

## XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN MẤT ĐOẠN GEN DYSTROPHIN Ở MỨC ĐỘ mRNA

Nguyễn Thị Bằng Suong\*, Trần Văn Khánh\*\*, Nguyễn Thị Hà\*\*\*, Tạ Thành Văn\*\*

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là bệnh lý cơ do di truyền thường gặp nhất. Đây là bệnh di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, gây nên bởi đột biến gen dystrophin. Dạng đột biến thường gặp nhất là đột biến mất đoạn, sau đó là đột biến điểm và đột biến lặp đoạn.

**Mục tiêu:** sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện đột biến gen dystrophin.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 25 bệnh nhân được chẩn đoán là DMD dựa vào triệu chứng lâm sàng, CK máu tăng cao. Sử dụng kỹ thuật tách chiết RNA, Nested-PCR.

**Kết quả:** Phát hiện được 13 bệnh nhân (chiếm 52%) có đột biến xóa đoạn gen.

**Kết luận:** Việc xác định được đột biến ở bệnh nhân có ý nghĩa quan trọng, từ đó giúp xác định người mẹ dị hợp tử để tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh nhằm làm giảm tỷ lệ mắc bệnh DMD. Phương pháp chẩn đoán đột biến ở mức độ mRNA này giúp tiết kiệm thời gian và kinh phí hơn so với chẩn đoán đột biến ở mức độ DNA.

### SUMMARY

#### SCREENING OF DELETION MUTATION IN THE DYSTROPHIN GENE AT THE mRNA LEVEL

Nguyen Thi Bang Suong, Tran Van Khanh, Nguyen Thi Ha, Ta Thanh Van

\* Y Học TP. Hồ Chí Minh \* Vol. 13 – Supplement of No 2 - 2009: 98 - 104

**Background:** Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common hereditary muscular disease. This is a recessive X-linked disease caused by a mutation in the dystrophin gene. The most frequent type of mutation in the dystrophin gene is deletion, followed by point and duplication mutation.

**Object:** The detection of a mutation in a patient and in a female carrier of mutation in dystrophin gene plays an important role in prenatal diagnosis as well as in genetic counseling in order to reduce the incidence of the DMD.

**Materials and methods:** In the present study we used 15 pairs of primers to amplify the whole length of the cDNA, comprising 79 exons of the dystrophin gene.

**Results:** We successfully detected 13 individuals with deletion mutation out of 25 DMD patients tested (52%).

**Conclusion:** This method of screening of deletion mutation in the dystrophin gene at the mRNA level showed to be helpful in saving time and reducing expense in comparison to the method of screening of deletion mutation in the dystrophin gene at the DNA level.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy-DMD) là bệnh di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, gây nên bởi đột biến gen dystrophin. Tần suất bệnh vào khoảng 1/3500 trẻ trai sinh sống. Dạng đột biến mất đoạn gen dystrophin là phổ biến nhất,

chiếm tỉ lệ 60-65% bệnh nhân DMD. Đột biến điểm chiếm 20-30% và đột biến lặp đoạn, khoảng 10-15%. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy, đột biến mất đoạn gen thường tập trung vào hai vùng trọng điểm (hot spot): vùng trung tâm ở giữa gen (exon 43- 60) và vùng tận cùng 5' (exon 1-19)<sup>(2,4,8)</sup>. Đã có nhiều nghiên cứu

\* Bộ môn Hoá sinh, Đại học Y Huế; \*\* Labo Trung tâm Y sinh học, Đại học Y Hà Nội;

\*\*\*Bộ môn Hoá sinh, Đại học Y Hà Nội

đột biến gen dystrophin ở các bệnh nhân DMD, tuy nhiên ở Việt Nam cũng như các nước đang phát triển, các nghiên cứu thường tập trung xác định dạng đột biến mất đoạn gen ở mức độ DNA, và thường chỉ ưu tiên xác định đột biến trong 2 vùng trọng điểm<sup>(3,7)</sup>. Trong khi đó đột biến gen dystrophin có thể rải rác khắp 79 exon, do vậy các nghiên cứu trên thường bỏ sót đột biến ở những exon khác và cả đột biến xảy ra trong quá trình hoàn thiện các tiền mRNA.

