được phát hiện bởi các kỹ thuật NGS.

## Nhược điểm

- Tốn thời gian
- Chi phí XN cao

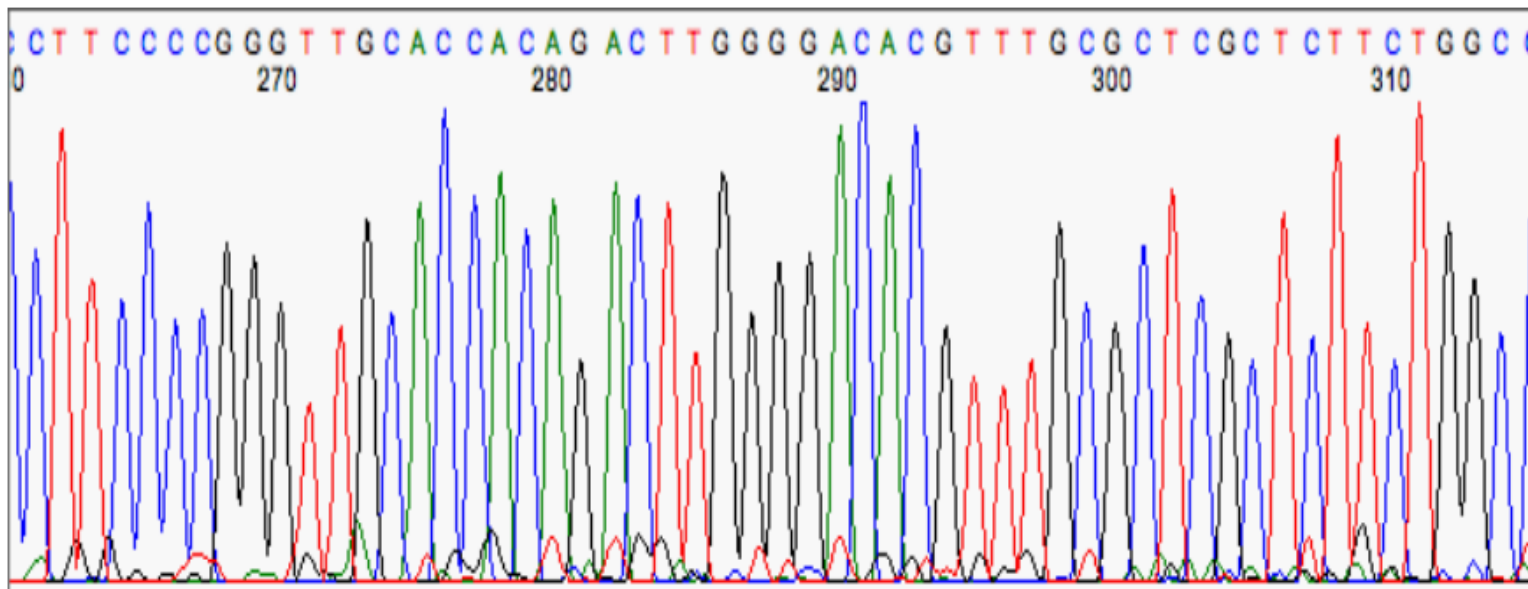


## Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)



Kết quả tốt, không “noise”

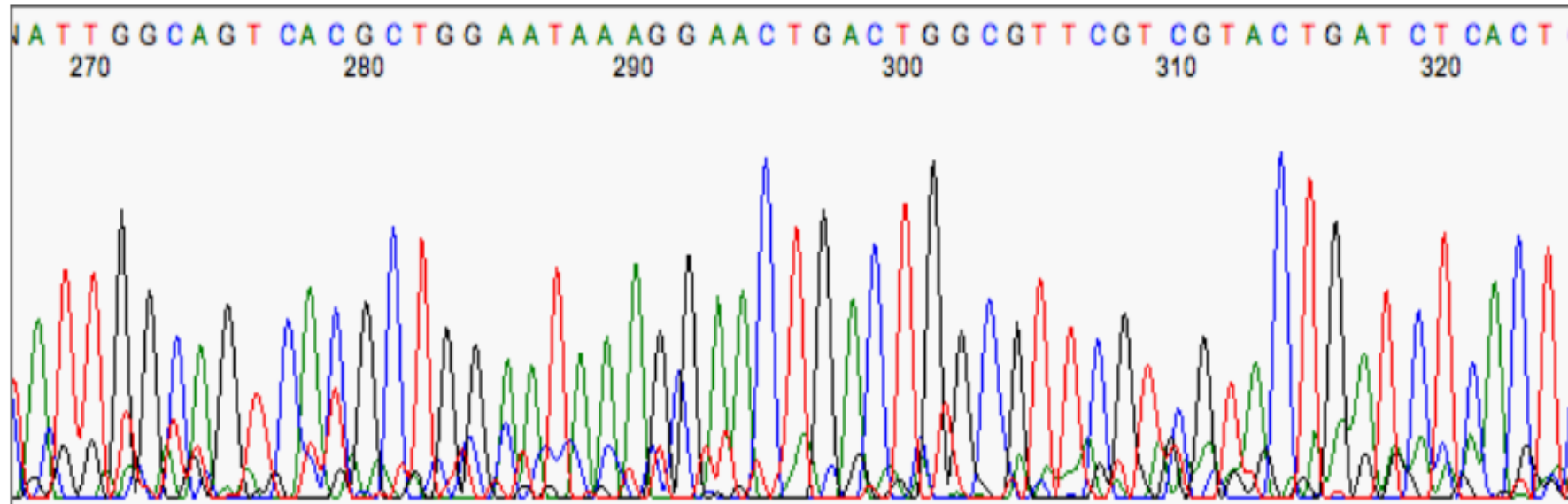
# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)



Kết quả tạm chấp nhận, ít “noise”



## Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)

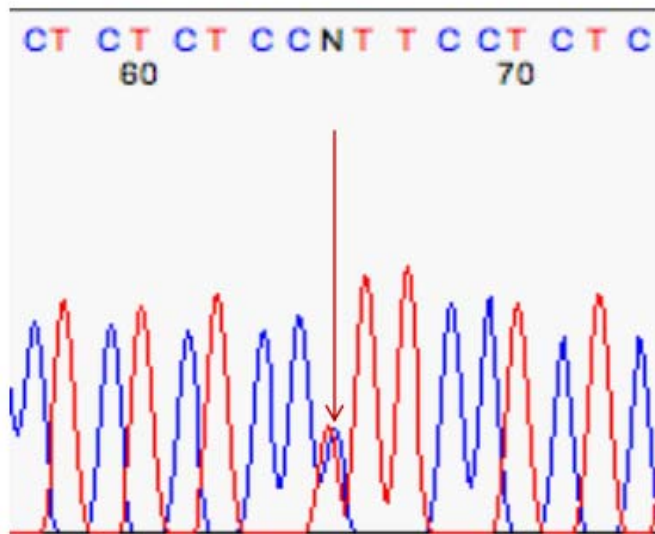


Kết quả không tốt

# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (4)



Heterozygous peaks



Mis-called

