

ĐẠI HỌC HUẾ

GIÁO TRÌNH
DI TRUYỀN Y HỌC

Ts.Bs. Nguyễn Viết Nhân

Ths.Bs. Hà Thị Minh Thi

2005

ĐẠI HỌC HUẾ

GIÁO TRÌNH DI TRUYỀN Y HỌC

*Tất cả các hình vẽ trong cuốn sách này được lấy từ cuốn "Medical Genetics"
của các tác giả Lynn B.J.; John C.C.; Michael J.B. và Raymond L.W.
Nhà xuất bản Mosby, 2003*

2005

NỘI DUNG

Chương 1, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
VAI TRÒ CỦA DI TRUYỀN TRONG Y HỌC	1
Chương 2, <i>Ths. Hà Thị Minh Thi</i>	
CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA GENE.....	4
Chương 3, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
ĐỘT BIẾN GENE	19
Chương 4, <i>Ths. Hà Thị Minh Thi</i>	
MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN CÁC BIẾN DỊ DI TRUYỀN Ở MỨC PHÂN TỬ.....	26
Chương 5, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
ĐỘT BIẾN ĐƠN GENE TRÊN NHIỄM SẮC THỂ THƯỜNG	40
Chương 6, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
ĐỘT BIẾN ĐƠN GENE DI TRUYỀN LIÊN KẾT VỚI GIỚI TÍNH VÀ DI TRUYỀN TY THỂ	49
Chương 7, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
DI TRUYỀN HỌC HOÁ SINH: CÁC RỐI LOẠN CHUYỂN HOÁ.....	55
Chương 8, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
BỘ NHIỄM SẮC THỂ NGƯỜI VÀ CÁC DẠNG ĐỘT BIẾN NHIỄM SẮC THỂ	63
Chương 9, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
DI TRUYỀN TẾ BÀO HỌC LÂM SÀNG	74
Chương 10, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
DI TRUYỀN ĐA YẾU TỐ	82
Chương 11, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
DI TRUYỀN HỌC QUẦN THỂ	88
Chương 12, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
LẬP BẢN ĐỒ GENE	94
Chương 13, <i>Ths. Hà Thị Minh Thi</i>	
DI TRUYỀN HỌC UNG THƯ.....	116
Chương 14, <i>Ts. Nguyễn Viết Nhân</i>	
PHÒNG VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH DI TRUYỀN VÀ DỊ TẬT BẨM SINH	127

Chương 1

Vai trò của di truyền trong y học

I. Di truyền y học là gì ?

Di truyền y học là ngành học nhằm ứng dụng di truyền học vào y học, bao gồm:

- Nghiên cứu sự di truyền của bệnh trong các gia đình.
- Xác định vị trí đặc hiệu của các gen trên nhiễm sắc thể (NST).
- Phân tích cơ chế phân tử trong quá trình sinh bệnh của gen đột biến.
- Chẩn đoán và điều trị các bệnh di truyền.
- Tư vấn di truyền.

II. Vai trò của di truyền y học đối với công tác chăm sóc sức khỏe

Bệnh di truyền hiện nay chiếm một tỷ lệ không nhỏ trong các bệnh được gặp ở trẻ em và người lớn. Tỷ lệ này sẽ ngày một tăng cùng với sự hiểu biết ngày càng nhiều của chúng ta về cơ sở di truyền của các bệnh.

Di truyền học cung cấp những kiến thức cơ bản về nền tảng sinh học dẫn đến sự hình thành cơ thể do đó giúp chúng ta có thể hiểu tốt hơn và sâu hơn về quá trình sinh bệnh. Trong nhiều trường hợp những hiểu biết này có thể giúp ngăn ngừa bệnh hoặc giúp cho việc điều trị chúng trở nên hiệu quả hơn.

III. Các loại bệnh di truyền

Những thay đổi của vật chất di truyền hoặc sự kết hợp giữa chúng và các yếu tố khác có thể gây ra các bệnh di truyền. Những bệnh này được chia thành 4 nhóm chính như sau (bảng 1):

- Các bất thường NST (chromosome disorders): xảy ra khi toàn bộ NST hoặc một phần của chúng bị mất đi, nhân lên v.v....
- Các bất thường đơn gen (single - gene disorder): xảy ra khi một gen bị đột biến. Trường hợp này thường được gọi là các bất thường kiểu Mendel.
- Các bất thường di truyền đa yếu tố (multifactorial disorders): đây là nhóm bệnh gây ra bởi sự kết hợp giữa yếu tố di truyền và yếu tố môi trường. Rất nhiều dị tật bẩm sinh và

nhều tình trạng bệnh lý mãn tính ở người lớn thuộc về nhóm này.

- Các bất thường di truyền của ti thể (mitochondrial disorders): chỉ chiếm một lượng nhỏ gây ra do bất thường của DNA trong các ti thể có trong bào tương của tế bào.

Trong 4 nhóm trên nhóm các bất thường đơn gen, là nhóm được quan tâm nhiều nhất. Các bệnh thuộc nhóm này được phân loại dựa trên cách thức di truyền của gen bệnh trong gia đình (kiểu gen trội trên NST thường, kiểu lặn NST thường, kiểu di truyền liên kết với giới tính). Cho tới nay con số các bệnh gây ra bởi kiểu rối loạn này đã lên đến 14.000 và vẫn tiếp tục tăng trong thời gian tới.

Bảng 1: Tỷ lệ tương đối của một số bệnh di truyền phổ biến

Loại bệnh di truyền	Tỷ lệ tương đối
Bất thường NST	
Hội chứng Down	1/700 - 1/1000
Hội chứng Klinefelter	1/1000 nam
Hội chứng Turner	1/2500 - 1/10000 nữ
Di truyền đơn gen	
Bệnh teo cơ Duchene	1/3500 nam
Hemophilia A	1/10000 nam
Bệnh di truyền đa yếu tố	
Khe hở môi +/- hàm	1/500 - 1/1000
Tật chân khoèo	1/1000
Các khuyết tật tim bẩm sinh	1/200 - 1/500
Ung thư (mọi loại)	1/3
Đái đường (type I và II)	1/10
Bệnh tim / đột quỵ	1/3 - 1/5

Ngoài ra rất nhiều bệnh là kết quả của sự tương tác giữa các yếu tố di truyền và không di truyền (di truyền đa yếu tố) ở những mức độ rất khác nhau cho phép chúng ta nghĩ rằng bệnh di truyền có một phạm vi phân bố rất rộng, từ chỗ hoàn toàn do yếu tố di truyền quy định như bệnh xơ nang, bệnh teo cơ Duchenne (Duchenne muscular dystrophy) cho tới chỗ chủ yếu là do yếu tố môi trường như các bệnh nhiễm trùng. Rất nhiều

loại bệnh có tỷ lệ mắc cao như các dị tật bẩm sinh, các bệnh tim mạch, cao huyết áp, đái tháo đường, ung thư nằm trong khoảng giữa của hai cực này. Chúng là kết quả của sự kết hợp ở các mức độ khác nhau của 2 yếu tố di truyền và môi trường.

IV. Tình hình bệnh di truyền trên lâm sàng

Trong thực tế chúng ta đang đối mặt với các bệnh có nguyên nhân môi trường như suy dinh dưỡng, điều kiện vệ sinh kém, nhiễm trùng và đây cũng chính là những nguyên nhân chính gây tử vong ở trẻ. Một nghiên cứu ở các bệnh viện Seattle (Mỹ) cho thấy 27% số trẻ em nhập viện vì bệnh di truyền, một nghiên cứu khác ở một bệnh viện nhi khoa của Mexico cho thấy 37,8% số trẻ nhập viện là do mắc bệnh di truyền hoặc có liên quan đến di truyền.

Một câu hỏi được đặt ra là tỷ lệ người mắc bệnh di truyền trong quần thể là bao nhiêu ? Đây là một câu hỏi rất khó trả lời vì có rất nhiều yếu tố làm cho tỷ lệ này trở nên không chính xác như: (1) Một số bệnh phân bố theo chủng tộc như bệnh hồng cầu hình liềm được gặp rất phổ biến ở Châu Phi, bệnh xơ nang được gặp phổ biến ở Châu Âu. (2) Một số bệnh do đột biến gen trội được gặp phổ biến hơn ở người lớn tuổi như bệnh ung thư vú, ung thư đại tràng ..., do đó tỷ lệ mắc các bệnh này cao hơn ở những quần thể có độ tuổi lớn hơn. (3) Khả năng chẩn đoán của bác sỹ cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ của bệnh.

Bảng 2: Tỷ lệ tương đối của các bệnh di truyền trong quần thể chung

Loại bệnh di truyền	Tỷ lệ mắc tính trên 1000 người
Di truyền trội	3 - 9,5
Di truyền lặn	2 - 2,5
Di truyền liên kết với NST X	0,5 - 2
Bất thường NST	6 - 9
Dị tật bẩm sinh	20 - 50
Tổng	31,5 - 73

Bảng 2 giới thiệu tỷ lệ tương đối của các bệnh di truyền trong quần thể chung, cho thấy tỷ lệ mắc bệnh di truyền từ 3 - 7%, tuy nhiên tỷ lệ này không bao gồm các bệnh có liên quan đến di truyền được gặp phổ biến hơn ở người trưởng thành như bệnh tim, bệnh đái tháo đường và bệnh ung thư. Nếu tính cả nhóm bệnh này thì tỷ lệ bệnh di truyền trong quần thể sẽ cao lên một cách đáng kể.

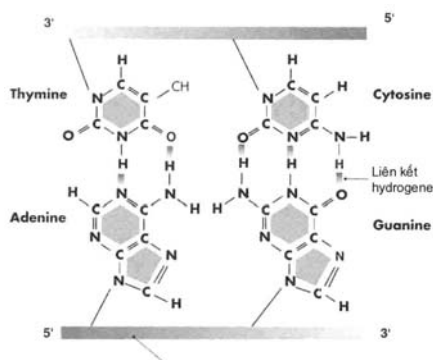
Chương 2

Cấu trúc và chức năng của gene

Nhiễm sắc thể chứa DNA (deoxyribonucleic acid) mang gene. Gen được truyền từ bố mẹ sang con cái và được xem là đơn vị cơ bản của sự di truyền, ảnh hưởng lên mọi cấu trúc và chức năng của cơ thể. Ở người có khoảng từ 30.000-40.000 gene cấu trúc (gene mã hóa cho RNA hoặc các protein).

I. Cấu trúc của DNA

1. Thành phần hóa học và cấu trúc không gian của DNA

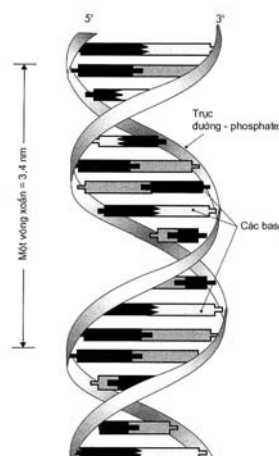


Hình 1. Cấu trúc của 4 loại base

Tên của các loại base được dùng để đặt tên cho các nucleotide.

DNA có cấu trúc không gian như một thang xoắn với 2 tay thang là các phân tử đường và phosphat nối với nhau bằng các liên kết phosphodiester bền vững, bậc thang do các base ở hai bên nối với nhau qua các liên kết hydro yếu theo nguyên tắc bổ sung giữa base adenine với thymine và giữa base guanine và cytosine. Mỗi tay thang bắt đầu từ vị trí 5', kết thúc ở vị trí 3' của phân tử đường deoxyribose và hai tay thang đi ngược chiều nhau. Như vậy nếu một chuỗi đơn của DNA có trình tự các nucleotide 5' - ATGCAG - 3' thì chuỗi bổ sung sẽ có chiều và trình tự của các nucleotide như sau:

Phân tử DNA được cấu tạo từ các đơn phân là nucleotide. Mỗi nucleotide có 3 thành phần cơ bản: (1) một đường pentose deoxyribose; (2) một nhóm phosphate và (3) một trong bốn loại base. Hai loại base cytosine (C) và thymine (T) có cấu trúc vòng đơn carbon nitrogen được gọi là các pyrimidine. Hai loại base adenine (A) và guanine (G) có cấu trúc vòng kép carbon - nitrogen được gọi là các purine (hình 1).

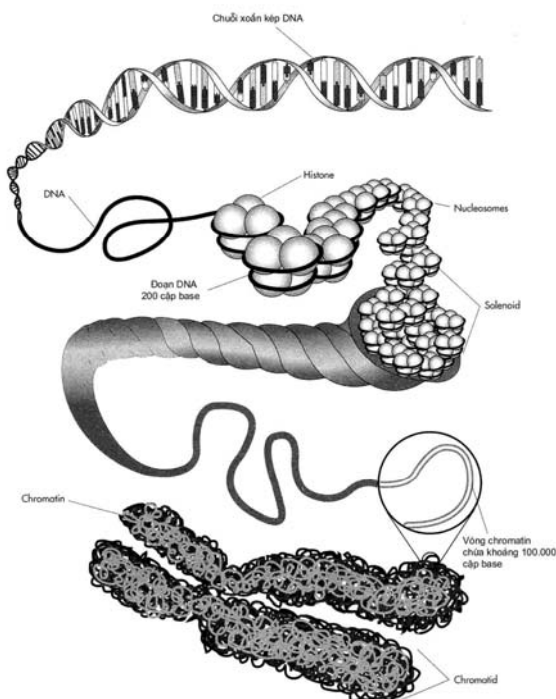


Hình 2. Cấu trúc xoắn kép của DNA

3' - TACGTC - 5' (hình 2).

Các trình tự khác nhau của các nucleotide sẽ quy định các loại protein khác nhau. Tính đặc hiệu của nhiều loại protein trong cơ thể đòi hỏi phải có một lượng lớn thông tin di truyền. Thực tế trong bộ NST đơn bội của các giao tử ở người chứa tới khoảng 3 tỷ cặp nucleotide, số lượng này nhiều hơn nhiều so với số nucleotide cần thiết cho việc mã hóa các protein của cơ thể.

2. Hiện tượng cuộn xoắn của DNA



Hình 3. Mô hình cuộn xoắn của DNA

Tổng chiều dài của DNA trong một tế bào khoảng 2 mét do đó để có thể nằm gọn trong nhân tế bào DNA phải cuộn lại ở nhiều mức độ khác nhau (hình 3). Đầu tiên các đoạn DNA với chiều dài tương ứng với khoảng từ 140 đến 150 cặp base (base pair: bp) cuộn quanh một lõi protein histon để tạo thành nucleosome. Các nucleosome nối với nhau bằng một đoạn DNA khoảng 20 - 60 bp. Khoảng 6 nucleosome cuộn lại thành một solenoid, các solenoid cuộn lại thành các quai chromatin (chromatin loop), mỗi quai chromatin có khoảng 100.000 bp

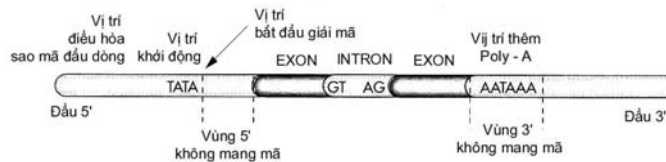
(100 kb). Các quai này được gắn với một khung protein. Bằng cách này DNA có thể giảm chiều dài xuống khoảng 1/10.000 lần so với chiều dài của nó trước khi cuộn xoắn.

II. Cấu trúc của gene

1. Các intron và exon

Cấu trúc intron và exon của gene là một đặc điểm để phân biệt giữa DNA của sinh vật eukaryote và prokaryote. Các intron chiếm phần lớn trong cấu trúc hầu hết các gene của cơ thể eukaryote. Các đoạn intron này

sẽ được các enzyme cắt một cách chính xác ra khỏi các phân tử mRNA trước khi chúng đi ra khỏi nhân tế bào. Vị trí cắt của các enzyme được xác định bởi các đoạn DNA được gọi là các đoạn đồng nhất (consensus sequences) (đoạn này có tên như vậy vì được thấy phổ biến ở tất cả các cơ thể eukaryote) nằm cạnh mỗi đoạn exon (hình 4).



