



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 Sanger vẫn là tiêu chuẩn vàng dù hiện nay có nhiều pp mới, rẻ hơn



# Kỹ thuật nhiễm sắc thể đồ (1)

## Chỉ định

lq, sex doubt, sản ut, tcgđ, hc nst dễ gây

- Chậm phát triển thể chất và / hoặc trí tuệ. LS thấy chậm phát triển mà nghĩ Turner thì làm (vì làm mới thấy), còn ko thì thôi ko ra đầu. làm mấy cái cao cấp hơn
- ◉ Mơ hồ giới tính 3 chỉ định rõ ràng nhất cho NSR đồ. Dễ làm, rẻ
- ◉ Sảy thai liên tiếp nhất là 3 tháng đầu
- ◉ Hiếm muộn – vô sinh hiếm muộn và vô sinh có bao la nguyên nhân, làm giải trình tự thì ko biết gen nào để giải
- 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 NST giống chữ X --> dễ thấy  
bằng Colchicine và làm phòng 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.

Lấy TB nuôi cấy 3 ngày, được kỳ giữa (60 - 70% TB đang ở kỳ giữa) --> cố định bằng colchicine  
Sau đó ngâm TB trong dd nhược trương để nước đi vào làm phòng tế bào --> cố định lại bằng ancol (gì gì nữa ko nghe)

đc coi là giải trình tự gene thời cổ đại (thời kỳ đồ đá :v)



# 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.

BẤT THƯỜNG LỚN

## Nhược điểm

- Cần thời gian để nuôi cấy tế bào. 3 ngày
- Cần thời gian để phân tích NST trong trường hợp thể khảm.
- Chỉ phát hiện bất thường cấu trúc NST  $\geq 10$  Mb.

vd 1 bà dốt con vô kiểm tra có bị down ko? muốn biết kếtqu ả phải sau 3 ngày

nếu đọc ra tất cả 46 NST thì dễ rồi, tự nhiên đâu ra 2 TB có 45 NST giống nhau --> phải đọc lên đến 50 - 100 TB

Bé 10 khó phát hiện



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

## Chỉ định

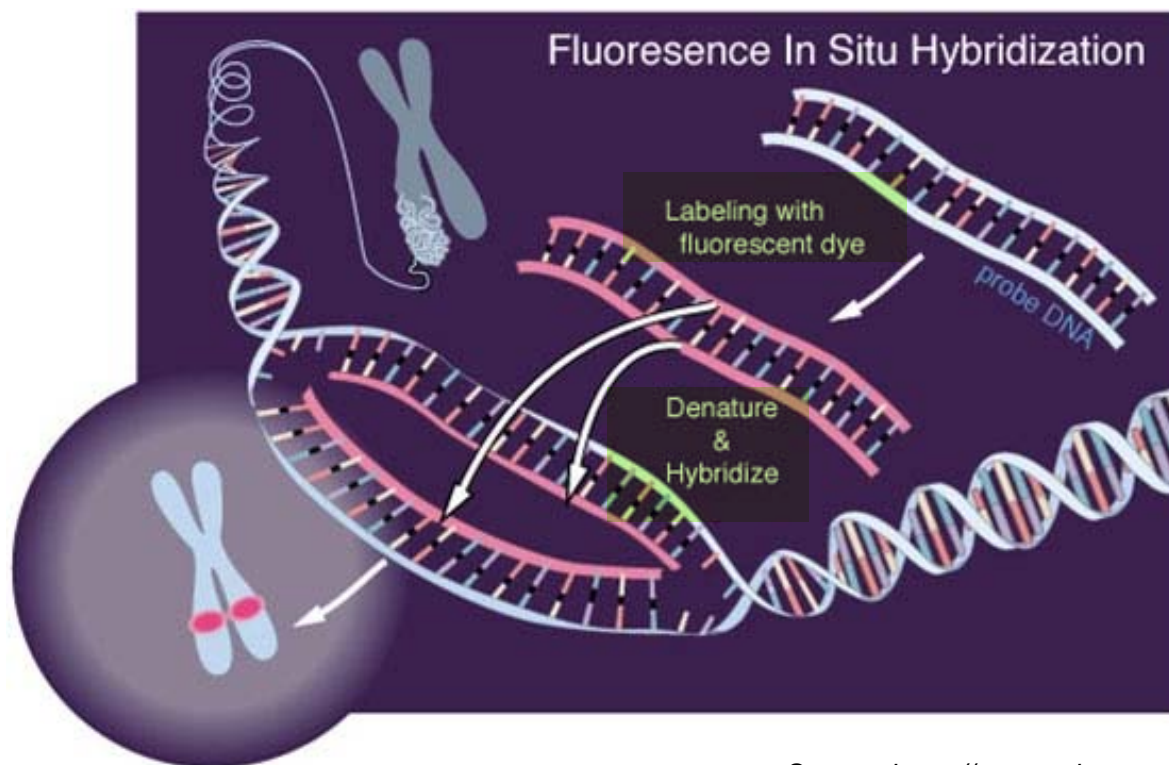
- Hội chứng **vi mất đoạn** (DiGeorge, Prader-Willi, Cri-du-chat, ...) **chỉ định nhiều nhất**
- Biểu hiện gen ung thư đặc trưng trong bệnh lý ác tính huyết học (Bcr-Abl trong CML), ung thư vú (Her-2 neu), ...  
Giúp cho chỉ định điều trị herceptin, FISH (+) + HER2 (2+) → CHỈ ĐỊNH ĐT  
**CML: NST philadelphia, đoạn mỗi NST số 9 vs số 22 màu xanh với đỏ, khi (+) là 2 thẳng chồng nhau --> ra màu vàng. (bt: 2 xanh 2 đỏ, CML: 1 xanh, 1 đỏ, 1 vàng)**
- Chẩn đoán nhanh trong chẩn đoán tiền sản 5 nst 13,18,21,X,Y sáng làm tối có  
**Cho kết quả trong ngày**
- Kiểm định các nghi ngờ bất thường cấu trúc của kết quả NST đồ

Ít làm, nghiên cứu mới làm  
PCR HUỖNH QUANG 4-5 CẶP MỖI ĐỘ CX CAO HƠN

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



## Nguyên lý kỹ thuật



Khi DNA nhân đôi, nó tháo xoắn tách đôi rồi bổ sung nu để tạo thành 2 đoạn DNA mới

Dùng đoạn mồi đánh dấu huỳnh quang --> 2 DNA mới có gắn đoạn mồi phát huỳnh quang

Bình thường mình sẽ thấy 2 chấm đỏ

Thấy có 1 chấm là mất đoạn rồi

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

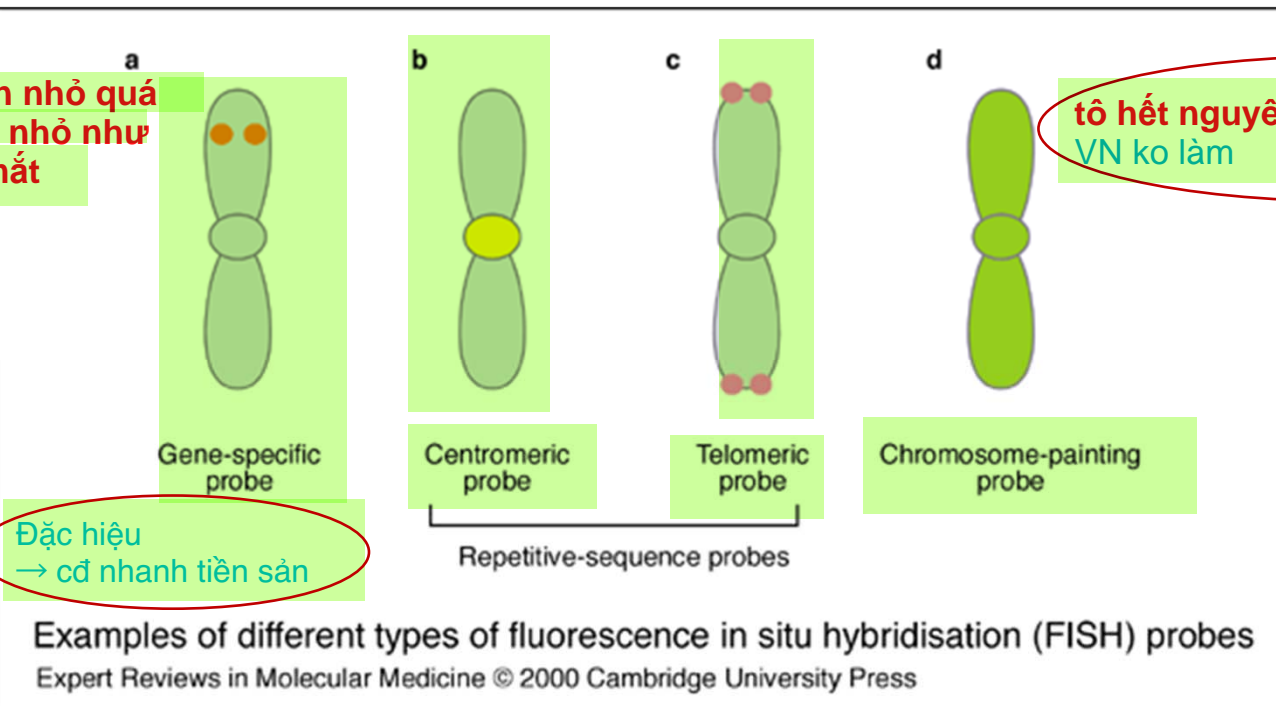
# Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) (3)



## Các loại đoạn dò (probes)

a: tốt, ko đắt.

Nhược điểm: 1 số gen nhỏ quá  
--> phát huỳnh quang nhỏ như  
đầu kim đọc lỗi con mắt



tô hết nguyên cái NST - nhà giàu  
VN ko làm

c: sàng lọc nhanh, có bất  
thường số lượng ko (bộ kit  
cho 23 NST)

b: hay dùng vì rẻ. Nhưng nó  
có thể lai nhầm NST



# 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).

giá tầm 1tr5 - 3tr5 (xài  
nhiều thì rẻ, hiếm chỗ làm  
thì đắt)

## 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)

liên quan đột biến gen



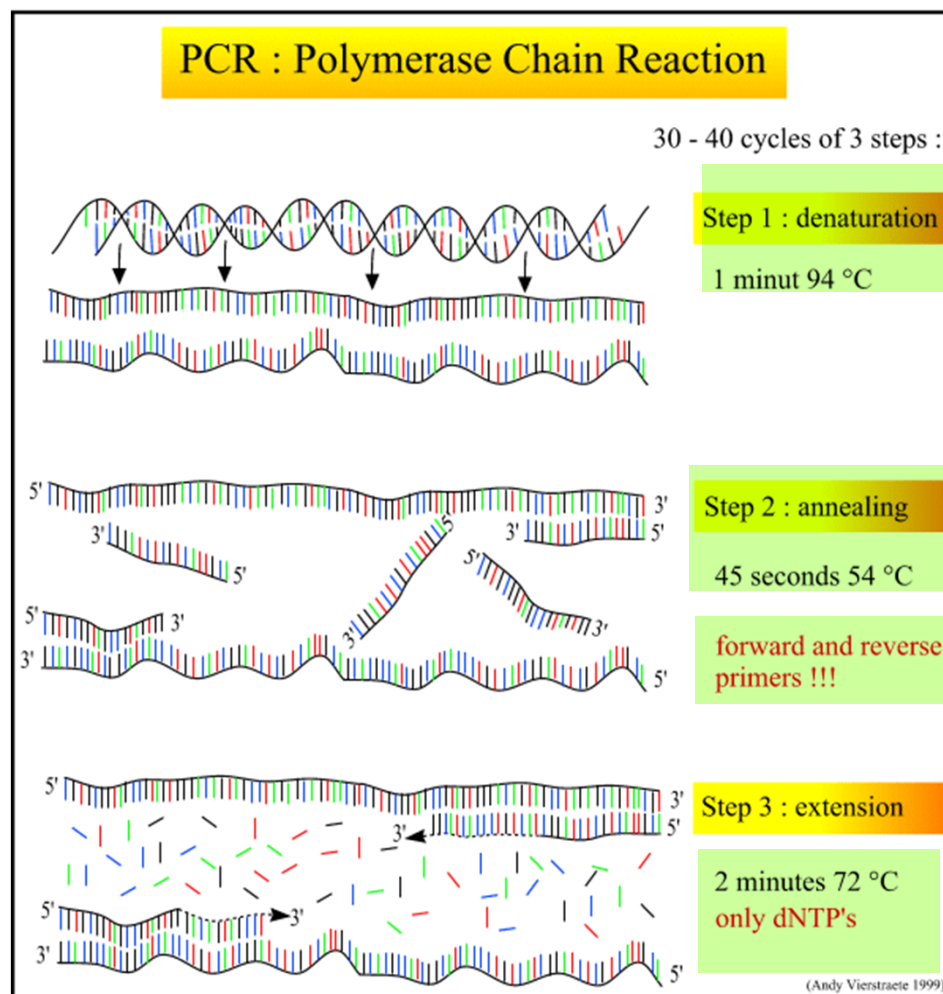
## Chỉ định

- Chẩn đoán bệnh di truyền.
- Chẩn đoán đột biến gen trong ung thư.
- Phát hiện khuếch đại gen.
- Theo dõi đáp ứng với thuốc điều trị. ung thư máu dùng theo dõi điều trị. coi gene bệnh có còn đó ko

# 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



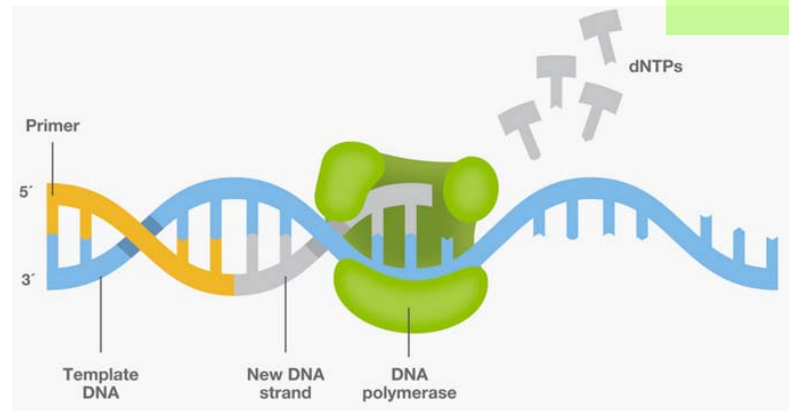
Source: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>