Muốn xác định đột biến xảy ra ở gen dystrophin bằng phản ứng PCR ở mức độ DNA, chúng ta phải khuếch đại toàn bộ chiều dài của gen, tuy nhiên vì đột biến ở các đoạn không mã hóa intron đóng vai trò không quan trọng trong quá trình tổng hợp protein dystrophin nên thường người ta chỉ khuếch đại 79 exon để xác định đột biến. Trên phân tử DNA, các exon lại nằm xen kẽ với các intron có kích thước quá lớn nên thông thường, để khuếch đại 79 exon ở mức độ DNA người ta phải thiết kế 79 cặp mồi bắt cặp đặc hiệu ở hai đầu mỗi exon. Điều này gây tốn kém cả về tài chính lẫn thời gian. Trong khi đó ở cấu trúc của mRNA, 79 exon nằm liên tục nhau, không bị xen kẽ với các intron nên muốn khuếch đại toàn bộ chiều dài đoạn mRNA chứa 79 exon này, người ta chỉ cần dùng 15 cặp mồi đặc hiệu đã có thể khuếch đại được cả chiều dài đoạn gen dystrophin<sup>(6)</sup>.

Xuất phát từ thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: *Xác định đột biến mất đoạn gen dystrophin ở mức độ mRNA.*

## ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng nghiên cứu

*Nhóm chứng:* Gồm 10 người nam bình thường, tiền sử gia đình không có ai mắc bệnh di truyền.

*Nhóm nghiên cứu:* gồm 25 bệnh nhân được chẩn đoán là DMD dựa vào các triệu chứng lâm sàng điển hình và enzym CK tăng rất cao.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Kỹ thuật tách chiết RNA tổng số từ 10 ml máu ngoại vi

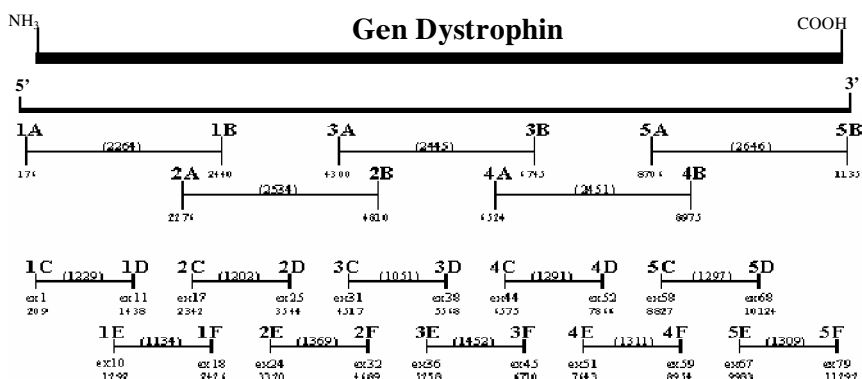
Máu tươi được chống đông bằng heparin, được tách trong vòng 24 giờ. Quy trình tách chiết RNA được tiến hành theo Qiagen Kit. Đo nồng độ và độ tinh sạch của RNA tổng số, những mẫu có giá trị tỷ lệ về mật độ quang đo ở bước sóng 260/280 đạt  $\geq 1,8$  mới được sử dụng để tổng hợp cDNA.

#### Quy trình RT-PCR tổng hợp cDNA

Sử dụng phương pháp MMLV-RT để tổng hợp cDNA với ba giai đoạn: biến tính RNA ở nhiệt độ 65°C, giai đoạn gắn mồi ở 25°C và giai đoạn tổng hợp phân tử cDNA. Chu trình nhiệt của giai đoạn tổng hợp cDNA như sau: 37°C trong 55 phút, 70°C trong 15 phút và bảo quản tạm thời ở 4°C.