Hình 4: Cấu trúc chi tiết của một gene

Vì hầu hết các gene của cơ thể eukaryote gồm chủ yếu là các đoạn intron nên cho phép người ta nghĩ đến việc các đoạn này có thể có một chức năng nào đó. Hiện nay chức năng của các intron vẫn còn đang được nghiên cứu, người ta cho rằng có thể những đoạn intron do làm tăng thêm chiều dài của gene sẽ tạo thuận lợi cho sự tái sắp xếp của các gene trên cặp NST tương đồng qua quá trình trao đổi chéo giữa các NST này trong giảm phân hoặc ảnh hưởng đến thời gian nhân đôi và phiên mã của DNA.

Một số intron lại mang trong nó các gene được phiên mã mà không liên quan gì tới chức năng gene mang chính các intron đó. Ví dụ như các intron trên gene gây bệnh u xơ thần kinh type 1 (NF1) chứa 3 gene được phiên mã theo hướng ngược với gene NF1 và không có mối liên hệ chức năng nào với gene NF1.

2. Các loại DNA

Mặc dù DNA mang thông tin mã hóa cho các protein nhưng trong thực tế chỉ có ít hơn 5% trong số 3 tỷ cặp nucleotide trong genome của người thực sự làm chức năng này, còn lại phần lớn vật liệu di truyền chưa được biết chức năng. Người ta chia DNA thành các loại sau:

2.1. DNA độc bản (single - copy DNA):

DNA độc bản chiếm khoảng 45% genome và gồm các gene mã hóa cho các protein. Các đoạn DNA loại này chỉ được thấy một lần duy nhất (hoặc vài lần) trong genome. Tuy nhiên phần mã hóa cho protein chỉ chiếm một phần nhỏ trên loại DNA này mà thôi, phần lớn còn lại là các intron hoặc là các đoạn DNA nằm xen giữa các gene.

2.2. DNA lặp (repetitive DNA):

DNA lặp chiếm 55% còn lại của genome, đây là các đoạn DNA

được lặp đi lặp lại có thể lên tới hàng ngàn lần trong genome, có 2 loại chính:

2.2.1. DNA vệ tinh (satellite DNA)

Loại DNA này chiếm khoảng 10% genome và tập trung ở một số vùng nhất định trên NST, ở đó chúng sắp xếp nối đuôi nhau, cái này tiếp theo cái kia. DNA vệ tinh được chia thành 3 loại nhỏ:

- *DNA vệ tinh alpha*: có kích thước 171 bp, lặp đi lặp lại nhiều lần với chiều dài hàng triệu bp hoặc hơn. Loại này được thấy cạnh tâm động của NST.
- *DNA tiểu vệ tinh (minisatellite DNA)*: có kích thước từ 14 - 500 bp, lặp đi lặp lại với chiều dài khoảng vài ngàn bp.
- *DNA vi vệ tinh (microsatellite DNA)*: có kích thước từ 1 - 13 bp, lặp đi lặp lại với tổng chiều dài không quá vài trăm bp.

Hai loại DNA tiểu và vi vệ tinh có sự khác nhau rất lớn trong chiều dài giữa người này với người khác và điều này làm chúng trở nên rất hữu ích trong việc lập bản đồ gene. DNA tiểu vệ tinh và vi vệ tinh được gặp với tần số trung bình là 1 trên mỗi 2 kb trong genome và chúng chiếm khoảng 3% genome.

2.2.2. DNA lặp lại rải rác:

Loại DNA này chiếm khoảng 45% genome, gồm 2 loại:

- *Các yếu tố rải rác có kích thước ngắn (SINEs: short interspersed elements)*: kích thước từ 90 - 500bp.
- *Các yếu tố rải rác có kích thước dài (LINEs: long interspersed elements)*: kích thước 7.000 bp

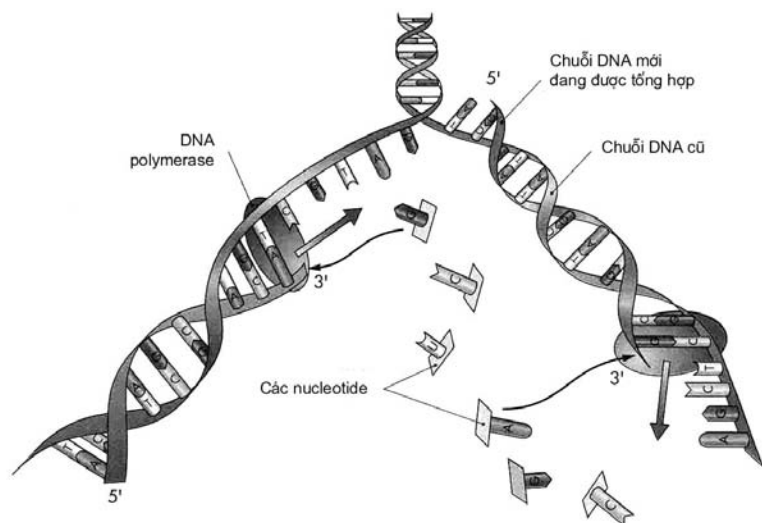
III. Chức năng của DNA

1. Sự nhân đôi

Sự nhân đôi của DNA khi tế bào phân chia giúp tạo ra các bản sao chính xác của DNA cho các tế bào con, đảm bảo cho việc duy trì vật chất di truyền ổn định qua các thế hệ tế bào.

Sự nhân đôi của DNA bắt đầu bằng việc phá vỡ các liên kết hydrogen yếu giữa các base, làm tách cấu trúc kép của DNA thành 2 sợi đơn với các base ở trạng thái tự do. Mỗi sợi đơn sẽ đóng vai trò như một khuôn (template) và các base này sẽ liên kết với các base của các nucleotide tự do theo nguyên tắc bổ sung giúp quá trình nhân đôi diễn ra chính xác. Bằng cách này sau khi hoàn tất quá trình nhân đôi mỗi DNA sẽ gồm có một chuỗi đơn cũ và một chuỗi mới được tổng hợp. Phân tử DNA

mới này có cấu trúc giống hệt DNA ban đầu (hình 6).



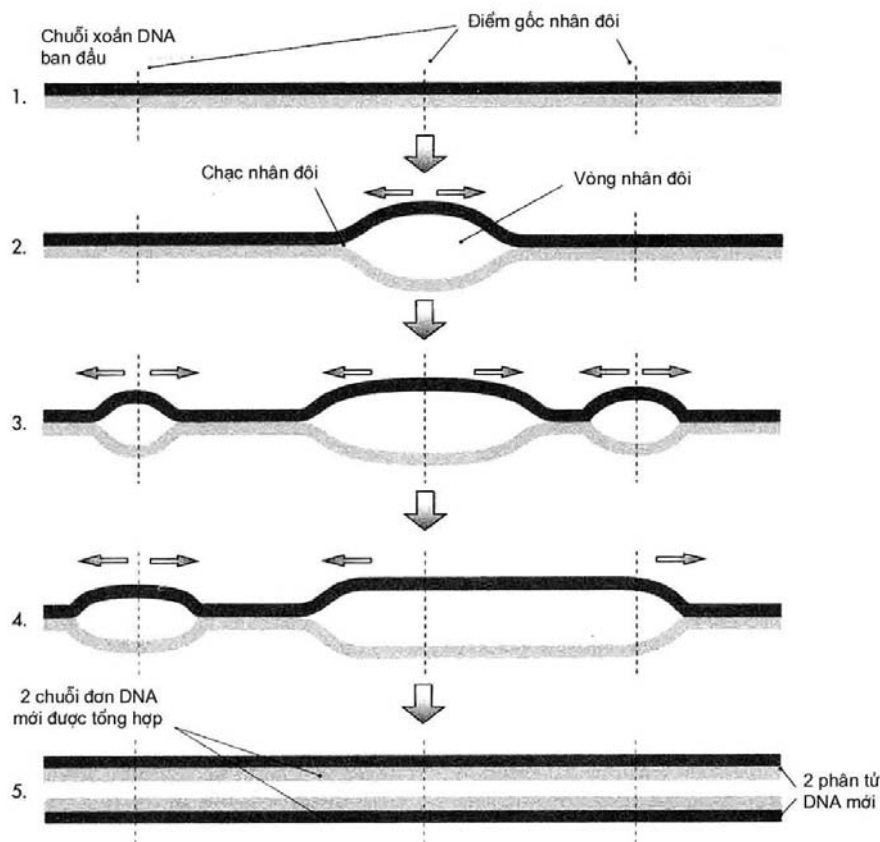
Hình 6. Sự nhân đôi của DNA

Quá trình nhân đôi của DNA được xúc tác bởi nhiều loại enzyme khác nhau, một enzyme xúc tác cho việc tháo xoắn, một enzyme khác xúc tác cho việc tách DNA thành 2 chuỗi đơn, và một số enzyme khác thực hiện những chức năng khác nhau trong quá trình nhân đôi. DNA polymerase là một trong số các enzyme chính phục vụ cho quá trình nhân đôi, di chuyển dọc theo sợi đơn DNA từ đầu 3' đến đầu 5' và gắn các nucleotide tự do theo nguyên tắc bổ sung vào sợi đơn DNA bằng cách gắn chúng vào đầu 3' của chuỗi polynucleotide đang được tổng hợp. Do đó sợi DNA đơn mới luôn luôn được hình thành theo chiều từ 5' đến 3' và quá trình nhân đôi trên 2 mạch của phân tử DNA mẹ sẽ diễn ra theo hai chiều ngược nhau.

Ngoài việc gắn các nucleotide, enzyme DNA polymerase còn thực hiện việc kiểm tra xem một nucleotide mới có bổ sung chính xác với nucleotide trên mạch khuôn không, nếu không thì nucleotide này sẽ bị loại bỏ và thay bằng một nucleotide khác. Quá trình này giúp đảm bảo cho sự nhân đôi của DNA diễn ra một cách chính xác. Nếu một sai sót trong quá trình nhân đôi không được sửa chữa thành công sẽ làm xuất hiện đột biến và các đột biến này có thể sẽ dẫn đến các bệnh di truyền.

Tốc độ nhân đôi của DNA khoảng 40 - 50 nucleotide / giây. Tốc độ này chậm hơn nhiều so với tốc độ nhân đôi ở vi khuẩn với 500 - 1000

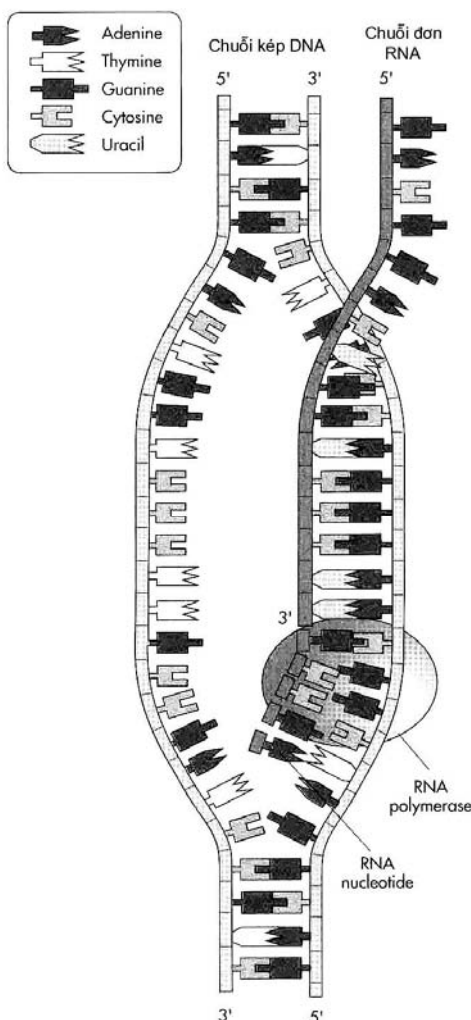
nucleotide / giây. Để có thể thực hiện nhân đôi một cách nhanh chóng DNA (một vài NST có khoảng 250 triệu nucleotide), sự nhân đôi xảy ra tại nhiều điểm khác nhau trên DNA, những vị trí này được gọi là các điểm gốc nhân đôi (replication origins). Cách nhân đôi như vậy sẽ tạo ra nhiều chỗ tách trên chuỗi DNA, những chỗ đó được gọi là các vòng nhân đôi (replication bubble) và phía xảy ra hướng phát triển sự nhân đôi của vòng nhân đôi này được gọi là chạc nhân đôi (replication fork) (hình 7).



Hình 7. Sự hình thành các vòng nhân đôi giúp quá trình nhân đôi diễn ra nhanh hơn

2. Quá trình phiên mã

Quá trình phiên mã (transcription) giúp truyền thông tin di truyền cho việc tổng hợp protein từ gene ở trên DNA trong nhân đi vào bào tương để tham gia vào quá trình tổng hợp protein. Quá trình này được thực hiện thông qua phân tử RNA.



Hình 8. Quá trình phiên mã trên DNA

trò quyết định mạch nào sẽ trở thành mạch khuôn trong việc tổng hợp mRNA thông qua việc định hướng cho enzyme RNA polymerase trên DNA. Trên mạch khuôn, RNA polymerase sẽ di chuyển theo chiều từ 3' đến 5' và cho phép các lắp ghép các ribonucleotide theo nguyên tắc bổ sung theo chiều từ 5' đến 3' với các base trên mạch khuôn theo cách thức tương tự như trong quá trình nhân đôi của DNA nhưng base thymine được thay bằng uracyl.

2. Sau khi quá trình tổng hợp RNA được bắt đầu, đầu 5' của phân tử RNA đang được tổng hợp sẽ được “bít” lại bằng cách thêm vào một

RNA cũng là một loại acid nucleic có cấu trúc tương tự DNA với các phân tử đường, nhóm phosphate và nitrogenous base tuy nhiên thay cho đường deoxyribose là đường ribose, và thay cho thymine là uracyl. Uracyl có cấu trúc tương tự thymine nên có thể bắt cặp với adenine. Một điểm khác biệt quan trọng nữa là RNA thường chỉ có cấu trúc sợi đơn thay vì sợi kép như DNA.

Quá trình phiên mã tổng hợp nên loại phân tử RNA thông tin (mRNA: messenger RNA) từ bản khuôn trên DNA (hình 8).

1. Bắt đầu cho quá trình phiên mã một trong số các enzyme RNA polymerase (RNA polymerase II) sẽ gắn vào một đoạn DNA nằm phía trên gene gọi là vị trí khởi động (promotor site). Dưới sự xúc tác của enzyme này cấu trúc xoắn kép của một đoạn DNA sẽ được tách đôi và một trong hai mạch của DNA sẽ đóng vai trò của bản khuôn để tổng hợp mRNA.

Vị trí khởi động đóng vai

nucleotide guanine đã được thay đổi về mặt hóa học đầu này được gọi là “5’ cap”. 5’ cap giúp ngăn cản sự giáng hóa của RNA trong quá trình tổng hợp và giúp chỉ định vị trí bắt đầu quá trình giải mã của mRNA.

3. Quá trình phiên mã được tiếp tục cho tới khi RNA polymerase đọc tới một đoạn nucleotide gọi là đoạn kết thúc (termination sequence). Khi đến vị trí này một đoạn gồm từ 100 đến 200 adenine sẽ được gắn vào đầu 3’ của mRNA, cấu trúc này được gọi là đuôi poly - A (poly A-tail). Đuôi poly-A được cho là có vai trò giữ cho phân tử này được hằng định và không bị giáng hóa khi vào trong bào tương. Khi đến vị trí kết thúc, RNA polymerase tiếp tục phiên mã trên chuỗi DNA thêm vài ngàn base tùy nhiên trên mRNA đoạn base thêm phía sau đuôi poly - A sẽ bị mất đi.

4. Cuối cùng RNA polymerase sẽ tách khỏi chuỗi DNA, giải phóng phân tử RNA với cấu trúc chuỗi đơn, phân tử này được gọi là phân tử mã sao nguyên thủy (primary transcript).

Ở một số gene người, trên một gene có thể có nhiều vị trí khởi đầu khác nhau nằm ở các vị trí khác nhau do đó làm gene có thể được bắt đầu phiên mã ở các vị trí khác nhau dẫn đến việc tổng hợp các phân tử protein ít nhiều khác nhau từ cùng một gene. Điều này cho phép với cùng một gene có thể mã hóa cho các protein khác nhau ở các mô khác nhau

3. Điều hòa sự biểu hiện của gen (hình 9)

Mặc dù tất cả tế bào của cơ thể đều mang trình tự DNA giống nhau, nhưng hoạt động phiên mã của các gene không giống nhau.

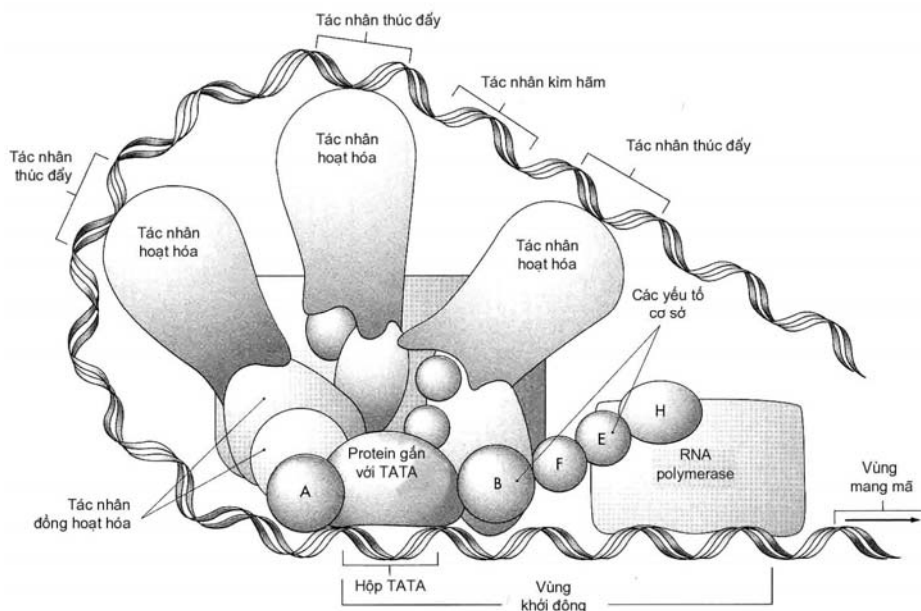
Một số gene được phiên mã trong tất cả các tế bào của cơ thể, chúng được gọi là các “gene quản gia” (housekeeping gene) chịu trách nhiệm mã hóa cho các sản phẩm cần thiết cho sự tồn tại và chuyển hóa của tế bào. Số này chỉ chiếm một tỉ lệ rất nhỏ trên DNA. Trong khi đó đa số gene chỉ hoạt động ở các mô đặc hiệu và ở những thời điểm nhất định do đó tạo nên tính đặc thù cho từng loại tế bào, loại mô khác nhau và qua đó sản xuất ra các loại protein khác nhau.

Nhiều loại protein khác nhau tham gia vào quá trình phiên mã. Một số cần thiết cho mọi quá trình phiên mã được gọi là các yếu tố phiên mã tổng quát (general transcription factors). Một số chỉ hoạt động ở một số gene nhất định vào những giai đoạn nhất định trong quá trình phát triển được gọi là các yếu tố phiên mã đặc hiệu (specific transcription factors).

Enzyme RNA polymerase II mặc dù có vai trò quyết định trong việc bắt đầu quá trình phiên mã thông qua việc gắn với vị trí khởi động nhưng tự nó không thể gắn vào vị trí này và không thể quyết định số lượng mRNA được tổng hợp.

Để thực hiện được quá trình phiên mã đòi hỏi một sự phối hợp phức tạp với khoảng trên dưới 50 loại protein khác nhau.

Những yếu tố phiên mã tổng quát cho phép gắn RNA polymerase vào đoạn DNA đặc hiệu như đoạn TATA và những đoạn khác để bắt đầu quá trình phiên mã trên vùng khởi động.



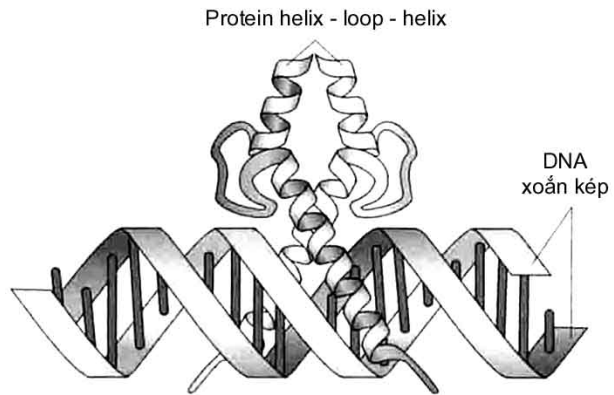
Hình 9. Các yếu tố tham gia vào cơ chế điều khiển hoạt động phiên mã

Hoạt động phiên mã của các gene đặc hiệu có thể được gia tăng đáng kể bằng cách tương tác với các đoạn DNA được gọi là tác nhân thúc đẩy (enhancer), đây là những đoạn có chiều dài khoảng vài ngàn nucleotide nằm ở phía trước hoặc sau gene. Tuy nhiên những tác nhân này không tương tác trực tiếp với các gene mà thay vào đó chúng được gắn với các yếu tố phiên mã đặc hiệu được gọi là các tác nhân hoạt hóa (activator). Những tác nhân này đến phiên nó lại gắn với tác nhân phiên mã đặc hiệu thứ hai gọi là các tác nhân đồng hoạt hóa (co-activator), các tác nhân này mới thật sự gắn với phức hợp các yếu tố phiên mã tổng quát nói trên. Chuỗi tác động này bắt đầu từ tác nhân thúc đẩy đến tác nhân hoạt hóa đến tác nhân đồng hoạt hóa rồi đến phức hợp phiên mã tổng quát và cuối cùng là đến bản thân của gene làm gia tăng tốc độ phiên mã của các gene đặc hiệu ở những thời điểm nhất định.

Trong khi các tác nhân thúc đẩy giúp gia tăng hoạt động phiên mã của các gene thì các đoạn DNA khác có tên là các tác nhân kim hãm

(silencer) lại ức chế hoạt động phiên mã của gene thông qua kiểu tác động tương tự.

Đột biến xảy ra ở các đoạn làm nhiệm vụ của tác nhân thúc đẩy, tác nhân kìm hãm, vị trí khởi động cũng như đột biến ở các gene mã hóa cho các yếu tố phiên mã có thể dẫn đến các bệnh di truyền do gây ra những sai lầm trong biểu hiện của các gene.



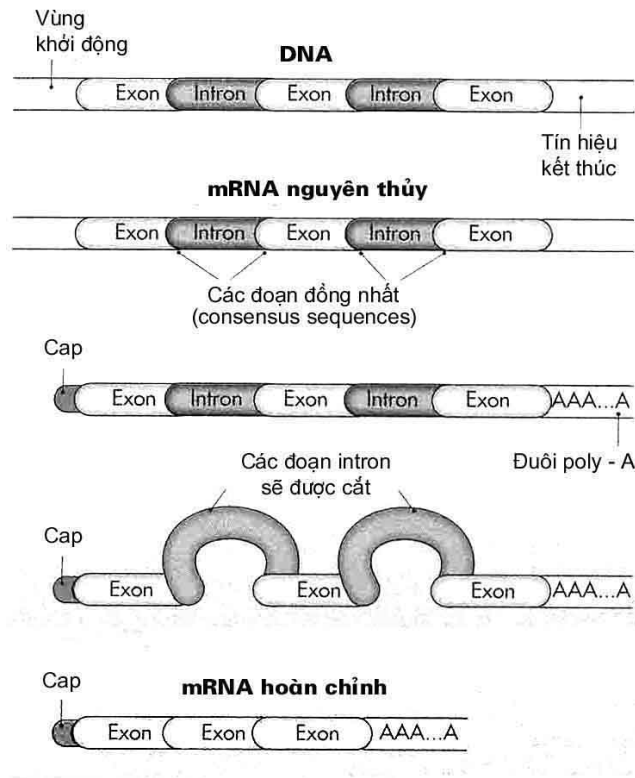
Hình 10. Một kiểu motif gắn với đoạn DNA đặc hiệu theo kiểu helix - loop - helix (xoắn - vòng - xoắn)

Một lượng lớn và khá phức tạp của các yếu tố phiên mã đã góp phần vào việc điều hòa một cách hiệu quả hoạt động của gene. Vấn đề đặt ra là làm thế nào chúng có thể định vị một cách chính xác các đoạn DNA đặc hiệu? Việc định vị này được thực hiện thông qua các motif gắn DNA (DNA-binding motif). Trong mỗi motif, cấu hình của phân tử protein cho phép chúng gắn một cách chính xác và hằng định trên một đoạn đặc hiệu của chuỗi xoắn kép DNA. Trong một số trường hợp chúng có thể uốn cong DNA để các tác nhân thúc đẩy có thể tác động lên trên các gene đích mặc dù chúng nằm xa nhau (hình 10).

4. Sự cắt nối gene (gene splicing) (hình 11)

Phân tử mRNA nguyên thủy (primary mRNA) được sao ra từ mạch khuôn ở trên gene theo nguyên tắc bổ sung. Ở cơ thể eukaryote, trước khi phân tử mRNA này đi ra khỏi nhân các enzyme của nhân tế bào sẽ cắt các intron đi đồng thời nối các đoạn exon lại với nhau để biến mRNA nguyên thủy thành mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA). Phân tử này sau đó sẽ được đưa vào bào tương.

Một vài gene có các vị trí cắt thay đổi (alternative splice sites), điều này làm cho một phân tử mRNA nguyên thủy có thể bị cắt theo nhiều kiểu khác nhau dẫn đến việc tạo ra các sản phẩm protein khác nhau từ cùng một gene. Những sai sót trong quá trình nối gene, cũng giống như những sai sót xảy ra trong quá trình nhân đôi cũng là một dạng đột biến có thể gây ra các bệnh di truyền.



Hình 11. Quá trình cắt nối mARN để tạo thành mRNA hoàn chỉnh

IV. Mã di truyền

Các protein được cấu tạo từ 1 hoặc nhiều chuỗi polypeptide. Mỗi chuỗi polypeptid được cấu tạo từ các đơn vị cấu trúc cơ bản là các acid amine. Cơ thể có 20 loại acid amine khác nhau, trình tự của các acid amine này trong chuỗi polypeptide được DNA quy định.

Mỗi acid amine được mã hóa bởi ba nucleotide kế nhau trên DNA, ba nucleotide này được gọi là một codon. Với 4 loại nucleotide khác nhau sẽ có 64 codon khác nhau bởi thành phần và trật tự của các nucleotide, trong số này có 3 codon kết thúc (stop codon) UAA, UAG và UGA có nhiệm vụ báo hiệu chấm dứt việc tổng hợp chuỗi polypeptide. Trong số 61 mã còn lại có nhiều codon cùng mã hóa cho 1 acid amine, hiện tượng này được gọi là hiện tượng thoái hóa mã (degeneration) (bảng 1).

Mã di truyền là chung cho toàn bộ sinh giới trừ một số ngoại lệ đối với các codon ở ti thể. Ở DNA của ti thể có một số codon mã cho các acid amine khác với nghĩa của các codon này trên DNA trong nhân.

- UGA mã cho tryptophan thay vì báo hiệu chấm dứt việc tổng hợp protein.
- AGA và AGG không mã cho arginine mà báo hiệu chấm dứt tổng hợp protein.
- AUA mã cho methionine thay vì mã cho isoleucine.

Bảng 1. Bảng mã di truyền.

VỊ TRÍ 1 (đầu 5')	VỊ TRÍ 2				VỊ TRÍ 3 (đầu 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	STOP	STOP	A
U	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
C	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
A	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
G	Val	Ala	Glu	Gly	G

Ala: Alanine; Arg: arginine; Asn: asparagine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Gln: glutamine; Glu: glutamic acid; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Trp: tryptophan; Tyr: tyrosine; Val: valine.

V. Hoạt động giải mã (translation)

Hoạt động giải mã là quá trình tổng hợp chuỗi polypeptide dựa trên khuôn mRNA. Phân tử mRNA không gắn trực tiếp với các amino acid mà phải thông qua vai trò của RNA vận chuyển (tRNA : transfer RNA).

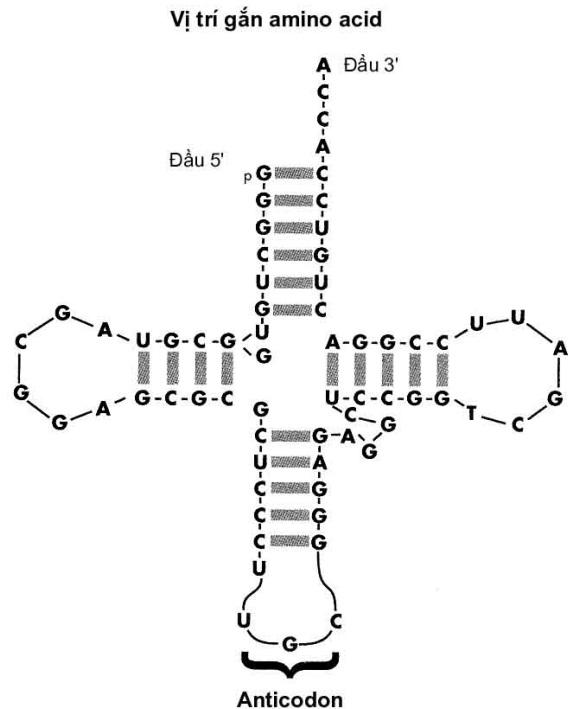
Phân tử này là một chuỗi RNA với khoảng 80 nucleotide có hình ba nhánh. Mỗi phân tử tRNA sẽ gắn 1 amino acid vào đầu 3' của nó qua một liên kết cộng hóa trị. Ở đầu kia của của phân tử tRNA là một đoạn 3 nucleotide được gọi là bộ ba đối mã (anticodon) (hình 12).

Trình tự của các nucleotide trong bộ ba đối mã sẽ bắt cặp với một codon trên mRNA theo nguyên tắc bổ sung. Bằng cách này phân tử mRNA quy định trình tự của các amino acid một cách đặc hiệu thông qua vai trò của các tRNA.

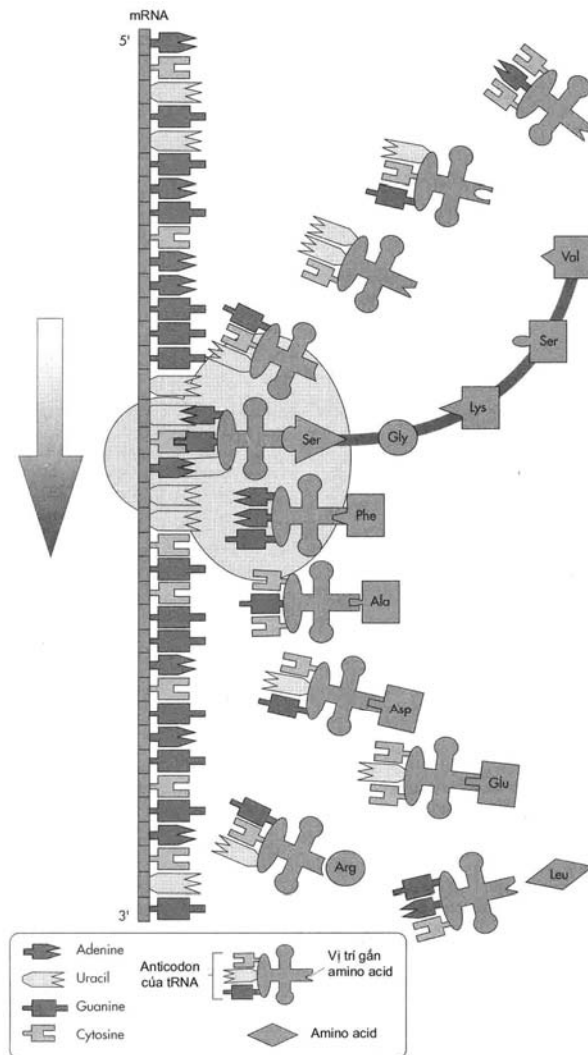
Nơi xảy ra quá trình tổng hợp protein trong bào tương là ribosome. Bào quan này được cấu tạo từ các protein có hoạt tính enzyme và các RNA ribosome (rRNA: ribosomal RNA) với tỷ lệ tương đương. Chức năng của rRNA là giúp gắn mRNA và tRNA vào ribosome.

Trong quá trình giải mã, đầu tiên ribosome gắn vào vị trí khởi đầu trên mRNA. Tại vị trí này có một codon đặc hiệu là AUG mã hóa cho amino acid methionine, amino acid này thường được tách khỏi chuỗi polypeptide đang được tổng hợp (hình 13).

Ribosome sẽ gắn tRNA vào bề mặt của nó để sự bắt cặp base có thể xảy ra giữa mRNA và tRNA. Ribosome di chuyển dọc theo phân tử mRNA từ codon này đến codon khác theo hướng từ 5' đến 3'. Khi qua được một codon thì một amino acid sẽ được giải mã thông qua sự tương tác giữa mRNA và tRNA. Trong quá trình này một enzyme của ribosome sẽ xúc tác cho việc hình thành các liên kết peptide giữa các amino acid kế nhau dẫn đến sự phát triển của chuỗi polypeptide. Khi ribosome đi đến codon kết thúc trên mRNA, sự giải mã và quá trình hình thành chuỗi polypeptide sẽ ngừng lại.



Hình 12: Cấu trúc của phân tử RNA vận chuyển



Hình 13: Quá trình giải mã trên mRNA

Đầu amino ($-NH_2$) của chuỗi polypeptide tương ứng với đầu 5' của mRNA và nhóm carboxyl ($-COOH$) tương ứng với đầu 3'. Khi hoàn tất quá trình giải mã, mRNA, ribosome, chuỗi polypeptide sẽ được tách rời nhau và chuỗi polypeptide sẽ được giải phóng vào trong tế bào chất.

Trước khi một chuỗi poly-peptide mới được tổng hợp có thể bắt đầu thực hiện hoạt động chức năng nó thường phải trải qua một số biến đổi.

Những biến đổi này được gọi là biến đổi sau giải mã (posttranslational modification).

Sự biến đổi này có thể diễn ra theo các kiểu khác nhau. Chuỗi polypeptide có thể được cắt thành các đoạn nhỏ hơn hoặc các chuỗi polypeptide khác nhau được gắn lại với nhau để tạo thành một phân tử protein lớn hơn hoặc các chuỗi bên carbohydrate được gắn thêm vào chuỗi polypeptide v.v... Những biến đổi này hết sức cần thiết để phân tử protein có được cấu trúc không gian chính xác, giúp chúng ổn định về cấu trúc và thực hiện các chức năng sinh học.

Chương 3

Đột biến gene

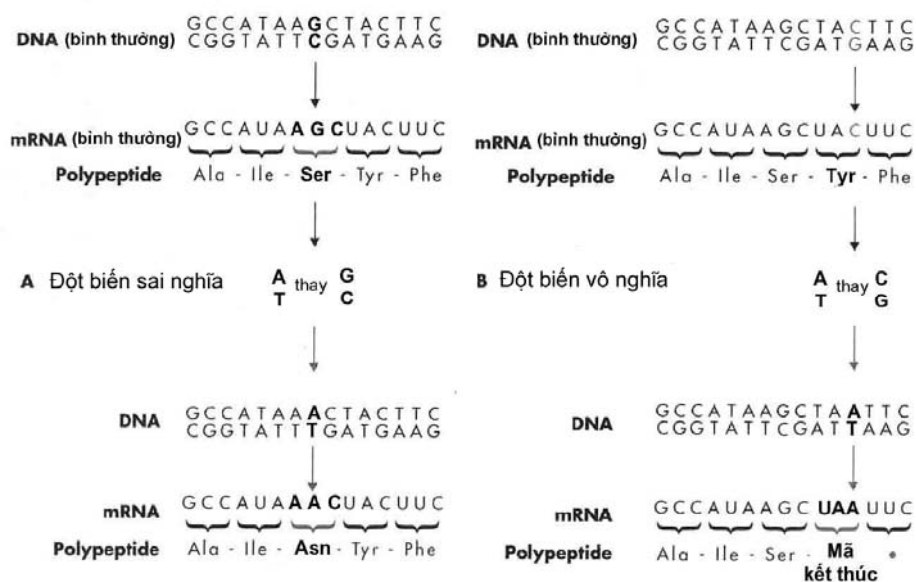
Đột biến gene (gene mutation) xảy ra khi có sự thay đổi trong trình tự của các nucleotide trên DNA. Chúng có thể xảy ra ở các tế bào dòng sinh dục (germline cell) hoặc các tế bào sinh dưỡng (somatic cell). Chương này tập trung vào các đột biến xảy ra trên các gene đơn (single gene), trong các tế bào dòng sinh dục và nằm trên các vùng DNA mang mã di truyền hoặc trên các đoạn tham gia vào quá trình điều hòa sự biểu hiện của gene vì các đột biến xảy ra trên các vùng khác của genome thường không gây ra các hậu quả về mặt lâm sàng.

I. Các loại đột biến đơn gene (single - gene mutation)

1. Đột biến thay cặp nucleotide (base pair substitution)

Một cặp nucleotide trong cấu trúc của gene bị thay bởi một cặp nucleotide khác. Tùy theo hậu quả của nó trên chuỗi polypeptide mà được chia làm ba loại:

1.1. Đột biến im lặng (silent substitution)



Hình 1: Đột biến sai nghĩa và đột biến vô nghĩa

Do tính chất thoái hóa của mã bộ ba nên đột biến làm thay đổi bộ ba mã hóa nhưng không làm đổi nghĩa do đó không làm thay đổi trình tự của các amino acid trong chuỗi polypeptide do đó không gây hậu quả trên kiểu hình.

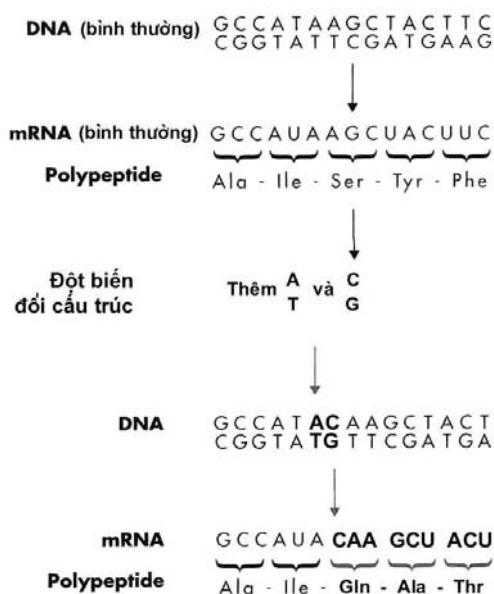
1.2. Đột biến sai nghĩa (missense mutation)(hình 1)

Đột biến chỉ làm thay đổi một amino acid trong chuỗi polypeptide.

1.3. Đột biến vô nghĩa (nonsense mutation) (hình 1)

Đột biến làm cho một codon có nghĩa trở thành một codon kết thúc (UAA, UAG hoặc UGA trên mRNA). Những codon này báo hiệu chấm dứt quá trình giải mã nên dẫn đến việc ngừng tổng hợp protein sớm và tạo nên các chuỗi polypeptide ngắn hơn bình thường. Ngược lại nếu một codon kết thúc bị đột biến thành một codon có nghĩa thì chuỗi polypeptide sẽ bị kéo dài.

