

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN THU PHƯƠNG

**ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN GLOBIN
CỦA CÁC BỆNH NHÂN THALASSEMIA
TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2019

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN THU PHƯƠNG

**ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN GLOBIN
CỦA CÁC BỆNH NHÂN THALASSEMIA
TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG THÁI NGUYÊN**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh

Mã số: 8420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. BS. Bùi Thị Thu Hương

TS. Nguyễn Thị Kim Cúc

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới:

Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo, các thầy cô giáo Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Với tấm lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn TS Bùi Thị Thu Hương và TS Nguyễn Thị Kim Cúc đã tận tình truyền đạt cho tôi những kiến thức, kinh nghiệm quý báu, trực tiếp hướng dẫn khoa học và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các thầy cô trong Hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp đã đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám Hiệu Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên, Khoa Miễn dịch - Di truyền phân tử Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên, đã tạo điều kiện thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và thu thập số liệu cho luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp cùng gia đình đã luôn động viên và là chỗ dựa vững chắc về mọi mặt cho tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2019

Tác giả

Nguyễn Thu Phương

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (RNA thông tin)
NST	Nhiễm sắc thể
Cd	Codon
Kb	Kilo base
bp	Base pair
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
ddNTP	dideoxyribonucleoside triphosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
Hb	Hemoglobin
HC	Hồng cầu
MCV	Thể tích trung bình hồng cầu
MCH	Huyết sắc tố trung bình hồng cầu
MCHC	Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu
Nu	Nucleotid
WHO	Tổ chức y tế thế giới

MỤC LỤC

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI.....	1
2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI.....	2
3. NỘI DUNG THỰC HIỆN.....	2
3.1. Sàng lọc, phát hiện, phân loại bệnh nhân, thu thập mẫu máu tách chiết DNA.	2
3.2. Ứng dụng quy trình phát hiện đột biến gen globin.....	2
3.3. Phân tích đặc điểm đột biến gen gây bệnh Thalassemia tại Bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên.....	2
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Sơ lược về hemoglobin.....	3
1.1.1. Chuỗi globin thường.....	3
1.1.2. Các loại hemoglobin sinh lý.....	3
1.2. Khái niệm, phân loại bệnh thalassemia.....	4
1.3. Sinh lý bệnh thalassemia.....	5
1.4. Cơ chế di truyền.....	7
1.5. Bệnh học phân tử bệnh β -thalassemia.....	7
1.5.1. Gen globin và các đột biến.....	7
1.6. Một số kỹ thuật ứng dụng trong sinh học phân tử để phát hiện đột biến gen .	12
1.6.1. Phương pháp PCR cách đoạn (Gap-PCR).....	13
1.6.2. Kỹ thuật khuếch đại nhiều đoạn đầu dò phụ thuộc kết nối (Multiplex ligation dependent probe amplification – MLPA).....	13
1.6.3. Kỹ thuật dùng enzyme cắt giới hạn (Restriction endonuclease - RE)	14
1.6.4. Kỹ thuật khuếch đại alen đặc hiệu ARMS-PCR.....	14
1.6.5. Phương pháp lai ngược (Reverse Dot Blot).....	15
1.6.6. Kỹ thuật lai phân tử (Reversehybridization - kit Strip Assay).....	15
1.6.7. Kỹ thuật phân tích giải trình tự gen theo nguyên lý Sanger.....	16

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Đối tượng và bệnh phẩm nghiên cứu.....	18
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.3. Địa điểm thời gian nghiên cứu.....	18
2.4. Quy trình kỹ thuật nghiên cứu.....	18
2.4.1. Thu mẫu.....	18
2.4.2. Xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu và điện di huyết sắc tố.....	19
2.4.3. Tách chiết DNA.....	20
2.4.4. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của sản phẩm DNA.....	20
2.4.5. Thiết kế môi.....	21
2.4.6. Quy trình multiplex PCR xác định đột biến gen thalassemia.....	23
2.5. Phân tích số liệu.....	24
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu.....	24
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Kết quả tách chiết DNA.....	25
3.2. Kết quả quy trình multiplex-PCR.....	27
3.3. Đặc điểm đột biến gây bệnh Thalassemia tại Bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên.....	31
KẾT LUẬN, KIẾN NGHỊ	39
TÀI LIỆU THAM KHẢO	41

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Phân bố kiểu gen đột biến trên các bệnh nhân β - Thalassemia.....	31
Bảng 3.2. Đặc điểm phân bố alen đột biến trên các bệnh nhân.....	32
Bảng 3.3. Phân bố kiểu gen và giá trị trung bình các chỉ số huyết học.....	34
Bảng 3.4. Đặc điểm đột biến gen alpha thalassemia.....	35
Bảng 3.5. Phân bố kiểu gen và giá trị trung bình các chỉ số huyết học.....	38