#### Phản ứng nested-PCR xác định đột biến

Phản ứng nested - PCR được ứng dụng sử dụng 15 cặp mồi khác nhau để **khuếch đại toàn bộ chiều dài gen Dystrophin** nhằm xác định đột biến ở mức độ mRNA.



**Hình 1:** Sơ đồ của phản ứng nested PCR sử dụng 15 cặp mồi khác nhau để khuếch đại toàn bộ chiều dài gen Dystrophin

Phản ứng PCR lần 1: Sử dụng 5 cặp mồi cho phản ứng PCR lần 1 là 1A- 1B, 2A- 2B, 3A- 3B, 4A- 4B và 5A- 5B. Mỗi phản ứng PCR có thể tích là 20µl chứa các thành phần: 20ng cDNA, 50ng mỗi primer, 200µmol/L dNTPs, 2 đơn vị enzym Taq polymerase và 2µL GeneAmp 10xBuffer. Chu trình nhiệt của phản ứng: Giai đoạn biến tính ở 96°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm biến tính ở 96°C trong 1 phút; gắn mồi ở 60°C trong 1 phút và bước kéo dài 72°C trong 3 phút, cuối cùng là giai đoạn hoàn chỉnh ở 72°C trong 5 phút.

Phản ứng PCR lần 2: Sử dụng 10 cặp mồi là 1CD và 1EF, 2CD, 2EF, 3CD, 3EF, 4CD, 4EF, 5CD và 5EF. Chu trình nhiệt tương tự như phản ứng lần 1.

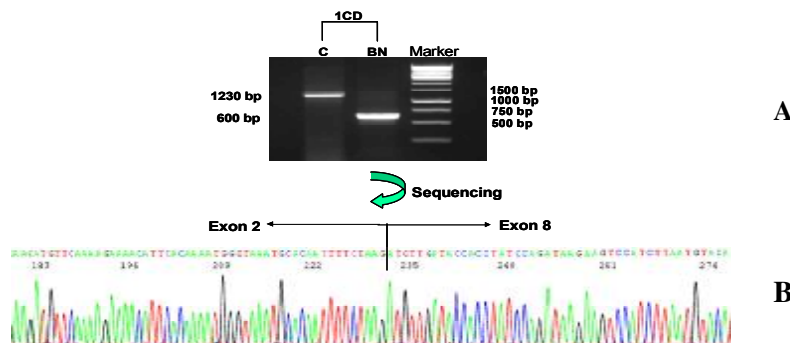
Nhân dòng gen (cloning): Sản phẩm PCR lần 2 sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% và xác định có đột biến mất đoạn gen sẽ được đưa vào vector tách dòng. Sau đó vector mang đoạn gen cần tách dòng được biến nạp vào tế bào *E.coli* để chọn lọc và tạo dòng. Tiến hành tách chiết DNA plasmid và giải trình tự đoạn gen đột biến này của bệnh nhân.

**Kết quả**

**Kết quả xác định đột biến gen ở mức độ mRNA**

**Kết quả các bệnh nhân có đột biến mất đoạn gen dystrophin**

Kết quả nghiên cứu của bệnh nhân mã số 3

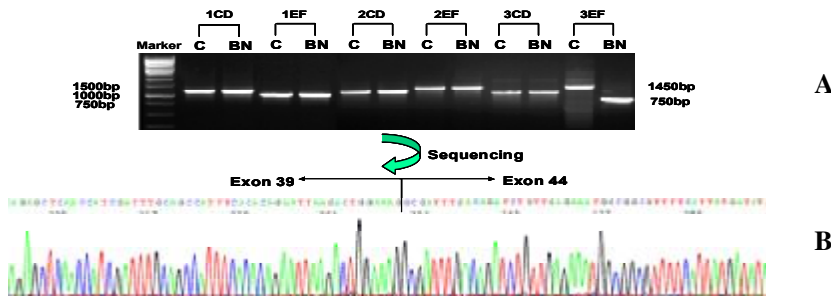


**Hình 1:** (A). Sản phẩm khuếch đại cDNA của mẫu đối chứng (C) và bệnh nhân (BN), Sử dụng cặp mồi 1A – 1B cho lần 1 và 1C – 1D cho phản ứng lần 2. (B). Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân

Nhận xét: Cặp mồi 1C (mồi xuôi) và 1D (mồi ngược) cho phép khuếch đại đoạn gen dystrophin từ exon 1 đến exon 11. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy vạch DNA của bệnh nhân có kích thước nhỏ hơn so với mẫu đối chứng (600bp so với 1230bp), chứng tỏ bệnh

nhân có đột biến mất đoạn gen nằm trong khoảng exon 1-11. Giải trình tự đoạn gen này của bệnh nhân chúng ta thấy đầu 3' của exon 2 (TCTAAG) gắn trực tiếp với đầu 5' của exon 8 (ATGTTG) và exon từ 3 đến 7 của bệnh nhân đã bị xóa đoạn hoàn toàn.

Kết quả nghiên cứu của bệnh nhân mã số 6

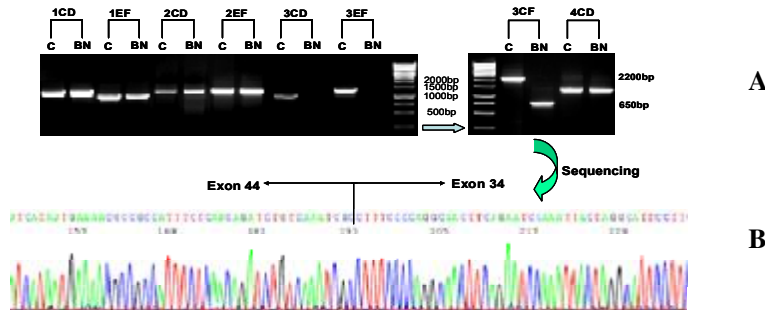


**Hình 2:** (A). Sản phẩm khuếch đại cDNA của mẫu đối chứng (C) và bệnh nhân (BN). (B). Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân, môi cho phản ứng PCR là 3E (mỗi xuôi)

Nhận xét: Tiến hành phản ứng PCR với cặp môi 3E - 3F (cho phép khuếch đại đoạn gen dystrophin từ exon 36 đến 45), đoạn DNA thu được của bệnh nhân có kích thước nhỏ hơn so

với mẫu đối chứng (750bp so với 1450bp). Kết quả giải trình tự cho thấy đầu 3' của exon 39 nối trực tiếp với đầu 5' của exon 44.

Kết quả nghiên cứu của bệnh nhân mã số 15



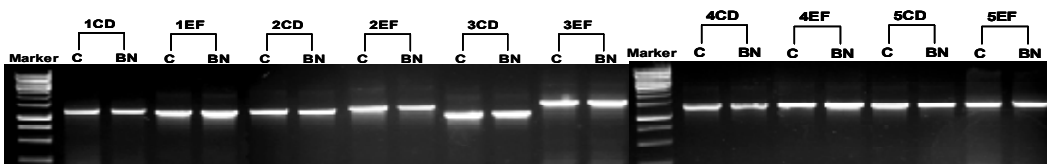
**Hình 3:** (A). Sản phẩm khuếch đại cDNA của mẫu đối chứng (C) và bệnh nhân (BN). (B). Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân, môi cho phản ứng PCR là 3F (mỗi ngược).

Nhận xét: Sản phẩm khuếch đại cDNA bằng cặp môi 3C - 3F (khuếch đại vùng exon 31 đến exon 45) của bệnh nhân có kích thước 650 bp, trong khi đó đoạn DNA của mẫu đối chứng có kích thước là 2200bp. Như vậy, bệnh nhân có

đột biến mất đoạn gen trong khoảng exon 31 đến 45. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân cho thấy exon từ 35 đến 43 của gen dystrophin đã bị xóa đoạn hoàn toàn.

Kết quả điện di của các bệnh nhân không có đột biến mất đoạn gen

Kết quả phân tích của bệnh nhân mã số 4



**Hình 4:** Sản phẩm khuếch đại cDNA của mẫu đối chứng (C) và bệnh nhân (BN) không bị đột biến mất đoạn.

Nhận xét: Sử dụng 10 cặp môi đặc trưng cho phản ứng Nested - PCR lần 2 để khuếch đại

toàn bộ chiều dài gen dystrophin của bệnh nhân và mẫu đối chứng, kết quả điện di cho thấy kích

thước DNA thu được sau mỗi phản ứng của bệnh nhân và mẫu chứng luôn bằng nhau, chứng tỏ bệnh nhân không có đột biến mất đoạn gen.

**Kết quả về tỷ lệ bệnh nhân bị đột biến mất đoạn gen dystrophin**

*Bảng 1. Tỷ lệ đột biến xóa đoạn trên gen Dystrophin*

Kết quả	Số lượng BN	Tỷ lệ %
Có đột biến mất đoạn	13	52
Không tìm thấy đột biến mất đoạn	12	48
Tổng số	25	100

*Nhận xét:* Có 13 bệnh nhân được phát hiện có đột biến mất đoạn gen dystrophin (chiếm tỷ lệ 52%) và 12 bệnh nhân không có đột biến mất đoạn (chiếm tỷ lệ 48%).

**BÀN LUẬN**

Phản ứng Nested- PCR giúp làm tăng chất lượng và độ đặc hiệu cho phản ứng PCR. Với 15 cặp mồi được thiết kế hợp lý chúng tôi đã khuếch đại được toàn bộ chiều dài đoạn cDNA của gen dystrophin chứa 79 exon.

Ở bệnh nhân mã số 3, sau khi phân tử cDNA được khuếch đại lần 1 với cặp mồi 1AB, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR lần 2 với cặp mồi 1CD, cặp mồi này cho phép khuếch đại đoạn gen dystrophin từ exon 1 đến exon 11. Kết quả cho thấy phân tử DNA thu được của mẫu đối chứng có kích thước khoảng 1230bp, kích thước này đúng bằng kích thước đoạn gen dystrophin được khuếch đại bởi cặp mồi 1CD theo lý thuyết (hình 2.1). Trong khi đó ở bệnh nhân, hình ảnh điện di trên agarose cho thấy đoạn DNA được khuếch đại bởi cặp mồi 1CD chỉ có kích thước 600bp. Theo nghiên cứu của Trần Văn Khánh (2005), khi khuếch đại một đoạn gen từ khuôn mẫu là cDNA, nếu sản phẩm thu được từ mẫu nghiên cứu của bệnh nhân có kích thước nhỏ hơn so với mẫu đối chứng thì bệnh nhân có đột biến xóa đoạn gen, đột biến này làm cho đoạn gen bị ngắn đi, do vậy khi điện di trên agarose, vạch của sản phẩm khuếch đại ở bệnh nhân này sẽ di chuyển xa hơn so với vạch sản

phẩm khuếch đại từ mẫu đối chứng không có đột biến gen<sup>(6)</sup>. Như vậy, chúng ta có thể khẳng định: bệnh nhân mã số 3 này đã bị đột biến mất đi 1 đoạn gen kích thước khoảng 630bp nằm trong khoảng exon 1 đến exon 11. Tuy nhiên chỉ với hình ảnh điện di trên agarose chúng ta không thể biết chính xác exon nào bị đột biến nên chúng tôi đã tiến hành giải trình tự đoạn gen này của bệnh nhân và phát hiện rằng, đầu 3' của exon 2 (TCTAAG) gắn trực tiếp với đầu 5' của exon 8 (ATGTTG) (hình 3.1) và đoạn exon từ 3 đến 7 của bệnh nhân (có kích thước khoảng 630 bp) đã bị xóa đoạn hoàn toàn. Như vậy có thể kết luận rằng bệnh nhân mã số 3 đã bị đột biến mất đoạn gen từ exon 3 đến exon 7, đột biến này làm lệch khung dịch mã trong quá trình tổng hợp protein dystrophin và gây bệnh DMD ở bệnh nhân.

Với bệnh nhân mã số 6, phản ứng Nested-PCR lần thứ nhất chúng tôi sử dụng cặp mồi 1AB cho phản ứng PCR lần 1 và 2 phản ứng PCR lần 2 với 2 cặp mồi 1CD và 1EF. Kết quả điện di cho thấy đoạn DNA thu được của mẫu đối chứng và của bệnh nhân có kích thước bằng nhau. Chứng tỏ bệnh nhân không bị đột biến mất đoạn trong vùng gen được khuếch đại bởi hai cặp mồi 1CD và 1EF. Tiến hành các phản ứng Nested- PCR tiếp theo với mồi cho phản ứng PCR lần 2 lần lượt là 2CD, 2EF, 3CD và 3EF. Kết quả cho thấy rằng, với các cặp mồi 2CD, 2EF, 3CD thì sản phẩm PCR thu được của bệnh nhân có kích thước bằng với đoạn DNA của mẫu đối chứng. Nhưng với cặp mồi 3EF, cho phép khuếch đại đoạn gen dystrophin từ exon 36 đến exon 45, sản phẩm PCR thu được của bệnh nhân có kích thước nhỏ hơn so với mẫu đối chứng (750bp so với 1450bp). Như vậy, chắc chắn bệnh nhân đã bị đột biến mất đoạn gen nằm trong khoảng exon 36 đến 45. Kết quả giải trình tự gen cho thấy đầu 3' của exon 39 (GGAAAG) nối trực tiếp với đầu 5' của exon 44 (GCGATT) và chúng ta khẳng định bệnh nhân đã bị đột biến mất đoạn từ exon 40 đến exon 43.

Chỉ với 9 phản ứng PCR gồm 3 phản ứng lần 1 và 6 phản ứng PCR lần 2 chúng tôi đã phát hiện được bệnh nhân mã số 6 có đột biến mất đoạn gen dystrophin. Trong khi đó, nếu phát hiện đột biến mất đoạn gen dystrophin của bệnh nhân ở mức độ DNA thì chúng ta phải khuyếch đại dần dần từng exon, bắt đầu từ vị trí exon thứ nhất. Để phát hiện được đoạn exon 40 - 43 bị mất đi ở bệnh nhân, nếu tiến hành phản ứng với từng cặp mồi riêng lẻ, chúng tôi phải sử dụng ít nhất 44 cặp mồi tương ứng với 44 phản ứng PCR để khuyếch đại từng exon từ 1 đến 44, cùng với điện di trên agarose 44 lần để xác định vạch DNA tương ứng có xuất hiện hay không, quá trình được tiến hành song song với 44 lần của mẫu đối chứng. Điều này gây tốn kém nhiều về thời gian và kinh phí. Như vậy, chúng ta có thể khẳng định được ưu điểm của việc xác định đột biến xóa đoạn ở mức độ mRNA so với mức độ DNA.

Sử dụng phương pháp khuyếch đại cDNA tương tự với bệnh nhân mã số 15, khi tiến hành phản ứng Nested- PCR lần thứ 3 với cặp mồi 3AB cho PCR lần 1 và phản ứng PCR lần 2 với 2 cặp mồi 3CD, 3EF. Kết quả cho thấy, ở mẫu đối chứng xuất hiện vạch đúng với kích thước đoạn DNA mà 2 cặp mồi này khuyếch đại được ở người bình thường không có đột biến mất đoạn gen dystrophin (khoảng 1050bp đối với cặp mồi 3CD và 1450bp đối với cặp mồi 3EF). Trong khi đó ở bệnh nhân không xuất hiện vạch khi điện di. Nguyên nhân được nghĩ đến là do vị trí gắn mồi của các cặp mồi đã bị đột biến. Trên cơ sở sẵn có sản phẩm PCR lần 1 của cặp mồi 3AB, chúng tôi tiến hành phản ứng lần 2 với cặp mồi 3C - 3F (khuyếch đại đoạn gen từ exon 31 đến 45), sau đó điện di sản phẩm PCR. Đoạn DNA của mẫu đối chứng có kích thước khoảng 2200bp, trong khi đó đoạn DNA thu được của bệnh nhân chỉ có kích thước khoảng 650bp. Tiến hành giải trình tự đoạn gen này của bệnh nhân chúng tôi nhận thấy đoạn gen dystrophin từ exon 35 đến exon 43 của bệnh nhân bị xóa đoạn hoàn toàn. Trong bảng thiết kế các cặp mồi cho nghiên cứu này (hình 2.1) chúng ta thấy vị trí

gắn mồi của mồi 3D (mồi ngược) là đầu 3' của exon 38, còn vị trí gắn mồi của 3E (mồi xuôi) là đầu 5' của exon 36. Bệnh nhân này bị đột biến mất đoạn từ exon 35 đến exon 43, có nghĩa là hai mồi 3D và 3E không còn vị trí để gắn vào. Bởi vậy, khi chúng ta sử dụng 2 cặp mồi 3CD và 3EF để khuyếch đại đoạn gen dystrophin của bệnh nhân thì không tồn tại sản phẩm đặc hiệu của hai cặp mồi này, do vậy không xuất hiện vạch khi điện di trên agarose.

Phân tích hình ảnh điện di agarose của bệnh nhân không có đột biến mất đoạn (mã số 4), chúng tôi đã sử dụng 5 cặp mồi cho phản ứng PCR lần 1 và 10 cặp mồi cho 10 phản ứng PCR lần 2 và đã khuyếch đại toàn bộ chiều dài gen dystrophin của bệnh nhân và mẫu đối chứng. Kết quả điện di agarose cho thấy rằng sản phẩm DNA thu được sau mỗi phản ứng của bệnh nhân và mẫu đối chứng luôn có kích thước bằng nhau (hình 4). Chúng tôi chứng tỏ rằng bệnh nhân này không có đột biến mất đoạn gen dystrophin.

Tiến hành các phản ứng tương tự để xác định đột biến mất đoạn gen ở các bệnh nhân khác, kết quả có tất cả 13 bệnh nhân được xác định có đột biến mất đoạn gen (chiếm tỷ lệ 52%), còn 12 bệnh nhân (chiếm tỷ lệ 48%) không tìm thấy đột biến mất đoạn. Kết quả này có thể được chấp nhận vì theo Prior (2005) và Foster (2006) ngoài đột biến mất đoạn gen, một số bệnh nhân DMD còn bị đột biến điểm hoặc đột biến lặp đoạn, các đột biến này rất khó phát hiện và đòi hỏi những kỹ thuật cao, rất tốn kém<sup>(1,5)</sup>. Ở Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh DMD, nghiên cứu của Nguyễn Thị Trang phát hiện được 30 - 38% bệnh nhân DMD có đột biến mất đoạn gen Dystrophin; Trần Văn Khánh (2004) nghiên cứu trên 85 bệnh nhân được chẩn đoán là DMD dựa vào triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng đã phát hiện xấp xỉ 40% bệnh nhân có đột biến mất đoạn gen<sup>(3,7)</sup>. Sự khác nhau giữa tỷ lệ bệnh nhân đột biến gen trong nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu trước ở Việt Nam khá rõ ràng, nguyên nhân là do các nghiên cứu trước đây dừng ở mức độ DNA và

với kinh phí có hạn các tác giả chỉ sử dụng 19 - 25 cặp môi để khuếch đại các exon nằm trong hai vùng thường xảy ra đột biến mất đoạn (vùng đầu tận 5' và vùng trung tâm). Như vậy, 54 - 60 exon còn lại của gen dystrophin chưa được khuếch đại để xác định có hay không có đột biến. Trong đề tài này, chúng tôi nghiên cứu ở mức độ mRNA với việc sử dụng 15 cặp môi đã khuếch đại được toàn bộ chiều dài (gồm 79 exon) của gen Dystrophin<sup>(3)</sup>, do đó không thể bỏ sót đột biến có thể xảy ra trên các exon của gen. Điều này chứng tỏ những ưu điểm của việc xác định đột biến mất đoạn gen ở mức độ mRNA.

Foster (2006) đã xác định đột biến gen của 80 bệnh nhân DMD và ông đã xác định được tỷ lệ mất đoạn gen dystrophin chiếm 63% bệnh nhân<sup>(1)</sup>. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Prior (2005) đã phát hiện tỷ lệ đột biến xóa đoạn gen dystrophin là 60 - 65% ở các bệnh nhân DMD<sup>(5)</sup>. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân DMD bị đột biến xóa đoạn thấp hơn so với các nghiên cứu của các tác giả nước ngoài. Sở dĩ như vậy có thể là do ảnh hưởng của yếu tố chủng tộc, cũng có thể do số lượng mẫu nghiên cứu của chúng tôi còn hạn chế. Một điều cần phải lưu ý rằng, các bệnh nhân ở Việt Nam được chẩn đoán là DMD dựa vào triệu chứng lâm sàng điển hình và nồng độ CK máu tăng cao, hầu hết không được làm sinh thiết cơ - một xét nghiệm cơ bản có tác dụng chẩn đoán xác định DMD, giúp phát hiện sự vắng mặt hoàn toàn hoặc một phần của protein dystrophin ở màng

tế bào cơ; bởi vậy, những sai sót trong chẩn đoán DMD là điều khó có thể tránh khỏi.

## KẾT LUẬN

Bằng phương pháp xác định đột biến mất đoạn gen Dystrophin ở mức độ mRNA chúng tôi đã phát hiện được 13 bệnh nhân DMD (chiếm tỷ lệ 52%) có đột biến mất đoạn. Phương pháp này giúp tiết kiệm nhiều thời gian và kinh phí so với phương pháp xác định đột biến mất đoạn ở mức độ DNA.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Foster K, Foster H, Dickson J.G. (2006). Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy". *Gene Ther* 13(24),1677-85.
2. Mendell RJ, Griggs CR (1998). Muscular dystrophin, *Harrison's principles of Internal medicine*, pp.2112-8.
3. Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Thị Hoàn (2005). Phát hiện đột biến mất đoạn gen dystrophin ở một số bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật Multiplex PCR. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Báo cáo hội nghị toàn quốc 3/11/2005, tr.1435-7.
4. Prior TW, Bartolo C, Paerl DK et al. (1995). Spectrum of small mutation in the dystrophin coding region, *Am J Hum Genet*, 57, pp. 22-4.
5. Prior TW, Bridgeman SJ (2005). Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophin. *JMD*, 7(3), pp.317-25.
6. Trần Văn Khánh (2005). Đột biến ở vùng rod của gen dystrophin gây nên bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 6, tr.33-9.
7. Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đặng Diễm Hồng, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Thị Hoàn, Vũ Chí Dũng, Bùi Phương Thảo, Masafumi Matsuo (2004). Chẩn đoán 85 bệnh nhân Việt Nam mắc bệnh nhược cơ Duchenne/Becker bằng phương pháp polymerase chain reaction. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 12, tr.33-8.
8. Vũ Chí Dũng (1996). Triệu chứng và chẩn đoán bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne trong điều kiện Việt Nam. *Luận văn thạc sĩ Y học*, Đại học Y Hà Nội, tr.17-20.