



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**



- 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 Sanger

# Kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ



## Chỉ định

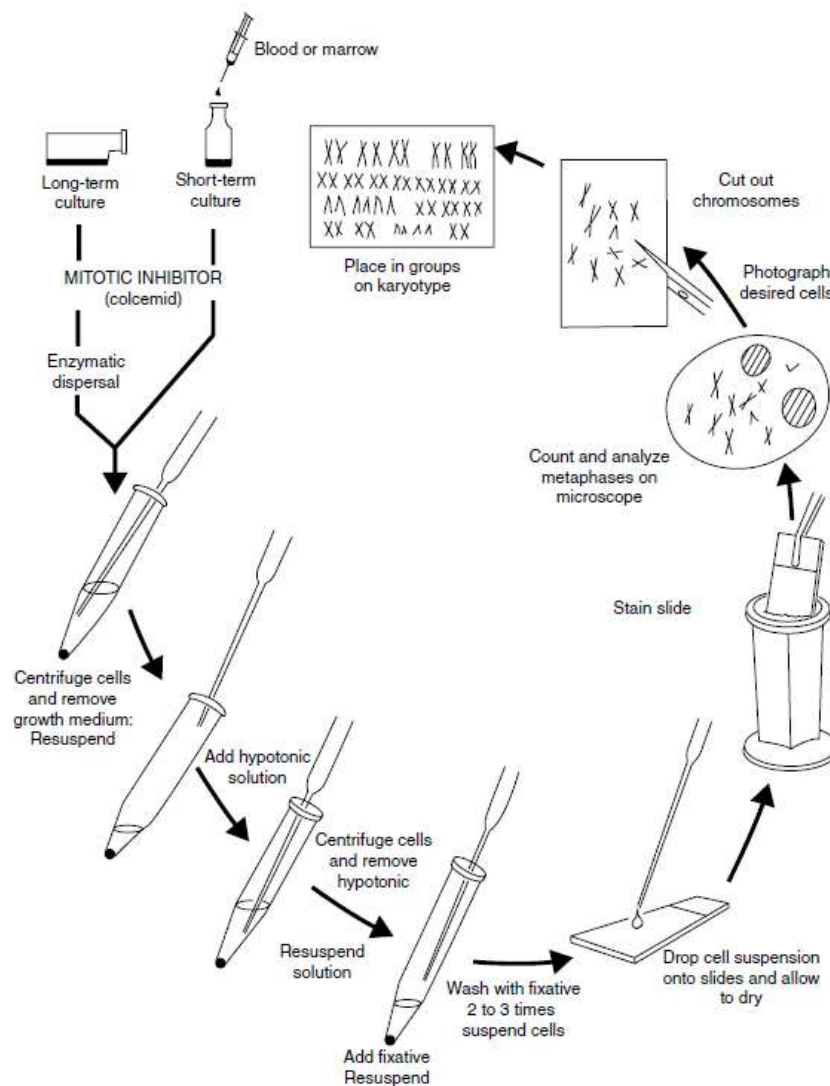
- Kiểu hình lâm sàng bất thường / đa dị tật bẩm sinh
- Chậm phát triển thể chất và / hoặc trí tuệ
- Mơ hồ giới tính
- Sảy thai liên tiếp / vô kinh / vô sinh
- Bất thường hình thái của thai trên siêu âm / Thai sảy trong 3 tháng đầu
- Bệnh sử gia đình đã xác định người mang bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể
- Ung thư (bạch cầu)

# Kỹ thuật nhuộm sắc thể đồ

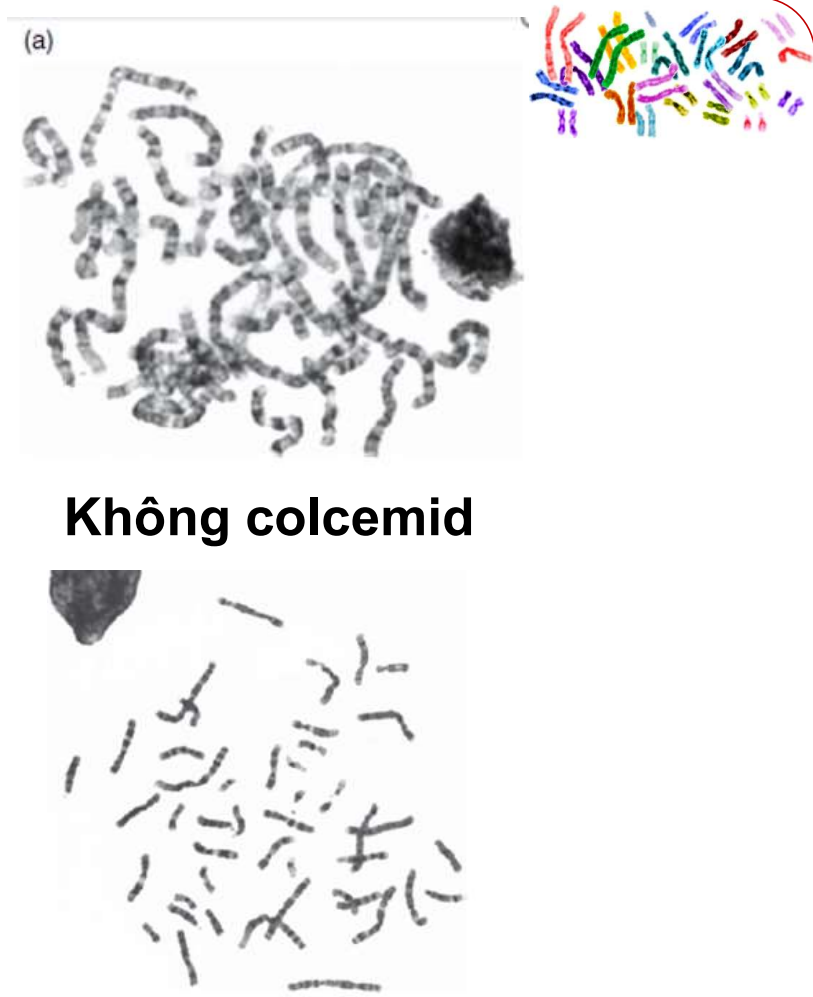
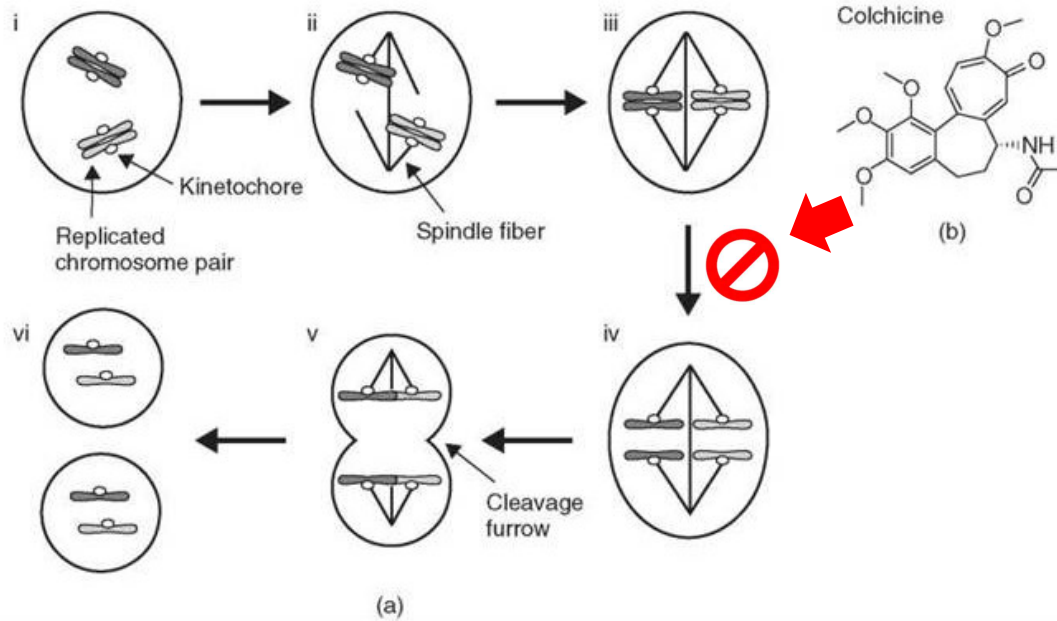


## Nguyên lý kỹ thuật

- Demecolcine (Colcemid) ngăn sự hình thành thoi vô sắc -> giữ nhiễm sắc thể ở trạng thái kỳ giữa
- Dung dịch nhược trương (KCl) -> nồng độ dung dịch bên trong cao hơn bên ngoài tế bào -> gia tăng thể tích tế bào -> cụm nhiễm sắc thể trải rộng
- Dung dịch định hình (Acetic acid : methanol = 3:1; Carnoy) -> loại nước khỏi tế bào & định hình nhiễm sắc thể



