

Xây dựng qui trình phát hiện đột biến vi mất đoạn nhiễm sắc thể giới tính Y trên bệnh nhân nam chẩn đoán mắc bệnh Azoospermia bằng kỹ thuật Multiplex – PCR

- Huỳnh Thị Kim Phương
 - Huỳnh Kiều Thanh
 - Võ Trí Nam
 - Nguyễn Lê Tuấn Anh
 - Nguyễn Đức Hoàng
 - Phan Thị Phương Trang
- Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
- Nguyễn Vạn Thông
 - Phạm Hà Giang
- Khoa Giải Phẫu Bệnh – Tế Bào – Di Truyền, Bệnh viện Hùng Vương

(Bài nhận ngày 14 tháng 04 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 10 năm 2015)

TÓM TẮT

Vi mất đoạn trên nhiễm sắc thể (NST) Y là một trong những nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới, chiếm tỉ lệ từ 2-10 % và xảy ra thường xuyên tại 3 vùng AZFa, AZFb, AZFc (nhân tố azoospermia) thuộc cánh dài nhiễm sắc thể (NST) Y. Hiện nay việc chẩn đoán vi mất đoạn trên NST Y hầu như là bắt buộc trước khi tiến hành lựa chọn các phương pháp điều trị hay hỗ trợ sinh sản tiếp theo tại các bệnh viện và trung tâm điều trị vô sinh hiếm muộn. Để phát hiện vi mất đoạn trên 3 vùng AZF, SRY, ZFY của NST Y hiện nay phải sử dụng kỹ thuật Multiplex – PCR do European Academy of Andrology/European Molecular Genetics Quality Network (EAA/

Từ khóa: AZF, Azoospermia, đột biến vi mất đoạn, Multiplex – PCR, vô sinh nam

MỞ ĐẦU

Vi mất đoạn trên nhiễm sắc thể Y là nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới, chiếm tỉ lệ từ 2-10

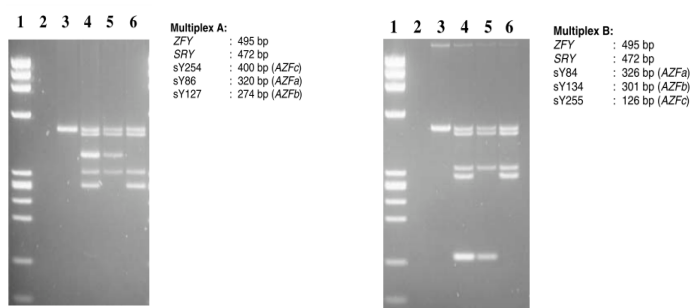
EMQN) đưa ra. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là sản phẩm Multiplex – PCR có kích thước tương đương nhau nên vạch điện di rất gần nhau, gây khó khăn cho việc chẩn đoán. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết kế lại các cặp mồi cũng bắt cặp trên vùng gene được EAA/EMQN khuyến cáo nhưng sản phẩm PCR có kích thước khác biệt rõ rệt, vạch DNA điện di phân tách xa nhau nhằm tạo thuận lợi cho công tác chẩn đoán. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng đã tạo được những plasmid tái tổ hợp có mang các gene cần kiểm tra để làm mẫu đối chứng cho bộ kit.

% và xảy ra thường xuyên tại 3 vùng là AZFa, AZFb, AZFc thuộc cánh dài NST Y [9]. Đột biến vi mất đoạn xảy ra trong quá trình sinh tinh tạo

giao tử trong cơ thể người bố, cho nên phần lớn các bệnh nhân nam vô sinh do mất đoạn trên NST Y là tự phát. Có 6 kiểu vi mất đoạn phổ biến: mất đoạn xảy ra tại một vùng *AZFa* hoặc *AZFb* hoặc *AZFc*, mất đoạn đồng thời ở 2 vùng *AZFab*, mất đoạn trên cả 3 vùng *AZFabc* và mất một phần *AZFc*. Theo các nghiên cứu trên thế giới, mức độ nghiêm trọng của quá trình sai hỏng sinh tinh phụ thuộc vào vùng *AZF* xảy ra vi mất đoạn. Mất đoạn một phần *AZFc* có thể biểu hiện sinh tinh bình thường cho đến không có khả năng sinh tinh [8, 10], trong khi các dạng mất đoạn còn lại thường đi kèm với hội chứng SCO (chỉ có tế bào Sertoli trong tinh hoàn) [4] hoặc quá trình sinh tinh không hoàn chỉnh (spermatogenic arrest) và dừng lại tại giai đoạn spermatocyte [3].

Bệnh nhân vô sinh do vi mất đoạn trên NST Y có biểu hiện không có tinh trùng trong tinh dịch hoặc có tinh trùng trong tinh dịch với số lượng thấp. Do đó, họ ít có khả năng sinh con theo cách tự nhiên mà cần đến sự can thiệp của các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản. Tuy nhiên, các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (assisted reproduction technology, ART) đã bỏ qua cơ chế chọn lọc tự nhiên, do đó các sai hỏng di truyền trên NST Y vẫn được truyền từ đời bố sang con trai [7].