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sinh tổng hợp globin ở các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi và thai.....	4
Hình 1.2. Hậu quả sản xuất dư thừa chuỗi α -thalassemia.....	6
Hình 1.3. Cơ chế di truyền trên nhiễm sắc thể thường.....	7
Hình 1.4. Cấu trúc gen β -globin.....	8
Hình 1.5. Cấu trúc gen α -globin.....	10
Hình 2.1. Sơ đồ sàng lọc, chẩn đoán đột biến gen thalassemia.....	19
Hình 2.2. Vị trí primer xác định đột biến trên alpha globin gen.....	23
Hình 3.1. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của một mẫu sản phẩm DNA.....	25
Hình 3.2. Hình ảnh điện di DNA tổng số tách chiết từ máu ngoại vi của các đối tượng nghiên cứu.....	26
Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm multiplex PCR (quy trình beta 1).....	28
Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm multiplex PCR (quy trình beta 2).....	28
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm multiplex PCR (quy trình alpha).....	29

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Thalassemia là tên một loại bệnh thiếu máu do di truyền. Nguyên nhân do các đột biến trên gen globin làm giảm hoặc mất khả năng tổng hợp chuỗi globin trong phân tử hemoglobin. Tùy theo sự thiếu hụt khả năng tổng hợp chuỗi globin mà bệnh thalassemia chia thành các loại khác nhau nhưng 2 loại phổ biến nhất là α -thalassemia, β -thalassemia.

Hiện nay, có khoảng hơn 500 đột biến liên quan đến thalassemia đã được báo cáo trên toàn thế giới. Tại Việt Nam, theo nhiều nghiên cứu tần số alen người Việt Nam cho thấy có 8 loại đột biến chính gây bệnh β -thalassemia là Cd41/42(-TCTT), Cd71/72(+A), CD17, IVS1-1(G>T), IVS1-5(G>C), -28(A-G), IVS2-654(C>T) và Cd26(GAG>AAG) [3]. Với alpha thalassemia con số này là đột biến xoá đoạn lớn kiểu SEA, THAI; đột biến xoá đoạn nhỏ là alpha 3.7 và alpha 4.2; đột biến điểm là HbCS và HbQS.

Việc chẩn đoán thalassemia trước đây dựa chủ yếu vào triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm sinh hoá huyết học. Tuy nhiên, các chẩn đoán này chỉ giúp sàng lọc và xác định một số thể thalassemia nhất định. Với đối tượng người lành mang gen hoặc thai nhi (trong chẩn đoán trước sinh) thì các phương pháp này không thể xác định được thể bệnh. Ngày nay, với sự tiến bộ vượt bậc của khoa học biệt là khoa học ứng dụng trong y học đã giúp các nhà nghiên cứu chẩn đoán được bệnh thalassemia ở cấp độ phân tử, phát hiện chính xác sự có mặt của các loại đột biến gây bệnh, mở ra sự hỗ trợ rất lớn cho công tác chẩn đoán trước sinh và tư vấn di truyền phòng bệnh thalassemia. Ở nước ta các kỹ thuật giúp cho sự chẩn đoán đột biến gen đang được nghiên cứu và đạt được một số thành tựu nhất định. Tuy nhiên, phần lớn các dịch vụ chẩn đoán tập trung ở các Viện, bệnh viện tuyến Trung ương trong khi bệnh nhân thalassemia chủ yếu tập trung ở đồng bào dân tộc ít người khu vực vùng cao miền núi. Khả

năng tiếp cận của nhóm người này tới tuyến Trung ương là rất hạn chế. Mặt khác thalassemia là bệnh rất đặc trưng cho vùng miền tương ứng với các nhóm chủng tộc. Do đó khi triển khai dịch vụ chẩn đoán đột biến gen thalassemia, người ta phải thực hiện các nghiên cứu cơ bản để xác định loại đột biến và tần số allel nhằm thiết lập labo một cách chuẩn xác và tối ưu nhất.

Bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên là bệnh viện tuyến Trung Ương duy nhất của 6 tỉnh miền núi Đông Bắc, khu vực mà tập trung hầu hết nhóm dân tộc ít người có dân số đông nhất cả nước. Tỷ lệ người mang gen thalassemia ở khu vực này được báo cáo là rất cao 10-30%. Hàng năm, bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên cũng tiếp nhận 300-500 lượt bệnh nhân thalassemia thể nặng vào truyền máu thải sắt. Nhu cầu dự phòng bệnh thalassemia cho khu vực là rất cấp thiết. Để đáp ứng nhu cầu đó, bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên đã thành lập khoa Miễn Dịch - Di truyền phân tử nhằm cung cấp các dịch vụ sàng lọc và chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia cũng như các bệnh di truyền khác. Để đánh giá kết quả bước đầu áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong sàng lọc đột biến gen gây bệnh thalassemia nhóm nghiên cứu tiến hành đề tài nghiên cứu ***“Đặc điểm đột biến gen globin của các bệnh nhân thalassemia tại bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên”***.

2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Ứng dụng kỹ thuật Multiplex -PCR trong sàng lọc và xác định một số đột biến phổ biến gây bệnh thalassemia.

3. NỘI DUNG THỰC HIỆN

3.1. Sàng lọc, phát hiện, phân loại bệnh nhân, thu thập mẫu máu tách chiết DNA.

3.2. Ứng dụng quy trình phát hiện đột biến gen globin.

3.3. Phân tích đặc điểm đột biến gen gây bệnh Thalassemia tại Bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên