GIỚI THIỆU RỐI LOẠN GEN DO BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ

PGS.TS. BS. Phan Thị Xinh
Bộ Môn Huyết Học
Đại Học Y Dược TP HCM

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

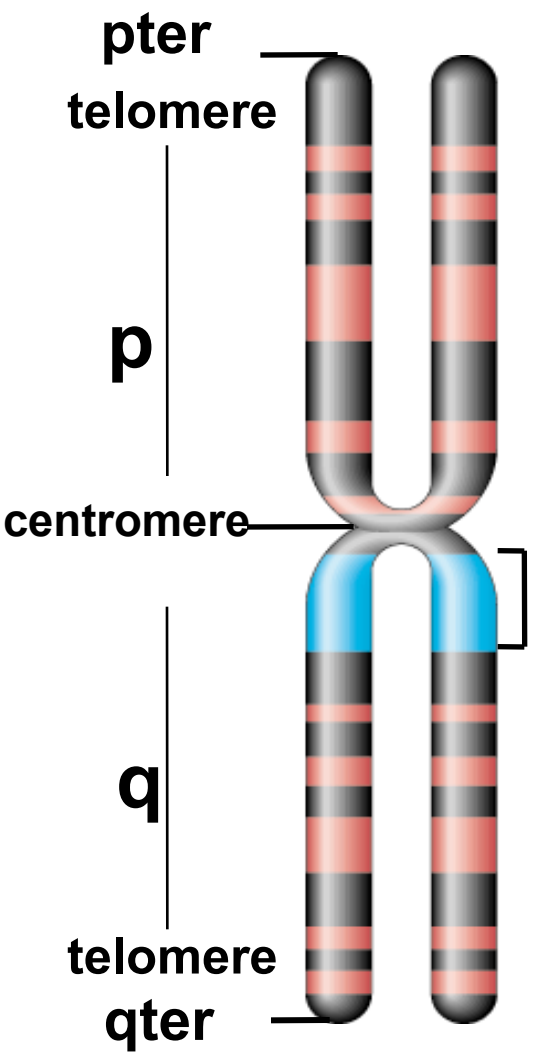
C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

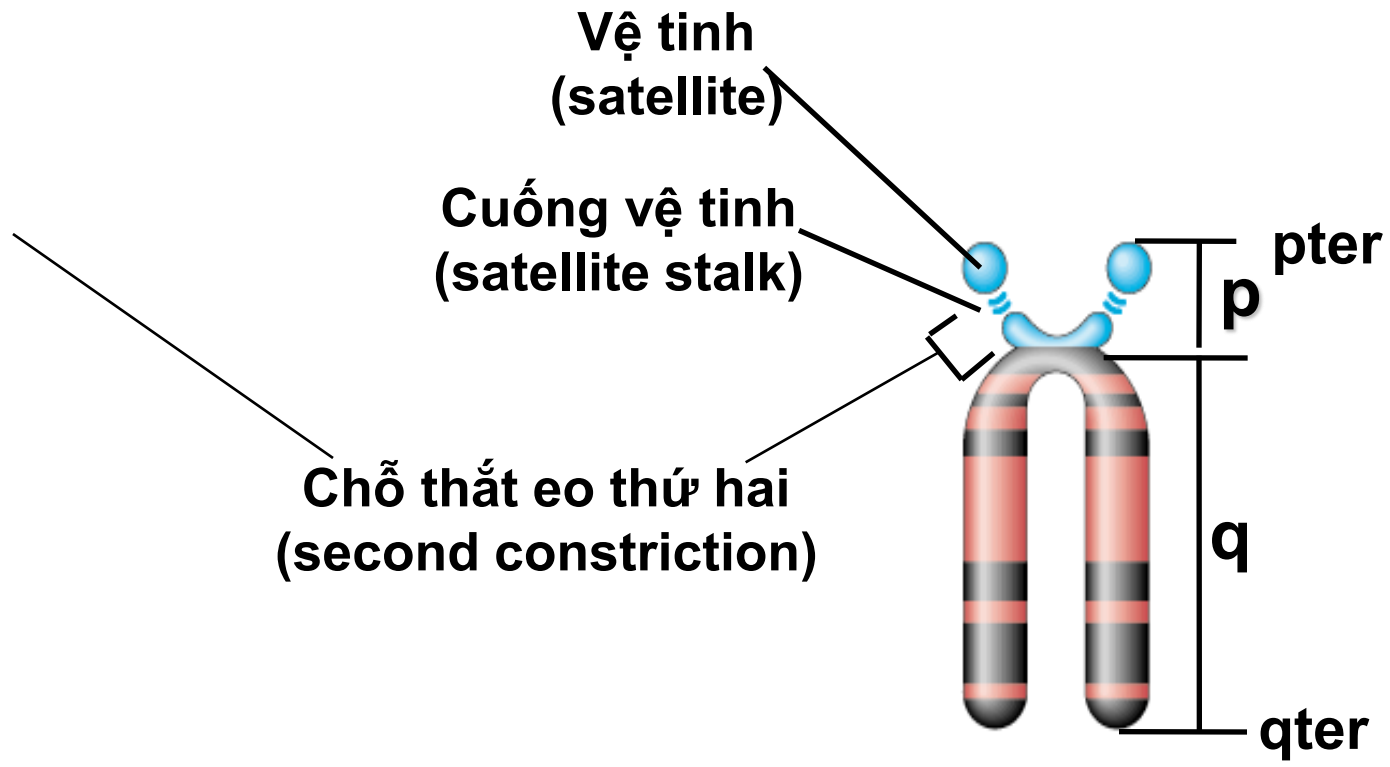
C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

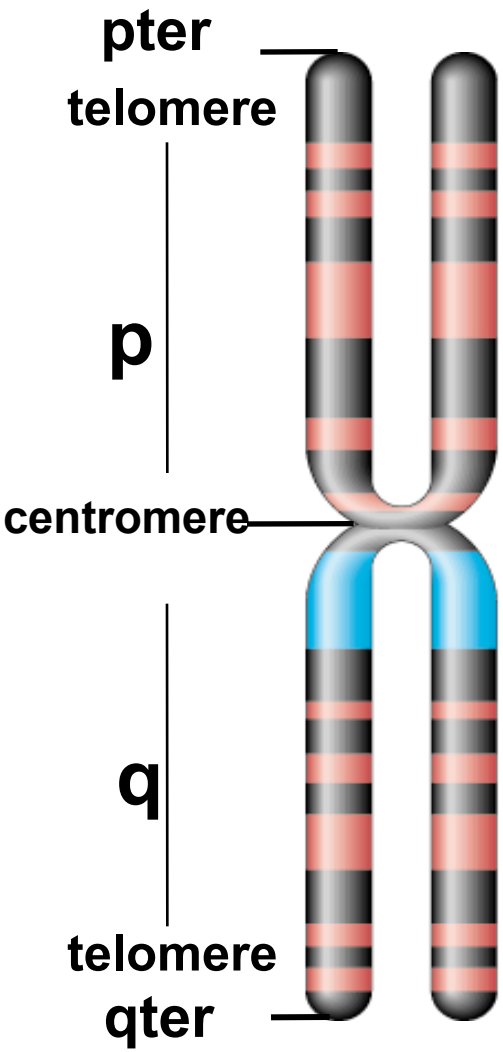
Cấu Trúc và Chức Năng Của NST (1)



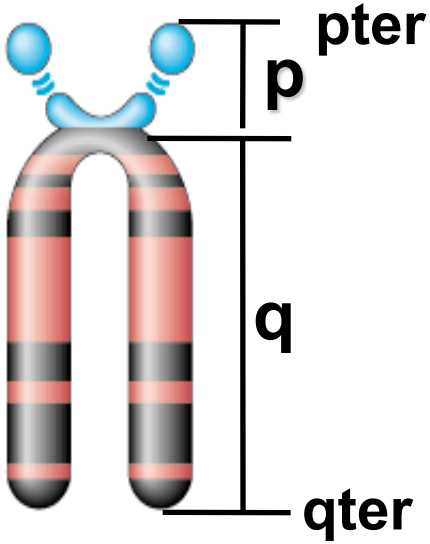
NST được cấu thành bởi DNA và protein, hiện diện trong nhân mỗi tế bào của cơ thể và mang thông tin di truyền cần cho sự phát triển của tế bào.



Cấu Trúc và Chức Năng Của NST (2)



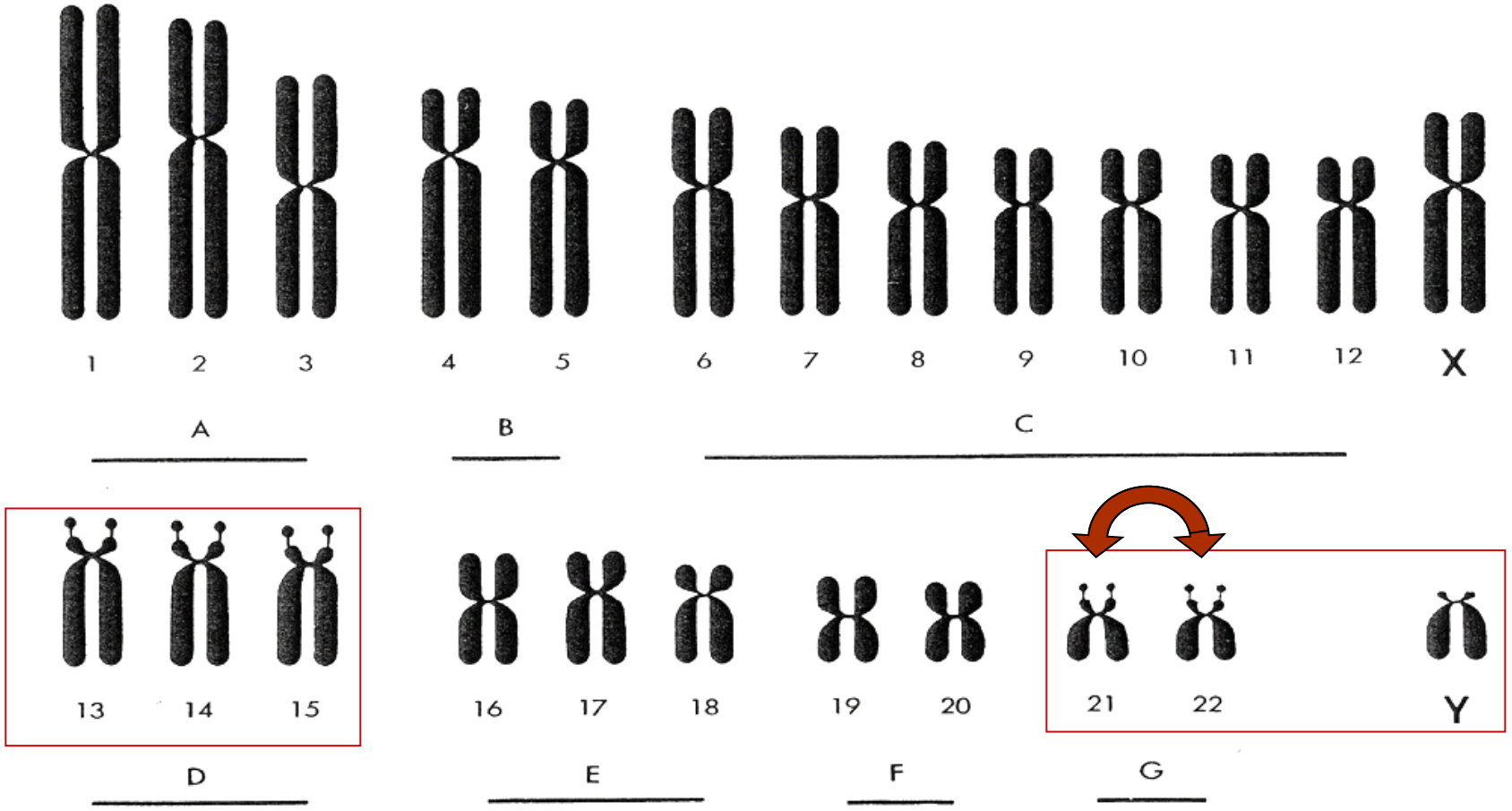
Telomere: Có cấu trúc đặc biệt gồm DNA và protein, là nắp tận của NST. Có các chức năng sau:
- Duy trì cấu trúc nguyên vẹn của NST
- Đảm bảo việc sao mã DNA hoàn tất
- Giúp định vị NST



Centromere: - Vị trí gắn kết của 2 chromatid
-Có vai trò trong quá trình phân bào:
Ở người, centromere gồm hàng trăm Kb của DNA lặp lại, thành phần chính là α–satellite DNA,
là chỗ gắn của protein nhân CENP-B.

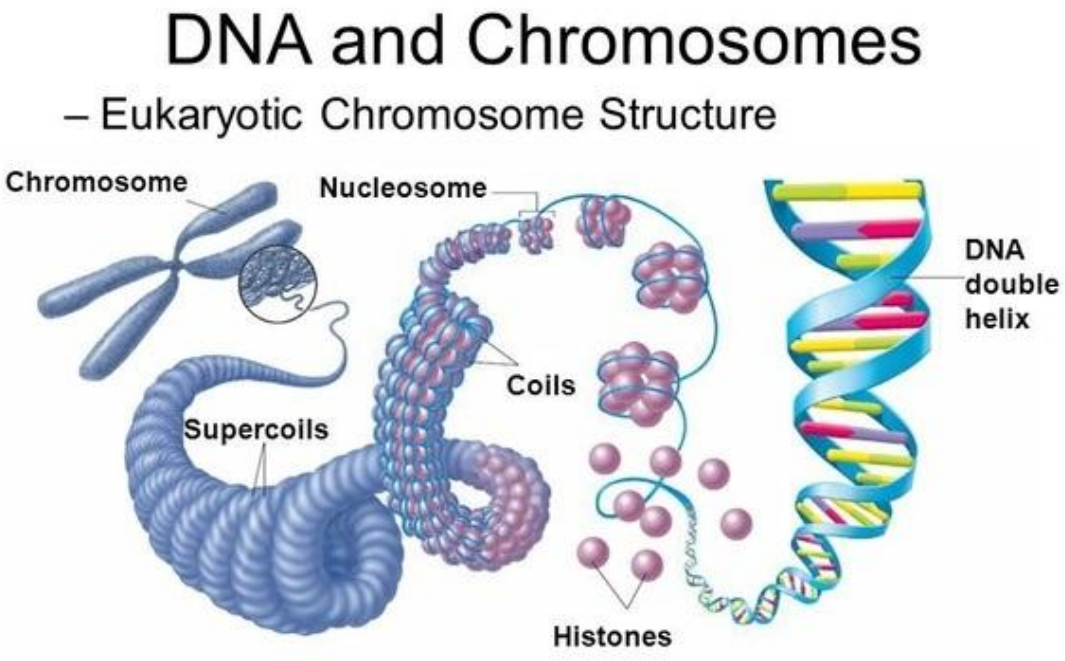
Bộ Nhiễm Sắc Thể Ở Người

2n = 46 NST, gồm 22 cặp NST thường và 2 NST giới tính XX /XY
Mỗi cặp NST mang gen giống nhau (allele khác nhau)



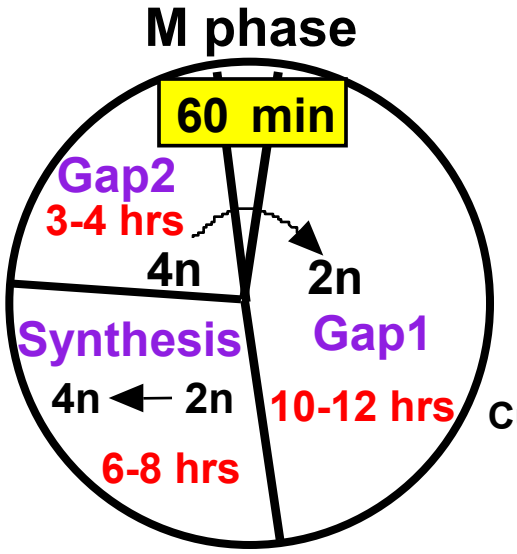
DNA VÀ NST

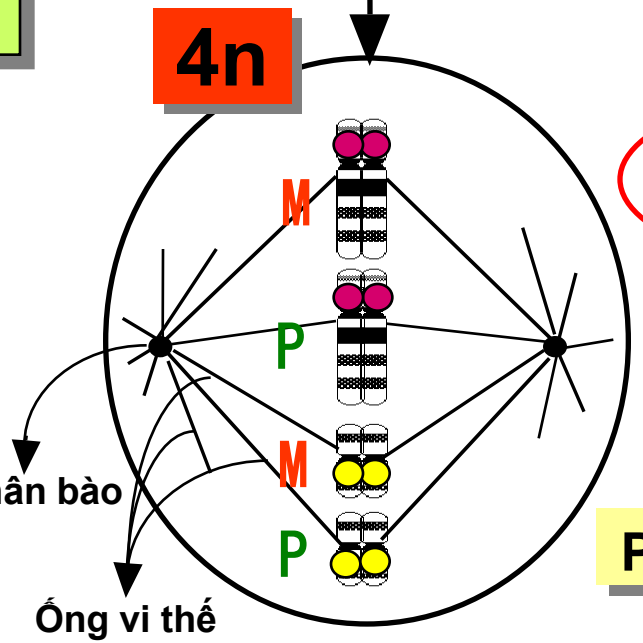
- ✓ NST ở gđ metaphase gồm 2 cấu trúc đối xứng gọi là chromatid.
- ✓ NST cấu tạo từ chất nhiễm sắc gồm chủ yếu là DNA và protein loại histon.
- ✓ Đơn vị cơ bản của NST là nucleosome. Mỗi nucleosome gồm:
  - 8 phân tử histon
  - 1,75 vòng xoắn DNA (khoảng 146 cặp nucleotide)



Thời Gian Của Chu Kỳ Phân Bào

Ngừng phân bào bằng colcemid





Nhiễm sắc thể nằm trên đĩa phân bào (metaphase plate)

Phân tích nhiễm sắc thể

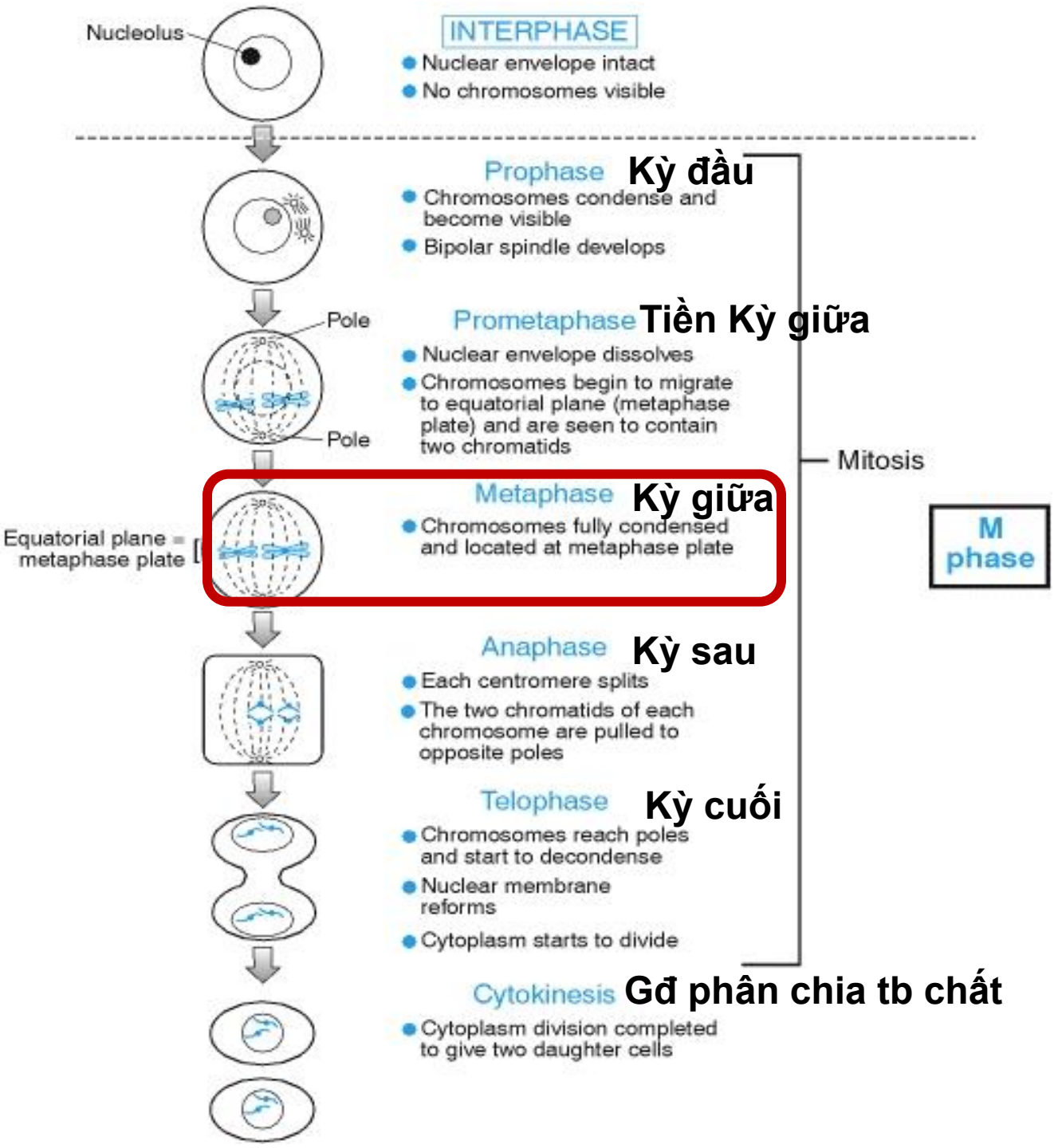
Chu kỳ tế bào: Khoảng 24 giờ

G1 (Gap 1)	: 10 – 12 giờ
S (Synthesis)	: 6 – 8 giờ
G2 (Gap 2)	: 3 – 4 giờ
M (Mitosis)	: 1 giờ

Từ kỳ sau đến trước khi nhân đôi DNA trong gđ S

NST là sợi đơn (n)

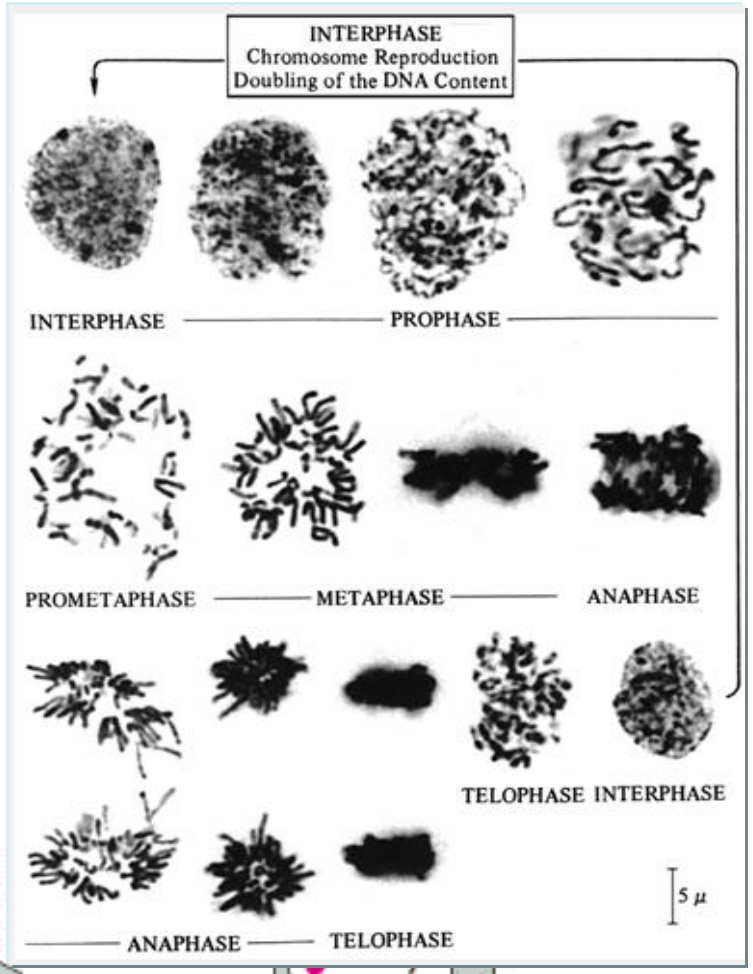
Sự Phân Bào Nguyên Phân (Mitosis)

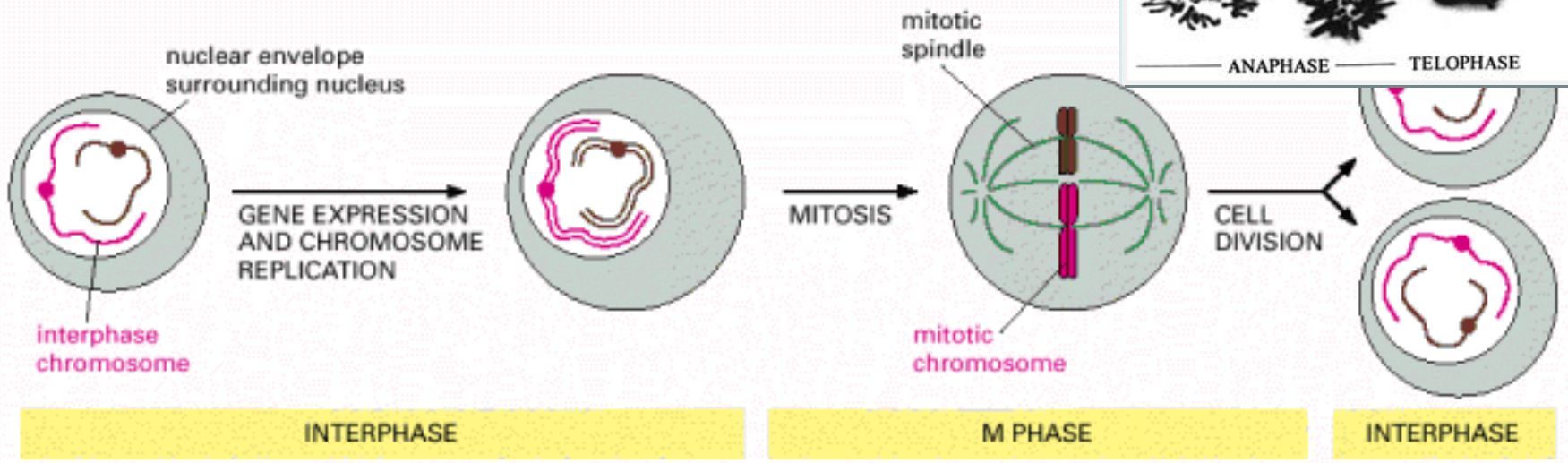


Khái niệm
Interphase và Metaphase

Interphase: là các giai đoạn của chu kỳ tb gồm giai đoạn S, giai đoạn G1 và G2, lúc này NST không quan sát được.

Metaphase: là một giai đoạn của sự phân chia tb, lúc này NST cuộn (condensed) nhiều nhất và dễ phân biệt nhất





Sơ Đồ Băng Của Bộ Nhiễm Sắc Thể

Nhận diện dựa vào kiểu băng đặc hiệu của từng NST



Cách Gọi Tên Nhánh và Băng NST

- Nhánh ngắn (p) và nhánh dài (q)
- Cách gọi tên băng NST: tùy vào độ phân giải băng 400 – 550 – 850.
- Ví dụ về băng nhánh p của NST 1 khi nhuộm 400 băng, gồm p1, p2 và p3, trong đó:

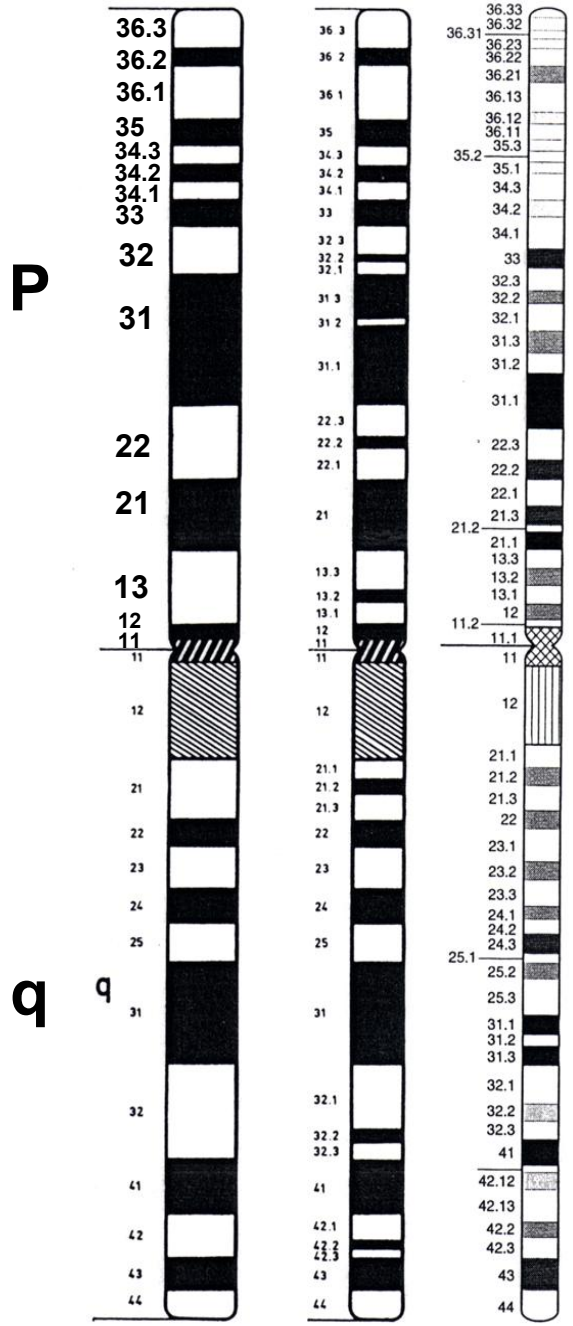
P1: p11, p12, p13

P2: p21, p22

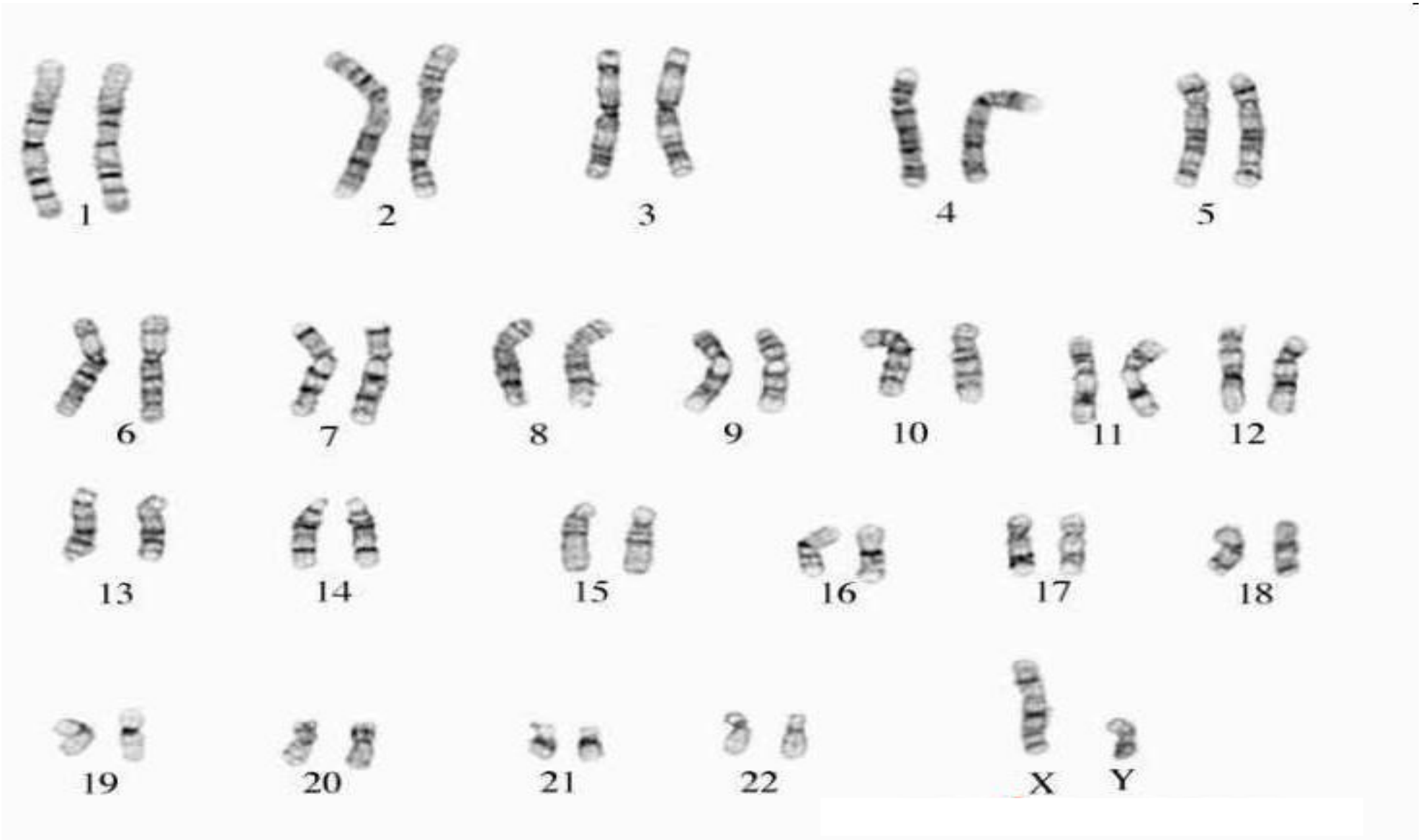
P3: p31, p32, p33,

p34 (p34.1, p34.2, 34.3), p35,

p36 (p36.1, p36.2, p36.3)



Sơ Đồ Băng Của Bộ Nhiễm Sắc Thể



NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

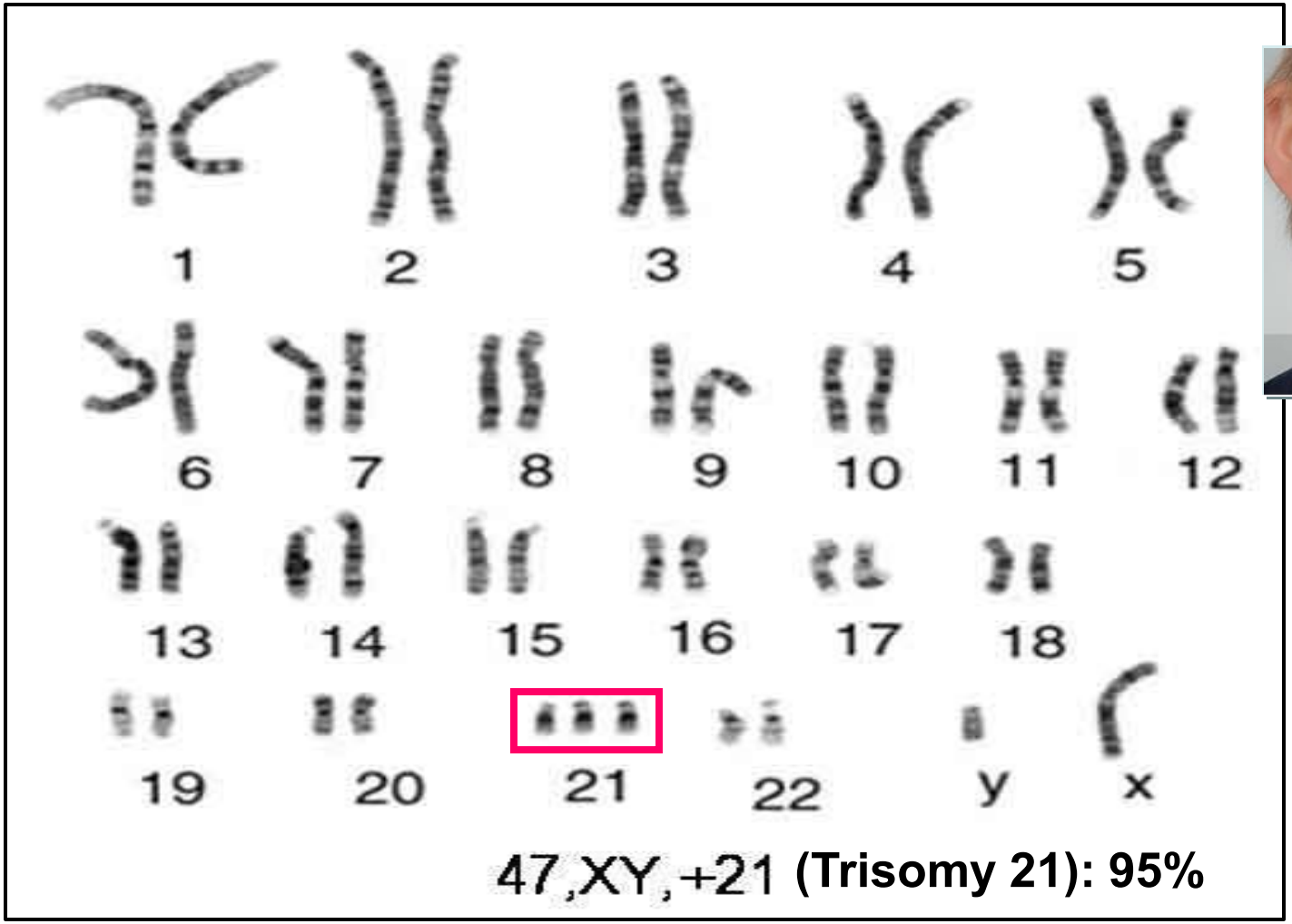
C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

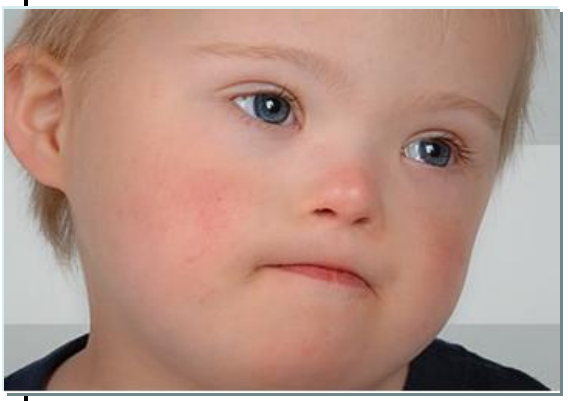
Các Rối Loạn
Số Lượng NST Thường Gặp

1. Hội chứng Down: trisomy 21
2. Hội chứng Edward: trisomy 18
3. Hội chứng Patau: trisomy 13
4. Hội chứng Klinefelter: 47,XXY
5. Hội chứng Turner: 45,X
6. Đa bội trong ung thư

Hội chứng Down



47,XY,+21 (Trisomy 21): 95%





Robertsonian translocation: 3-4% (có thể là partial trisomy 21)

Mosaicsm: gồm - dòng tb bình thường
- dòng tb có trisomy 21

Các rối loạn gen trong hội chứng Down

Sự hiện diện thêm 1 NST 21 → tăng thêm 1 phần gen → tăng biểu hiện các gen trên NST 21:

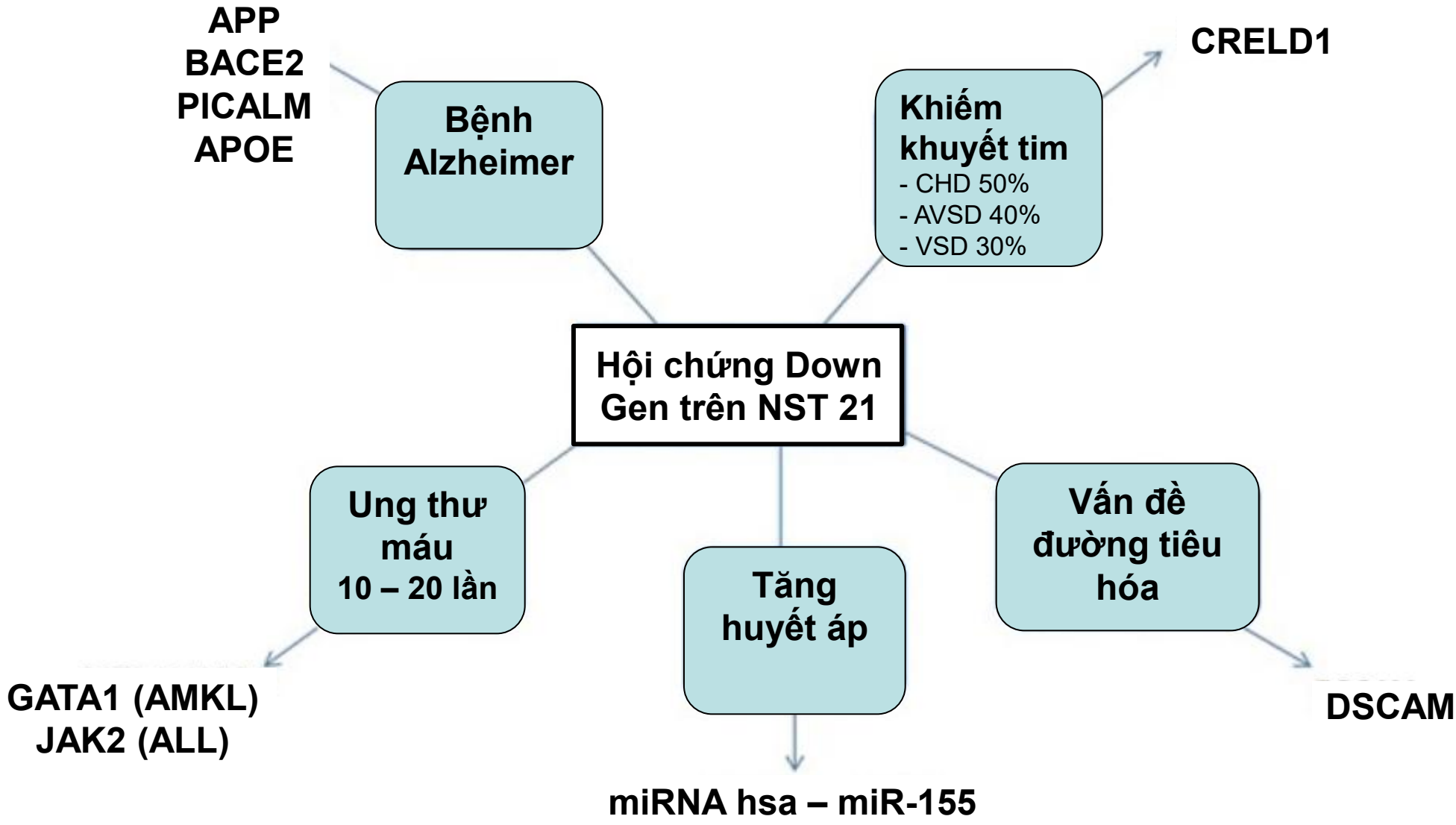
- **Superoxide Dismutase (SOD1): có thể gây lão hóa sớm và giảm chức năng hệ miễn dịch**
- **COL6A1: có thể gây khiếm khuyết ở tim**
- **ETS2 : có thể gây bất thường xương**
- **CAF1A: có thể gây bất lợi cho việc tổng hợp DNA**
- **Cystathione Beta Synthase (CBS): có thể gây phá vỡ sự trao đổi chất và sửa chữa DNA**
- **DYRK: có thể là nguyên nhân gây chậm phát triển tâm thần**
- **CRYA1: có thể là nguyên nhân gây đục thủy tinh thể**
- **GART: có thể phá vỡ sự tổng hợp và sửa chữa DNA**
- **IFNAR (gen cần cho biểu hiện interferon): có thể can thiệp vào hệ thống miễn dịch cũng như các hệ thống cơ quan khác**

Các rối loạn gen trong hội chứng Down

Bất thường tạo dòng tủy thoáng qua (TAM: Transient abnormal myelopoiesis):

- TAM thường tự mất đi ≤ 3 tháng; nhưng khoảng 10% BN tử vong do suy gan hoặc đa cơ quan.
- Có đột biến GATA binding protein 1 (GATA1)
- Phát triển AML liên quan Down syndrome (AML-DS)

Các rối loạn gen trong hội chứng Down



Hội chứng Edwards: trisomy 18



- 1/3000 trẻ mới sinh
- Khiếm khuyết tim
- Gan lạc chỗ
- Tai thấp
- Tay bất thường
- Chậm phát triển tâm thần nặng
- 98% sảy thai
- Sống <1 năm

Có 3 dạng:
+ Trisomy 18
+ Mosaicsm
+ Translocation



Các rối loạn gen trong hội chứng Edwards

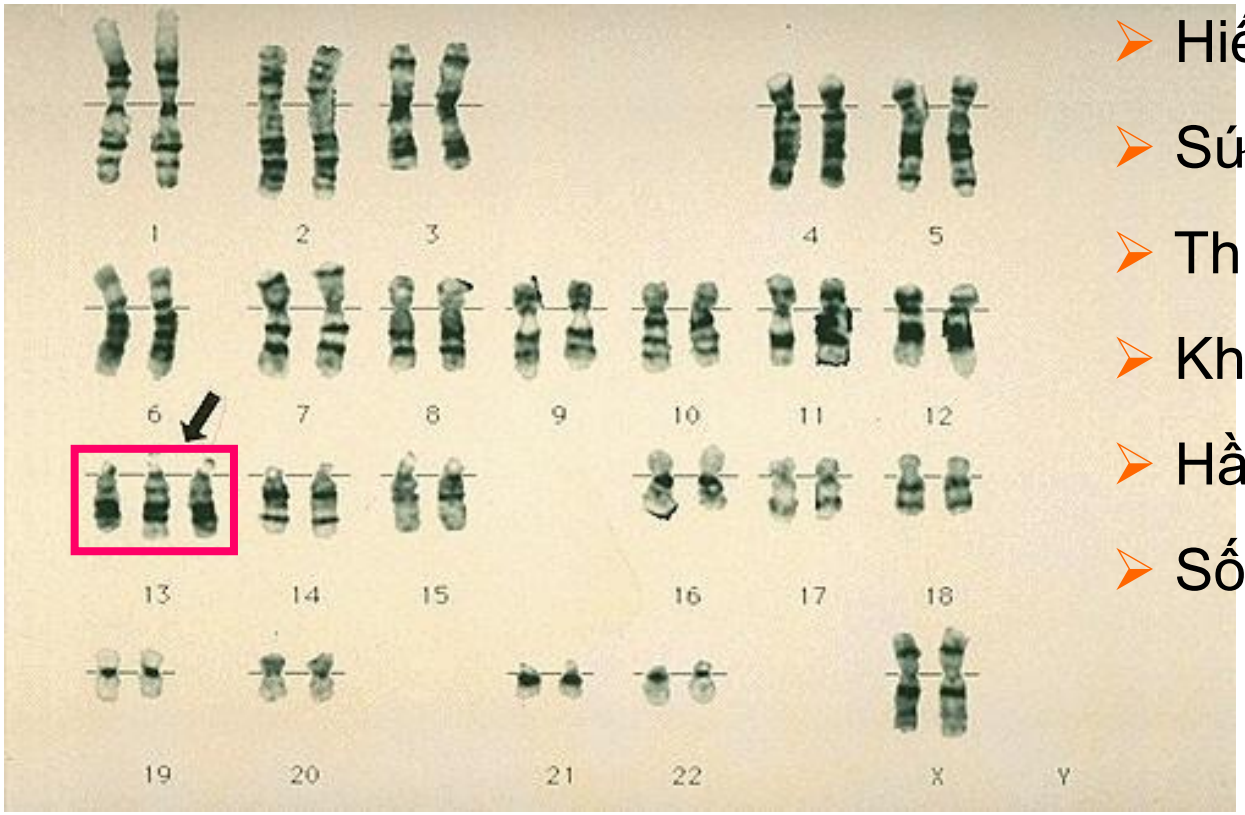
Sự hiện diện thêm 1 NST 18 → tăng thêm 1 phần gen → Biểu hiện bất thường của những gen quan trọng trong sự phát triển cơ thể trên NST 18:

- Nghiên cứu biểu hiện gen bằng KT microarray trên tế bào dịch ối và gai nhau của nhóm có NST đồ bình thường và nhóm trisomy 18 → tăng biểu hiện gen Transthyretin (TTR) và thay đổi mạnh các yếu tố sao mã hạ nguồn /trisomy 18

- Tăng biểu hiện của TTR cũng tìm thấy trên mô gan và ruột những trường hợp trisomy 18 ở tuần 20-23 của thai.

- TTR vận chuyển thyroxine và retinol → quan trọng cho việc phát triển bình thường của thai nhi.

Hội chứng Patau: trisomy 13



- Hiếm: 1/6000 trẻ mới sinh
- Sứt môi và hở hàm ếch
- Thừa ngón tay và ngón chân
- Khiếm khuyết: tim, não, thận
- Hầu hết sảy thai
- Sống < 1 tháng



Có 3 dạng:
+ Trisomy 13
+ Mosaicsm
+ Translocation

Thể khảm điển hình thì triệu chứng ít nặng nề hơn. Tuy nhiên, biểu hiện bệnh có thể thay đổi từ gần bình thường đến đầy đủ triệu chứng.

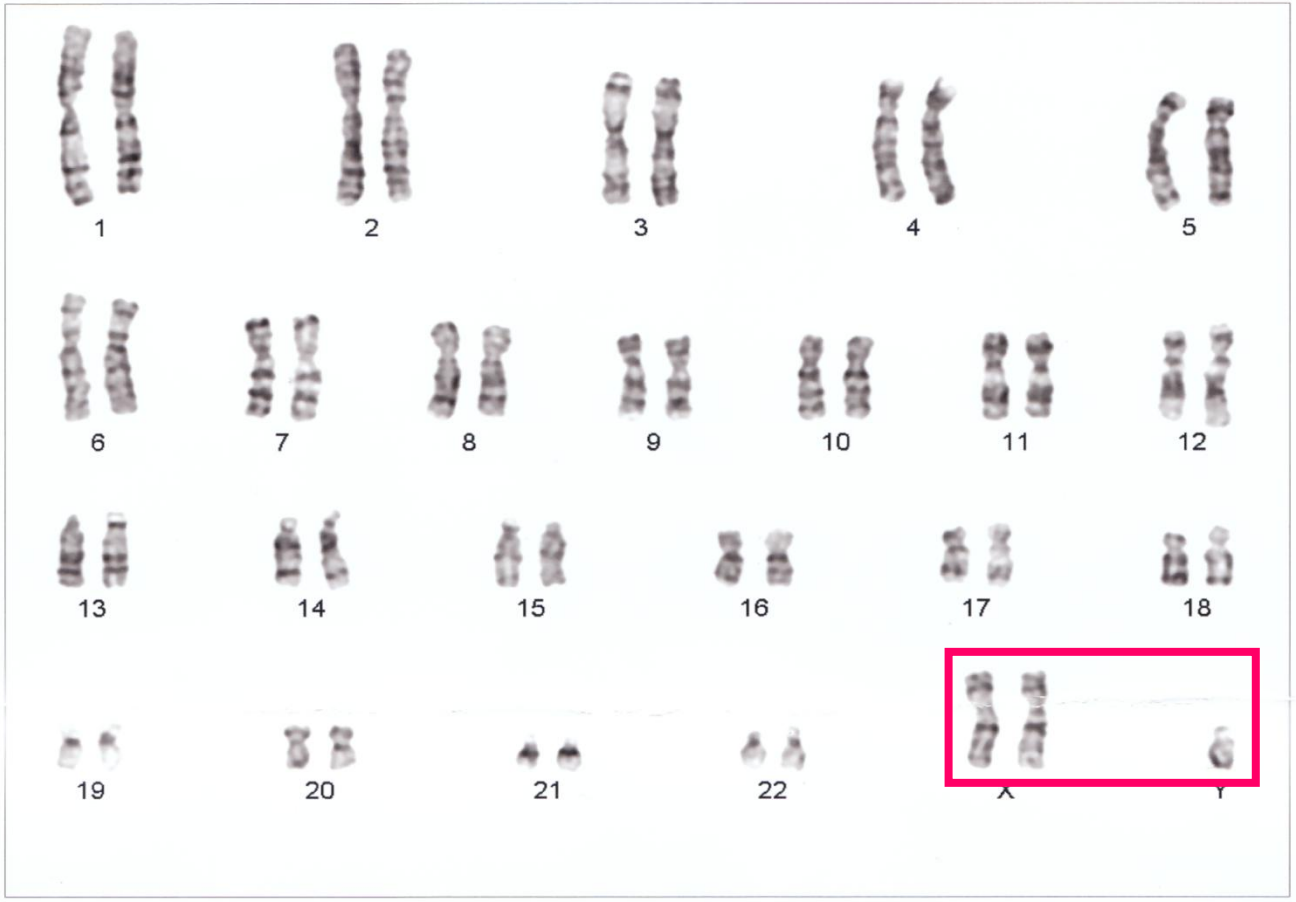
Các rối loạn gen trong hội chứng Patau

Sự hiện diện thêm 1 NST 13 → tăng thêm 1 phần gen → tăng biểu hiện các gen quan trọng trong sự phát triển trên NST 13:

➢Esterase D (ESD, định vị tại 13q14.11) là thành viên của nhóm enzyme thủy phân ester có vai trò trong việc giải độc vì vậy nó có vai trò trong sự phát triển của gan và thận.

➢Tăng biểu hiện của esterase D được tìm thấy trên mô thận của thai nhi có trisomy 13 → có thể liên quan đến việc tạo thành những bất thường.

Hội chứng Klinefelter: 47,XXY



Thường gặp là nam: 47,XXY

Các dạng thay đổi của NST (rất hiếm gặp)

- Nam: 46,XX
- Nữ: 47,XXY
- Nam: 47,XX,der(Y)
- Nam: 47,X,der(X),Y
- Các bất thường số lượng NSt khác:
  - 48,XXXY
  - 48,XXYY
  - 49,XXXXY

Các rối loạn gen trong hội chứng Klinefelter

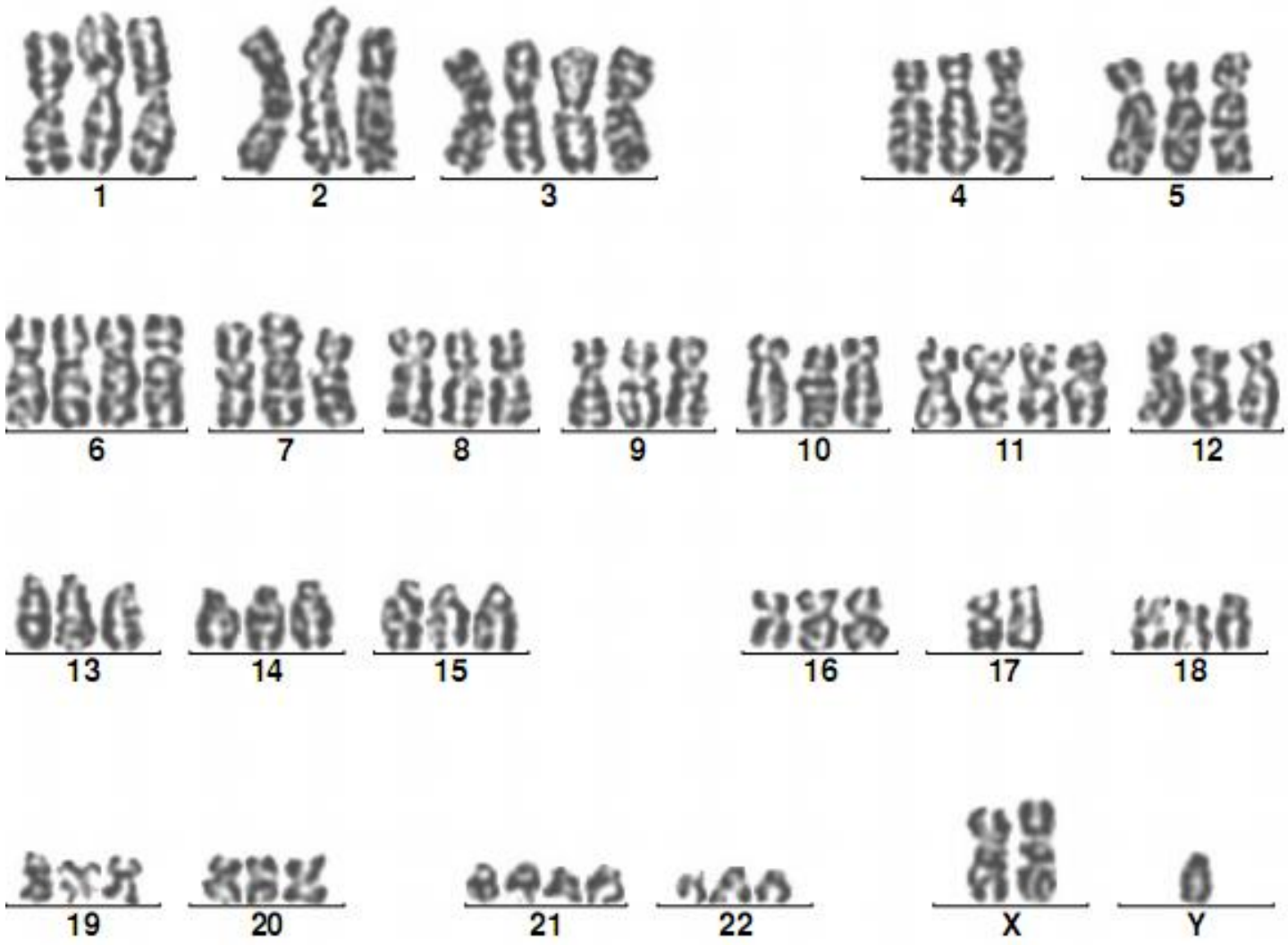
Sự hiện diện thêm 1 NST X → tăng thêm 1 phần gen → tăng biểu hiện các gen trên NST X → giảm biểu hiện của các gen chịu trách nhiệm việc sản xuất testosterone → giảm đáng kể testosterone trong huyết tương.

➢Nghiên cứu cho thấy có mối liên hệ giữa biểu hiện gen *GTPBP6* (GTP binding protein 6), *TAF9L* và *CXORF21* với nhận thức ngôn ngữ → có thể thiết lập mối liên hệ nhân quả giữa các gen này với phát triển thần kinh và chức năng ngôn ngữ.

➢Tăng biểu hiện của *GTPBP6* trong KS: tương quan nghịch với khả năng ngôn ngữ (tùy thuộc thêm 1 hoặc > 1 NST X)

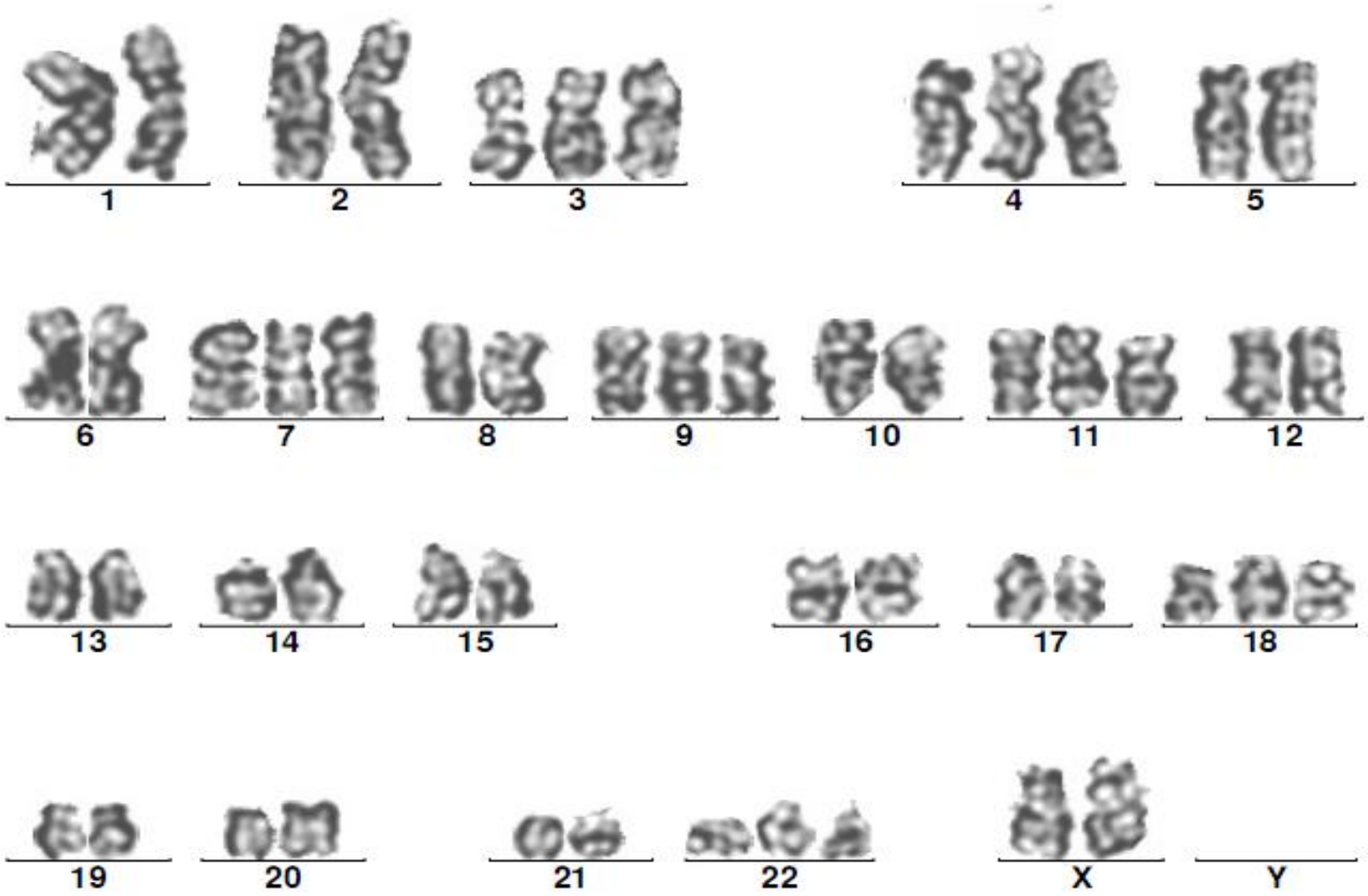
➢Tăng biểu hiện của XIST (X inactive-specific transcript): bất hoạt nhiều gen trên NST X trên KS tương tự như người nữ (XX) (bình thường 1 NST X trên người nữ bị bất hoạt về mặt di truyền để cân bằng về những gen liên kết NST X với nam, nghiên cứu trong gần 5 thập kỷ chứng minh là do XIST locus).

ĐA BỘI TRONG BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO



72,XXY,+1,+2,+3,+3,+4,+5,+6,+6,+7,+8,+9,+10,+11,+11,
+12,+13,+14,+15,+16,+18,+19,+20,+21,+21,+22

ĐA BỘI TRONG BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO



53,XX,+3,+4,+7,+9,+11,+18,+21

Các rối loạn gen trong đa bội NST/BCCDL

- Giảm biểu hiện gen mã hóa asparagine synthetase

- Tăng biểu hiện gen SLC19A1 (mã hóa chất vận chuyển MTX vào tb) trên NST 21 → tăng tích tụ của MTX polyglutamates trong tế bào (thường có 3, 4 NST 21/đa bội)

- Tăng biểu hiện của gen proapoptotic CAS-P8AP2 tại NST 6q15 → tế bào blast đa bội có xu hướng trải qua quá trình chết theo chương trình tế bào một cách tự phát khá rõ

↓ **Giải thích**

Vấn đề nhạy với hóa trị liệu:
corticosteroids, mercaptopurine, thioguanine,
cytarabine, L-asparaginase (ASP) và methotrexate (MTX)

Các rối loạn gen trong đa bội NST/BCCDL

Aspartate + glutamin

ATP ↓ Asparagine synthetase

Asparagine + glutamate

↓ Asparaginase

Aspartic acid + Ammonium

Tế bào ung thư không tự tổng hợp được asparagine, mà sử dụng asparagine trong máu do tế bào bình thường tiết ra

Asparaginase phân hủy asparagine trong máu nên tế bào ung thư không sử dụng được → chết

Mục tiêu điều trị BCCDL: ↓ Asparagine

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

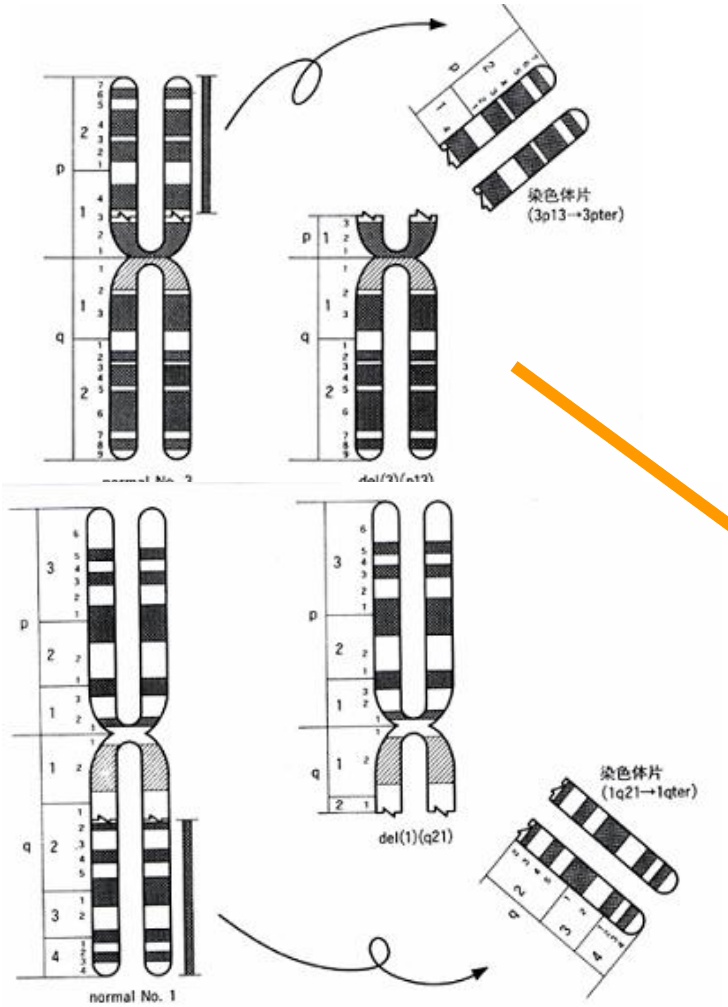
C3. CGH-Array CGH

Một Số Bất Thường Cấu Trúc NST Thường Gặp

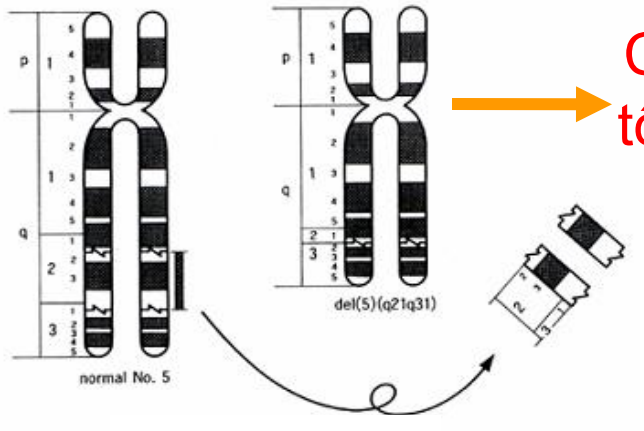
1. deletion: mất đoạn
2. addition: thêm đoạn
3. isochromosome: đồng NST
4. balanced translocation: chuyển vị cân bằng
5. inversion: đảo đoạn
6. insersion: chèn đoạn
7. Ring chromosome

Deletion: mất đoạn

Mất đoạn ở phần nhánh NST

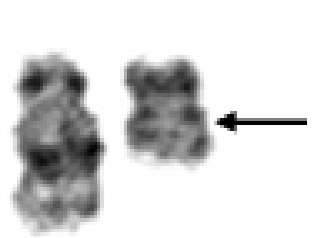


Mất đoạn ở trong NST



Có thể tạo tổ hợp gen

del(5)(q21q31)



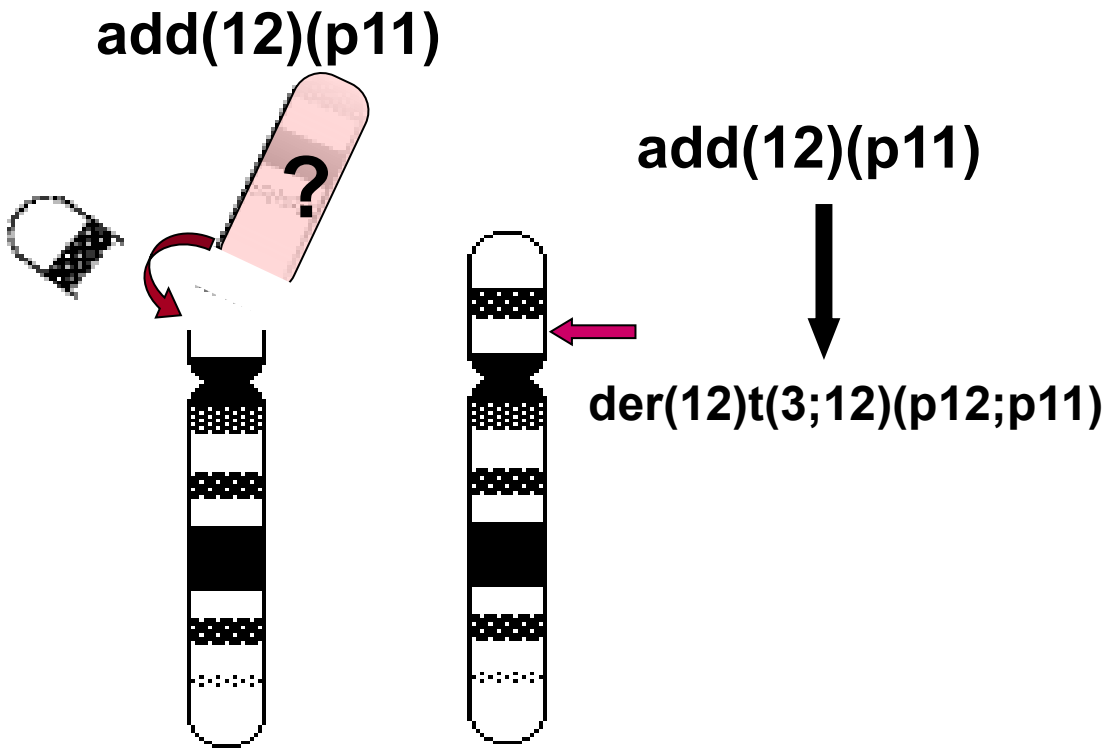
del(5q14)

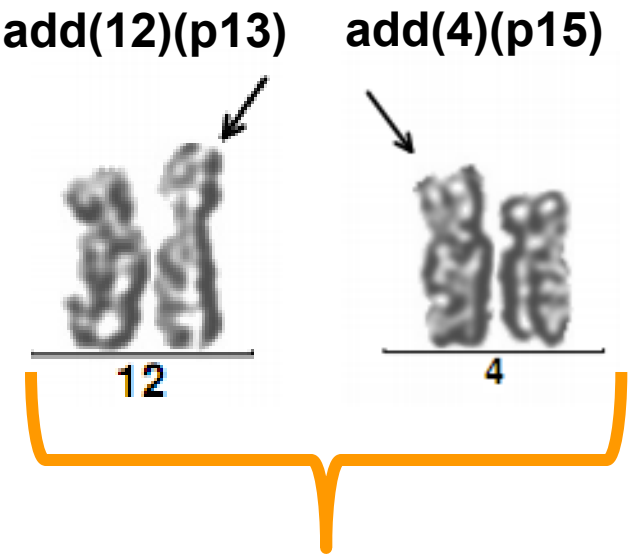


del(7q31)

Giảm 1/2 các gen
ở phần NST bị mất đoạn

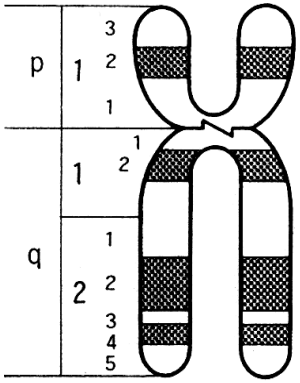
Addition: thêm đoạn



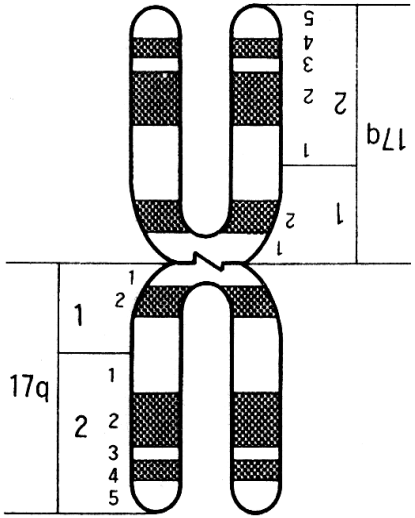


Thêm chất liệu di truyền ở phần NST thêm đoạn (có thể không xác định được phần NST thêm vào)

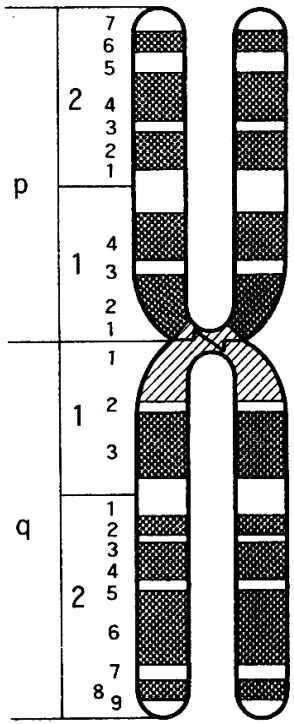
Isochromosome: đồng NST



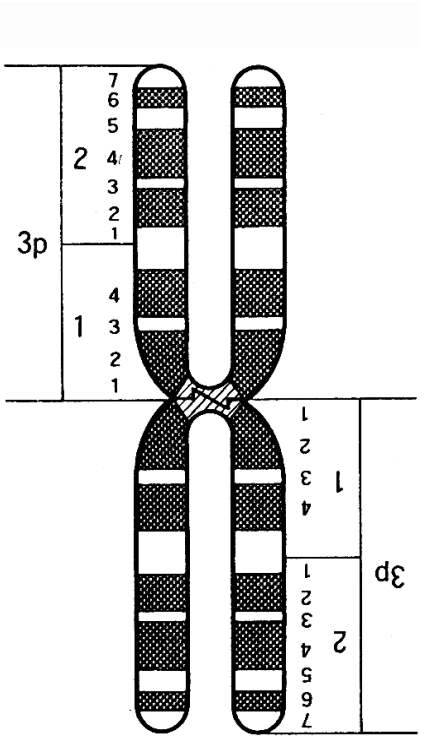
No.17



iso(17q)



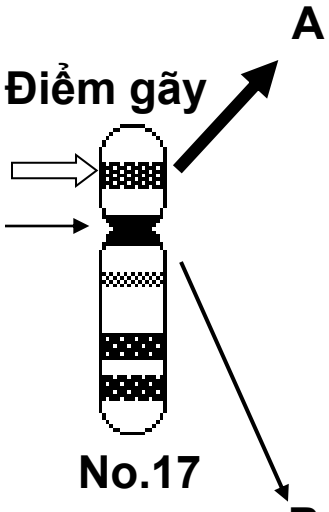
No.3

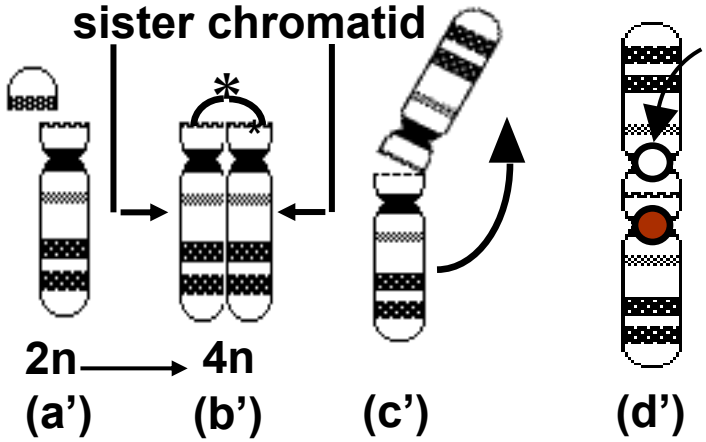


iso(3p)

Tăng thêm 1 lần phần gen của 17q hoặc 3p
(cơ chế tương tự như trisomy)

Cơ chế của đồng nhiễm sắc thể 17





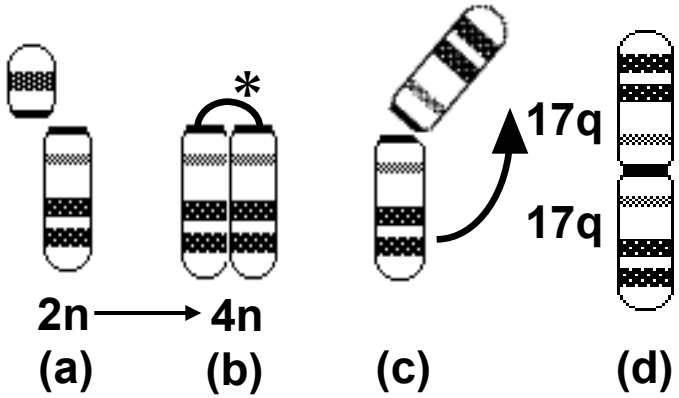
idic(17)(p12)

idic(17)(qter→ p12::
p12 →qter)



i(7)(q11)

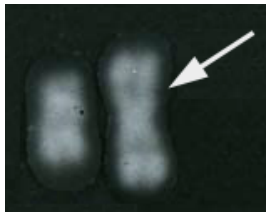
* Kết hợp sister chromatid



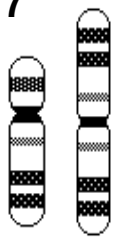
i(17)(q10)

i(17)(qter→q10::
q10→qter)

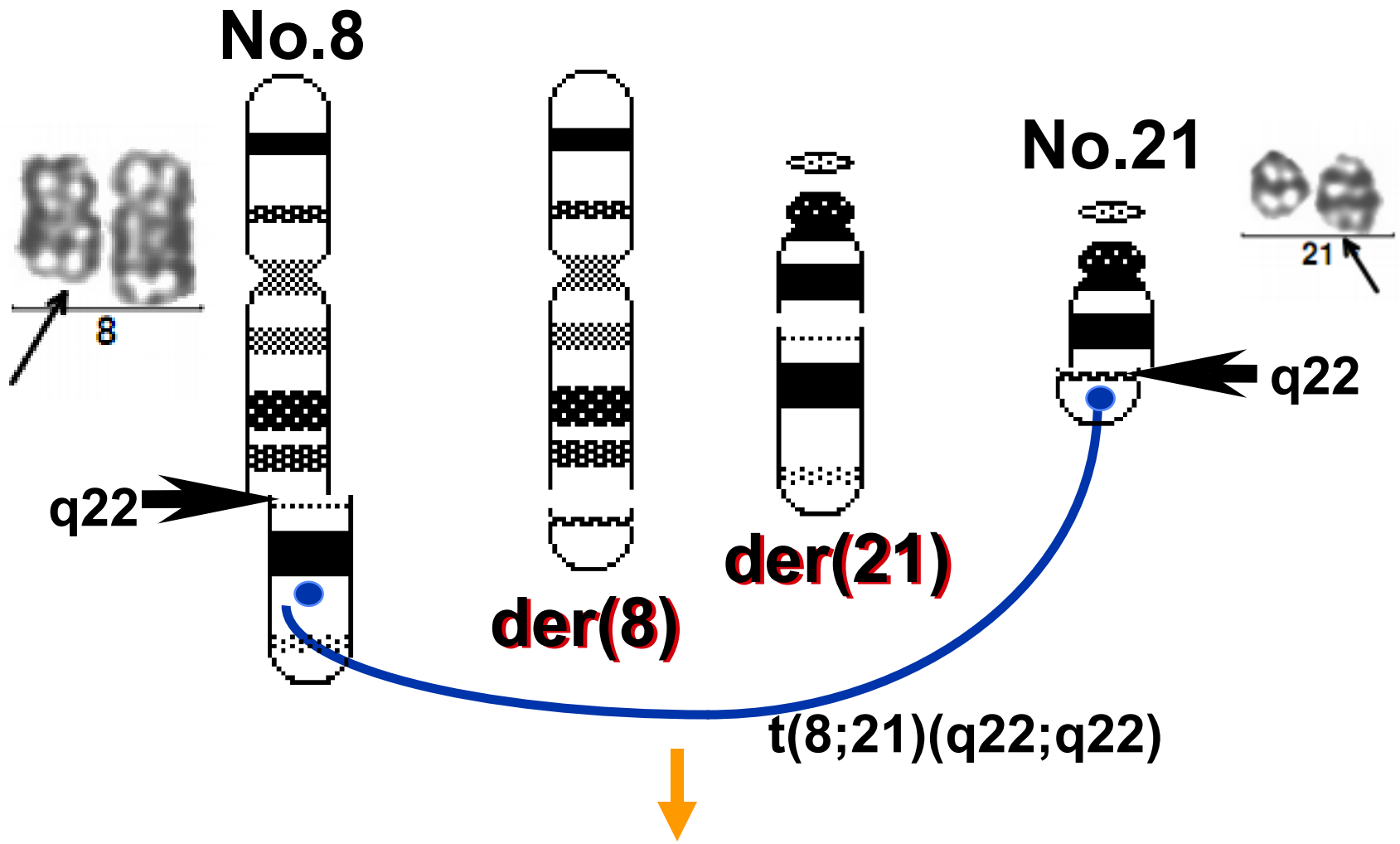
i(17)(q10)



No.17

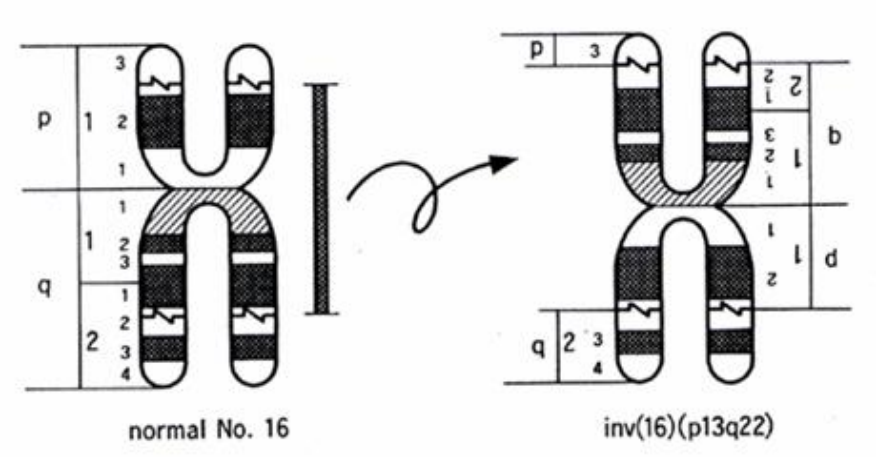


Balance translocation- derivative



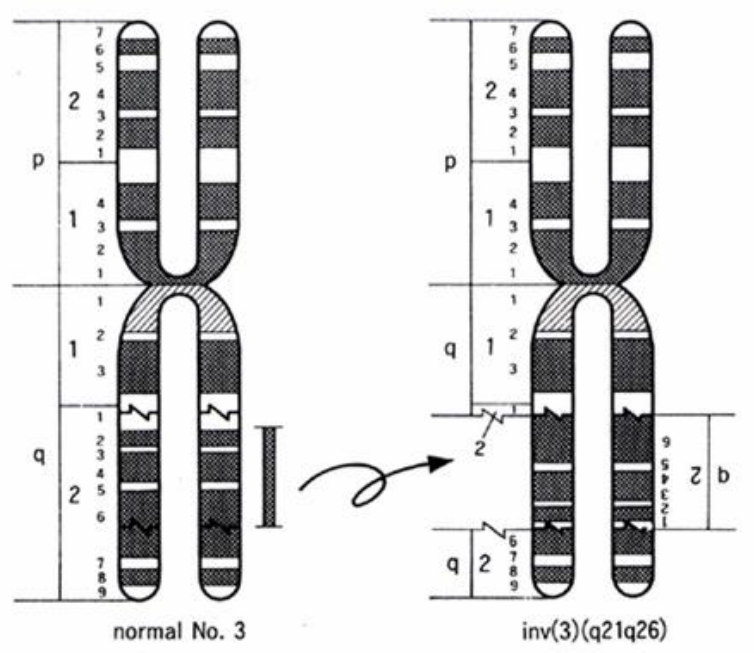
Inversion: đảo đoạn

Đảo đoạn ở 2 nhánh NST



Inv(16)(p13q22)

Đảo đoạn trên cùng 1 nhánh NST

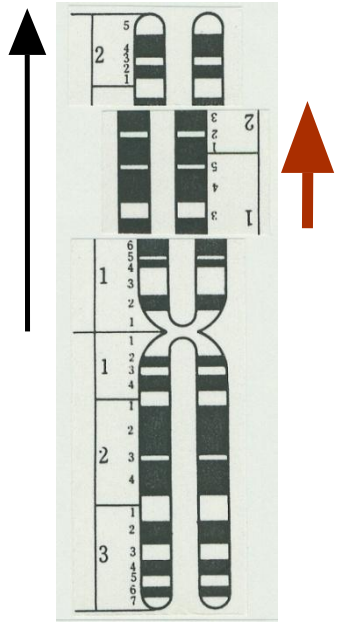


Inv(3)(q21q26)

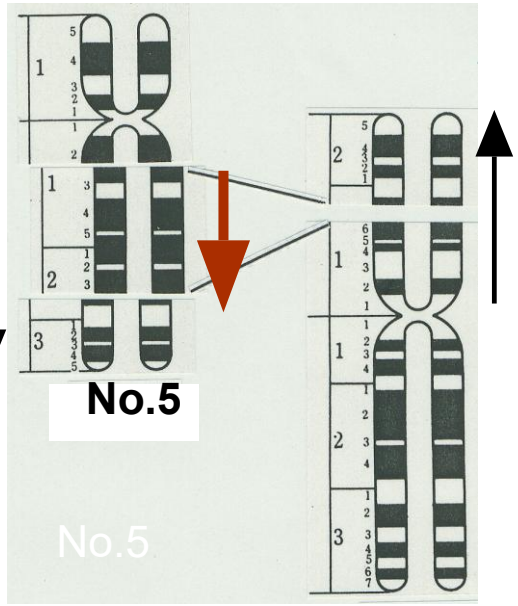
Tạo tổ hợp gen

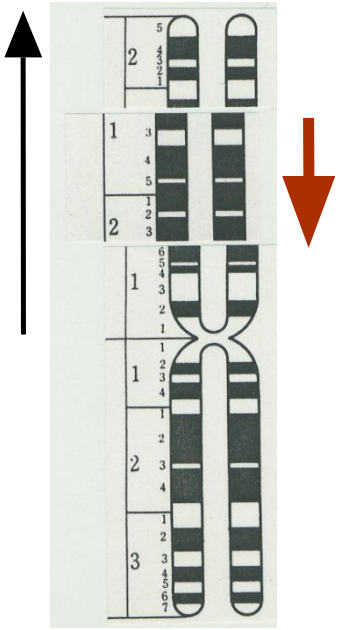
insertion: chèn đoạn

(direct, inverted)



dir ins(2;5)(p16;q13q23)





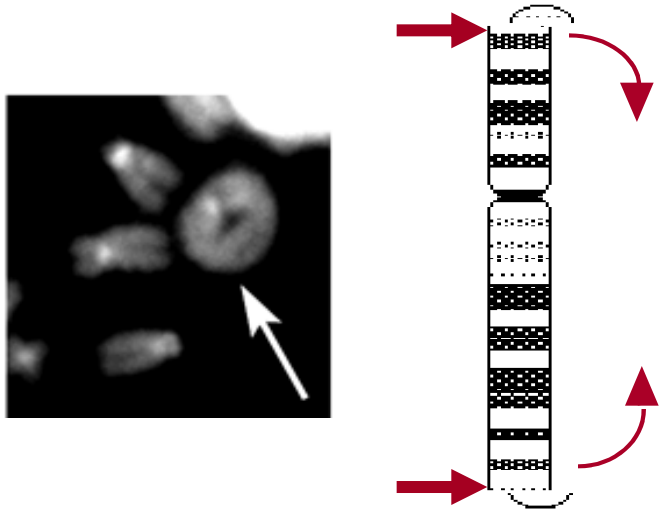
inv ins(2;5)(p16;q23q13)

- Có thể tạo tổ hợp gen
- Có thể tăng thêm phần gen

} Tùy đoạn NST chèn vào

Ring & marker chromosome

ring(2)(p25q37)



Có thể tạo tổ hợp gen

marker chromosome

- ✓ **Có bất thường NST nhưng chưa xác định được**
- ✓ **Khi đã xác định thì định danh bất thường**

mar1, mar2, mar3 ➡ mar1, mar2

⬇

der(5) del(5)(p14)t(5;16)(q32;q22)

DANH PHÁP ĐỌC NST THEO ISCN

International system for

human cytogenetic nomenclature

Có từ năm 1966, sửa đổi qua các năm 1971, 1978, 1985, 1991, 1995, 2009, 2013, 2016, 2020, 2024

XÁC ĐỊNH DÒNG TẾ BÀO BẤT THƯỜNG

1. Bất thường cấu trúc: ≥ 2 tế bào

2. Bất thường về số lượng: ≥ 3 tế bào

46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]/47,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]

MÔ TẢ BẤT THƯỜNG NST

- Số lượng NST viết đầu tiên
- NST giới tính viết trước, sau đó là bất thường trên NST thường.
- Đối với mỗi NST, bất thường số lượng được liệt kê trước bất thường cấu trúc.
- Có nhiều bất thường cấu trúc 1 NST: viết theo thứ tự alphabe để phù hợp với thuật ngữ viết tắt của bất thường.
- Nhiều dòng bất thường khác nhau: mỗi dòng phân cách bởi dấu /
- Dòng NST bình thường nếu có hiện diện luôn được liệt kê sau cùng.

Cách Viết Bất Thường Nhiễm Sắc Thể (1)

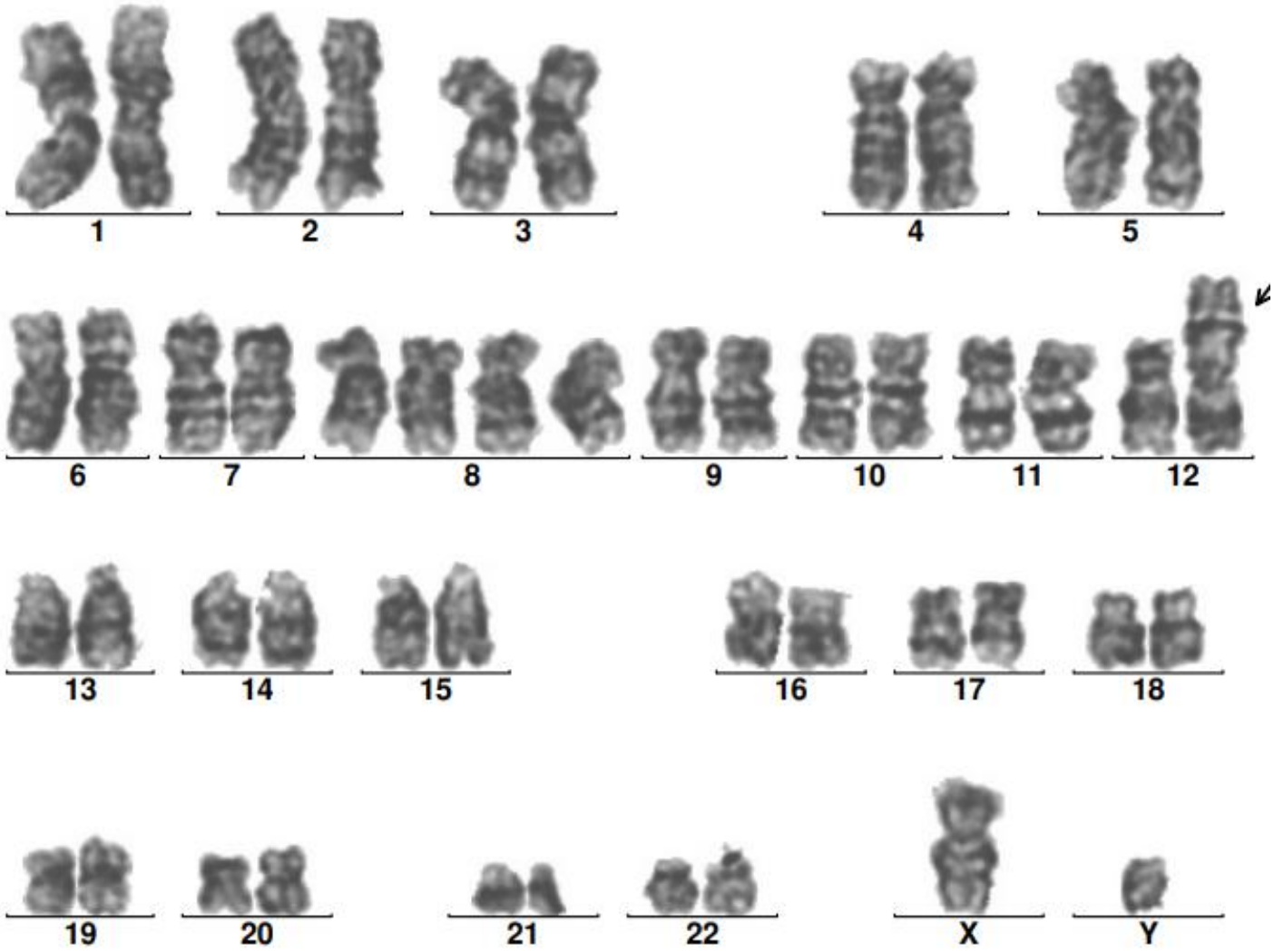
Mô tả chi tiết NST

Cách viết ngắn	Cách viết dài
del(3)(p13)	del(3)(p13 → qter)
del(5)(q12q31)	del(5)(pter → q12::q31 → qter)
der(12)t(1;12)(p12;p13)	der(12)t(1;12)(1pter → 1p12::12p13 → 12qter)
t(9;22)(q34;q11)	t(9;22)(9pter → 9q34::22q11 → 22qter; 22pter → 22q11:: 9q34 → 9qter)

Cách Viết Bất Thường Nhiễm Sắc Thể (2)

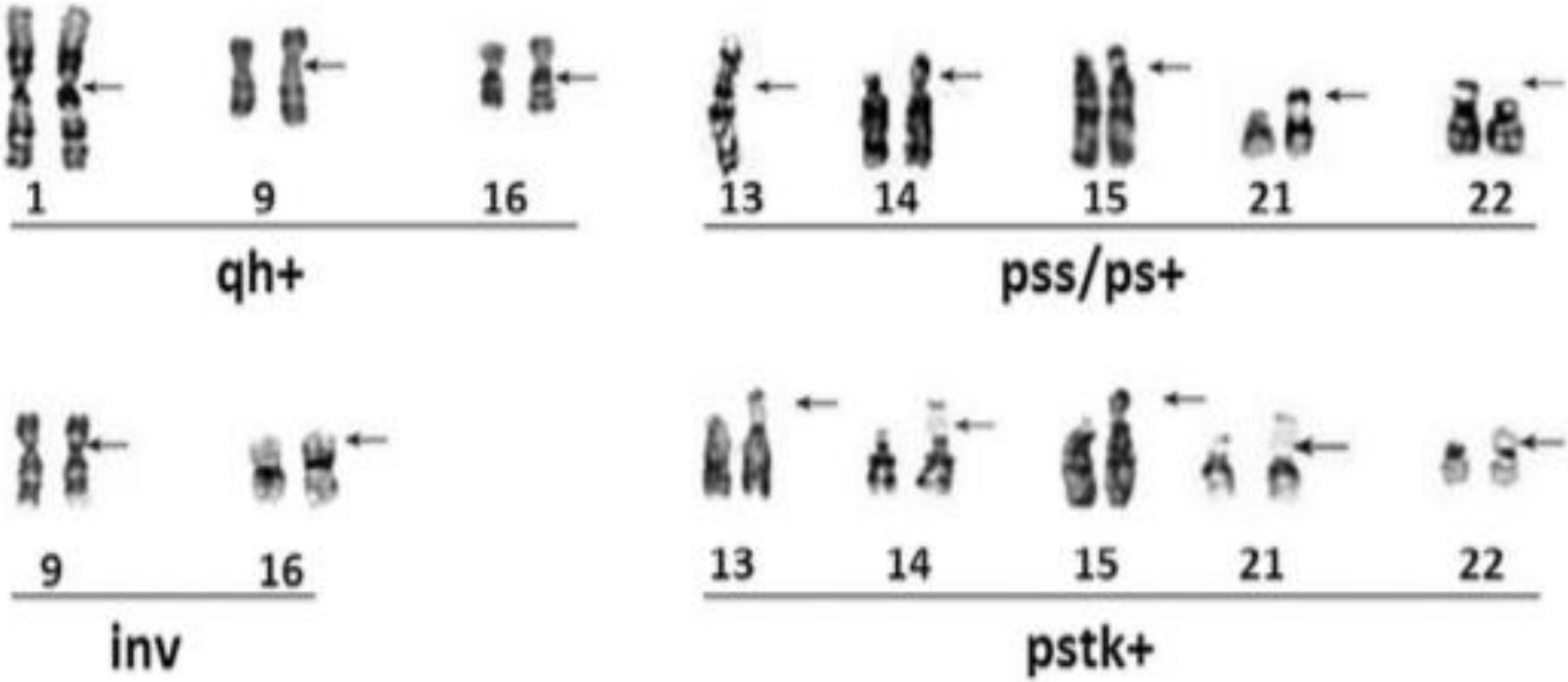
Sai	Đúng
del(5)(q12;q31)	del(5)(q12q31)
d e r (1) t (1 ; 12)	der(1)t(1;12)
t(9,22)	t(9;22)

MỘT SỐ BẤT THƯỜNG NST TRONG UNG THƯ



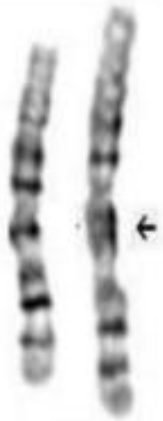
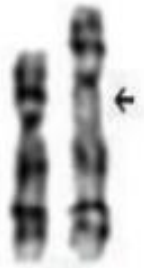
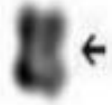
48,XY,+8x2,der(12)t(1;12)(q21;p13)

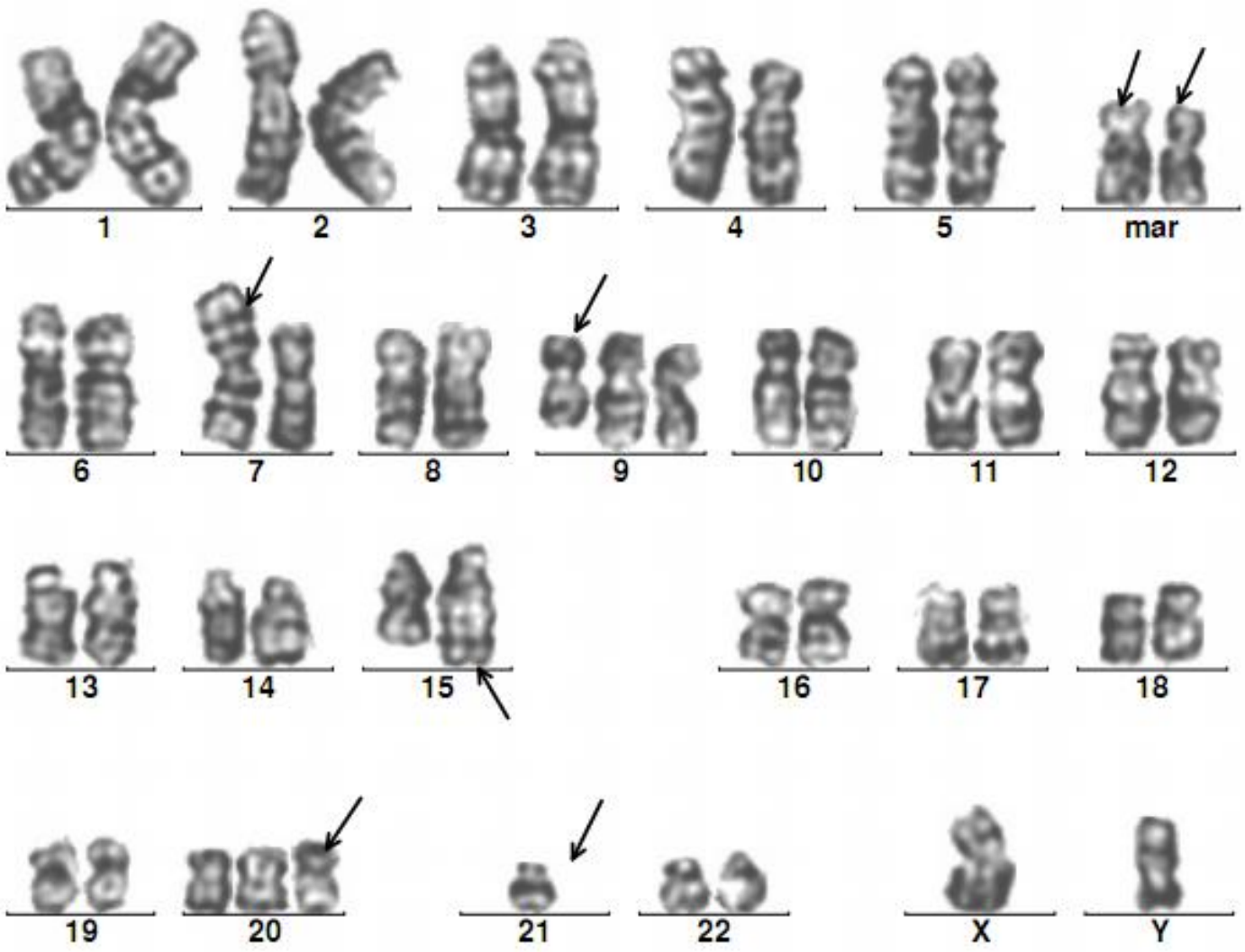
MỘT SỐ BIẾN THỂ VỀ CHIỀU DÀI CỦA NST



Cheng R, 2017 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved

MỘT SỐ BIẾN THỂ VỀ CHIỀU DÀI CỦA NST

Variations of 'q' Heterochromatin	 1qh+	 9qh+	 16qh+
Presence of satellite on Short Arm 'p'	 13ps+	 15pstk+	 21ps+
Inversion	 Inv(6)	 Inv(9)	 Inv(Y)



49,XY,iso(7)(q10),+del(9)(q22),der(15)t(15;21)(q26;q21),
+20,-21,+mar1,+mar2

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

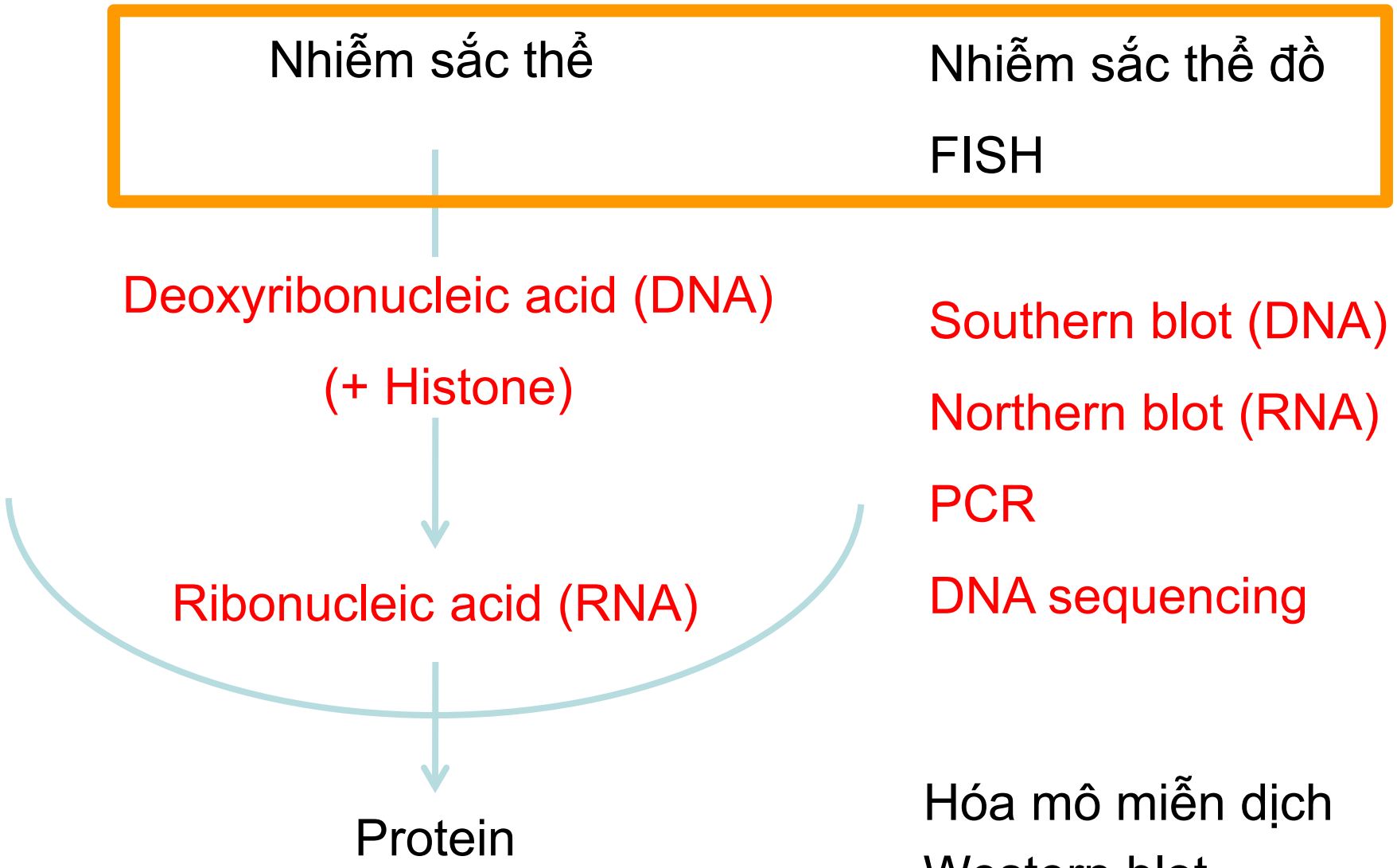
C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

CÁC KỸ THUẬT TƯƠNG ỨNG MỨC PHÂN TỬ



BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ TRONG UNG THƯ

- ✓ Hầu hết các bệnh ung thư đều có bất thường NST (chromosomal instability: CIN)
- ✓ Bất thường về số lượng hoặc cấu trúc

Phát hiện bất thường NST:

- ❖ Giúp cho chẩn đoán:
  CML [t(9;22)(q34;q11)], AML [t(8;21)(q22;q22)], Ung thư bàng quang (NST 3, 7, 9 và 17),…
- ❖ Đánh giá tiên lượng: ung thư máu, khuếch đại gen *HER2* trong ung thư vú, gen *MYCN* trong neuroblastoma,...
- ❖ Giúp quyết định điều trị: Ung thư vú có khuếch đại gen *HER2*, ung thư phổi có gen tổ hợp *EML4/ALK*,...
- ❖ Đánh giá đáp ứng với điều trị, đặc biệt trong ung thư:
  NST Ph trong CML

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

Yếu Tố Cần Thiết Trong Nuôi Cấy NST

1. Bệnh phẩm

- Tủy xương hoặc máu TM (chống đông heparin)
- Dịch ối, gai nhau, da, u đặc …

Nên nuôi cấy càng sớm nếu có thể, tốt nhất là trong 1 - 2 giờ sau khi lấy mẫu. Không được làm đông các mẫu.

2. Môi trường cấy

- RPMI 1640, MEM, Ham F10, McCoys …
- Bổ sung fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, kháng sinh và một số chất kích thích tùy loại tế bào được cấy.

3. Điều kiện nhiệt độ và độ ẩm

- Cấy tế bào ở 37°C, 5% CO_2
- Điều kiện labo lúc thu hoạch, nhuộm băng: nhiệt độ 24 - 27°C, độ ẩm 50-60%.

Các Chất Kích Thích Trong Nuôi Cấy NST

1.Chất chuyển dạng tế bào lympho T trưởng thành

Trong máu người bình thường: # 70% là lympho T

- Phytohaemagglutinin (PHA): PHA-M (mucoprotein form)

- Pokeweed mitogen: vừa chuyển dạng lympho T và B

2. Chất kích thích phân bào khi nuôi cấy rối loạn tb lympho B

- Lympho B giai đoạn non: không dùng chất kích thích

- Lympho B trưởng thành: TPA (*12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate***),**

EBV (*Epstein–Barr virus***), LPS** (*lipopolysaccharide*)…

3. Chất kích thích phân bào khi nuôi cấy rối loạn tb dòng tủy

- Không có mitogen đặc hiệu

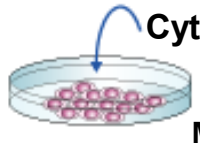
-Thường bổ sung các cytokin: IL3, IL6, GM-SCF,…

(cần thận trọng vì có thể tế bào bình thường cũng phát triển)

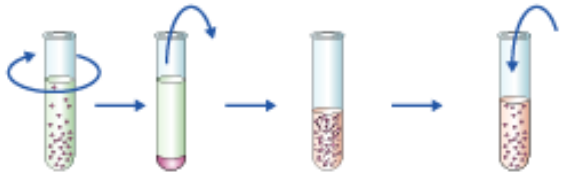
4. Chất kích thích khi nuôi cấy tế bào ối: không có chất kt đặc hiệu

Quy Trình Cấy, Thu Hoạch và Phân Tích NST

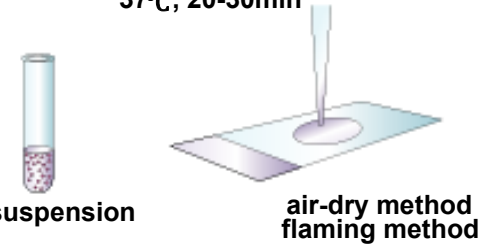
Cấy tế bào



Thu hoạch



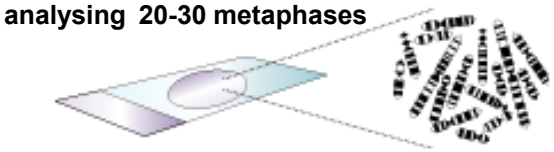
Chuẩn bị tiêu bản



Nhuộm băng

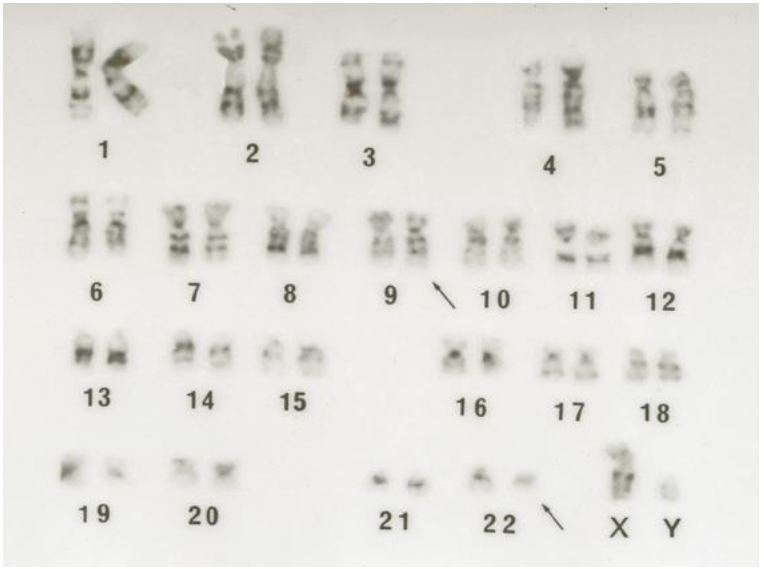


Phân tích



Trả kết quả

Hiện nay, khoảng 20 - 30 tế bào được phân tích để cho ra kết quả. Trong trường hợp có bất thường NST chưa xác định được, chúng ta có thể phân tích thêm hoặc thực hiện các kỹ thuật di truyền phân tử khác.



Các Loại Băng

1.Băng G-------xử lý với trypsin + nhuộm Giemsa

(băng đậm là băng G nhuộm vùng DNA giàu AT)

2. Băng Q-------nhuộm bằng Quinacrine,

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) hoặc Hoechst 33258,

nhuộm vùng DNA giàu AT, giống băng G, KHV huỳnh quang

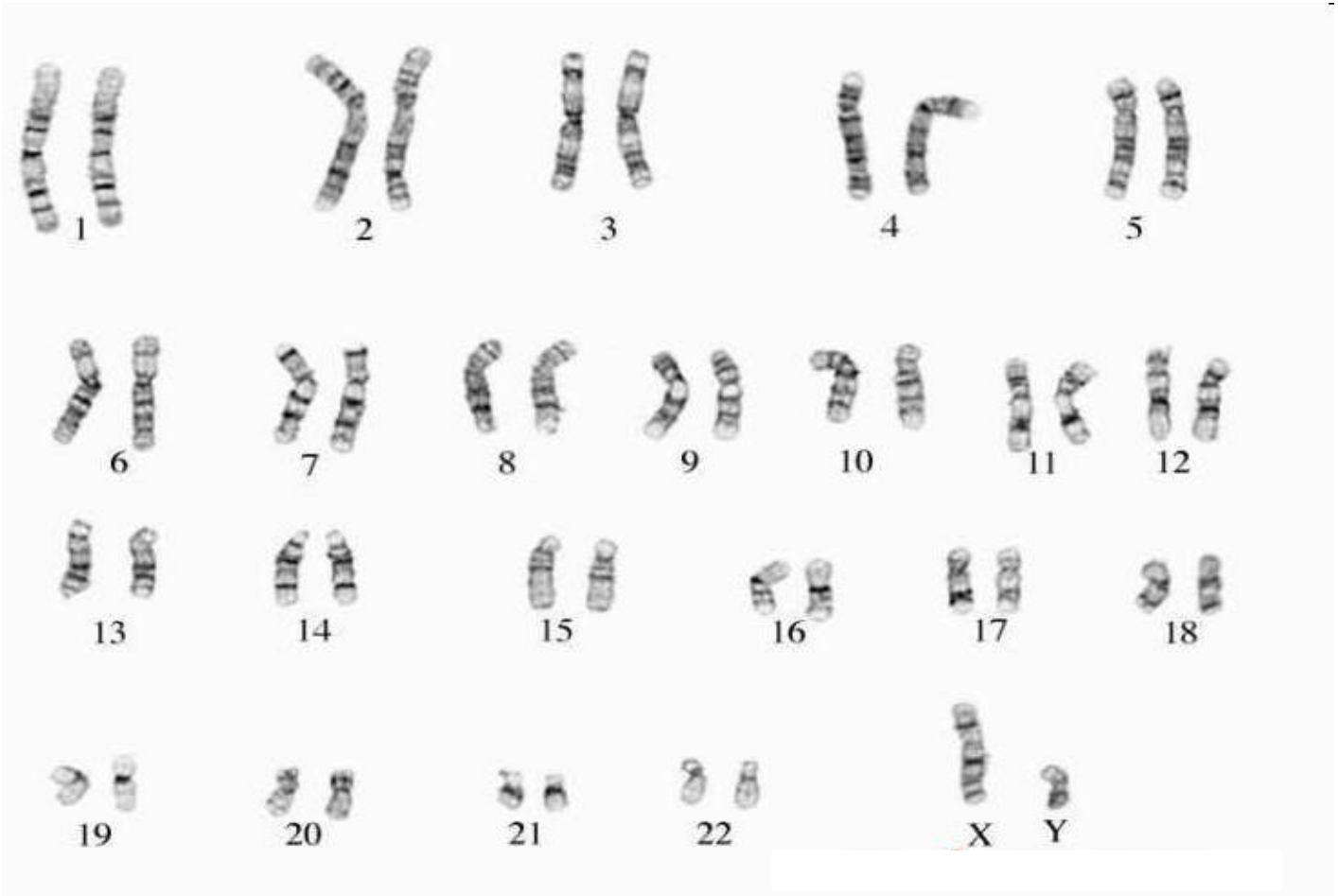
3. Băng R-------Reverse--- ngược với band G (nhuộm vùng GC)

(biến tính trong dd muối nóng – Giemsa)

4. Băng T-------Giống băng R, nhưng nhuộm tập trung Telomere

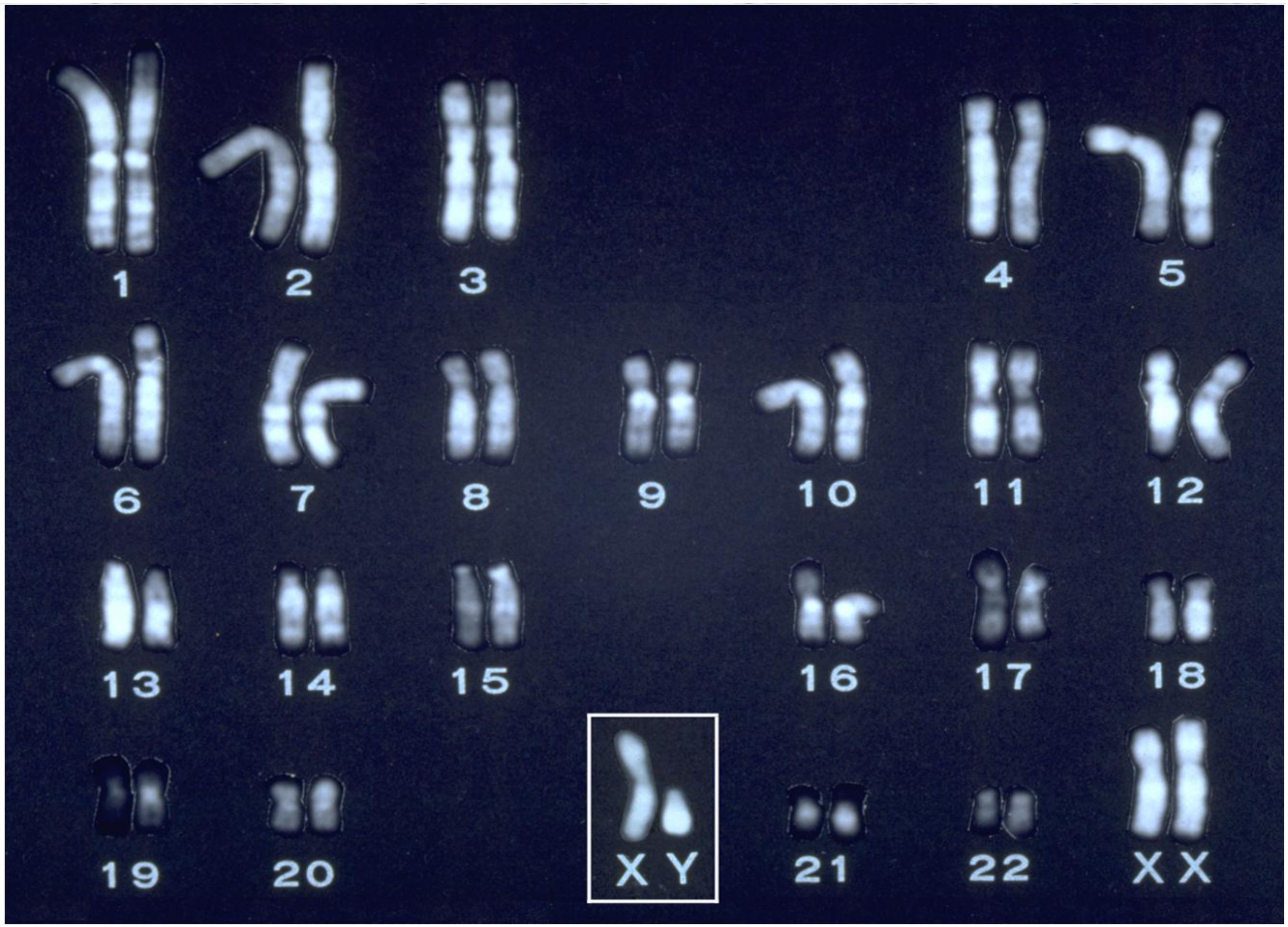
5. Băng C-------nhuộm Centromere (barium hydroxide-Giemsa)

G-banding



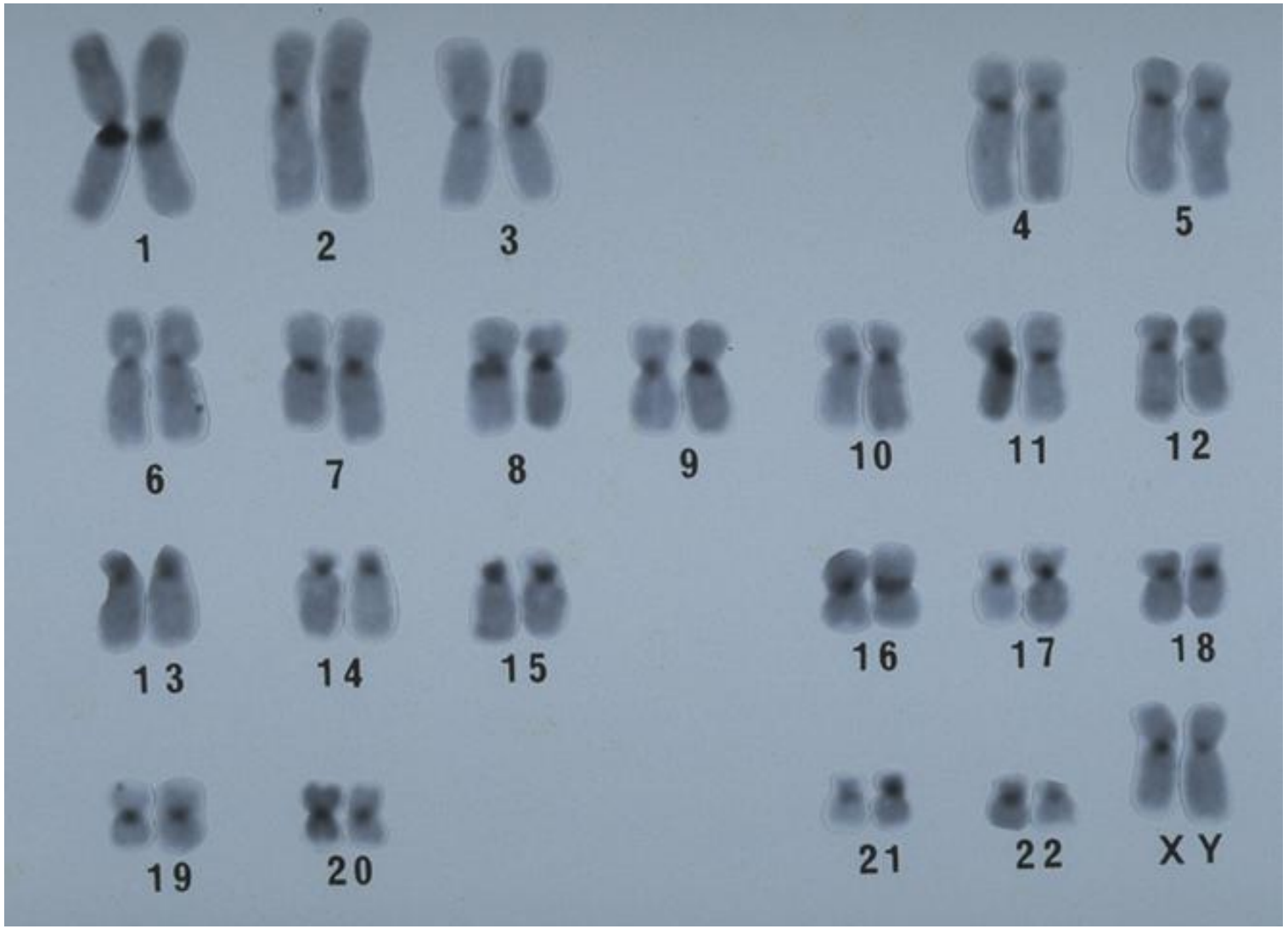
Thường được sử dụng nhất vì sau khi nhuộm lam lưu được lâu (khoảng 2-3 năm)

Q-banding

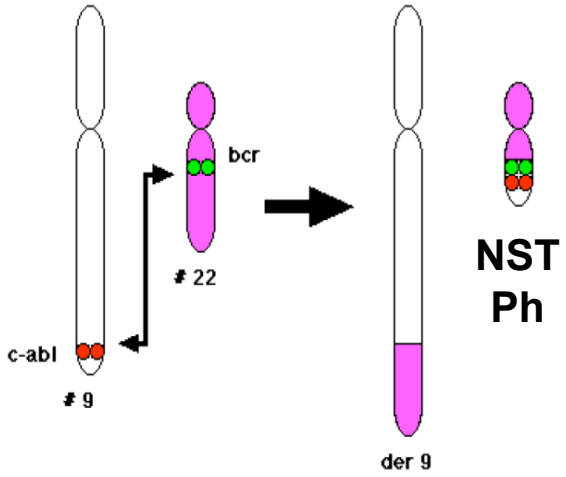


Dễ nhuộm nhưng băng dễ bị hủy khi phân tích dưới KHV huỳnh quang nên không lưu lam được

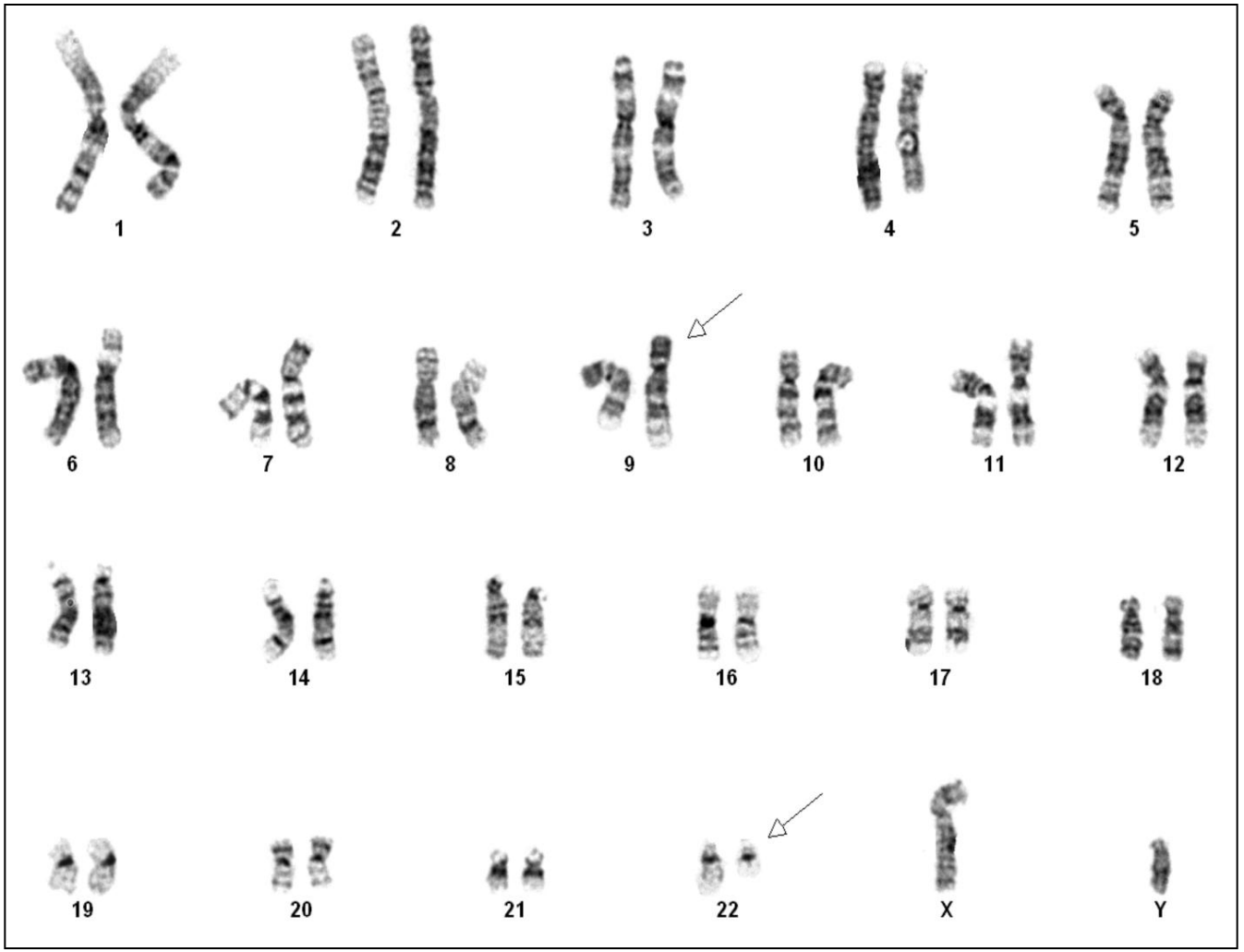
C-banding



NHIỄM SẮC THỂ ĐỒ: BẠCH CẦU MẠN DÒNG TỦY



Chuyển vị NST
t(9;22)(q34;q11)



Ưu và Khuyết Điểm Của NST Đồ

- Ưu điểm:

- **Phát hiện được nhiều dạng bất thường NST trên một bệnh nhân**

- Khuyết điểm:

- **Đòi hỏi tế bào phân chia và phải thu được TB ở kỳ giữa.**
- **Nhận ra bất thường khi băng NST đó ≥ 10 Mb.**
- **Kết quả thường có trong vòng 2 tuần, sớm nhất là 3 ngày.**
- **Không phát hiện được bất thường NST nếu tái sắp xếp ẩn.**
- **Phân tích khoảng 20 - 30 tế bào.**
- **Không phát hiện được khuếch đại gen**

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

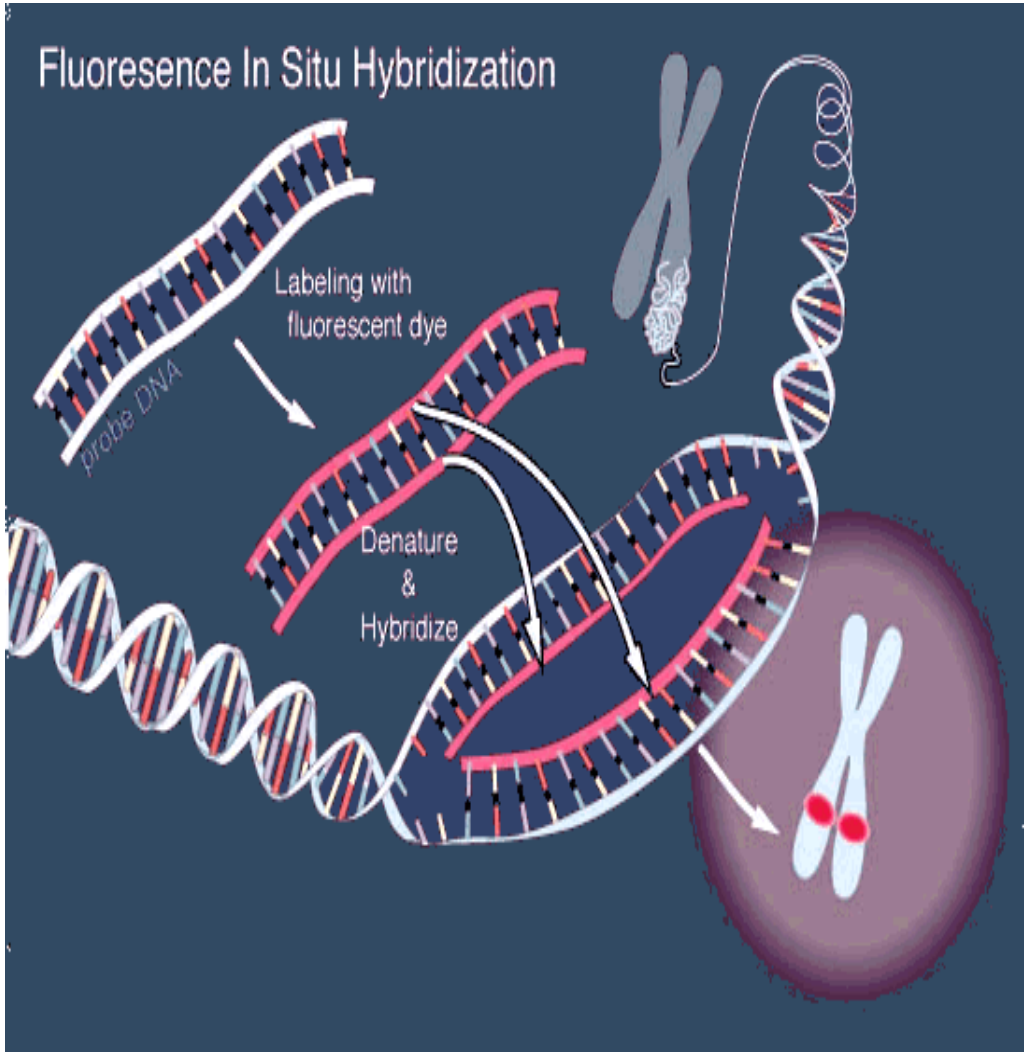
C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

C3. CGH-Array CGH

FISH: NGUYÊN TẮC KỸ THUẬT

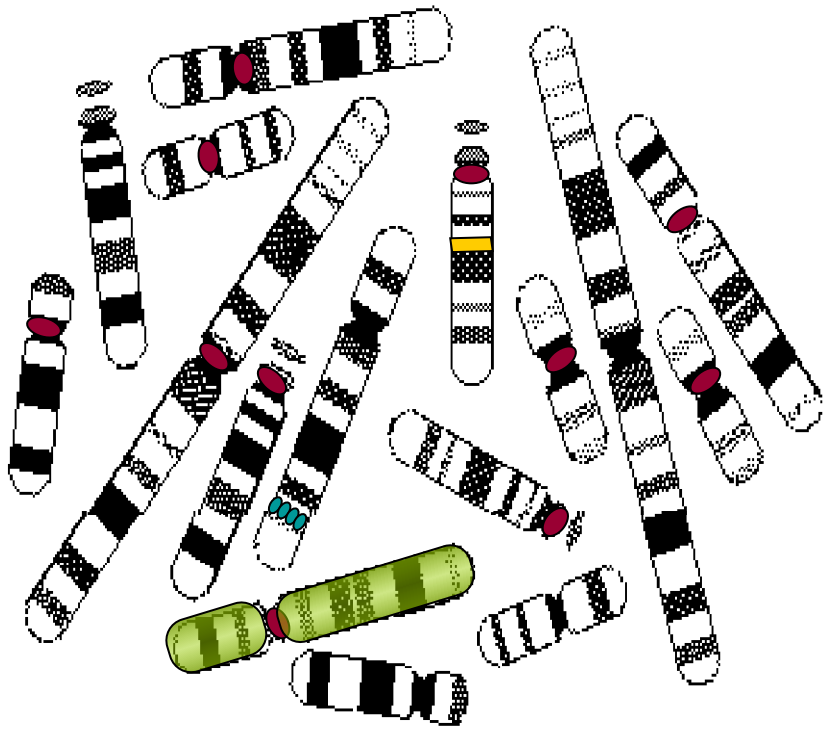


- Mẫu dò (probe): Chuỗi DNA ngắn đã được gắn huỳnh quang
- Biến tính (denature): Chuỗi đôi DNA tách rời thành chuỗi đơn ở 75^0C
- Lai hóa (hybridize): Các chuỗi đơn DNA đặc hiệu sẽ bắt cặp được với nhau ở điều kiện thích hợp

Phát hiện được các chuỗi đặc hiệu nhờ các probe

Những Probe Sử Dụng Cho FISH

- α-satellite probe
- whole painting probe
- BAC/PAC probe (150-200kb)
- gDNA probe for a specific gene(>2kb)
- cDNA probe for a specific gene (>5kb)



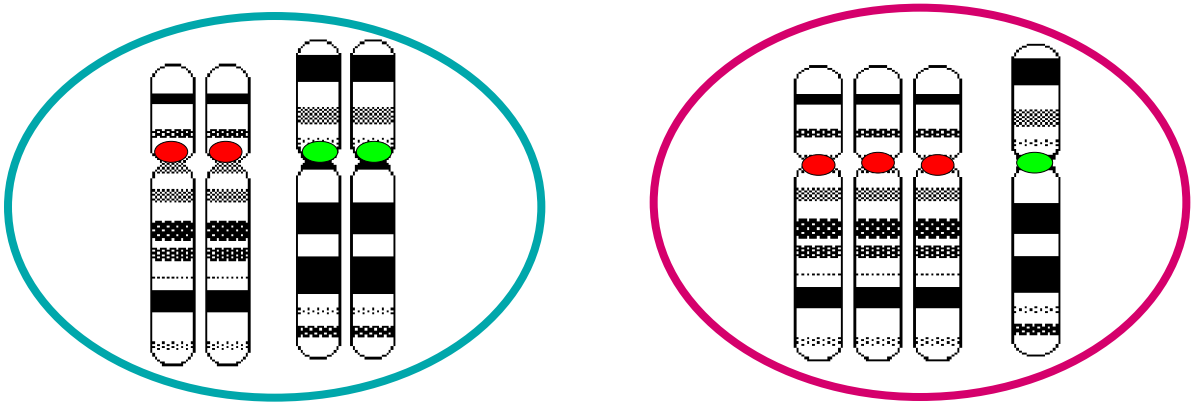
BAC: Bacterial artificial chromosome
PAC: P1 artificial chromosome

Nguyên tắc của interphase và metaphase FISH (1)

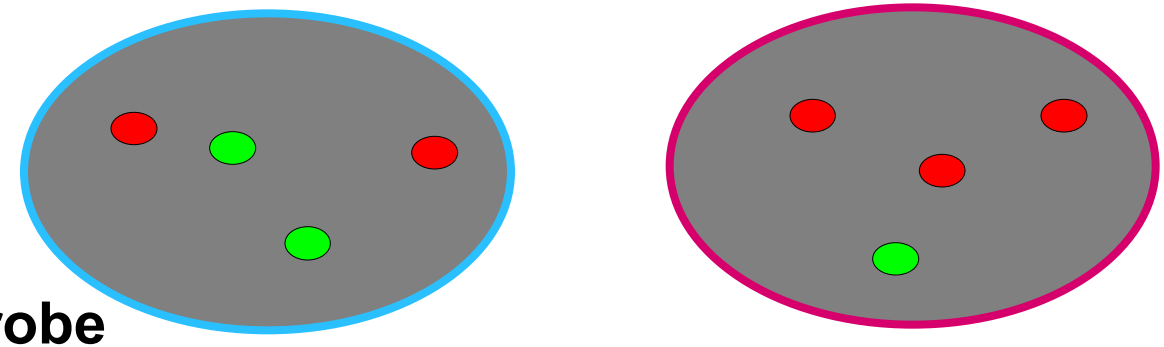
Tế bào bình thường

Tế bào bất thường

Metaphase FISH



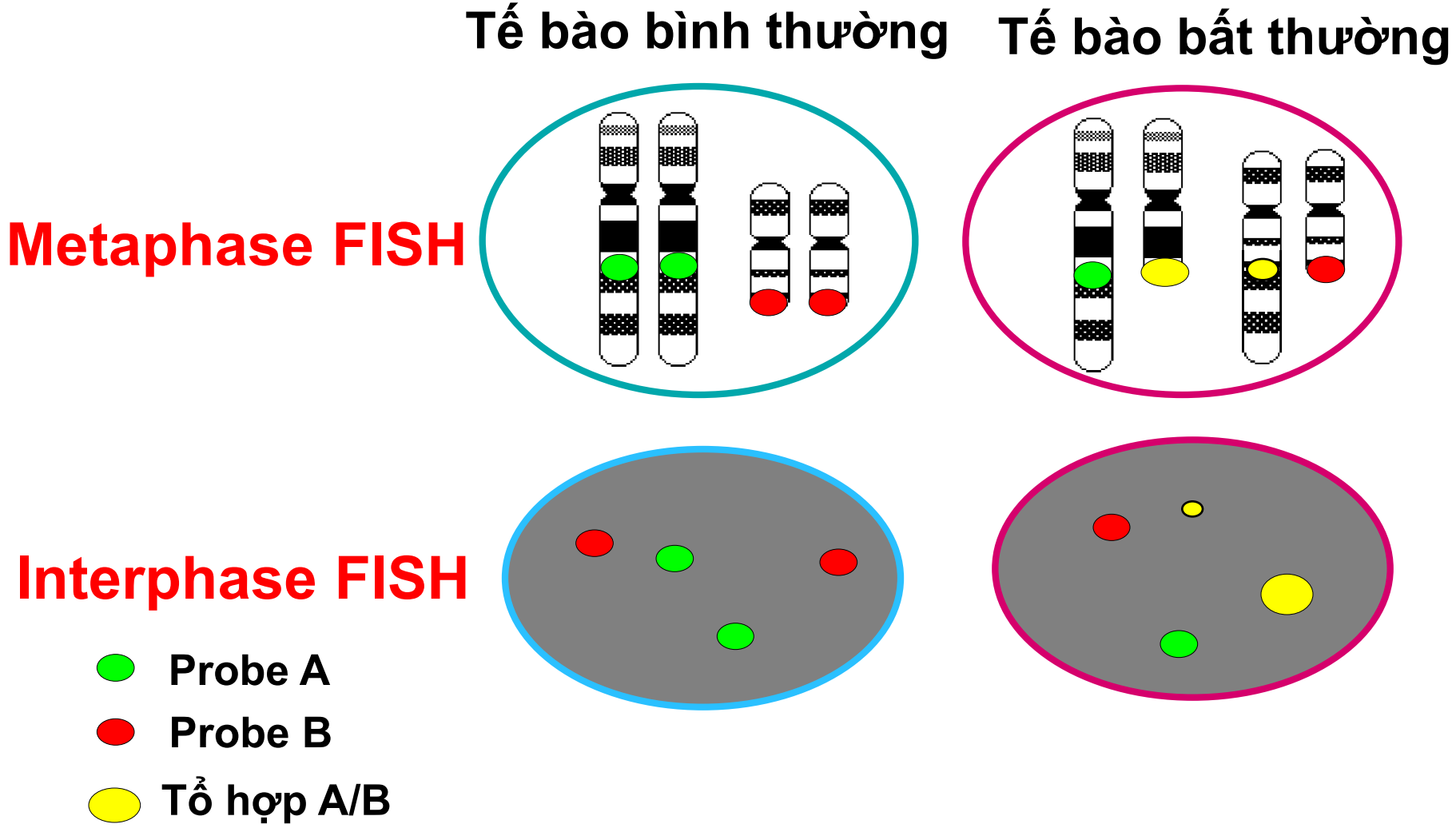
Interphase FISH



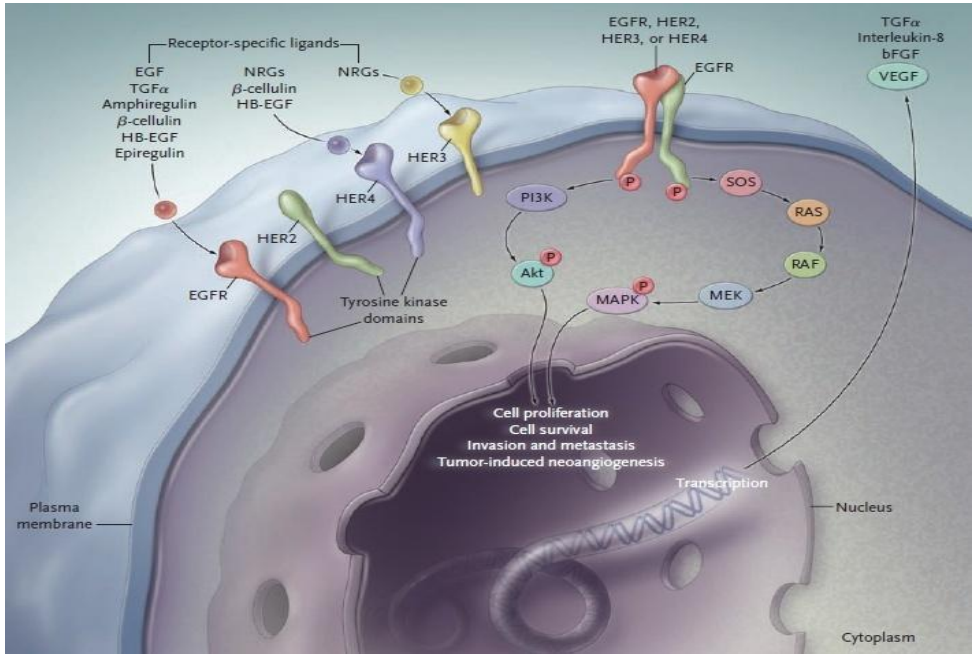
No.8 α–satellite probe

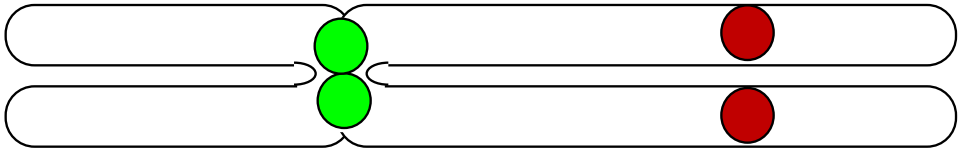
No.7 α–satellite probe

Nguyên tắc của interphase và metaphase FISH (2)

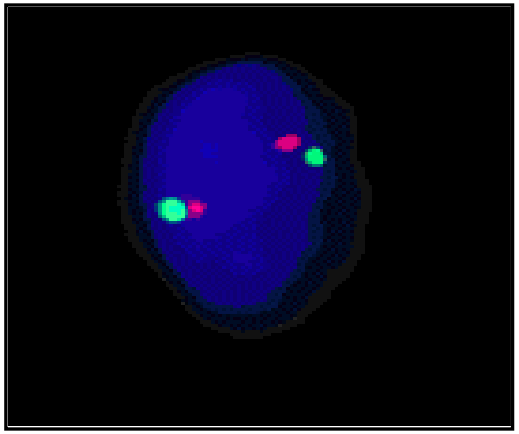


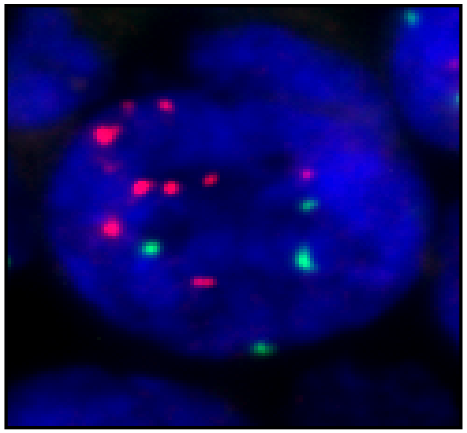
KHUẾCH ĐẠI GEN *HER2* TRONG UNG THƯ VÚ





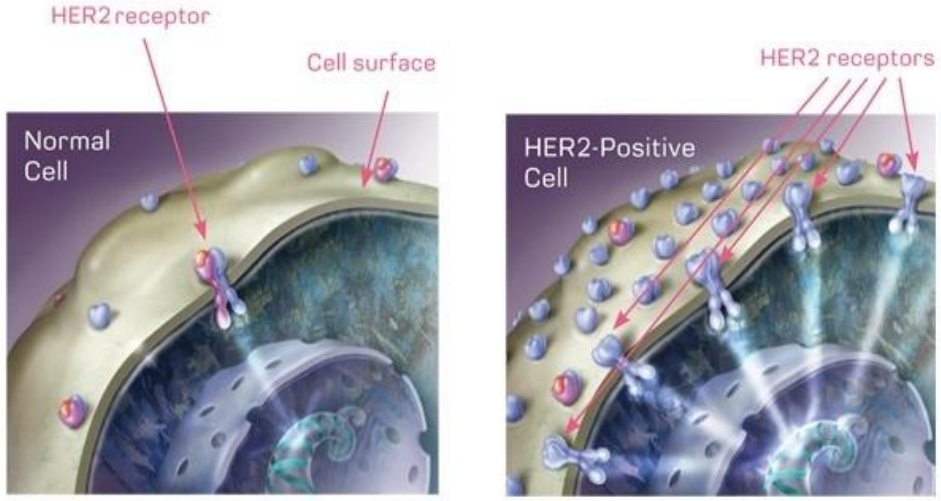
HER2
(NST 17)





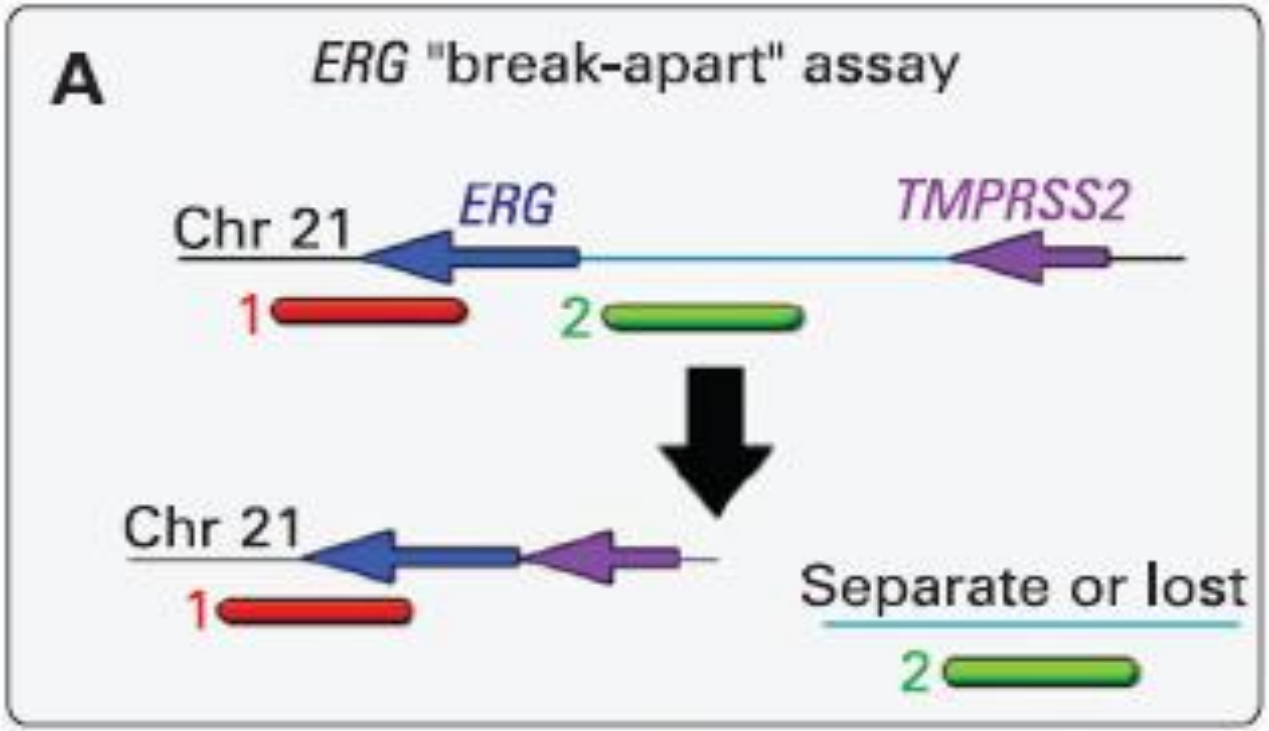
Bình thường:
2 tín hiệu màu đỏ

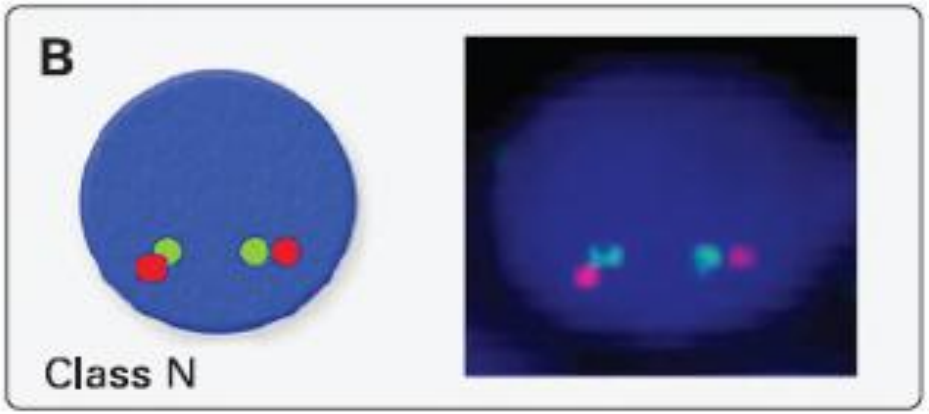
Ung thư vú:
nhiều tín hiệu đỏ

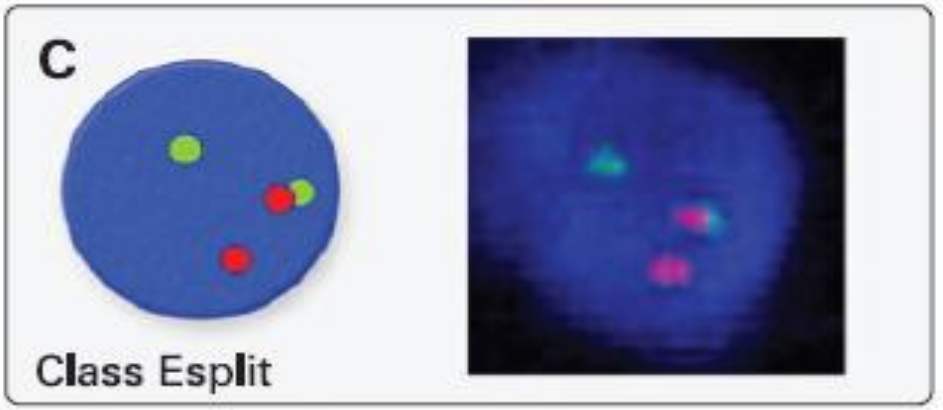


Trastuzumab
(Herceptin)

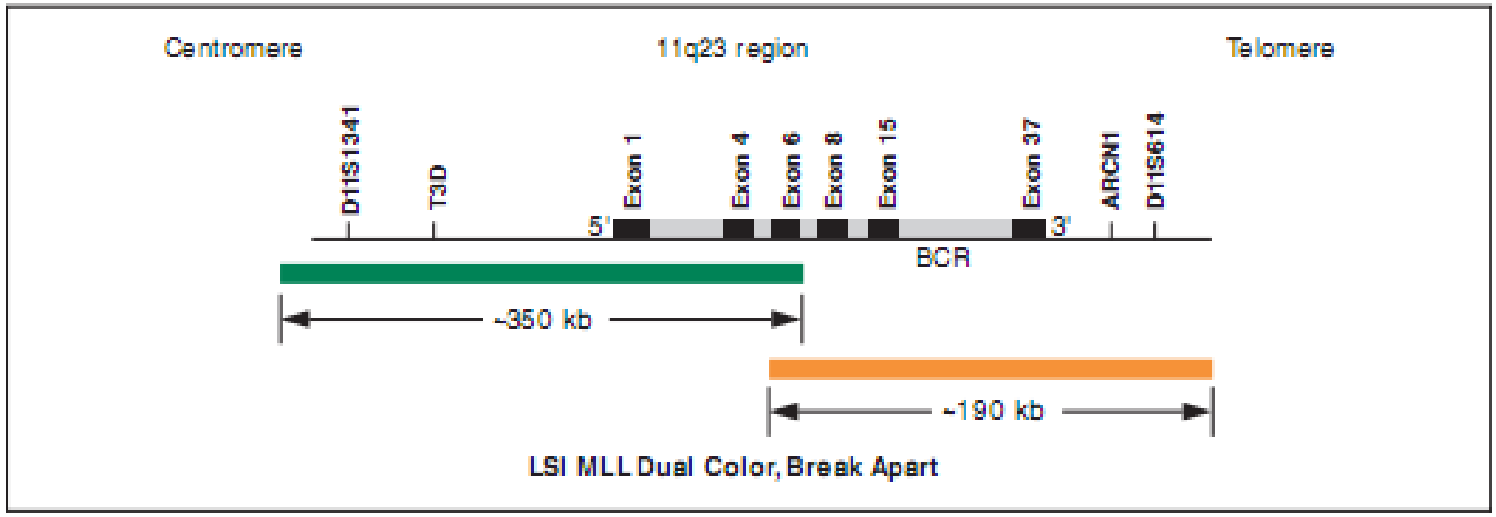
MẤT ĐOẠN TRONG UNG THƯ TIỀN LIỆT TUYẾN

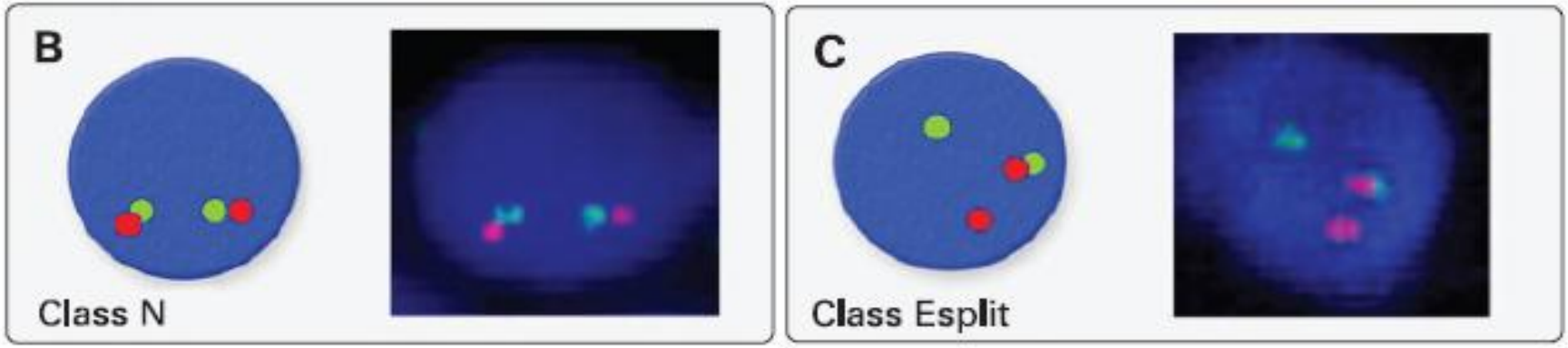


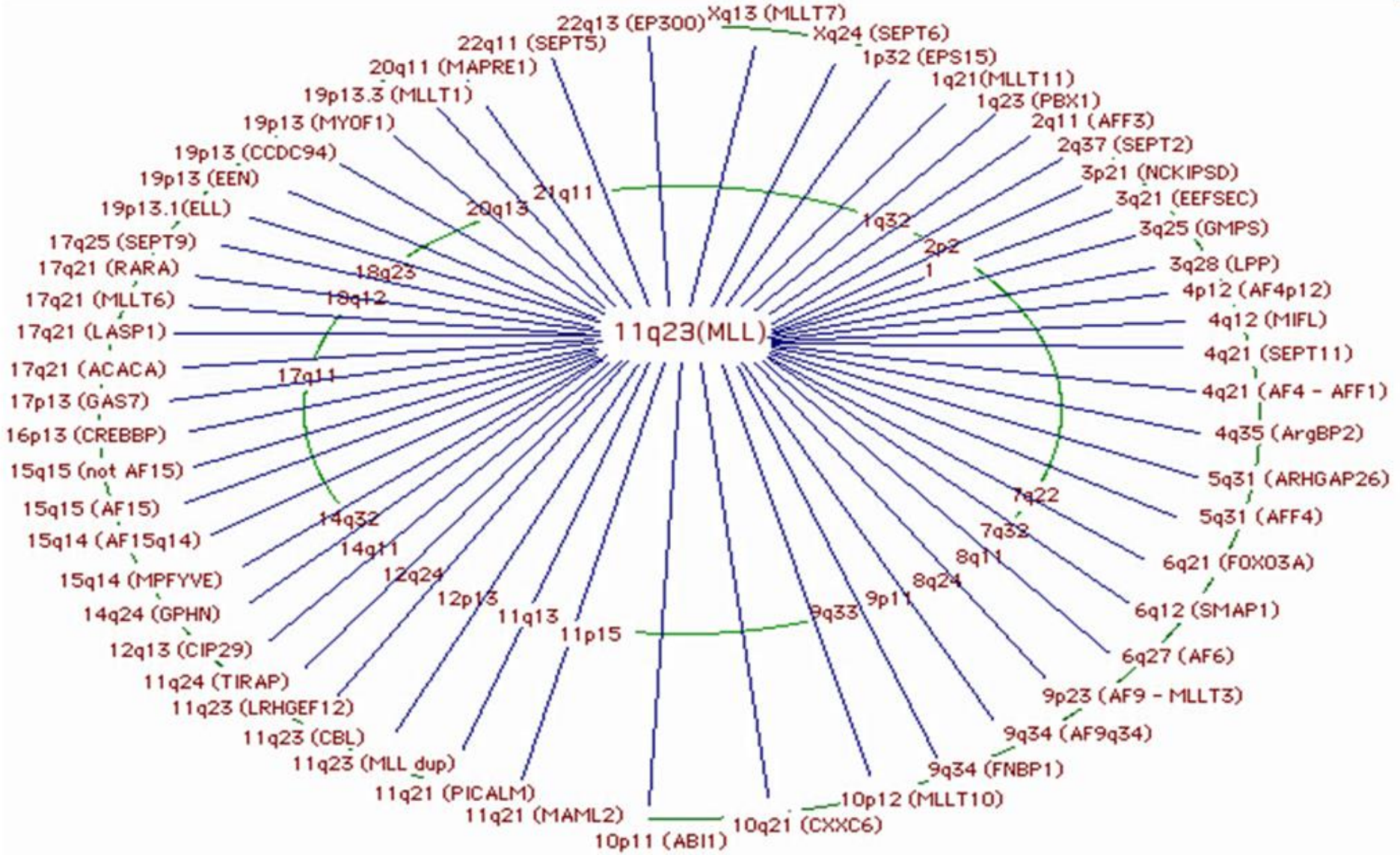




TÁI SẮP XẾP *MLL* (11q23)



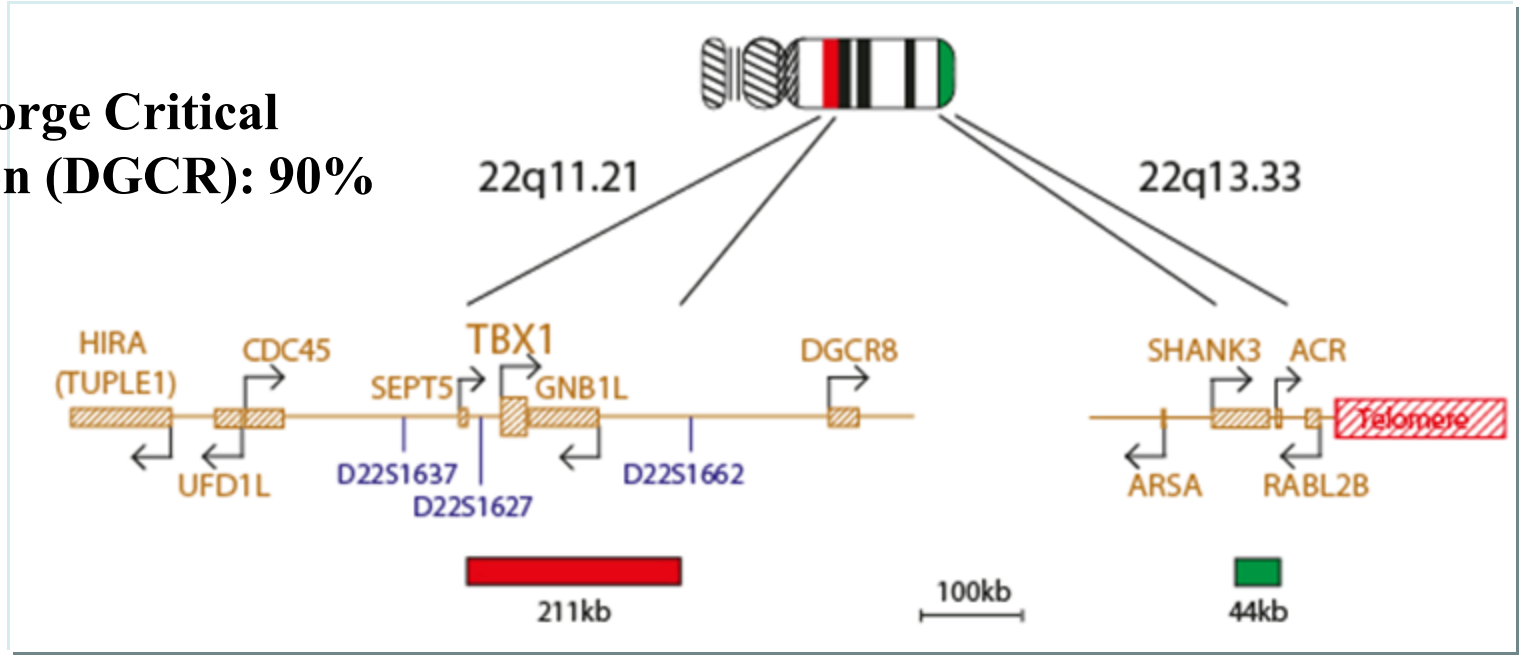


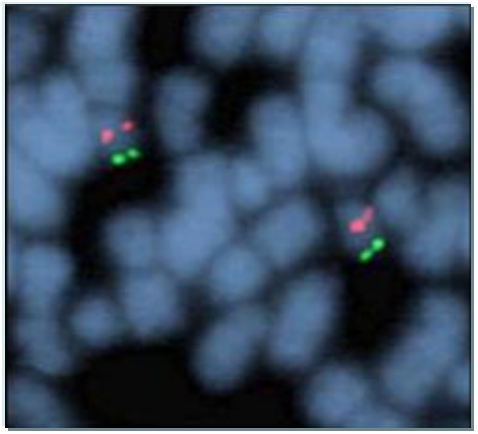


MLL and partners - 73 recurrent translocations and 54 partner genes. Editor 06/2000; last update 10/2007

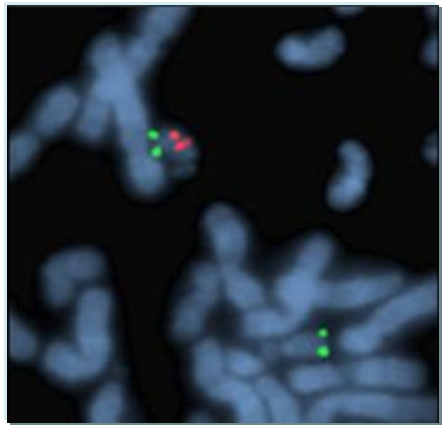
HC MẤT ĐOẠN *TBX1* VÀ 22q13.3 TRONG DIGEORGE

DiGeorge Critical Region (DGCR): 90%





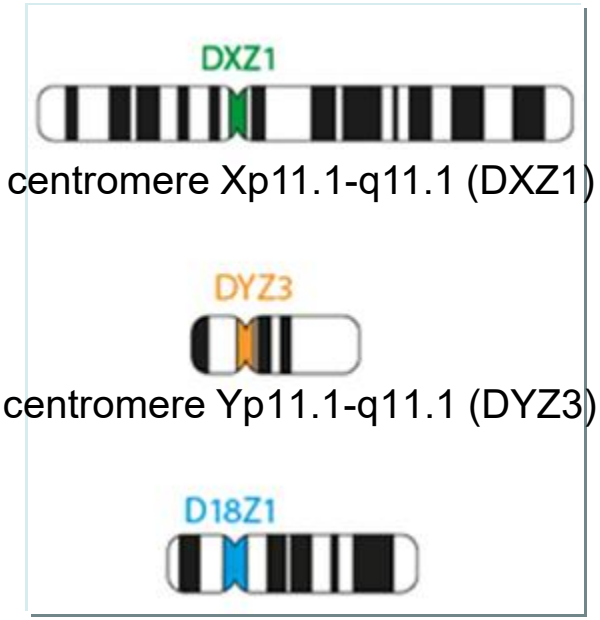
Tế bào bình thường



Mất đoạn gen TBX1

LỆCH BỘI NST TRONG KHẢO SÁT TIỀN SINH

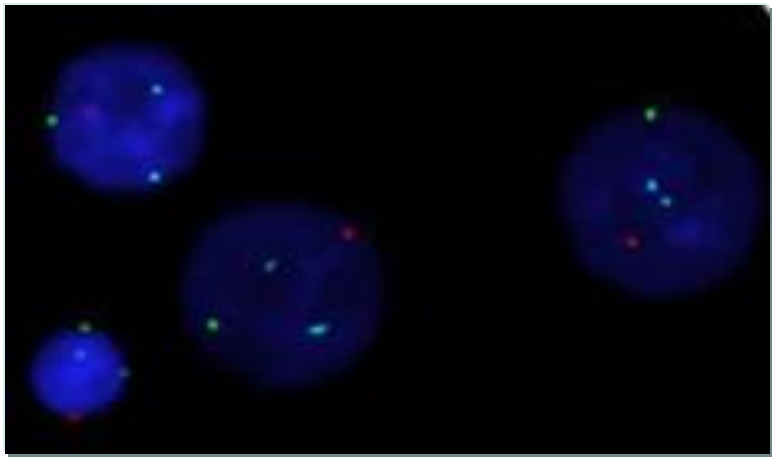
PROBE SET 1



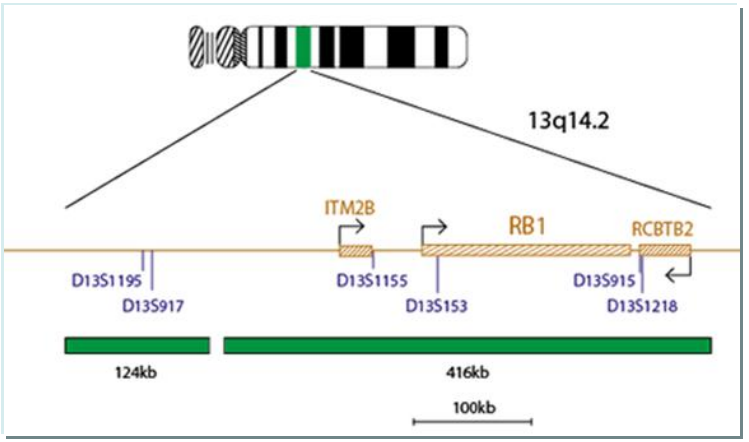
X centromere Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Green

Y centromere Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Orange

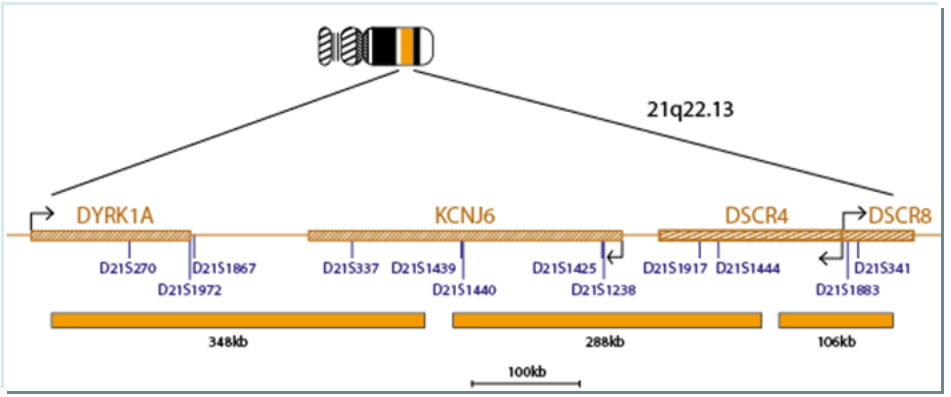
18 centromere 18p11.1-q11.1 (D18Z1) Blue

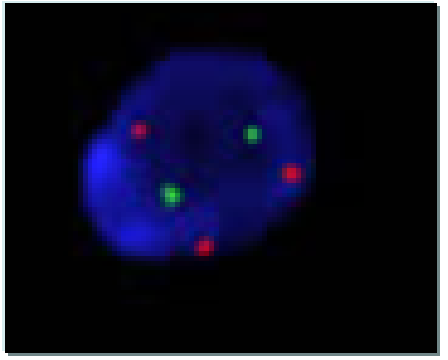


PROBE SET 2



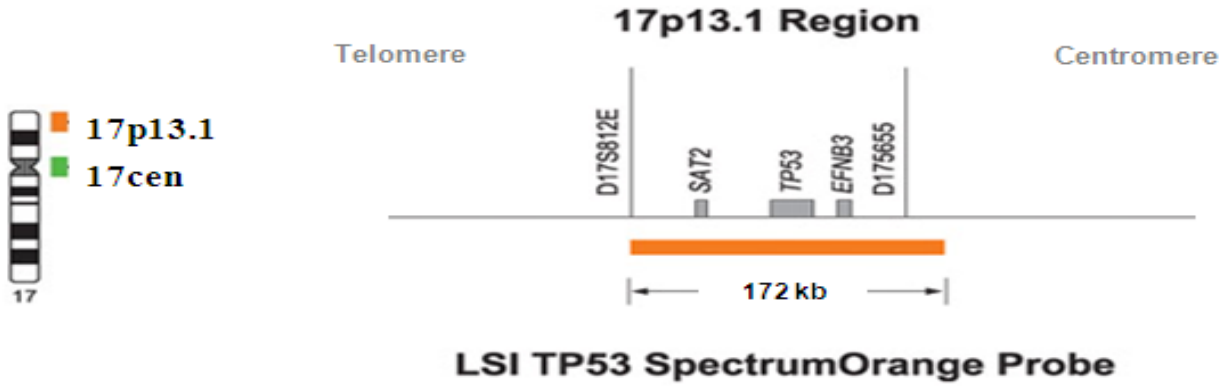
13 unique sequence (13q14.2) Green



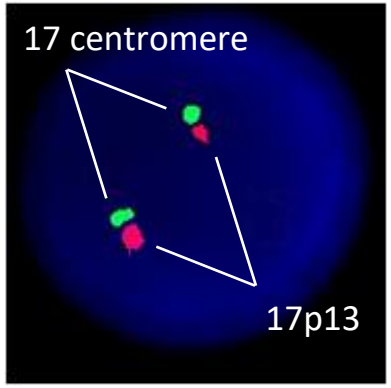


21 unique sequence (21q22.13) Orange

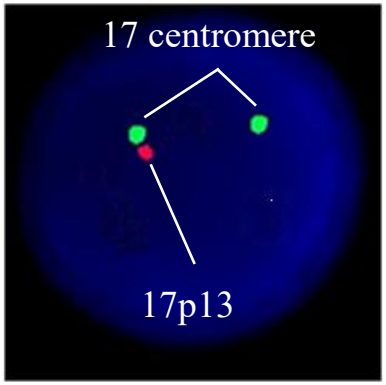
MẤT ĐOẠN 17p13 (p53) TRONG ĐA U TỦY



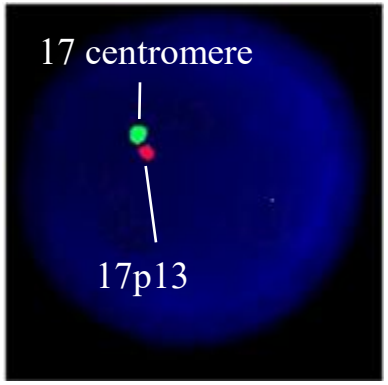
Đoạn dò LSI TP53 Spectrum Orange / CEP17 Spectrum Green



NST 17p bình thường

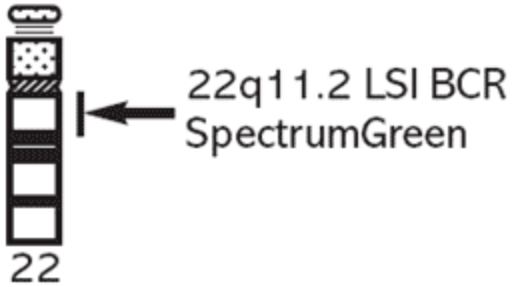


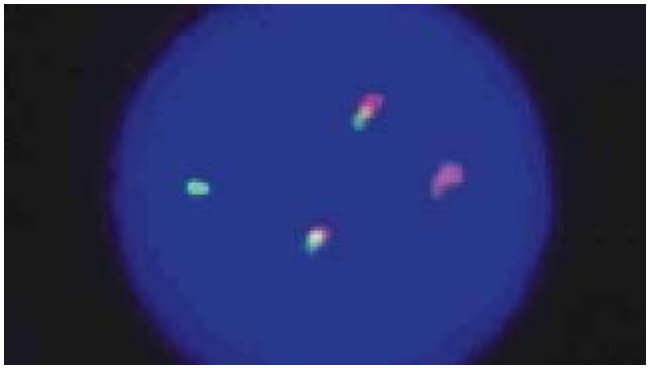
Mất đoạn 17p13

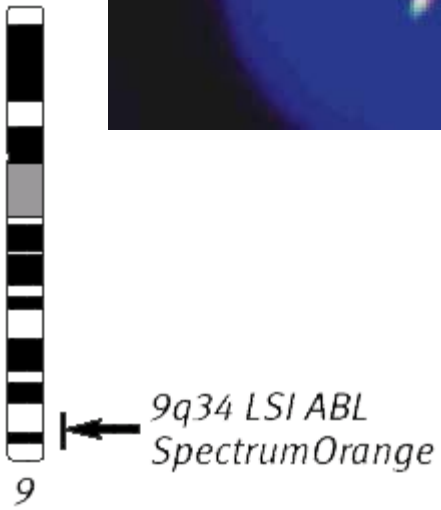


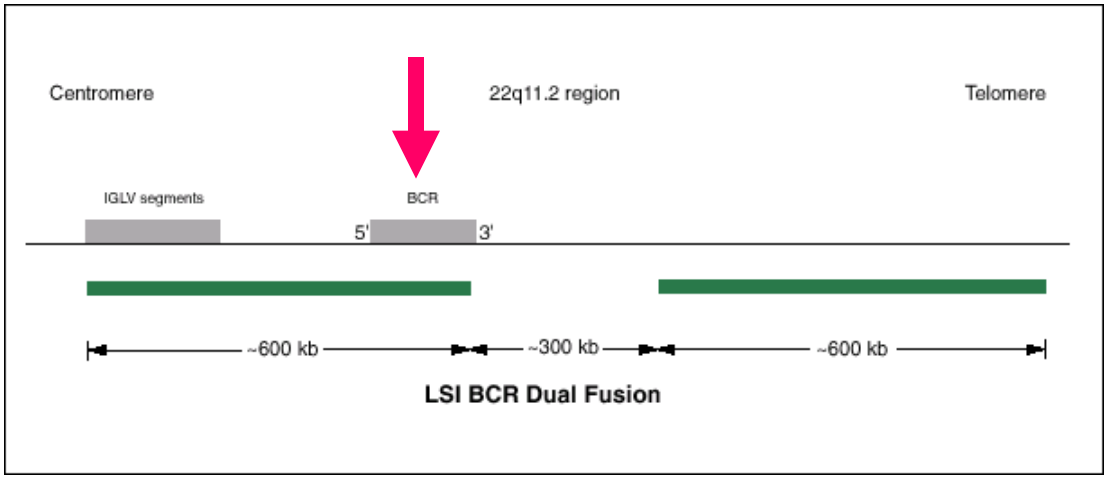
Monosomy 17

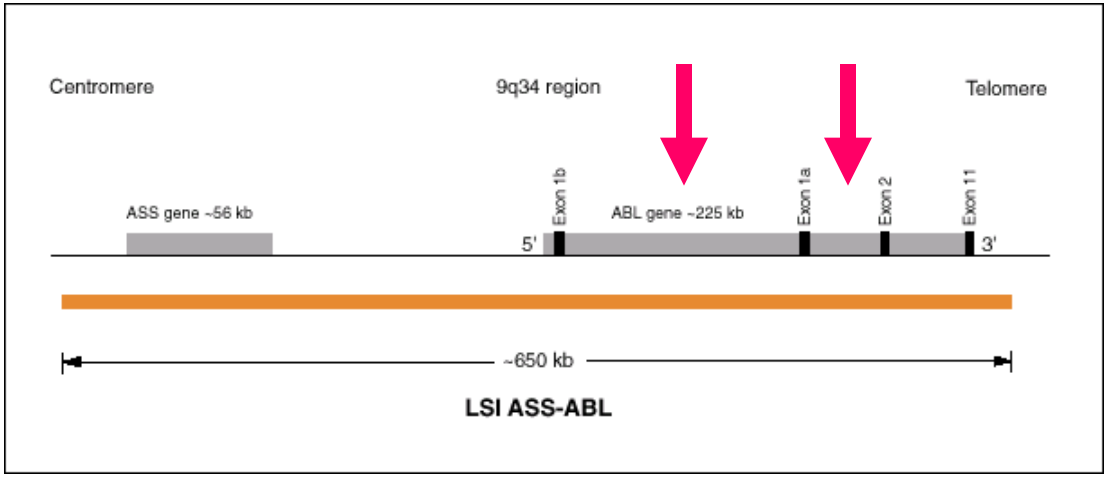
CHUYỂN VỊ t(9;22)(q34;q11) TRONG CML











ỨNG DỤNG CỦA KỸ THUẬT FISH TRONG UNG THƯ

Khoảng 20 loại FISH probes

- **Ung thư phổi**
- **Ung thư tiền liệt tuyến**
- **Ung thu vú**
- **Melanoma**
- **Neuroblastoma**

ỨNG DỤNG CỦA KỸ THUẬT FISH TRONG HUYẾT HỌC

Khoảng 50 loại FISH probes

- **Bệnh bạch cầu cấp**
- **Bệnh bạch cầu mạn**
- **Loạn sinh tủy**
- **Đa u tủy**
- **Lymphoma**

ỨNG DỤNG CỦA KỸ THUẬT FISH TRONG BỆNH LÝ DI TRUYỀN

- Digeorge syndrome
- Prader-Willi
- Rubinstein-Taybi
- Alagille
- Wolf-Hirschhorn,…

FISH: Ưu và khuyết điểm

- Ưu điểm:

- ❖ **Phát hiện được bất thường NST trên cả TB không phân chia.**
- ❖ **Cho kết quả nhanh trong vòng 24 giờ.**
- ❖ **Mồi đặc hiệu nên phát hiện được tái sắp xếp ẩn.**
- ❖ **Phân tích nhiều TB: từ 200 đến 500 TB (độ nhạy để phát hiện clone bất thường là 1%).**
- ❖ **Phát hiện được khuếch đại gen**

- Khuyết điểm:

- ❖ **Không phát hiện được bất thường đi kèm vì không quan sát được toàn bộ cấu trúc của bộ NST.**

NỘI DUNG

A. Cấu trúc và chức năng NST người

B. Rối loạn gen do bất thường NST

B1. Các bất thường về số lượng

B2. Các bất thường về cấu trúc

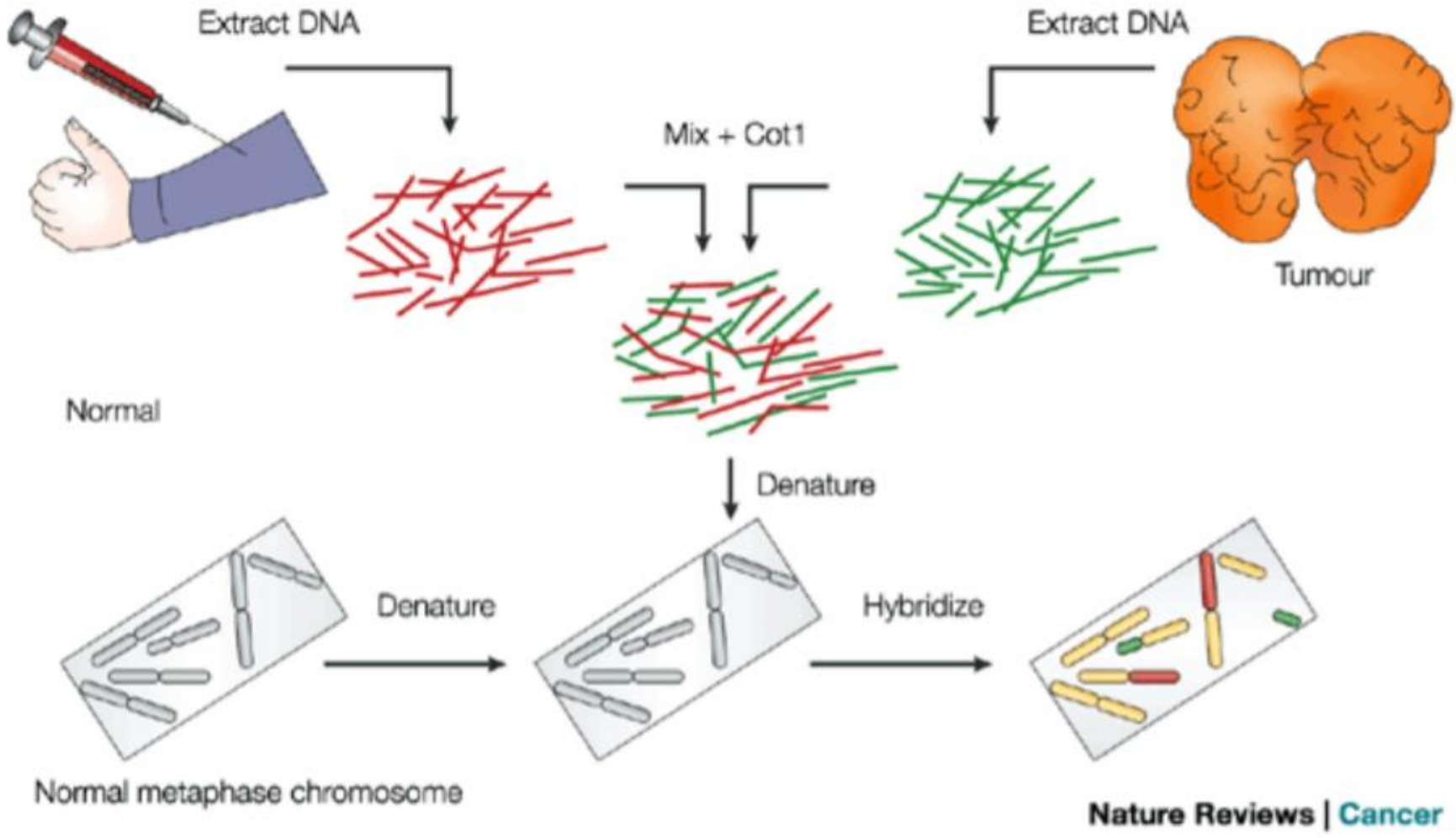
C. Các kỹ thuật phát hiện bất thường NST

C1. Nhiễm sắc thể đồ

C2. Lai tại chỗ phát huỳnh quang (FISH)

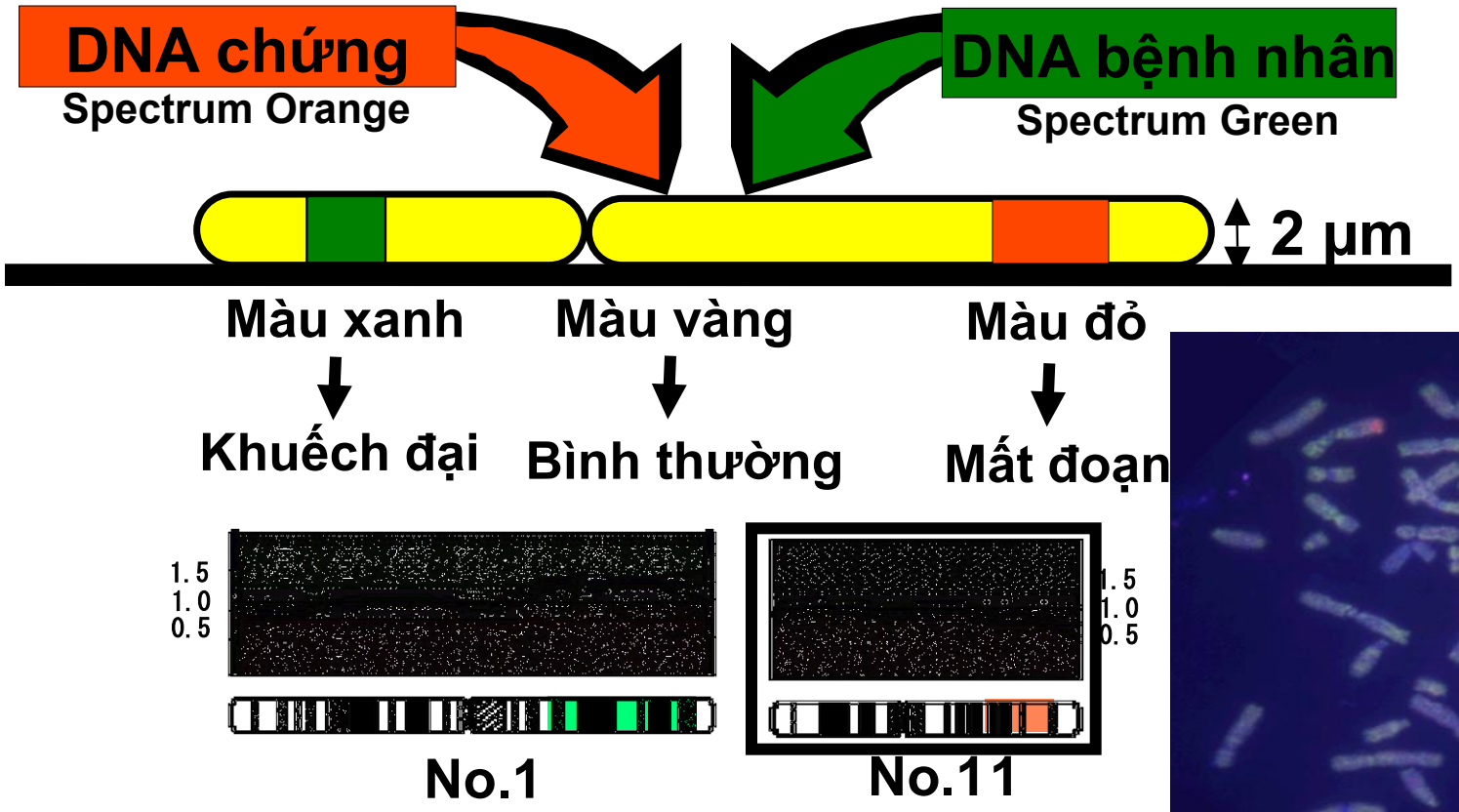
C3. CGH-Array CGH

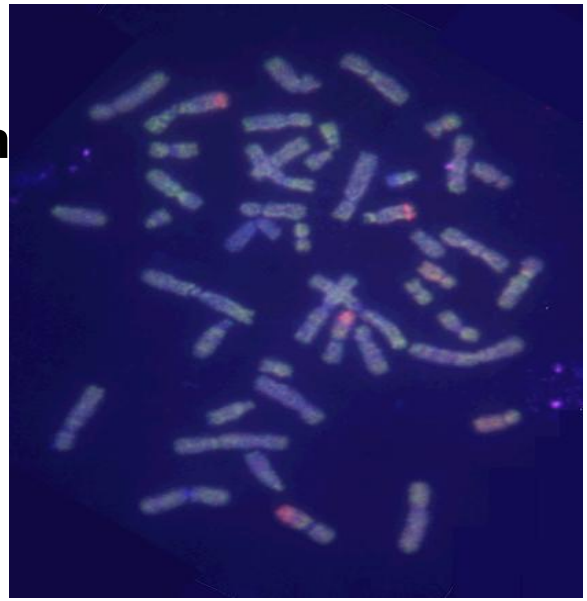
CGH


Extract DNA
Extract DNA
Mix + Cot1
Tumour
Normal
Denature
Denature
Hybridize
Normal metaphase chromosome
Nature Reviews | Cancer

Kỹ Thuật CGH

(comparative genomic hybridization)

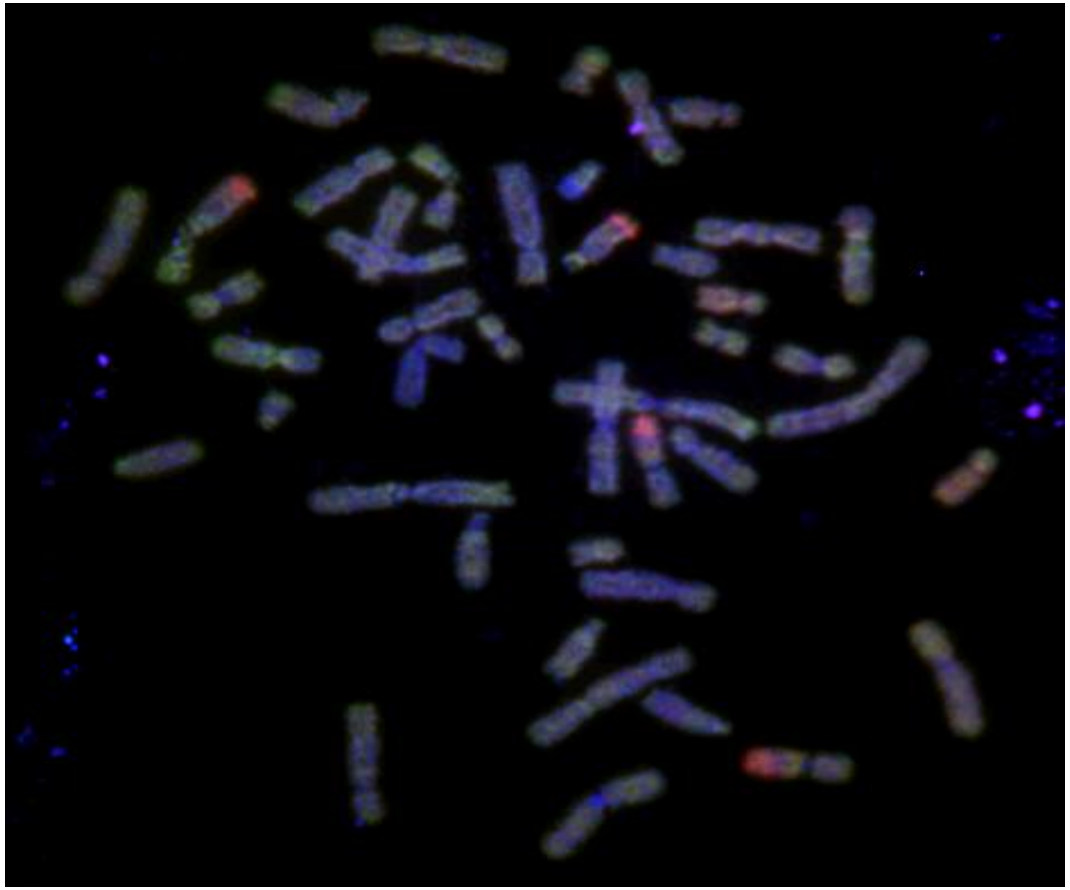




Tìm bất thường NST trong trường hợp:

- U đặc
- Không cấy được NST

CGH-metaphase



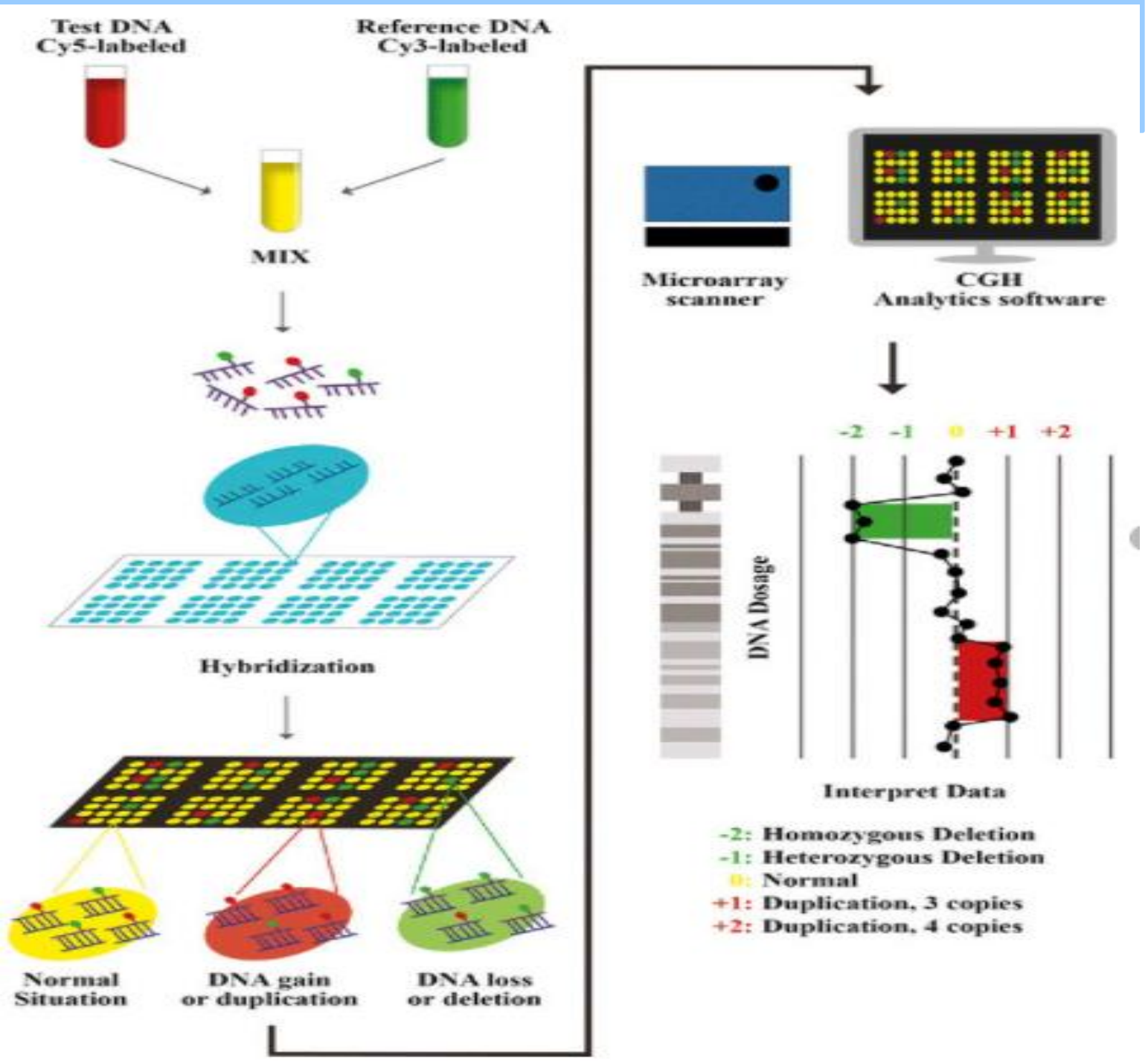
DNA chứng (người bình thường)

DNA bệnh nhân

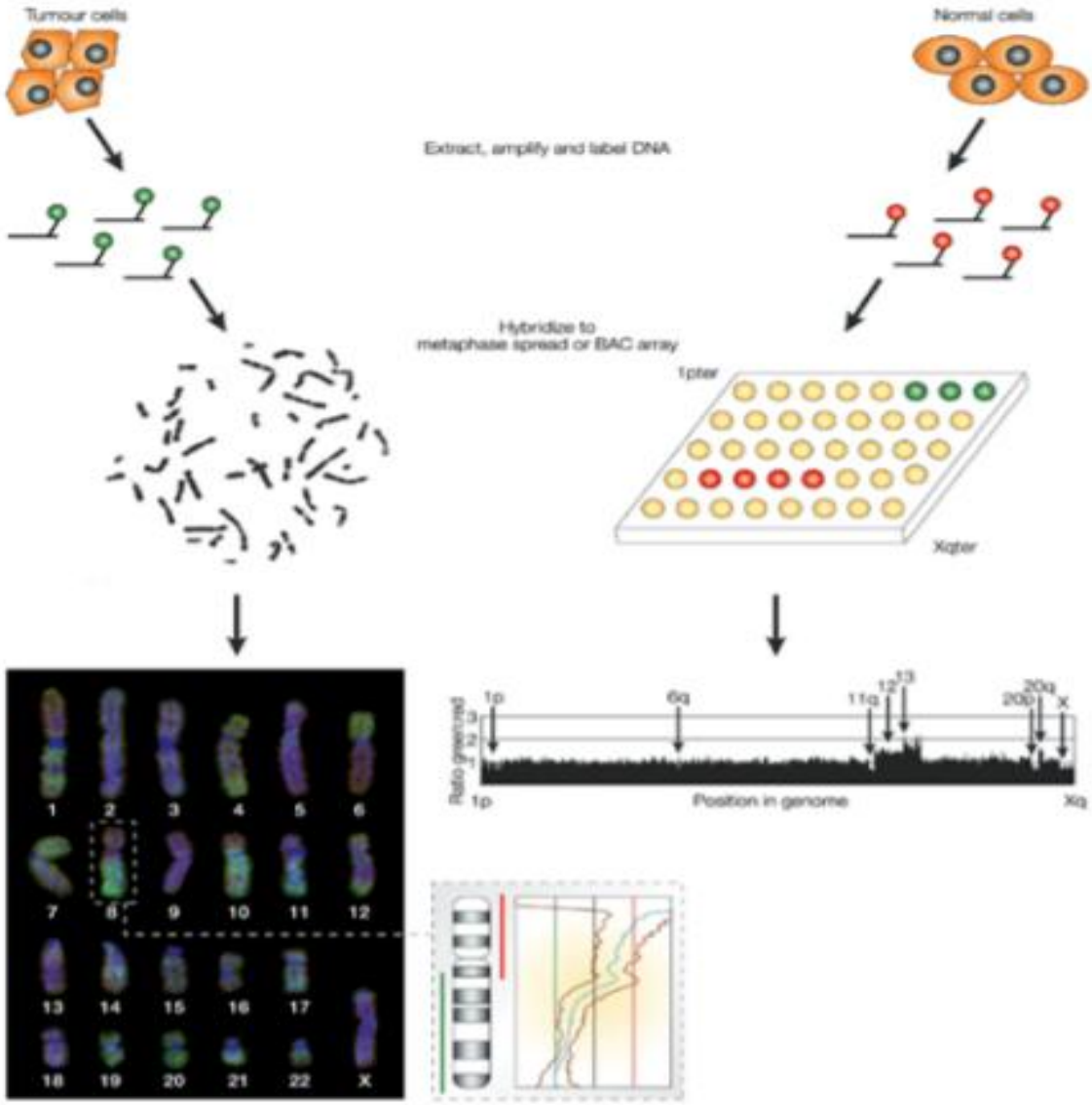
ARRAY CGH

- In array CGH arrays of genomic BAC,P1,cosmid or cDNA clones are used for hybridization instead of metaphase chromosomes in conventional CGH technique.
- Fluorescence ratios at arrayed DNA elements provide a locus-by-locus measure of DNA copy-number variation, represents a means of achieving increased mapping resolution.

ARRAY CGH


Test DNA
Cy5-labeled
Reference DNA
Cy3-labeled
MIX
Hybridization
Normal
Situation
DNA gain
or duplication
DNA loss
or deletion
Microarray
scanner
CGH
Analytics software
-2
-1
0
+1
+2
DNA Dosage
Interpret Data
-2: Homozygous Deletion
-1: Heterozygous Deletion
0: Normal
+1: Duplication, 3 copies
+2: Duplication, 4 copies

CGH VÀ ARRAY CGH



ƯU ĐIỂM CỦA ARRAY CGH

- Đánh giá toàn bộ 46 NST trong 1 XN duy nhất và phát hiện các bất thường mất cân bằng của NST: lệch bội, mất đoạn, nhân đoạn của NST chính xác hơn NST đồ.
- Phát hiện các bất thường NST khi không có định hướng trong chẩn đoán, là ưu thế của array CGH so với kỹ thuật FISH.
- Phát hiện các trường hợp khảm (mosaic). Tùy vào tỷ lệ giữa dòng TB bình thường và TB đột biến: khảm với dòng TB đột biến dạng lệch bội, array CGH phát hiện ở mức khảm từ 10% trở lên; khảm với dòng TB đột biến mang nhân đoạn hoặc mất đoạn của NST được phát hiện ở mức khảm từ 20 – 30% trở lên.
- Phát hiện các NST đánh dấu (marker chromosome).
- Thực hiện trên mẫu TB không cần qua nuôi cấy và tự động hóa nên giảm thời gian XN và tăng độ chính xác, có ý nghĩa lớn trong các XN trước sinh.

NHƯỢC ĐIỂM CỦA ARRAY CGH

- Không phát hiện bất thường cấu trúc NST ở dạng cân bằng: chuyển vị cân bằng và đảo đoạn. Array CGH không phân biệt được trisomy với các trường hợp chuyển đoạn Robertson không cân bằng.

- Không phát hiện 1 số trường hợp lệch bội như trường hợp XYY nếu mẫu DNA chứng bị chọn sai giới tính.

- Không phát hiện được trường hợp khảm có tỷ lệ khảm < 10% (lệch bội) và < 20 - 30% (bất thường cấu trúc NST dạng mất cân bằng).

- Không phát hiện bệnh lý di truyền do đột biến điểm và đột biến gen mà trong đó số cặp bp bị ảnh hưởng nhỏ hơn số bp được sử dụng làm đoạn dò.

- Array CGH phát hiện các sSMC (*small supernumerary marker chromosome*) nhưng chỉ khoảng 30% người mang sSMC có biểu hiện bất thường trên lâm sàng. Nếu sSMC được phát hiện trong chẩn đoán trước sinh thì khó để đánh giá và tiên lượng về tình trạng sức khỏe của thai nhi.
- Kỹ thuật array CGH xác định được các thay đổi số lượng bản sao (CNV: copy number variants) của NST. CNV thay đổi từ 1Kb đến nhiều Mb và chiếm khoảng 12% genome. Chỉ khoảng 5 – 18% trẻ chậm phát triển, một số dị tật bẩm sinh, sẩy thai tự nhiên, thai lưu có thể do ảnh hưởng của CNV.

CÁC ĐIỂM CẦN LƯU Ý

1. Cấu trúc, chức năng NST và sự phân bào nguyên phân.
2. Khái niệm interphase và metaphase
3. Các rối loạn gen trong các HC: Down, Patau, Klinefelter
4. Các bất thường NST có thể tạo tổ hợp gen
5. Giá trị của việc phát hiện bất thường NST
6. Các yếu tố cần thiết trong nuôi cấy NST
7. Các chất kích thích trong nuôi cấy NST
8. Cách đọc công thức NST
9. Ưu và khuyết điểm của NST đồ, FISH
10. Các loại FISH probe
11. Các ứng dụng của kỹ thuật FISH
12. CGH và array CGH: nguyên lý, ưu và nhược điểm