



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

PHÒNG XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TẾ BÀO
Bộ môn Mô Phôi – Di truyền
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 ≥ 10 Mb.

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



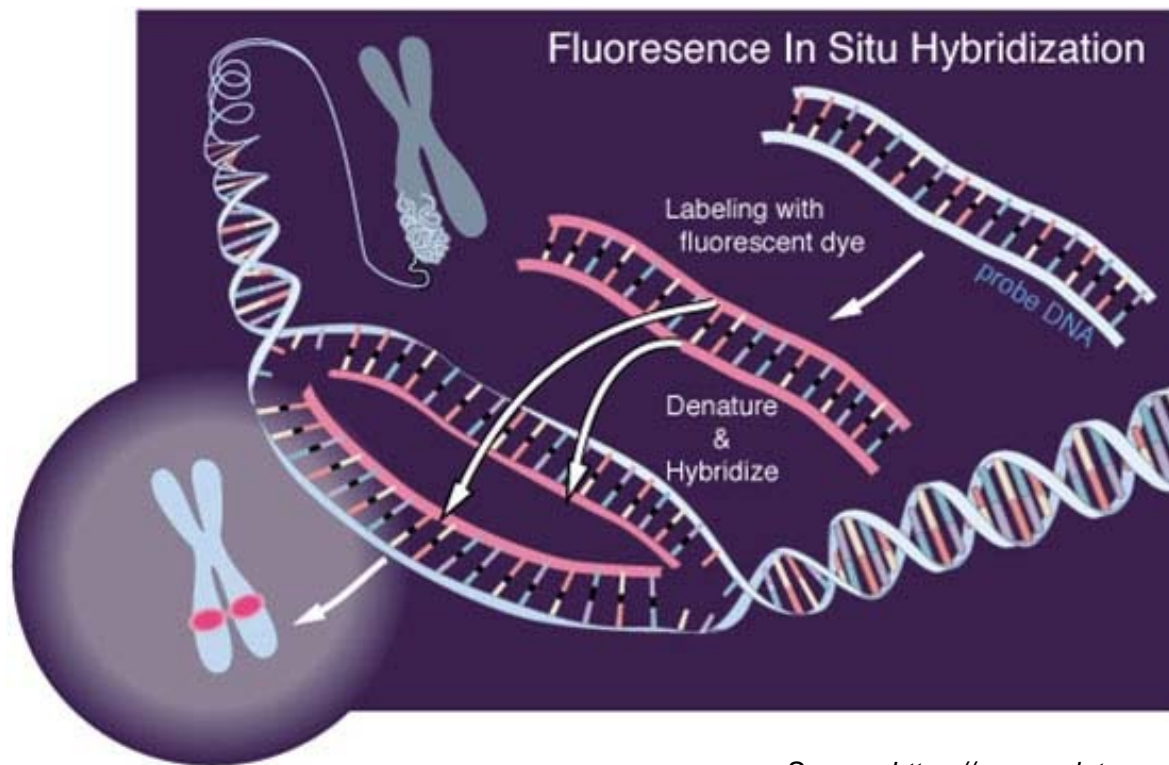
Chỉ định

- 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

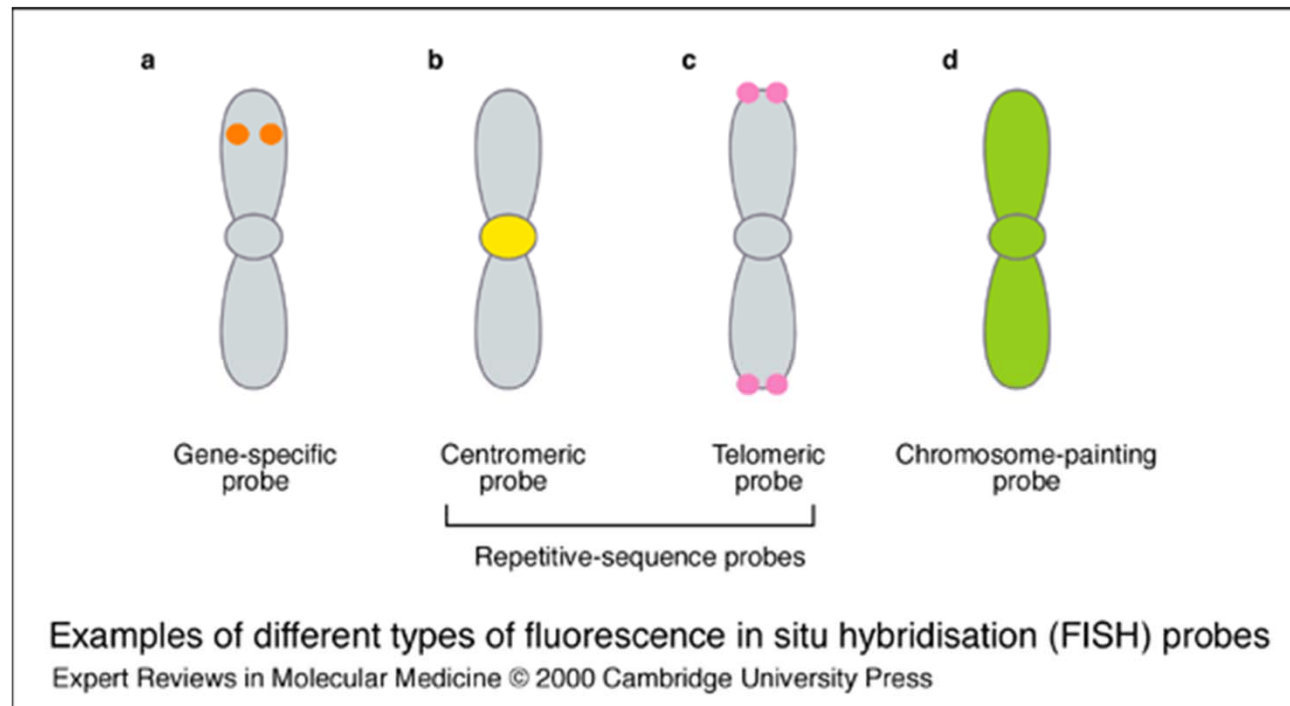


Source: https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fish.html

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

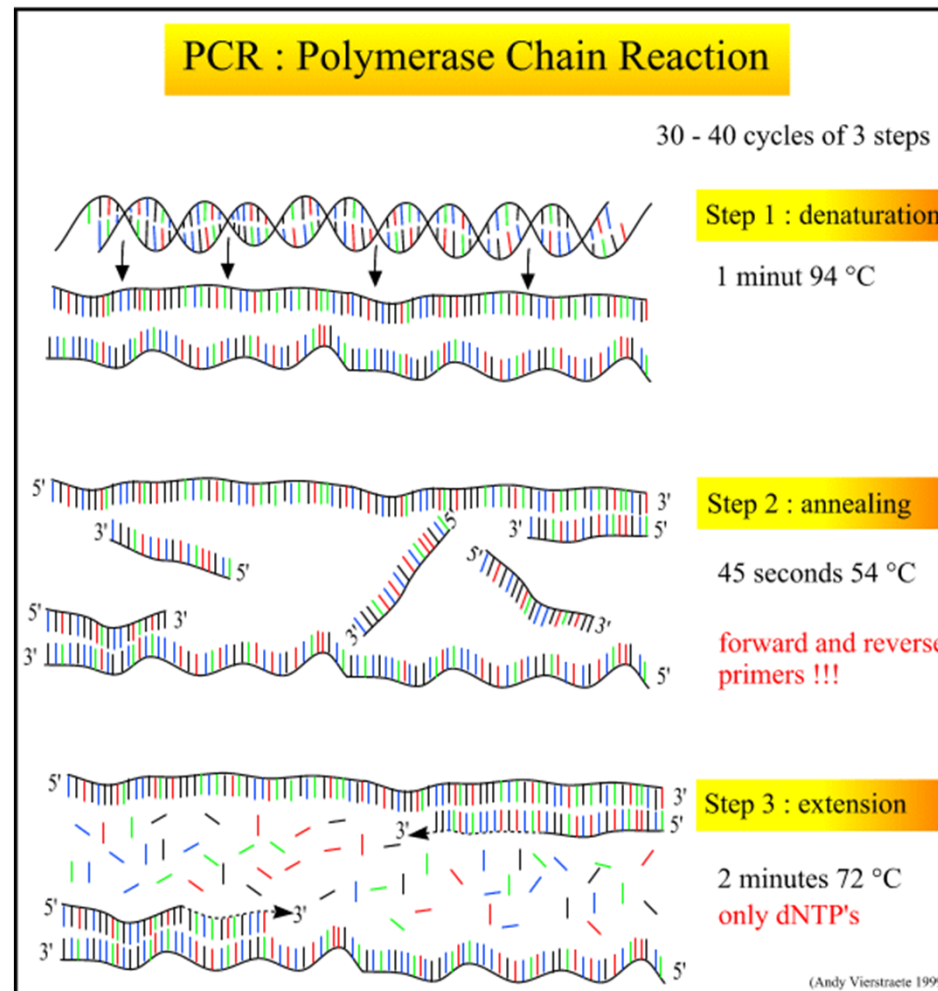
- Chẩn đoán bệnh di truyền.
- Chẩn đoán đột biến gen trong ung thư.
- Phát hiện khuyết đại gen.
- Theo dõi đáp ứng với thuốc điều trị.

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



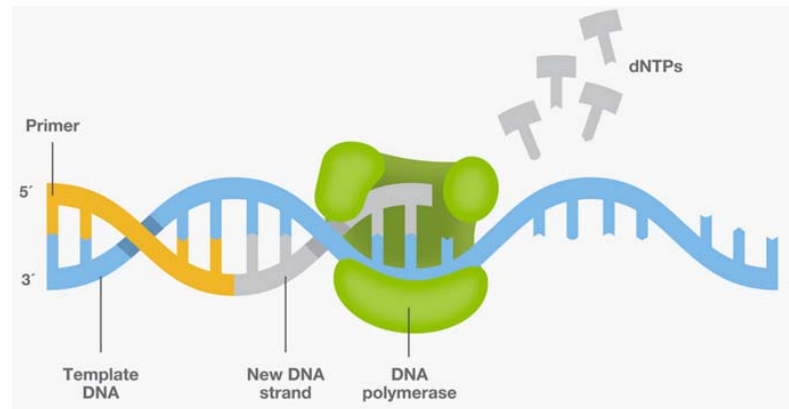
Source: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Kỹ thuật PCR (3)



DNA polymerase

- 1 thành phần thiết yếu trong phản ứng PCR với vai trò 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)

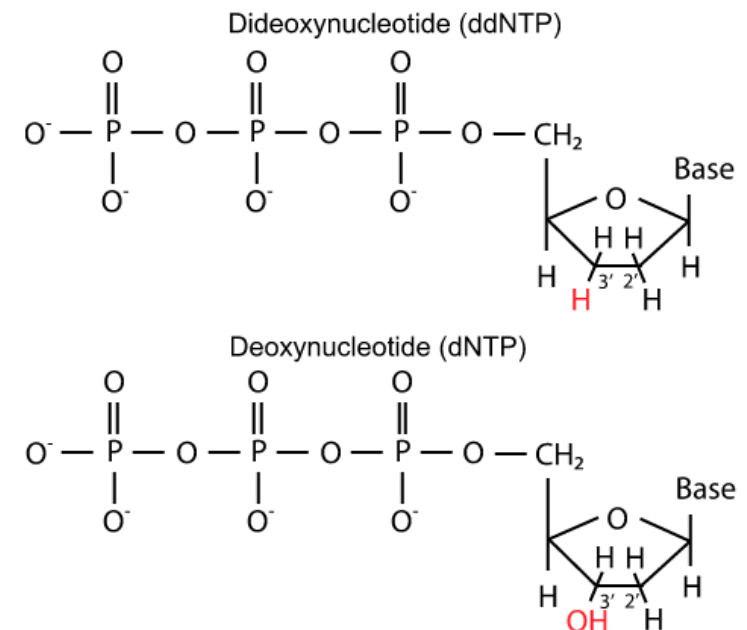
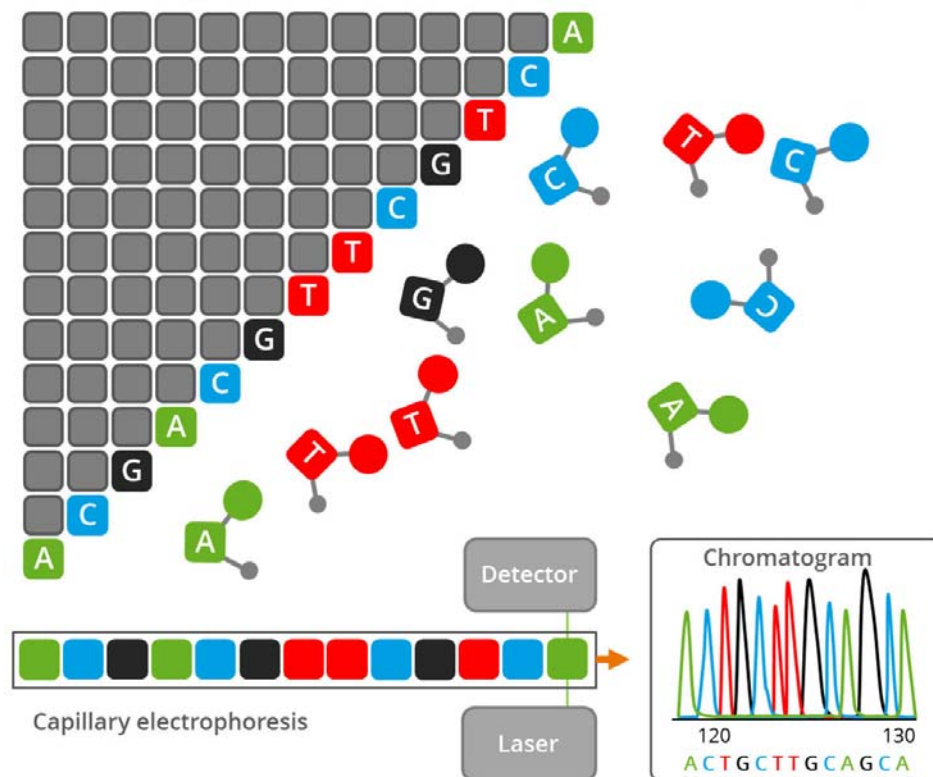
Nguyên lý kỹ thuật

- 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)



PCR containing fluorescent, chain-terminating dideoxynucleotide triphosphates



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