# Kỹ thuật PCR (3)

## DNA polymerase bung chuỗi kép

- 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. con vk này sống ở 72 độ, đó là lí do phản ứng đầu iên phải tăng nhiệt độ lên 90 độ



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



# Kỹ thuật PCR (4)

## Ưu điểm

- Độ nhạy & đặc hiệu cao
- Không yêu cầu thể tích mẫu lớn 1 ml máu là dư xài rồi
- Có thể thực hiện nhiều mẫu cùng lúc
- Thời gian trả kết quả ngắn 6h là có kết quả chạy prc tầm 1 - 2 tiếng thôi

## Nhược điểm

- Chi phí cao cho trang thiết bị và hóa chất hiện nay giá ko còn cao nữa
- Cần môi trường vô trùng để tránh nguy cơ nhiễm ADN từ mẫu khác.  
Không chạy cùng 1 chỗ vì lây nhiễm dna  
khác phòng, khác hood. Hood có áp suất âm và tia cực tím càng tốt  
DNA bay bay trong ko khí của mẫu trước--> rút vô  
--> khuếch tán, sai lệch



# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (1)

## Chỉ định

- Phát hiện các đột biến ADN trong ung thư, bệnh lý thần kinh.  
Ưu thế nhất
- 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).  
Chạy thế hệ mới không rõ bằng, rẻ hơn



# Kỹ thuật giải trình tự Sanger (2)

## Nguyên lý kỹ thuật

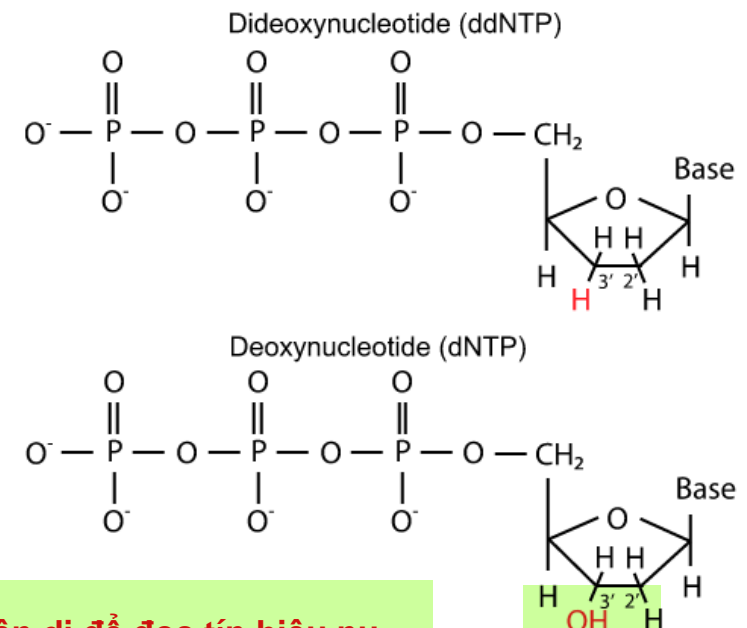
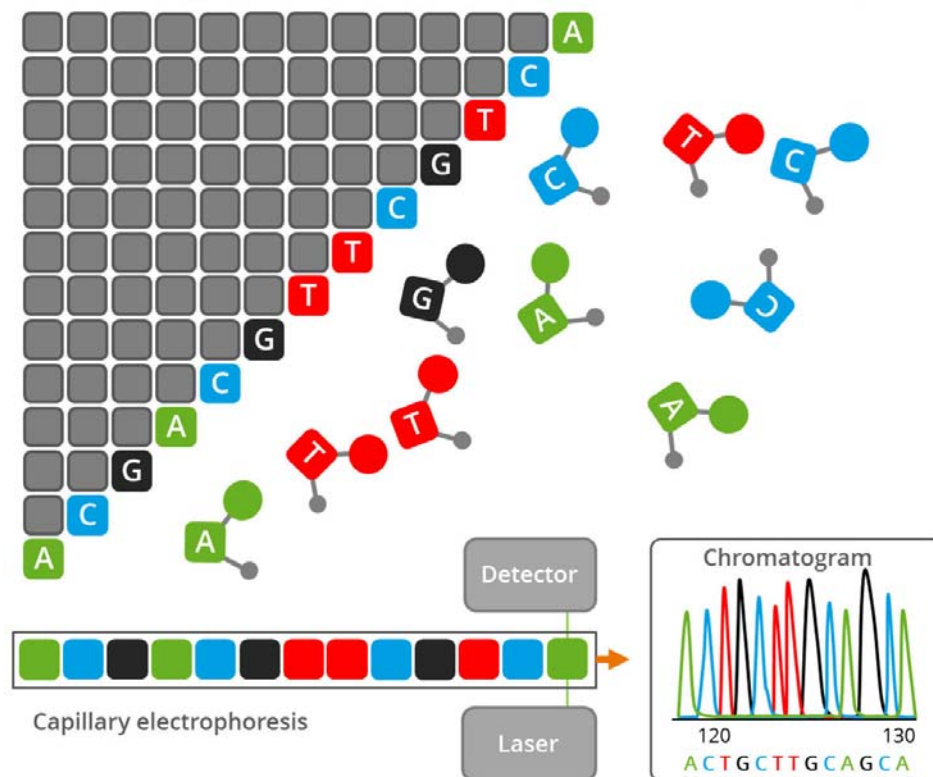
Nối dài bổ sung (kéo dài chuỗi bổ sung)

- 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  $\rightarrow$  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



chạy điện di để đọc tín hiệu nu

soi thứ tự từng nucleotid trong gen --> tiêu chuẩn vàng

Source: <https://www.gate-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

NGS làm những đoạn nhỏ  
<300 kB thôi

Bổ sung 2 slide: đọc kết quả giải trình tự phải biết kết quả có chấp nhận đc ko tùy vào:

- đường baseline: càng phẳng càng tốt (ít noise).

- chữ (N) trong chuỗi là do máy ko biết đọc gì (vs: khoảng trắng, 2 nu trùng nhau --> kiểm định lại)