# Hãm phân bào



**Không colcemid**

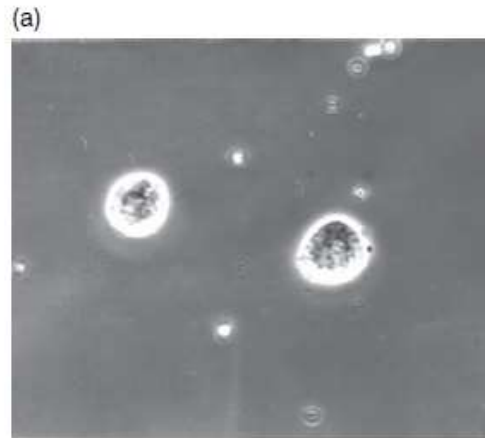
**Có colcemid**

Source: AGT, 2017

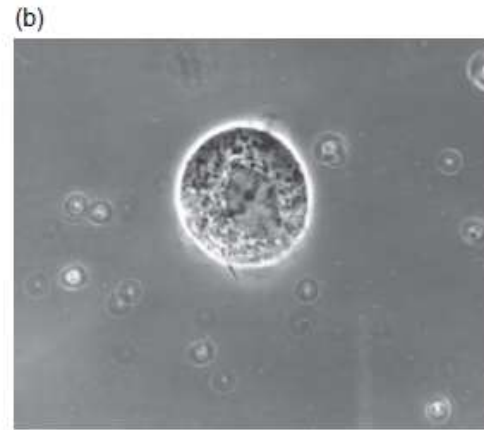
# Nhược trương tế bào



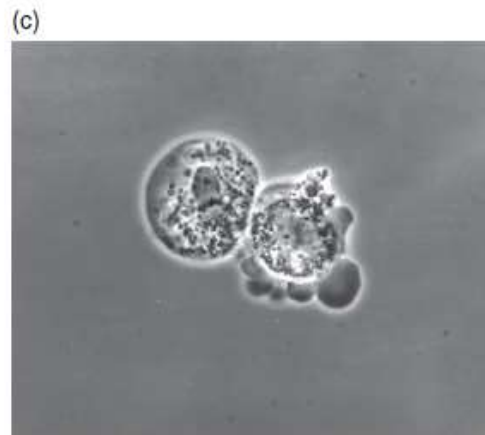
**Sau 3 phút  
thêm KCl  
0.075M**



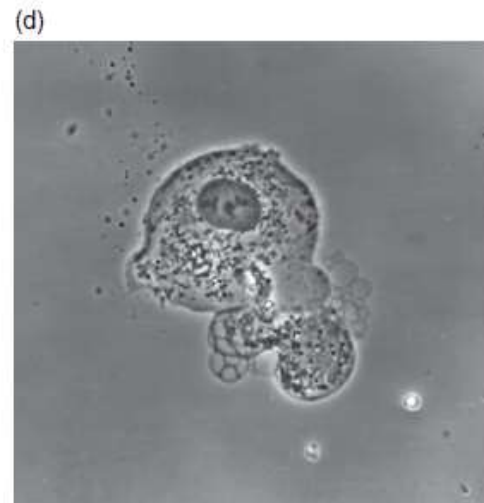
**Sau 10 phút  
thêm KCl  
0.075M**



**Sau 30 phút  
thêm KCl  
0.075M**



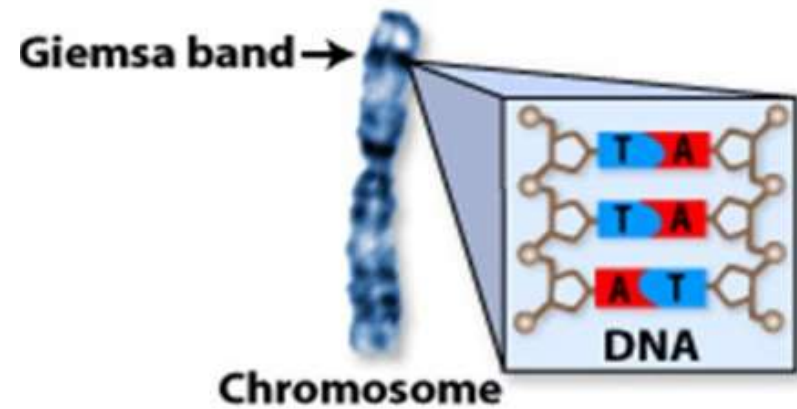
**Sau 45 phút  
thêm KCl  
0.075M**



## Định danh nhiễm sắc thể nhuộm bằng G



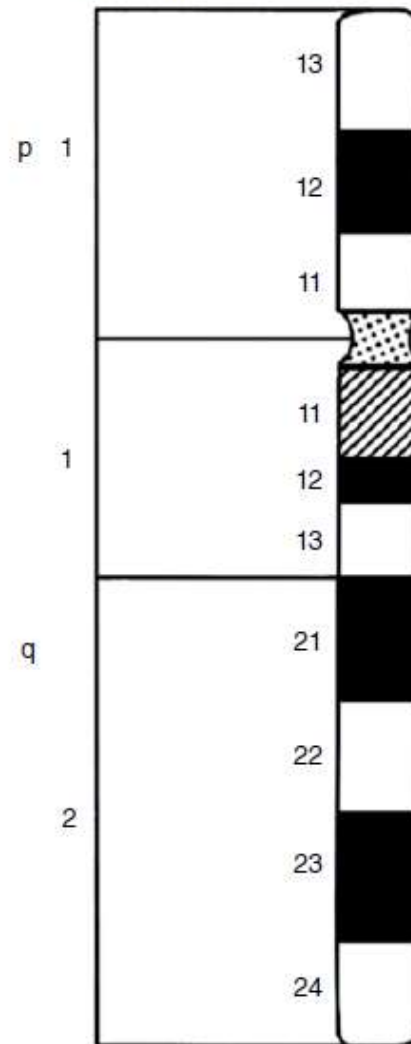
- Kích thước
- Vị trí tâm
- Hình thái, kích thước và vị trí các băng



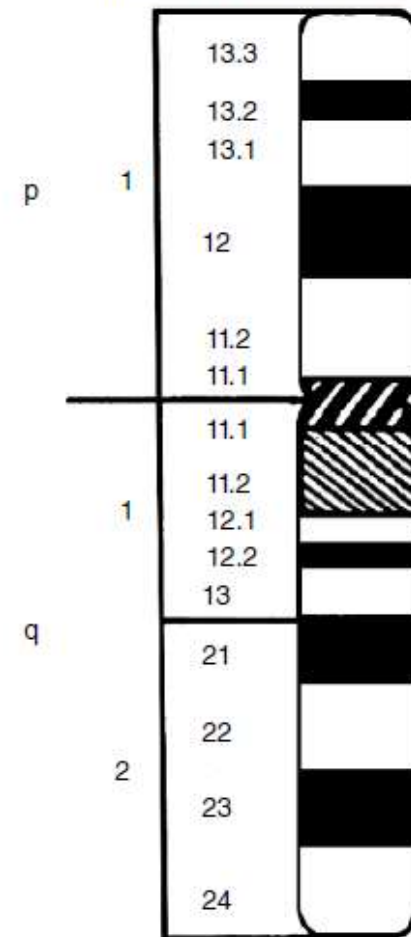


## Cách ghi vị trí băng của NST

ISCN regions and bands

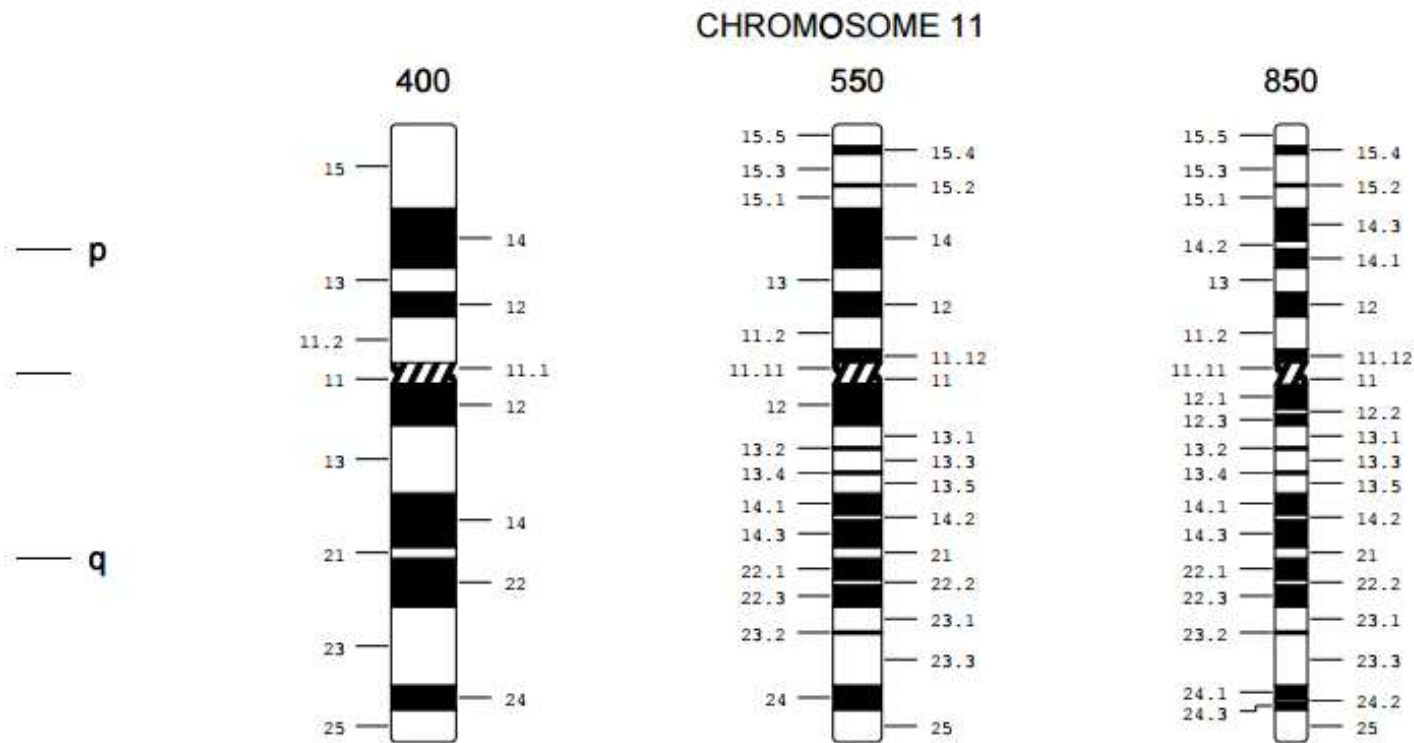


ISCN regions, bands, and sub-bands



Source: AGT, 2017

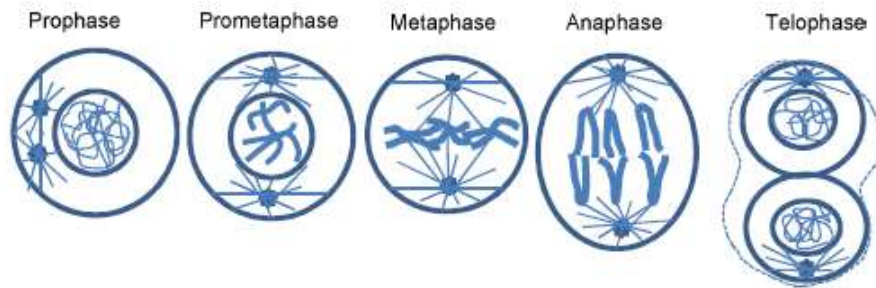
## Cách ghi vị trí băng của NST



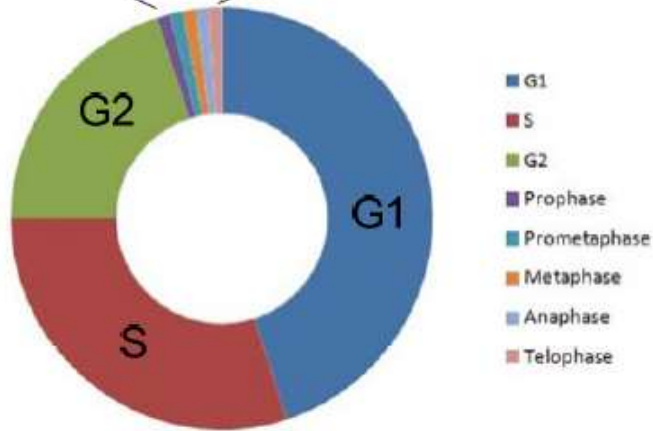
- 400 band  
11q14
- 550 band  
11q14.1  
11q14.2  
11q14.3

Source: <http://www.pathology.washington.edu/research/cytopages/idiograms/human/>

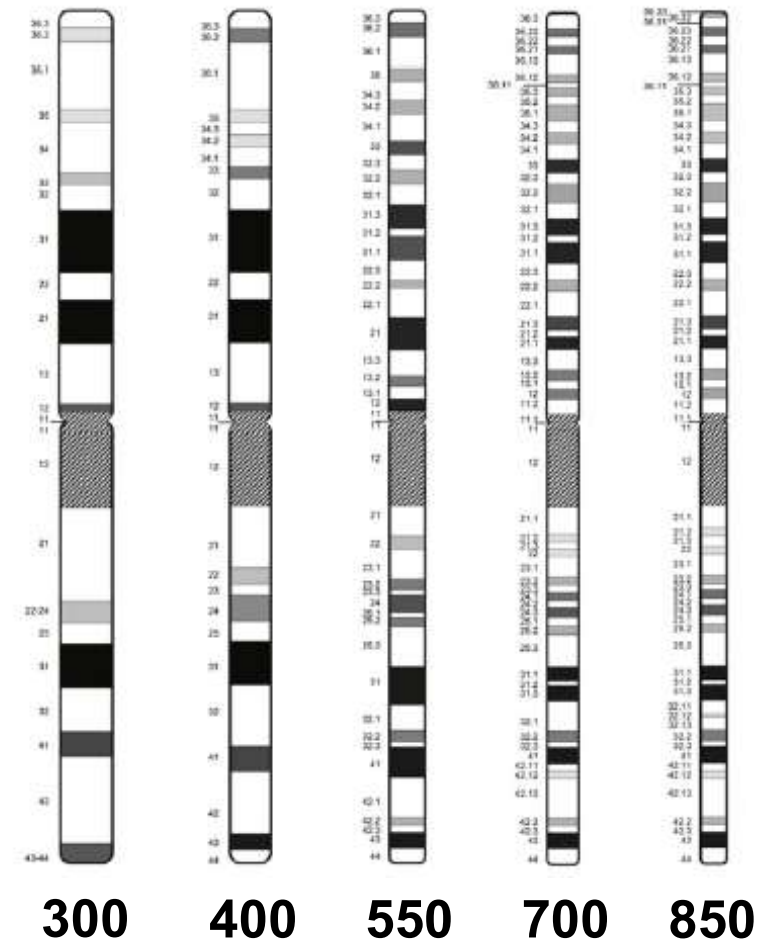
# Độ phân giải bằng của NST



Cell Division stages (Mitosis)



Source: Sethakulvivhai W. et al.,2012



# Độ phân giải bằng của NST



TABLE I G-BANDING RESOLUTION EVALUATION SCORE [10].

<i>Band resolution</i>	<i>Land marks Criteria</i>
300 band	2 dark bands on 8p (8p12 & 8p22) 3 dark bands on 10q (10q21, 10q23, 10q25) 20p12 visible 22q12 distinct
400 band	3 dark bands on mid-4q (q22-28) 3 dark bands mid-5q (5q14, 5q21, 5q23) 2 dark bands on 9p (9p21 & 9p23) 13q33 distinct
500 band	7q33 & 7q35 distinct 3 dark bands on 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) 14q32.2 distinct 4 dark bands on 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q22)
550 band	5q31.2 distinct 8p21.2 visible 2 dark bands on 11pter (11p15.2 & 11p15.4) 22q13.2 distinct
700 band	2p25.2 distinct 2q37.2 distinct 10q21.1 and 10q21.3 resolve 17q22-q24 resolves into 3 dark bands

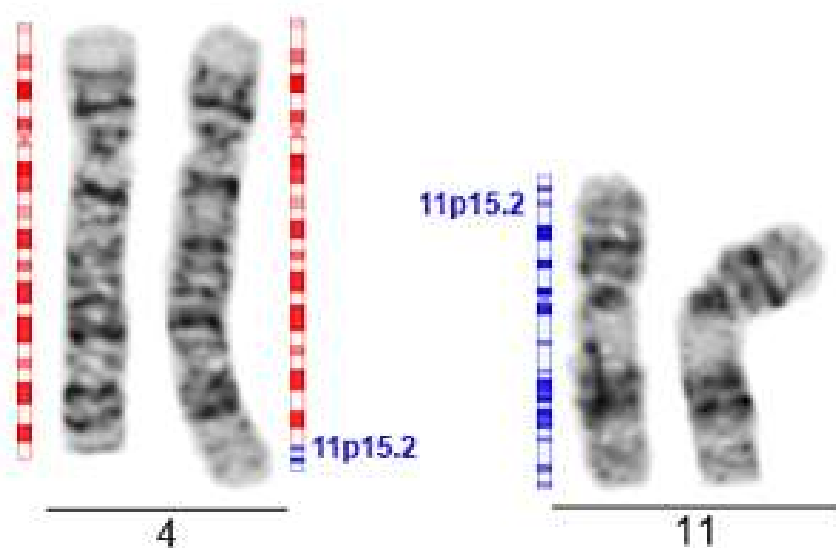
TALBE II MINIMUM G -BANDING RESOLUTION FOR REGERRAL REASON [10].

<i>Reason for referral</i>	<i>Minimum level of resolution of G-banding images quality</i>
Confirmation of aneuploidy e.g. direct lymphocyte, direct CV or solid tissue culture preparation	< 300 band
Exclusion of known large structural rearrangements e.g. lymphocyte, solid tissue, CVS direct preparation or amniotic fluid cell preparation	300 band
Identification and exclusion of small expected structural rearrangements e.g. lymphocyte, solid tissue, CVS culture or amniotic fluid preparation	400 band
Routine amniotic fluid and CV culture preparations	400 band
Abnormal ultrasound scan associated with AF, CV and solid tissue referrals	500 band
Blood referrals, not covered by exclusion criteria	550 band
For microdeletion syndroms (when no FISH probe is available)	700 band

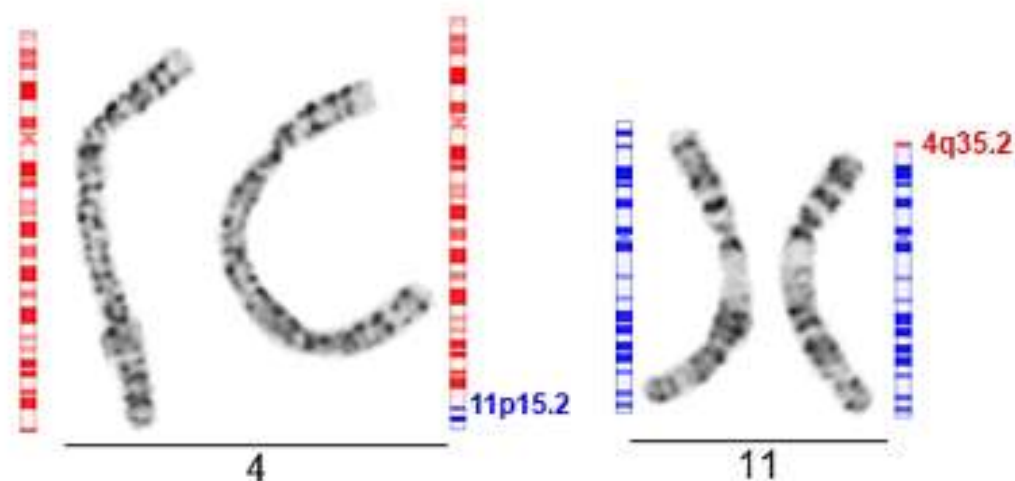
Thai 19 tuần 2 ngày / Thiếu ối nặng, nghi ngờ bất sản thận hai bên

Karyotype thai: 46,XY,der(4)t(4;11)(q35.2;p15.2)mat

Karyotype mẹ : 46,XX,t(4;11)(q35.2;p15.2)



**THAI**



**MẸ**

## Cách ghi kết quả phân tích NST (karyotype)



**(số lượng NST),(NST giới tính),(bất thường số lượng),(bất thường cấu trúc)**

- X trước Y trước NST thường.
- Bất thường số lượng NST thường = ghi theo thứ tự tăng dần.
- Nhiều bất thường cấu trúc = theo ABC (*del*, *inv*, *rob*).
- Nhánh p trước nhánh q.
- Điểm gãy gần trước điểm gãy xa.



# Cách ghi kết quả phân tích NST (karyotype)



## Bất thường cấu trúc NST

❖ trên cùng 1 NST, 1 điểm gãy

46,XY , sự kiện(NST số mấy)(điểm gãy ở nhánh nào)

❖ trên cùng 1 NST, 2 điểm gãy

46,XY , sự kiện(NST)(điểm gãy 1/nhánh?điểm gãy 2/nhánh?)

# Cách ghi kết quả phân tích NST (karyotype)



## Bất thường cấu trúc NST

### ❖ trên cùng 1 NST, 1 điểm gãy

Ví dụ: 46,XX,del(5)(q13)

*Diễn giải: người nữ có mất đoạn trên nhánh dài nhiễm sắc thể 5 ở vị trí 13.*

### ❖ trên cùng 1 NST, 2 điểm gãy

Ví dụ 1: 46,XX,dup(1)(q22q25) = người nữ có nhân đoạn trên nhánh dài NST 1 ở giữa vị trí 22 và 25.

Ví dụ 2: 46,XY,inv(3)(p13q21) = người nam có đảo đoạn quanh tâm trên NST 3 với 2 điểm gãy ở vị trí 13 của nhánh ngắn và vị trí 21 của nhánh dài.

Ví dụ 3: 46,XY,inv(3)(q21q26.2) = người nam có đảo đoạn cạnh tâm trên NST 3 với 2 điểm gãy trên nhánh dài ở vị trí 21 và vị trí 26.2.



# Cách ghi kết quả phân tích NST (karyotype)



## Bất thường cấu trúc NST

❖ giữa 2 NST, 2 điểm gãy

**46,XY , sự kiện(NST1;NST2)(điểm gãy 1;điểm gãy 2)**

Ví dụ: 46,XY,t(5;6)(q33;q23) = người nam có chuyển đoạn tương hỗ giữa 2 nhiễm sắc thể 5 và 6 với 2 điểm gãy ở nhánh dài NST 5 vị trí 33 và nhánh dài NST 6 vị trí 23.



# Kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ

## 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)

## Chỉ định

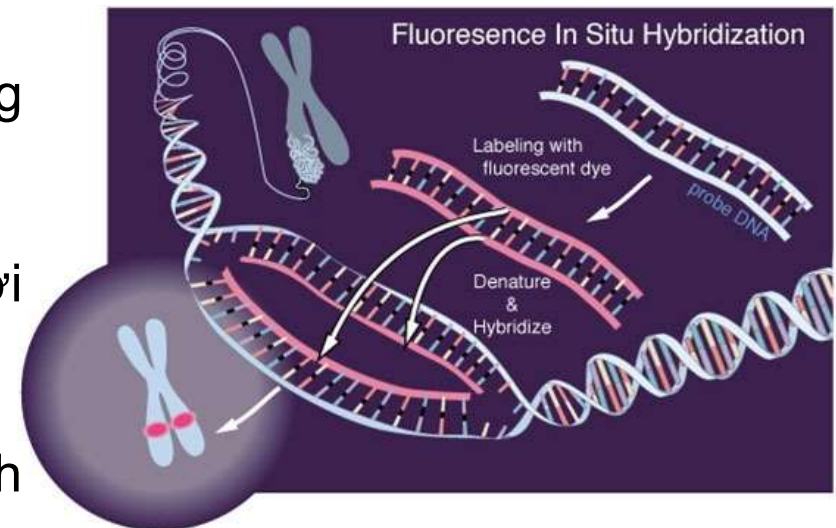
- Hội chứng vi mất đoạn (DiGeorge, Prader-Willi, Cri-du-chat, ...)
- Biểu hiện gen ung thư đặc trưng trong bệnh lý ác tính huyết học (Bcr-Abl trong CML), ung thư vú (Her-2 neu), ...
- Chẩn đoán nhanh lệch bội NST trong chẩn đoán tiền sản
- Kiểm định các nghi ngờ bất thường cấu trúc của kết quả NST đồ



# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

## Nguyên lý kỹ thuật

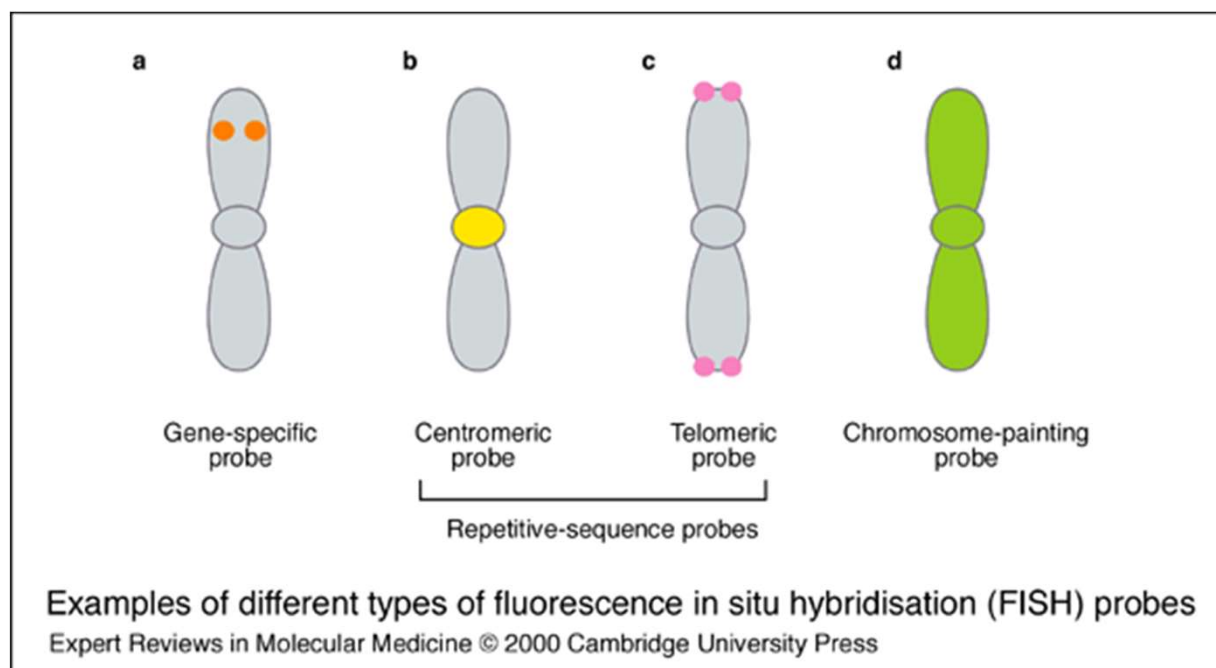
- Chuyển chuỗi DNA kép thành chuỗi DNA đơn
- Đoạn dò DNA có gắn huỳnh quang ở dạng chuỗi DNA đơn
- Đoạn dò DNA có gắn huỳnh quang lai với đoạn DNA cần khảo sát
- Quan sát kết quả lai dưới kính hiển vi huỳnh quang





# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

## Các loại đoạn dò (probes)



# Các loại đoạn dò (probe)

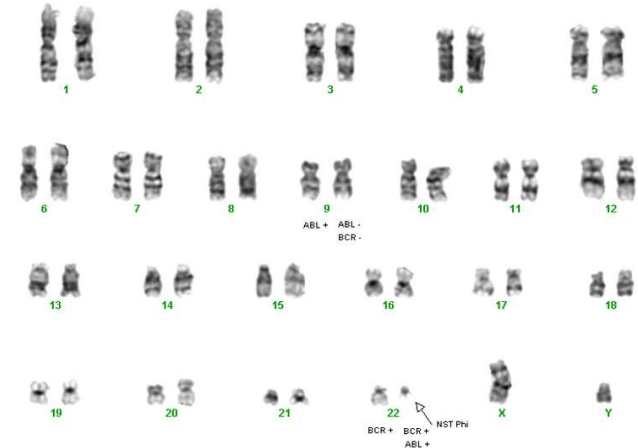
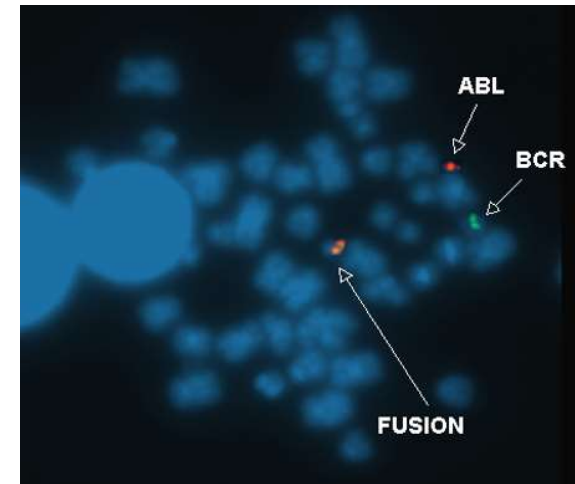
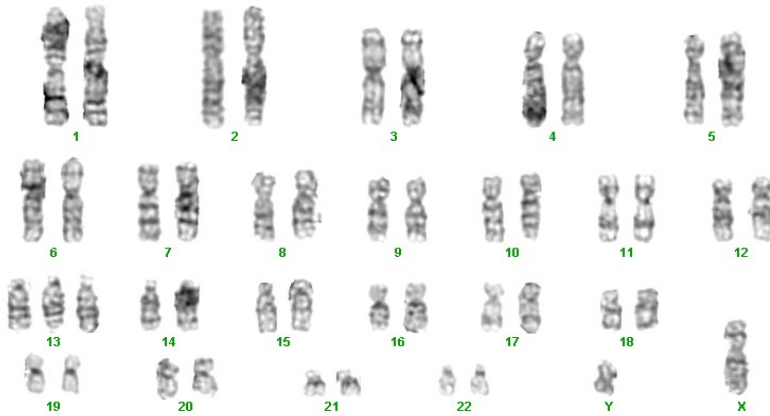
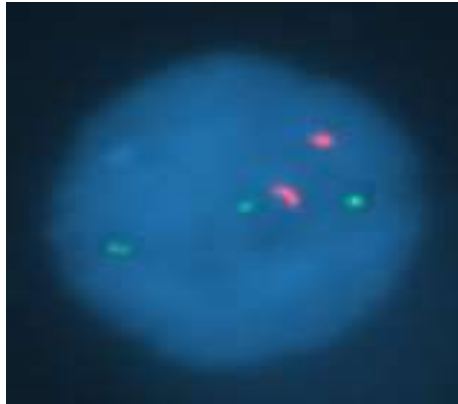


## Locus-specific probes

- Những đoạn trình tự đặc hiệu tạo thành các clones với kích thước thay đổi tùy vào cloning vector  
plasmids (1-10 kb) -> PAC, YAC, BAC vectors (80 kb -> 1 Mb)
- Ứng dụng:
  - + bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (chuyển đoạn / mất đoạn / đảo đoạn trong ung thư)
  - + khuếch đại gene trong ung thư
  - + chẩn đoán nhanh lệch bội nhiễm sắc thể trong chẩn đoán trước sinh
- Độ sáng huỳnh quang mức độ trung bình

# Các loại đoạn dò (probe)

## Locus-specific probes



# Các loại đoạn dò (probe)



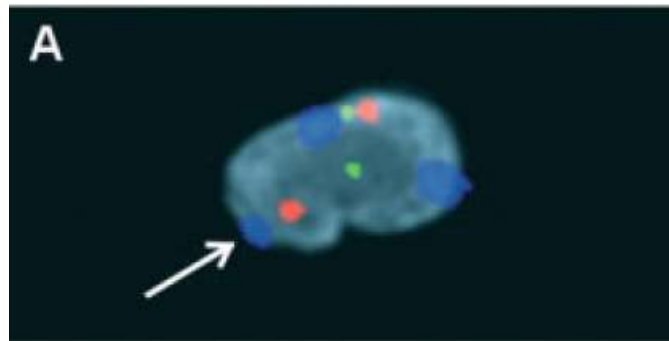
## Repetitive-sequence probes

- Những đoạn trình tự DNA ngắn lặp lại ở các vùng dị nhiễm sắc, ở tâm động hoặc các đầu tận của nhiễm sắc thể
- Ứng dụng:
  - + xác định nhanh lệch bội nhiễm sắc thể
  - + xác định sự thay đổi kích thước vùng dị nhiễm sắc ở NST 1, 9, 16 và Y
- Độ sáng huỳnh quang mức độ cao
- Thận trọng: có lai chéo giữa các NST khi dùng đoạn trình tự DNA lặp lại ở tâm động NST

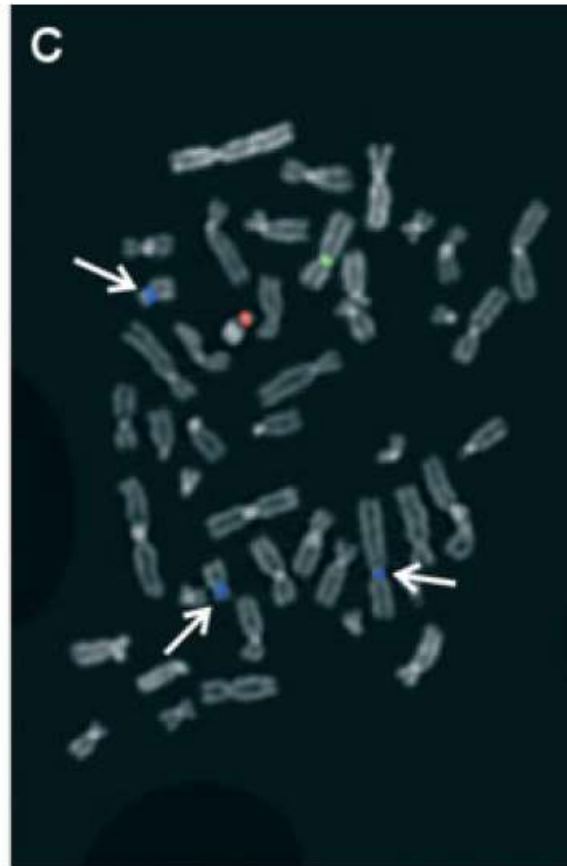


# Các loại đoạn dò (probe)

## Repetitive-sequence probes



**B**



Source: Collin A. et al., 2009

# Các loại đoạn dò (probe)

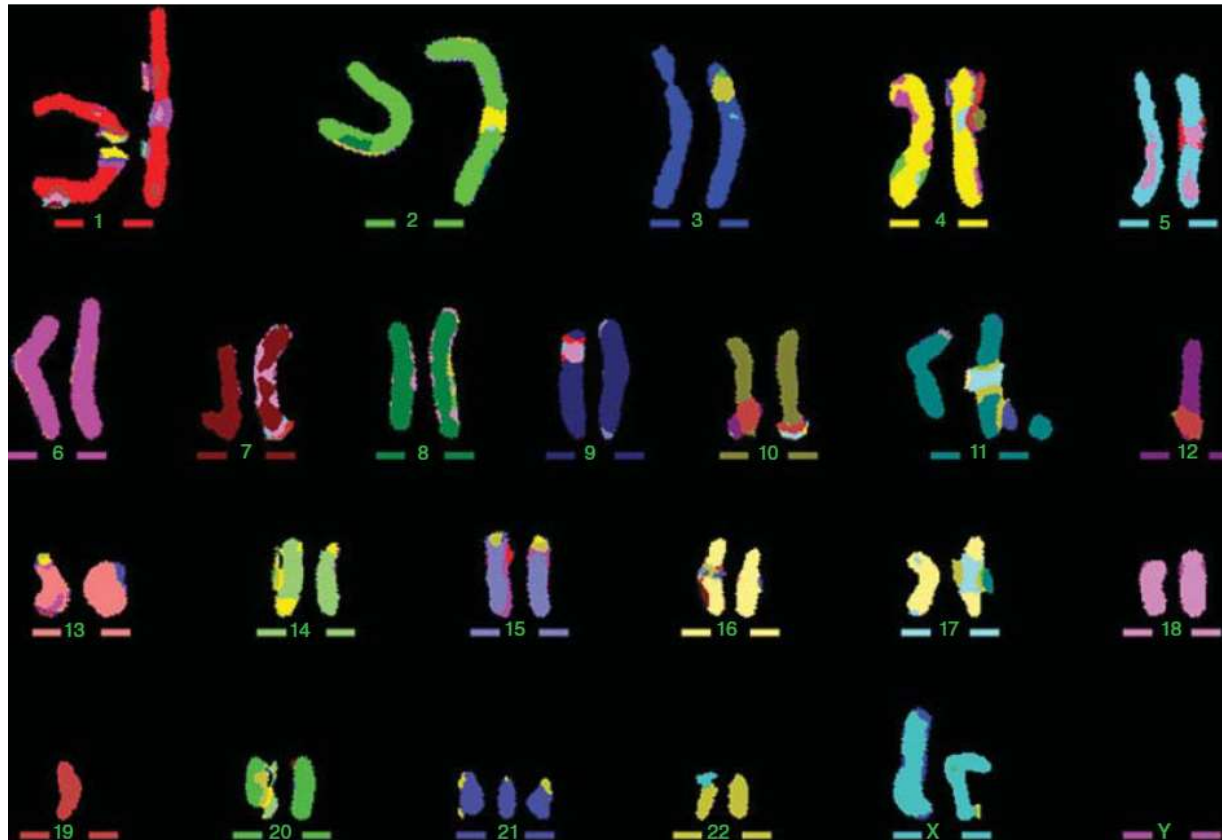


## Chromosome-painting probes

- Thư viện những probe đặc trưng cho một vùng của nhiễm sắc thể  
whole chromosome / whole chromosome arm / band-sized chromosomal regions
- Ứng dụng:
  - + định danh nhiễm sắc thể
  - + định danh nhánh / vùng nhiễm sắc thể
  - + định danh nhiễm sắc thể marker (M-FISH, SKY)
- Độ sáng huỳnh quang mức độ trung bình -> cao
- Nhược điểm: chi phí cao, thiết bị đắt tiền

# Các loại đoạn dò (probe)

## Chromosome-painting probes



# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)



## 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

## Chỉ định

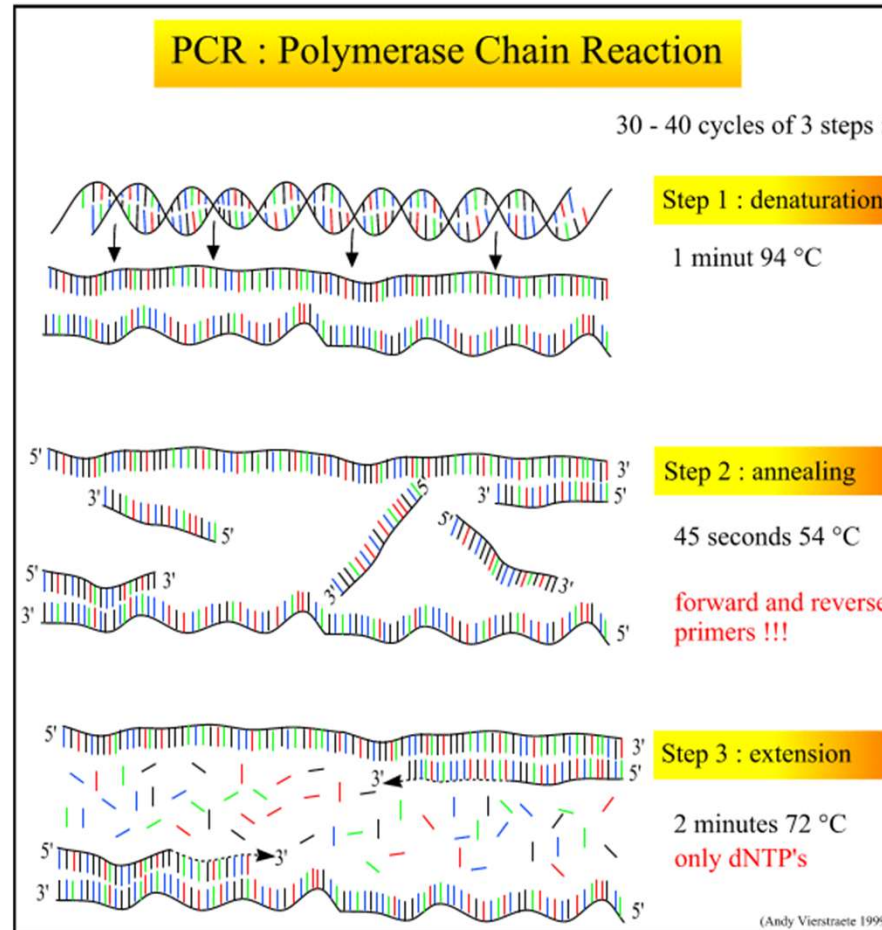
- Chẩn đoán bệnh di truyền.
- Chẩn đoán đột biến gen trong ung thư.
- Phát hiện khuyết đại gen.
- Theo dõi đáp ứng với thuốc điều trị.

# Kỹ thuật PCR

## 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



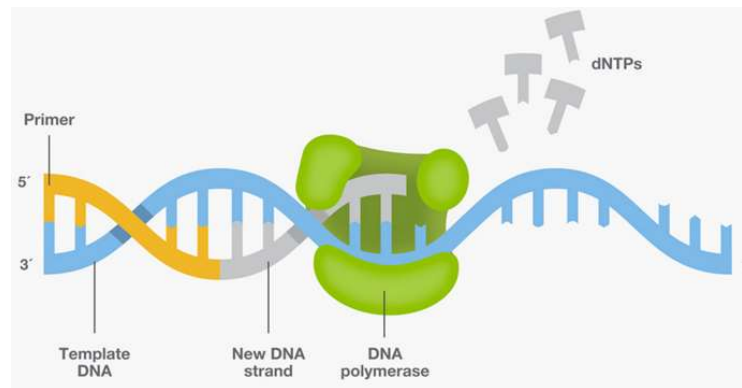
Source: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

# Kỹ thuật PCR



## 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

## 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.





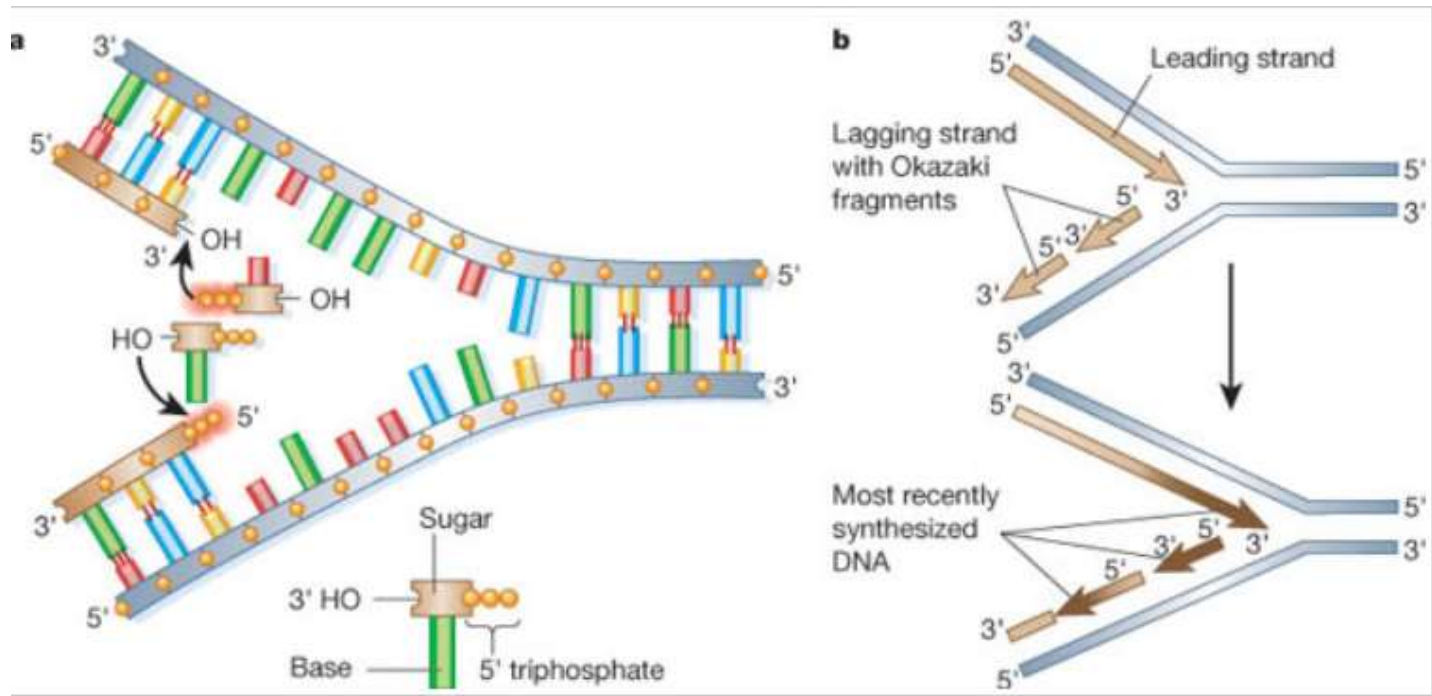
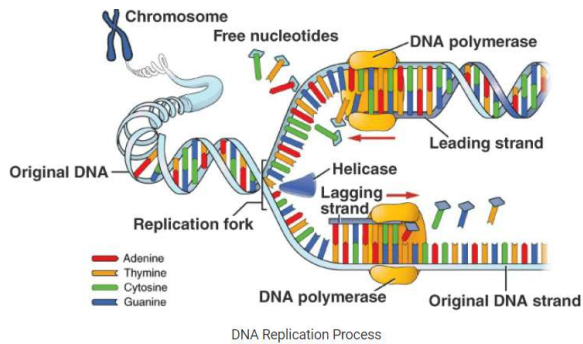
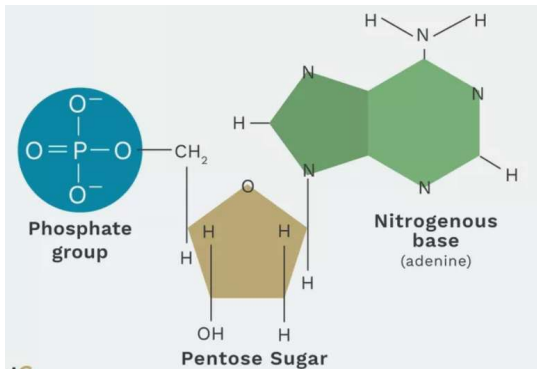


# Kỹ thuật giải trình tự Sanger

## 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 mới được phát hiện bằng các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS).

# Kỹ thuật giải trình tự Sanger





# Kỹ thuật giải trình tự Sanger

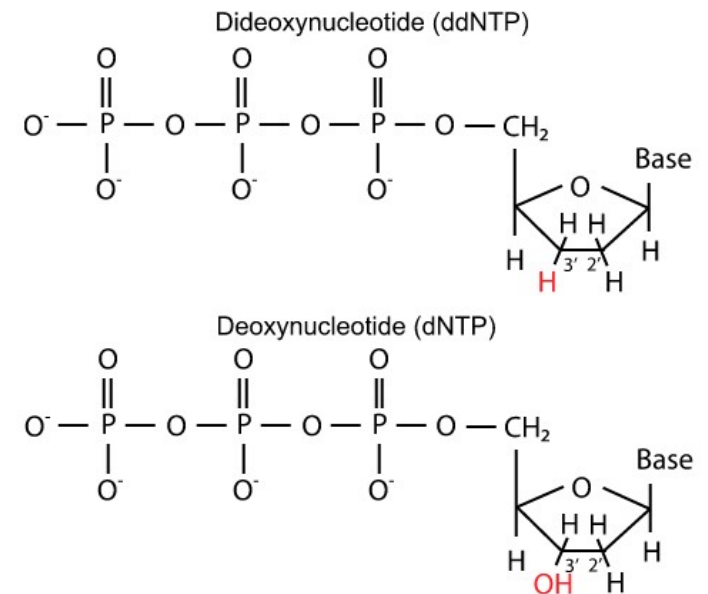
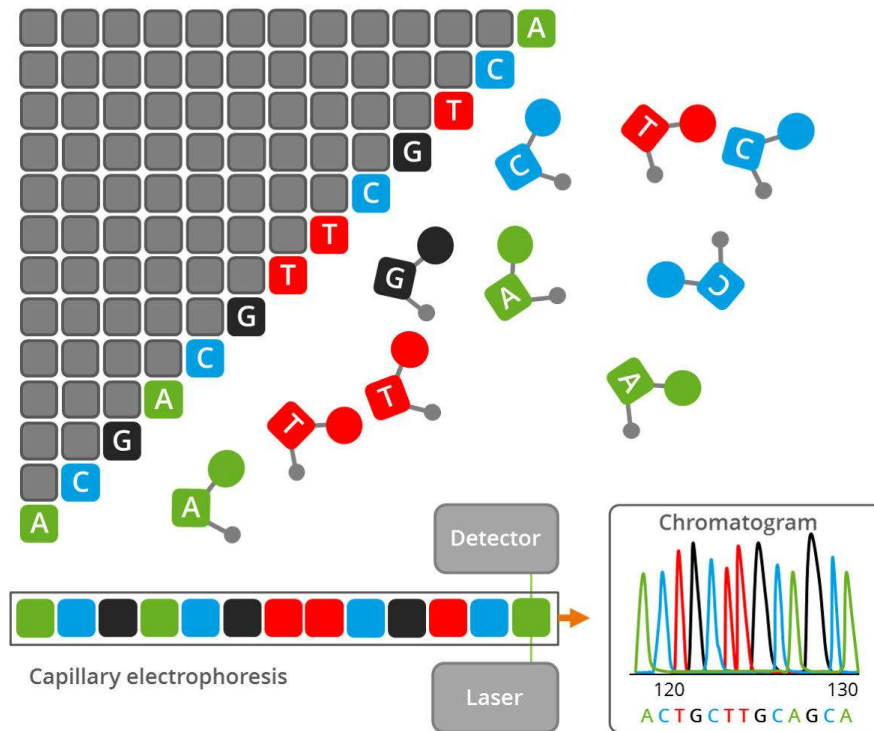
## Nguyên lý kỹ thuật

- 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



PCR containing fluorescent, chain-terminating dideoxynucleotide triphosphates



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

# Kỹ thuật giải trình tự Sanger





# Kỹ thuật giải trình tự Sanger

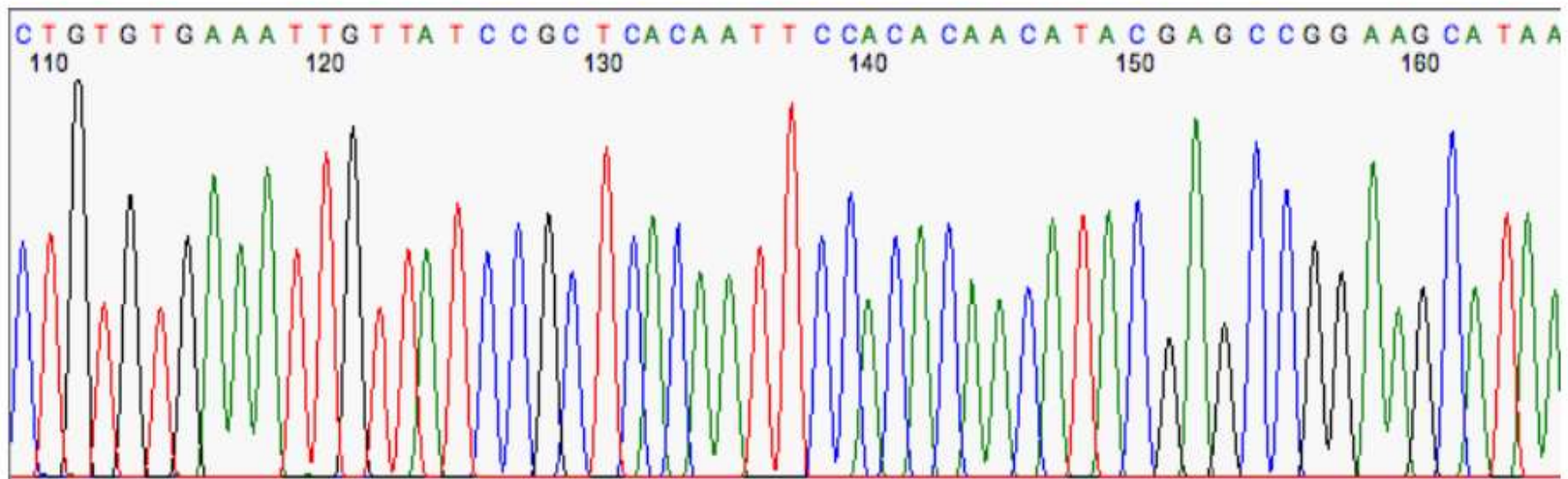
## Ưu điểm

- 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

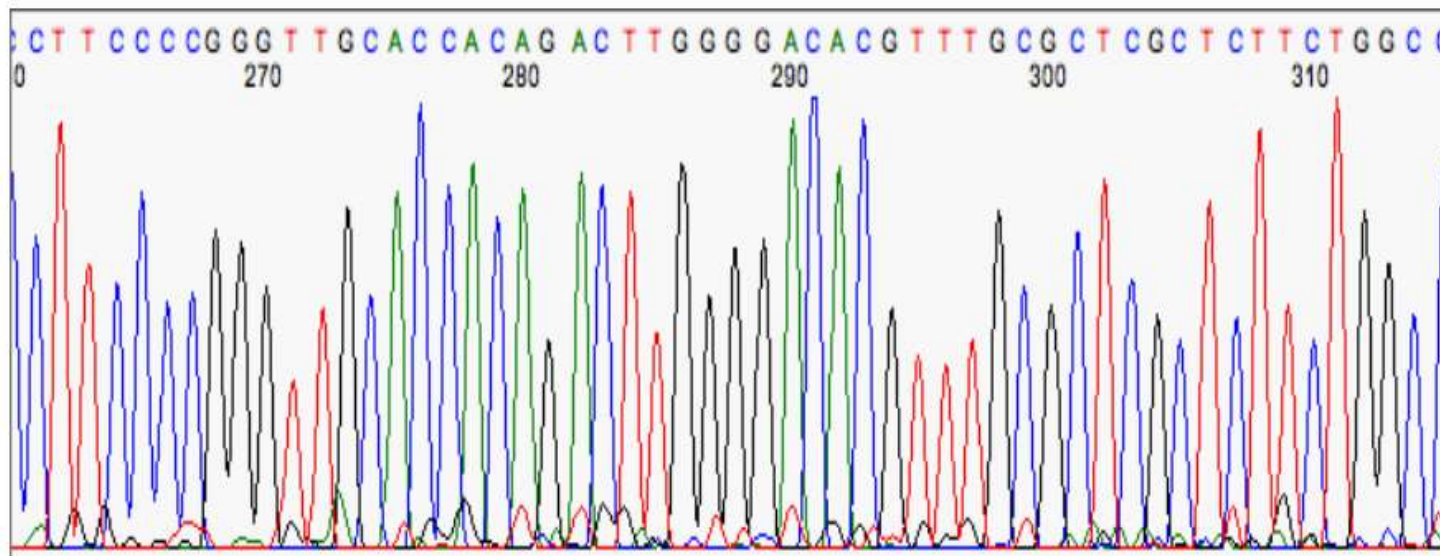
# Kỹ thuật giải trình tự Sanger



Kết quả tốt, không “noise”



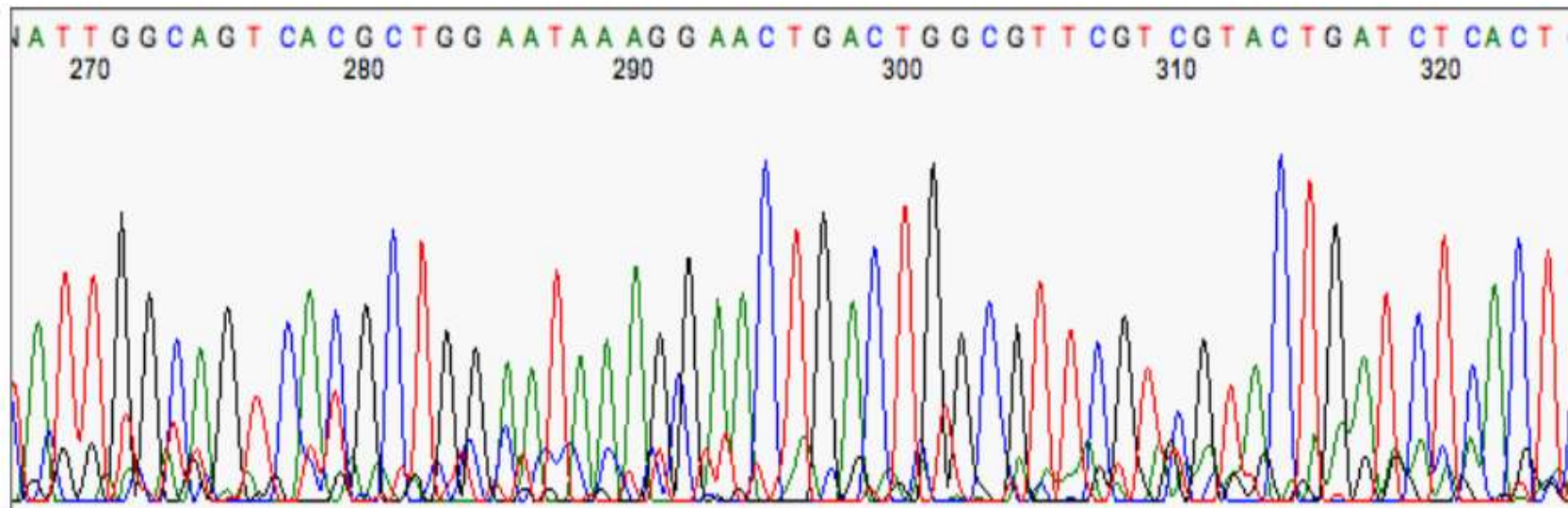
# Kỹ thuật giải trình tự Sanger



Kết quả tạm chấp nhận, ít “noise”



# Kỹ thuật giải trình tự Sanger

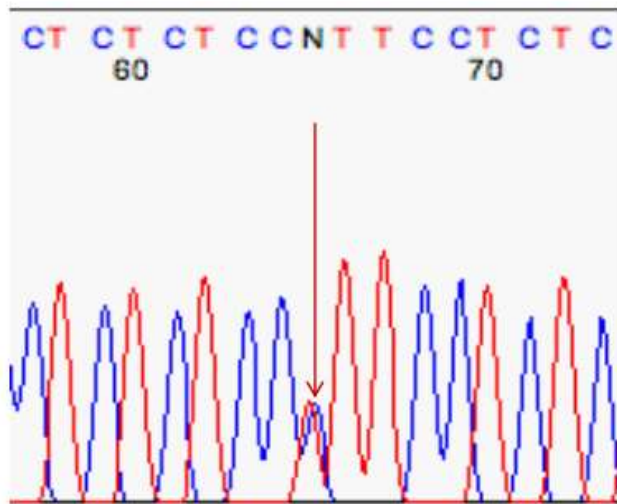


Kết quả không tốt

# Kỹ thuật giải trình tự Sanger



Heterozygous peaks



Mis-called