Xuất phát từ nguyên nhân trên, các xét nghiệm về bất thường trong bộ gene, đặc biệt là vi mất đoạn trên NST Y, phải được tiến hành trước khi áp dụng các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản phù hợp tiếp theo [6]. Hiện nay, phương pháp phổ biến để chẩn đoán vi mất đoạn trên NST Y là Multiplex – PCR với quy trình được khuyến cáo của European Academy of Andrology/European Molecular Genetics Quality Network (EAA/EMQN). Phương pháp này sử dụng các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại các trình tự DNA marker nằm trên 3 vùng *AZF*, *SRY*, *ZFY* của NST Y với khả năng phát hiện trên 90 % các trường hợp vi mất đoạn [5]. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là tạo ra sản phẩm PCR có kích thước tương đương nhau nên vạch điện di rất gần nhau, gây khó khăn cho thao tác chẩn đoán và thời gian điện di phân tách lâu (Hình 1). Vì vậy, chúng tôi thiết kế lại các mồi dùng trong phản ứng Multiplex – PCR chẩn đoán vi mất đoạn trên NST Y với sản phẩm điện di khác xa nhau về kích thước nhằm giúp đánh giá kết quả xét nghiệm chính xác hơn và đơn giản hơn. Đồng thời khảo sát các điều kiện phù hợp cho phản ứng Multiplex – PCR, từ đó có thể đưa vào áp dụng thực tiễn tạo thuận lợi cho công tác chẩn đoán lâm sàng ở Việt Nam cũng như quốc tế.



Hình 1. Thử nghiệm minh họa cho hai phản ứng Multiplex – PCR với cặp mồi đã được thiết kế và công bố. 1: thang DNA; 2-6 sản phẩm phản ứng PCR với DNA khuôn là: 2: nước; 3: DNA bộ gen nữ; 4: DNA bộ gen của người nam bình thường; 5: DNA bộ gen của người nam đột biến mất vùng AZFb; 6: DNA bộ gen của người nam mất vùng AZFc [3].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Plasmid pBluescript II KS (+) được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM, DNA bộ gene nam giới bình thường (đã có con) không chứa vi mất đoạn trên NST Y đã được kiểm tra thông qua bộ kit xét nghiệm bằng các cặp mồi cũ [3].

Chủng vi sinh vật gồm *E. coli* OmniMAX™-T1^R (F' {proAB + lacIq lacZΔM15 Tn10 (Tet^R) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD

Các enzyme: Enzyme Pfu DNA polymerase, T4 DNA ligase và enzyme cắt giới hạn bao gồm

EcoRV, *EcoRI* và *BamHI* được cung cấp bởi công ty Thermo Scientific, *Taq* DNA polymerase được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Các bộ kit và hóa chất cơ bản dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử và nuôi cấy vi sinh được cung cấp bởi các công ty Qiagen, GE Healthcare, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, Merck-Millipore và BioBasic.

Mồi cho phản ứng PCR được thiết kế bằng phần mềm Primer3plus và tổng hợp bởi công ty Macrogen. Inc. Trình tự các mồi như trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các mồi đã thiết kế mới dùng trong các phản ứng PCR và giải trình tự

| Mồi | Trình tự mồi (5' → 3') | Bắt cặp của mồi lên gene/DNA | Kích thước sản phẩm PCR (bp) |
|--------|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| ON1315 | TTTCGAACTCTGGCACCTT | SRY | 686 |
| ON1316 | GCCAATGTTACCCGATTGTC | | |
| ON1319 | TTGCATGATTTGTGGGAAGA | ZFY | 777 |
| ON1320 | TTGTGGACAGCCACATGTTT | | |
| ON1324 | GCCTACTACCTGGAGGCTTC | sY84 | 396 |
| ON1325 | AGGCATGTGGACACTCACAG | | |
| ON1327 | GTCTGCCTCACCATAAAAACG | sY134 | 303 |
| ON1328 | ACCACTGCCAAAACCTTCAA | | |
| ON1329 | GTTACAGGATTCGGCTGTAT | sY255 | 526 |
| ON1332 | GACAGGAAGGGTTGGAGACA | | |
| ON1334 | ACACACAGAGGGACAACCCT | sY86 | 506 |
| ON1335 | TCTGCAGGGGTCGAAGTATT | | |
| ON1337 | GGCTCACAAACGAAAAGAAA | sY127 | 274 |
| ON1338 | CTGCAGGCAGTAATAAGGGA | | |
| ON1339 | GGGTGTTACCAGAAGGCAAA | sY254 | 400 |
| ON1340 | GAACCGTATCTACCAAAGCAGC | | |
| ON1267 | CACTATAGGGCGAATTGGAGC | pBluescript II KS (+) | |
| ON1268 | GCGCAATTAACCCTCACTAAAG | pBluescript II KS (+) | |

Phương pháp

Tạo dòng các plasmid mang các gene marker trên NST Y nhằm làm mẫu đối chứng

Marker *sY84* (thuộc AZFa) được thu nhận thông qua phản ứng PCR với khuôn DNA là bộ

gene nam giới bình thường và cặp mồi đặc hiệu ON1324 với ON1325. Sản phẩm PCR được nối vào plasmid pBluescript II KS (+) đã được cắt mở vòng bằng enzyme *EcoRV* để tạo thành plasmid pHT1959. Sản phẩm nối được biến nạp vào

E.coli OmniMAX™ và sàng lọc các thể biến nạp trên đĩa LB-Agar chứa ampicillin nồng độ 100 µg/mL và X-gal. Chọn các khuẩn lạc màu trắng để tiếp tục sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON1267 và ON1268 bắt cặp trên plasmid cách 2 đầu của đoạn gene chèn khoản 100 bp. Các khuẩn lạc cho kết quả PCR khuẩn lạc đúng với dự đoán lý thuyết sẽ được nuôi cấy, tách chiết plasmid thông qua bộ kit QIAprep Plasmid purification Mini kit (Qiagen). Plasmid được tiếp tục cắt kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *BamHI*, plasmid cho kết quả cắt kiểm tra đúng như lý thuyết sẽ được giải trình tự bằng cặp mồi ON1267 và ON1268.

Tương tự như cách thiết kế plasmid pHT1959 mang gene *sY84* các plasmid tái tổ hợp pHT1960, pHT1961, pHT1962, pHT1963, pHT1964, pHT1965 được tạo ra bằng cách nối lần lượt các marker *sY86* (*AZFa*), *sY134* (*AZFb*), *sY127* (*AZFc*), *sY254* *sY255* (*AZFc*), gene *SRY*, *ZFY* vào plasmid pBluescript II KS (+).

Khảo sát điều kiện phù hợp cho phản ứng PCR với bộ mồi thiết kế mới

Khảo sát tính đặc hiệu của mồi và điều chỉnh nồng độ mồi

Các mồi được kiểm tra bước đầu bằng phản ứng PCR với từng mồi riêng biệt cho từng phản ứng PCR [1, 2]. Thành phần phản ứng: 1X buffer *Taq*; 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,25 µM mồi; 0,5 µl *Taq* DNA polymerase, 250 ng DNA bộ gene nam giới bình thường. Phản ứng được thực hiện trong 30 chu kỳ gồm các bước 95 °C/30 giây, 55 °C/30 giây, 72 °C/60 giây.

Thực hiện phản ứng Multiplex – PCR với hỗn hợp mồi A khuếch đại các marker *SRY* (686 bp), *sY255* (526 bp), *sY84* (396 bp), *sY134* (301 bp) và hỗn hợp mồi B khuếch đại các marker *ZFY* (777 bp), *sY86* (506 bp), *sY254* (400 bp), *sY127* (274 bp) thành phần mồi như trên Bảng 1. Thành phần phản ứng tương tự như trên, các sản

phẩm cho vạch điện di được phân tích mức độ đậm nhạt của từng vạch DNA để điều chỉnh nồng độ từng mồi trong hỗn hợp phản ứng. DNA khuôn là DNA bộ gene của người nam bình thường và hỗn hợp các plasmid tái tổ hợp đã đồng hóa.

Khảo sát nồng độ MgCl₂

Thực hiện phản ứng Multiplex – PCR khảo sát nồng độ MgCl₂ cho hỗn hợp mồi A, B [2]. Thành phần phản ứng như bước trên với nồng độ mồi tối ưu đã được khảo sát, nồng độ MgCl₂ được khảo sát ở 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM.

Khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi

Thực hiện phản ứng Multiplex – PCR khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi cho hỗn hợp mồi A, B [1, 2]. Thành phần phản ứng đã được tối ưu về nồng độ mồi và nồng độ MgCl₂. Chu trình nhiệt được thực hiện tương tự các khảo sát trên, tuy nhiên nhiệt độ bắt cặp mồi được khảo sát dao động từ 50 °C đến 60 °C.

Khảo sát nồng độ khuôn

Thực hiện phản ứng Multiplex – PCR khảo sát hàm lượng DNA khuôn cho hỗn hợp mồi A, B. Thành phần phản ứng đã được tối ưu về nồng độ mồi, nồng độ MgCl₂ và nhiệt độ bắt cặp của mồi, trong đó nồng độ DNA khuôn được khảo sát ở 50 ng, 75 ng, 100 ng và 125 ng cho 25 µl phản ứng.

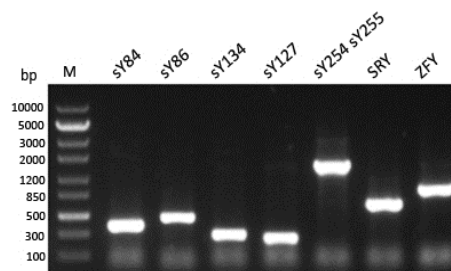
Phần mềm ImageJ được sử dụng để đánh giá độ sáng tương đối của các vạch điện di trong các khảo sát các điều kiện tối ưu cho phản ứng Multiplex – PCR.

Sau khi tối ưu hóa được quy trình, tiến hành kiểm tra tính ổn định của quy trình dựa trên kiểm tra 50 mẫu thử từ DNA bộ gene tách chiết từ nhân viên, học viên và sinh viên làm việc và học tập tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo các vector tái tổ hợp mang các trình tự DNA marker trên bộ gene nam giới bình thường

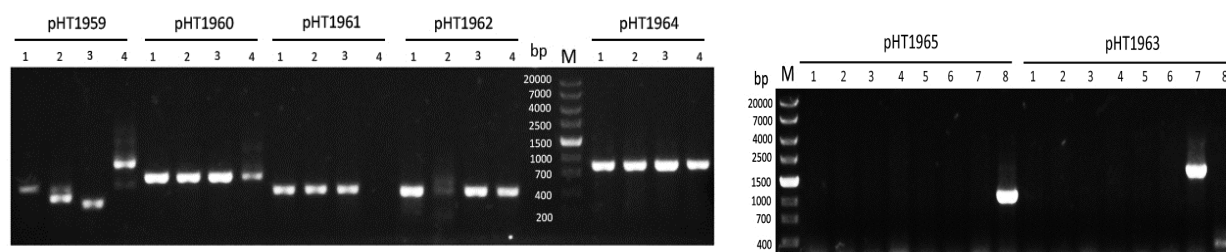
Vì bộ kit nhằm phát hiện đột biến mất đoạn gene, cho nên kết quả dương tính của bộ kit lại là vạch bị mất trong quá trình phát hiện. Để tránh trường hợp dương tính giả do chất lượng của DNA khuôn và thành phần của phản ứng PCR, bộ kit sử dụng chứng nội là vùng gene trên *SRY* và *ZFY*. Ngoài ra các trường hợp dương tính giả do lỗi kỹ thuật hay chất lượng của từng mỗi trong phản ứng cần phải được kiểm chứng thông qua mẫu đối chứng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập các plasmid mang đúng các vùng gene cần phát hiện trong phản ứng Multiplex – PCR nhằm bổ sung vào bộ kit làm mẫu đối chứng bằng cách dòng hóa các đoạn gene *sY84*, *sY86*, *sY134*, *sY127*, *sY254 sY255*, *SRY*, *ZFY* được nhân bản từ DNA bộ gene của người nam bình thường vào plasmid pBluescript II KS (+). Kết quả điện di sản phẩm PCR thu các trình tự DNA marker của NST Y trên gel agarose (Hình 2) cho thấy ở mỗi giếng điện di xuất hiện một vạch sáng có kích thước phù hợp với kích thước dự đoán trên lý thuyết của *sY84* là 396 bp, *sY86* là 506 bp, *sY134* là 303 bp, *sY127* là 274 bp, *sY254 sY255* là 1756 bp, *SRY* là 694 bp, *ZFY* là 956 bp. Kết quả này cho thấy các trình tự mỗi mới thiết kế có độ đặc hiệu cao và DNA marker đã được thu nhận thành công.



Hình 2. Kết quả PCR thu các trình tự DNA marker trên NST Y.

sY84: 396 bp, *sY86*: 506 bp, *sY134*: 303 bp, *sY127*: 274 bp, *sY254 sY255*: 1756 bp, *SRY*: 694 bp, *ZFY*: 956 bp

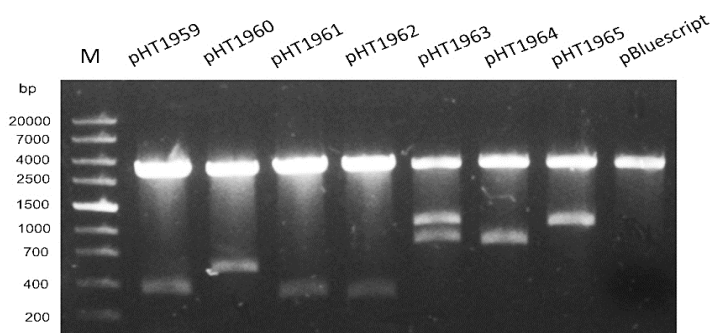
Các sản phẩm PCR trên được nối vào pBluescript II KS (+) đã được cắt mở vòng bằng *EcoRV*, sau đó biến nạp vào *E.coli* OmniMAX™ và sàng lọc trên đĩa có kháng sinh ampicillin và Xgal. Chọn các khuẩn lạc trắng để thực hiện phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi bắt cặp trên plasmid. Kết quả điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR khuẩn lạc cho kết quả xuất hiện vạch sáng đúng với kích thước lý thuyết ở một số khuẩn lạc (Hình 3). Cụ thể, pHT1959 có khuẩn lạc số 1 cho sản phẩm PCR điện di có kích thước đúng với kích thước dự đoán lý thuyết là 556 bp, pHT1960 xuất hiện vạch sáng đúng với kích thước dự đoán 666 bp ở giếng điện di khuẩn lạc 1, 2, 3, 4; tương tự pHT1961 có khuẩn lạc 1, 2, 3; pHT1962 có khuẩn lạc 1, 3, 4; pHT1964 có cả bốn khuẩn lạc 1, 2, 3, 4; pHT1965 có khuẩn lạc 8, pHT1963 có khuẩn lạc 7 cho sản PCR đúng như dự đoán lý thuyết lần lượt là 463 bp, 434 bp, 1916 bp, 856 bp, 1116 bp.



Hình 3. Kết quả PCR khuẩn lạc sàng lọc các plasmid tái tổ hợp pHT1959, pHT1960, pHT1961, pHT1962, pHT1963, pHT1964 và pHT1965. M: thang; 1-8: khuẩn lạc số 1-8 được chọn để kiểm tra PCR khuẩn lạc. Sản phẩm PCR khuẩn lạc của plasmid pHT1959, pHT1960, pHT1961, pHT1962, pHT1963, pHT1964 và pHT1965 có kích thước lần lượt là 556 bp, 666 bp, 463 bp, 1116 bp, 856 bp và 1916 bp.

Các khuẩn lạc cho kết quả PCR khuẩn lạc phù hợp được nuôi cấy, tách plasmid và tiến hành cắt kiểm tra với enzyme *EcoRI* và *BamHI*. Sản

phẩm cắt giới hạn được điện di trên gel agarose cho các vạch sáng có kích thước đúng như lý thuyết (Hình 4 và Bảng 2).



Hình 4. Kết quả cắt kiểm tra các plasmid tái tổ hợp bằng *EcoRI* và *BamHI*. Kích thước sản phẩm cắt được trình bày trong Bảng 2

Bảng 2. Kích thước sản phẩm cắt giới hạn kiểm tra các plasmid tái tổ hợp

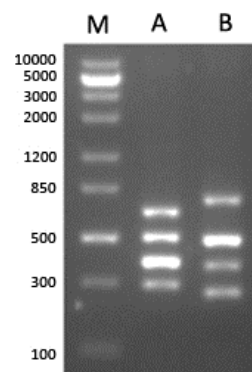
| Tên plasmid | pHT1959 | pHT1960 | pHT1961 | pHT1962 | pHT1963 | pHT1964 | pHT1965 | pBluescript II KS (+) |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------------|
| Kích thước sản phẩm cắt dự đoán (bp) | 2949 | 2949 | 2949 | 2949 | 2949 | 2949 | 2949 | 2949 |
| | 436 | 518 | 315 | 286 | 1008 | 706 | 968 | 12 |
| | 62 | | | | 760 | | | |

Các plasmid tái tổ hợp với các đoạn marker trên được giải trình tự vùng gene chèn với cặp mồi ON1267 và ON1268. Kết quả so sánh với trình tự lý thuyết cho thấy có sự tương đồng 100 %. Chứng tỏ đã tạo dòng thành công 7 plasmid tái tổ hợp mang trình tự DNA marker mong muốn.

Kiểm tra phản ứng Multiplex – PCR trên plasmid tạo dòng làm mẫu đối chứng

Các plasmid sau khi dòng hóa có chứa toàn bộ các vùng gene marker cần phát hiện trên NST Y. Để sử dụng các plasmid này như một mẫu đối chứng cho phản ứng Multiplex – PCR cần có sự phối trộn các plasmid đã được dòng hóa lại với nhau theo phức hợp phản ứng PCR. Đối với thành phần phản ứng A cần phối trộn plasmid pHT1964, pHT1959, pHT1961 và pHT1963. Đối với thành phần phản ứng B cần phối trộn plasmid pHT1965, pHT1960, pHT1962 và pHT1963.

Hỗn hợp plasmid này dùng làm khuôn cho phản ứng Multiplex – PCR tương ứng.



Hình 5. Kết quả Multiplex – PCR với tổ hợp khuôn plasmid đã tạo dòng. A: phản ứng multiplex-PCR A với tổ hợp plasmid pHT1964 (SR_Y), pHT1959 (s_Y84), pHT1961 (s_Y134) và pHT1963 (s_Y255); B: phản ứng multiplex-PCR B với tổ hợp plasmid pHT1965 (Z_{FY}), pHT1960 (s_Y86), pHT1962 (s_Y127) và pHT1963 (s_Y254).

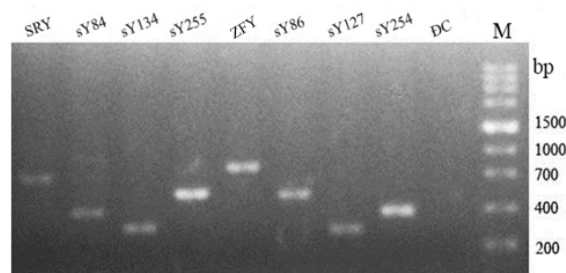
Kết quả điện di sản phẩm Multiplex – PCR với tổ hợp khuôn plasmid tạo dòng cho kết quả điện di đầy đủ các vạch và đúng kích thước trên gel agarose (Hình 5). Các vạch sáng rõ dễ quan sát phù hợp với mục tiêu làm mẫu đối chứng đóng vai trò như là bộ gene nam giới bình thường (mang đầy đủ các vùng *AZF*) trong chẩn đoán vi mất đoạn.

Kết quả khảo sát điều kiện phù hợp cho phản ứng Multiplex – PCR với môi thiết kế mới

PCR với từng cặp môi riêng lẻ

Mặc dù các môi đã được khảo sát tính đặc hiệu thông qua khả năng nhân bản và thu nhận gene trong bước dòng hóa, tuy nhiên để thu nhận gene cho việc dòng hóa phải sử dụng enzyme Pfu DNA polymerase, enzyme này có tốc độ tổng hợp DNA chậm, ít bị đột biến và đắt tiền. Trong mục đích phát hiện gene mục tiêu bằng kỹ thuật PCR, enzyme Taq DNA polymerase được sử dụng vì các ưu điểm như tốc độ tổng hợp DNA nhanh, rẻ tiền. Như vậy các cặp môi riêng lẻ được kiểm tra tính đặc hiệu và khả năng khuếch đại gene bằng enzyme Taq DNA polymerase được khảo sát lại. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose (Hình 6) cho thấy các vạch duy nhất đúng với kích thước lý thuyết, chứng tỏ các cặp môi được thiết kế mới bắt cặp đặc hiệu với các vùng trình tự trên NST Y của DNA bộ gene nam giới bình thường (không chứa vi mất đoạn). Như vậy các cặp môi mới thiết kế có thể dùng để kiểm tra sự hiện diện của các vùng gene *AZF*_a, *AZF*_b và *AZF*_c trên NST Y. Để giảm chi phí xét nghiệm, các phản ứng PCR này cần được nghiên cứu phối hợp để chạy Multiplex – PCR trong phản ứng. Hai tổ hợp phản ứng Multiplex – PCR được thiết lập để xác định vị trí mất đoạn trên NST Y như sau: Tổ hợp phản ứng A gồm các môi khuếch đại vùng gene *SRY*, *sY84*, *sY134*,

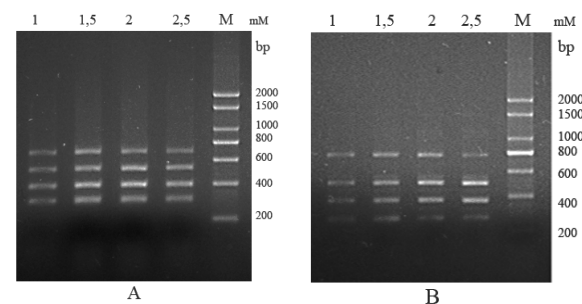
sY255 và tổ hợp phản ứng B gồm các môi khuếch đại vùng gene *ZFY*, *sY86*, *sY127*, *sY254* dùng trong chẩn đoán vi mất đoạn.



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR với từng cặp môi khuếch đại các vùng DNA marker trên NST Y. M: Thang DNA; DC: mẫu đối chứng với khuôn DNA thay bằng nước; *SRY*: 686 bp; *sY84*: 396 bp; *sY134*: 303 bp; *sY255*: 526 bp; *ZFY*: 777 bp; *sY86*: 506 bp; *sY127*: 274 bp và *sY254*: 400 bp

Kết quả khảo sát nồng độ $MgCl_2$

Nồng độ $MgCl_2$ có ảnh hưởng đến kết quả khuếch đại của phản ứng PCR do vậy cần phải khảo sát để tìm nồng độ $MgCl_2$ tối ưu cho phản ứng thông qua khảo sát các nồng độ khác nhau của $MgCl_2$ 1 mM; 1,5 mM; 2 mM và 2,5 mM.

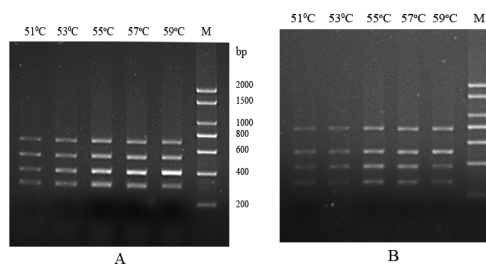


Hình 7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ $MgCl_2$ lên sản phẩm Multiplex – PCR. A: hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex A; B: hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex B; M: thang DNA; 1; 1,5; 2; 2,5: nồng độ $MgCl_2$ khảo sát trong ứng 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM

Kết quả điện di sản phẩm PCR trong thí nghiệm khảo sát nồng độ $MgCl_2$ trên gel agarose (Hình 7) cho thấy ở các nồng độ $MgCl_2$ khảo sát đều cho sản phẩm PCR có đầy đủ vạch đối với cả 2 tổ hợp môi A và B. Ở nồng độ $MgCl_2$ 1 mM và 2,5 mM các vạch tương đối mờ so với 1,5 mM và 2 mM. Đối với tổ hợp môi A, nồng độ $MgCl_2$ ở 1,5 mM và 2 mM cho sản phẩm PCR không có sự khác biệt lớn trên gel điện di trong khi đối với tổ hợp môi B, ở 1,5 mM $MgCl_2$ các vạch điện di tương đối sáng đều hơn so với 2 mM. Như vậy nồng độ $MgCl_2$ 1,5 mM thích hợp cho cả hai tổ hợp môi nên được chọn lựa cho các khảo sát tiếp theo.

Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp môi

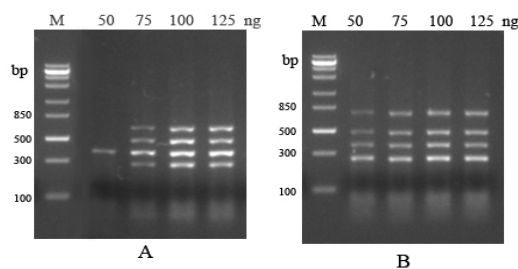
Vì trong quá trình thiết kế môi cho thấy nhiệt độ nóng chảy của môi là khoảng 60 °C do vậy nhiệt độ bắt cặp được khảo sát trong dãy nhiệt độ nhỏ hơn 60 °C. Tiến hành khảo sát nhiệt độ bắt cặp môi ở 51 °C, 53 °C, 55 °C, 57 °C và 59 °C cho cả hai tổ hợp môi A và B. Ở cả tổ hợp môi A và B tại 51 °C và 53 °C sản phẩm PCR cho kết quả điện di đầy đủ các vạch nhưng độ sáng các vạch mờ hơn so với kết quả điện di sản phẩm PCR ở các nhiệt độ còn lại, tại 55 °C và 57 °C sản phẩm PCR cho kết quả điện di các vạch sáng rõ phù hợp với mục tiêu phục vụ chẩn đoán ban đầu. Đối với tổ hợp môi A, ở 59 °C vạch sY84 rất sáng còn vạch sY134 tương đối mờ đi. Cùng ở ngưỡng nhiệt độ này thì sY254 và sY127 ở tổ hợp B cho vạch điện di mờ đi (Hình 8). Như vậy, nhiệt độ 55 °C sản phẩm multiplex cho tất cả các vạch sáng rõ ở cả 2 tổ hợp môi nên được chọn lựa cho khảo sát DNA khuôn tiếp theo.



Hình 8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ bắt cặp môi lên phản ứng Multiplex – PCR. A: hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex A; B: hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex B; M: thang DNA; 51°C; 53°C; 55°C; 57°C; 59°C: nhiệt độ bắt cặp môi đã khảo sát

Kết quả khảo sát nồng độ DNA khuôn

Kết quả điện di (Hình 9) cho thấy ở 100 ng DNA khuôn ở cả tổ hợp môi A, B cho vạch điện di sáng rõ, đầy đủ vạch và đúng kích thước so với các khảo sát DNA khuôn còn lại. Riêng đối với tổ hợp môi A ở 50 ng DNA khuôn, sản phẩm Multiplex – PCR cho kết quả điện di chỉ có một vạch sáng là sY84, ở 75 ng DNA khuôn sản phẩm PCR cho đầy đủ 4 vạch trên gel điện di với độ sáng mờ hơn so với 2 điều kiện nồng độ DNA khuôn 100 ng và 125 ng. Đối với tổ hợp môi B, sản phẩm Multiplex – PCR cho đầy đủ 4 vạch trên gel điện di ở cả 4 nồng độ DNA khuôn khảo sát, độ sáng vạch điện di của sản phẩm PCR tăng dần khi tăng lượng DNA khuôn khảo sát từ 50 ng đến 100 ng. Ở 125 ng DNA khuôn, độ sáng của vạch điện di của sản phẩm PCR mờ hơn ở nồng độ 100 ng DNA khuôn của tổ hợp môi A và B. Vì vậy lượng DNA khuôn được chọn lựa là 100 ng.



Hình 9. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ khuôn DNA lên phản ứng Multiplex – PCR. A) hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex A; B) hỗn hợp môi cho phản ứng Multiplex B; M: thang; 50, 75, 100, 125: nồng độ khuôn DNA khảo sát (ng).

Như vậy điều kiện tối ưu cho phản ứng Multiplex – PCR để phát hiện các gene *AZFa*, *AZFb* và *AZFc* là nồng độ $MgCl_2$ là 1,5 mM, nồng độ DNA khuôn là 100 ng trong 25 μ l phản ứng, nhiệt độ bất cập của môi là 55 °C. Áp dụng quy trình này kiểm tra thử trên 50 mẫu DNA bộ gene của người nam bình thường (đã xác định bằng bộ kit chuẩn song song), cho thấy kết quả tương đồng giữa 2 bộ kit và có tính ổn định cao.

KẾT LUẬN

Đã tạo dòng thành công 7 plasmid mang các trình tự DNA marker của gene *SRY*, *ZFY*, *AZF* dùng làm mẫu DNA đối chứng trong công tác chẩn đoán vi mất đoạn.

Các cặp môi mới thiết kế có tính đặc hiệu và ổn định cao, độ phân tách tốt trên gel agarose, cho kết quả sáng rõ khi khuếch đại các đoạn gene sử dụng khuôn từ DNA bộ gene của người nam bình thường.

Đã xác định được điều kiện tối ưu cho phản ứng Multiplex – PCR là nồng độ $MgCl_2$ 1,5 mM, nồng độ khuôn 100 ng/25 μ l phản ứng, nhiệt độ bất cập môi là 55 °C. Với các điều kiện này sản phẩm Multiplex – PCR cho vạch điện di sáng rõ trên gel agarose, thuận lợi trong việc xác định kết quả chẩn đoán vi mất đoạn trên NST Y.

Việc thiết kế lại các môi phát hiện đột biến vi mất đoạn trên NST Y tạo những thuận lợi cơ bản trong thao tác chẩn đoán nguyên nhân gây vô sinh ở Việt Nam, cũng như trên thế giới. Việc tối ưu hóa các điều kiện phù hợp như tổ hợp nồng độ môi, nồng độ $MgCl_2$, nhiệt độ bất cập môi thích hợp là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo. Mặc dù chưa kiểm tra trên mẫu bệnh phẩm nhưng bộ kit có độ tin cậy và có tiềm năng ứng dụng vì các môi mới được thiết kế lại dựa trên nghiên cứu và tiêu chuẩn của EAA/EMQN chỉ thay đổi kích thước của sản phẩm PCR. Các sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn gene cũng đã được giải trình tự và cho kết quả tương đồng với vùng gene cần khuếch đại trên NST Y. Tuy nhiên để bộ kit đưa vào ứng dụng cần tiến hành kiểm tra trên số lượng lớn mẫu DNA nam giới bình thường và mẫu DNA nam giới có vi mất đoạn trên NST Y song song với tổ hợp các cặp môi được EAA/EMQN đưa ra.

Lời cảm ơn: Một phần nghiên cứu của đề tài này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, mã số đề tài: C2014-18-22.

Establishment of a Multiplex – PCR protocol for detection of Y chromosome microdeletion in Azoospermia male patients

- **Huynh Thi Kim Phuong**
- **Huynh Kieu Thanh**
- **Vo Tri Nam**
- **Nguyen Le Tuan Anh**
- **Nguyen Duc Hoang**
- **Phan Thi Phuong Trang**
University of Science, VNU-HCM
- **Nguyen Van Thong**
- **Pham Ha Giang**
Hung Vuong Hospital

ABSTRACT

Microdeletion on the Y chromosome is one of the causes that makes men infertile, accounting for 2-10 % of all infertility cases, and occurs frequently at 3 regions of the Y-chromosome long arm namely AZFa, AZFb and AZFc (azoospermia factor). Currently, the diagnosis of microdeletion on the Y chromosome is almost mandatory in institutes and centers for infertility diseases before selecting treatment or assisting methods. To detect microdeletion in AZF, SRY and ZFY regions, the current approach is a Multiplex – PCR assay offering by European Academy of Andrology/European Molecular Genetics Quality Network (EAA/

EMQN). However, the drawback of this method is the PCR products possess similar size and then the DNA electrophoresis bands were very close on gels causing the difficult in diagnosis. Therefore, in this study, we have redesigned primer pairs matching with genes that were recommended by EAA/EMQN but the PCR products are clearly different in sizes, making the DNA electrophoresis bands take apart further to facilitate the diagnosis. Besides, we have also created recombinant plasmids carrying the marker genes for the control sample in kits.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J.M.S. Bartlett, D. Stirling, eds., PCR Protocols, *Humana Press*, Totowa, NJ, 226 (2003).
- [2]. O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt, Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol, *BioTechniques*, 23, 3, 504–511 (1997).
- [3]. C.V. Hopps, A. Mielnik, M. Goldstein, G.D. Palermo, Z. Rosenwaks, P.N. Schlegel, Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions, *Human*

- reproduction (Oxford, England)*, 18, 8, 1660–1665 (2003).
- [4]. C. Kamp et al., High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome, *Molecular Human Reproduction*, 7, 10, 987–994 (2001).
- [5]. C. Krausz, L. Hoefsloot, M. Simoni, F. Tüttelmann, EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013, *Andrology*, 2, 1, 5–19 (2014).
- [6]. S.J. Qureshi, A.R. Ross, K. Ma, H.J. Cooke, M.A. Intyre, A.C. Chandley, T.B. Hargreave, Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men, *Molecular Human Reproduction*, 2, 10, 775–779 (1996).
- [7]. G.B. Rucker, A. Mielnik, P. King, M. Goldstein, P.N. Schlegel, Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction, *The Journal of Urology*, 160, 6 Pt 1, 2068–2071 (1998).
- [8]. H. Sadeghi-Nejad, F. Farrokhi, Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions, *Urology journal*, 4, 4, 192–206 (2007).
- [9]. P.H. Vogt, A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiesewetter, F.M. Köhn, W.B. Schill, S. Farah, W. Weidner, H.J. Gröne, A. Jung, W. Engel, G. Haidl, Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11, *Human Molecular Genetics*, 5, 7, 933–943 (1996).
- [10]. F. Zhang, C. Lu, Z. Li, P. Xie, Y. Xia, X. Zhu, B. Wu, X. Cai, X. Wang, J. Qian, X. Wang, L. Jin, Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility, *Journal of Medical Genetics*, 44, 7, 437–444 (2007).