2. Đột biến thêm (insertion) và mất (deletion) một hoặc nhiều cặp nucleotide



Hình 2: Đột biến đổi khung

Những đột biến thuộc loại này thường gây ra các hậu quả nghiêm trọng.

Nếu đột biến làm thừa hoặc mất ba nucleotide thuộc cùng một codon hoặc là một bội số của codon sẽ dẫn đến việc thừa hoặc thiếu 1 hoặc vài amino acid. Nếu số nucleotide thêm hoặc mất không phải là một bội số của codon sẽ làm thay đổi trình tự của các nucleotide từ vị trí đột biến về phía cuối gen, loại đột biến này được gọi là **đột biến đổi khung** (frameshift mutation) (hình 2)

Ví dụ: Đột biến thêm 1 nucleotide Adenine vào vị trí thứ 6 của chuỗi nucleotide sau 5' - ACT - **GAT** - TGC - GTT - 3' sẽ làm thay đổi trình tự của nó thành: 5' - ACT - **GAA** - T TG - CGT - T 3' và do đó trình tự amino acid từ Thr - **Asp** - Cys - Val sẽ trở thành Thr - **Glu** - Leu - Arg.

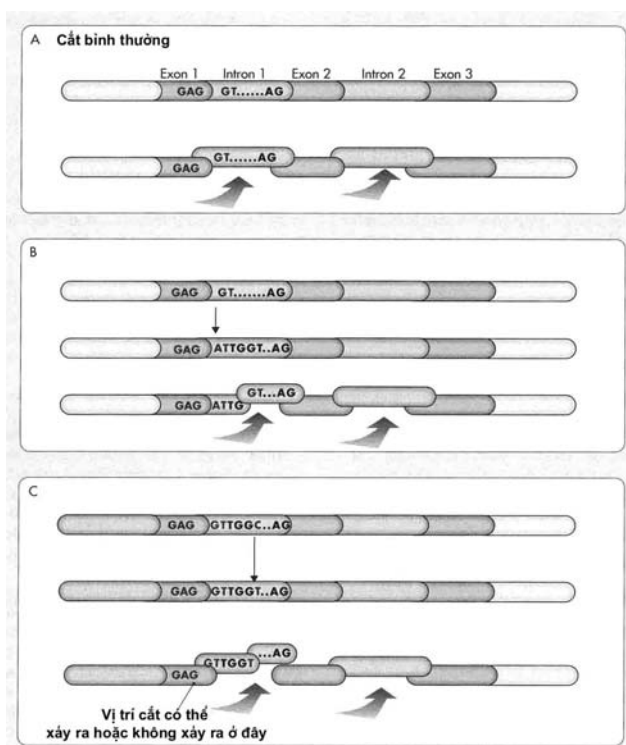
Đột biến đổi khung thường làm xuất hiện một codon vô nghĩa sau vị trí đột biến dẫn đến việc cắt ngắn chuỗi polypeptide.

3. Đột biến trên vị trí khởi động (*promotor mutation*)

Đột biến xảy ra trên vị trí khởi động của gen có thể làm giảm ái lực của RNA polymerase tại vị trí này và dẫn đến kết quả là giảm sản xuất mRNA và qua đó làm giảm sản lượng protein.

Đột biến xảy ra trên các gene mã hóa cho các yếu tố sao mã (*transcription factor gene*) hoặc trên các đoạn thúc đẩy (*enhancer*) của gene cũng gây ra hậu quả tương tự.

4. Đột biến ở vị trí cắt (*splice site mutation*)



Hình 3. (A) vị trí cắt bình thường. (B) Đột biến vị trí cắt xảy ra trên đoạn cho, GT bị thay bởi AT. (C) Đột biến làm xuất hiện một vị trí cho GT mới trong đoạn intron đầu tiên dẫn đến việc tạo nên các mRNA hoàn chỉnh bình thường và bất thường.

cắt tại những vị trí cắt bí ẩn sẽ làm mất đoạn một phần exon hoặc đôi khi mất nguyên cả một exon. Đột biến này cũng có thể làm cho một phần hoặc

Đột biến xảy ra ở ranh giới của các đoạn exon và intron do đó làm thay đổi các vị trí báo hiệu cho việc cắt chính xác các đoạn intron. Những đột biến này có thể xảy ra trên đoạn GT có chức năng xác định vị trí cho 5' (5' donor site) hay ở vị trí nhận 3' (3' acceptor site), hoặc có thể xảy ra ở những vùng lân cận các vị trí này (hình 3).

Khi đột biến này xảy ra, việc cắt có thể sẽ được thực hiện ở trong exon tiếp theo. Vị trí cắt mới này có trình tự nucleotide hơi khác so với ở vị trí bình thường, thường không được dùng đến và được “dấu” trong đoạn exon. Chúng được gọi là các **vị trí cắt ẩn** (*cryptic splice site*). Việc

toàn bộ một intron có mặt trong mRNA hoàn chỉnh.

II. Transposon (các yếu tố cơ động: mobile element)

Các transposon là các đoạn DNA có thể tự tạo ra bản sao của chính mình và cài vào các vị trí khác trên các nhiễm sắc thể và do đó có thể gây ra đột biến đổi cấu trúc. Đây là hiện tượng đã được chứng minh trên các súc vật thí nghiệm như ruồi giấm nhưng trước đây không rõ là có xảy ra ở người hay không. Hiện nay người ta đã phát hiện được ở một số bệnh như bệnh u xơ thần kinh (neurofibromatosis) type I, bệnh ung thư vú có tính gia đình, ung thư ruột kết (colon cancer) và bệnh máu khó đông A và B (hemophilia) ở người có liên quan đến hiện tượng này.

III. Đột biến của các đoạn DNA lặp (tandem repeated DNA sequence)

Đây là loại đột biến mới được khám phá gần đây. Đột biến ảnh hưởng lên các đoạn DNA lặp nằm ở trong hoặc ở cạnh các gene bệnh. Các đơn vị lặp có chiều dài ứng với ba cặp nucleotide như CAGCAGCAG chẳng hạn. Ở người bình thường có số lượng đoạn DNA lặp này tương đối nhỏ (ví dụ khoảng từ 20 đến 30 đoạn lặp) ở tại một vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể.

Vì một lý do chưa rõ số đoạn này bị tăng lên một cách đáng kể trong giảm phân hoặc trong giai đoạn sớm của quá trình phát triển phôi làm cho trẻ có số lượng đoạn lặp lên tới hàng trăm hoặc thậm chí hàng ngàn lần. Khi hiện tượng này xảy ra tại một số vùng nhất định trên genome sẽ gây ra các bệnh di truyền. Giống như các đột biến khác chúng có thể được truyền cho thế hệ sau. Hiện nay người ta đã biết khoảng độ hơn mười bệnh liên quan đến loại đột biến này.

IV. Hậu quả của đột biến gene ở mức phân tử

Đột biến gene có thể làm tăng (gain of function) hoặc mất chức năng (loss of function) của phân tử protein do nó mã hóa.

1. Đột biến làm tăng chức năng của protein

Đột biến làm xuất hiện một phân tử protein mới hoàn toàn hoặc làm biểu hiện quá mức bình thường chức năng của một phân tử protein hoặc làm phân tử protein biểu hiện không phù hợp (được tổng hợp ở không đúng loại mô hoặc không đúng giai đoạn). Đột biến làm tăng chức năng gây ra những bệnh di truyền trội (dominant disorder) (Vd: Bệnh Huntington).

2. Đột biến làm mất chức năng của protein

Đột biến làm mất 50% sản phẩm protein của gene nhưng 50%

protein bình thường còn lại vẫn đủ cho hoạt động chức năng bình thường do đó gây ra những bệnh di truyền lặn (recessive disorder). Người mang gene đột biến ở trạng thái dị hợp sẽ không có biểu hiện bệnh. Tuy nhiên trong một số trường hợp 50% sản phẩm protein bình thường vẫn không đủ cho chức năng bình thường khi đó sẽ làm xuất hiện bệnh ở trạng thái dị hợp (có biểu hiện trội), tình trạng này được gọi là **haploinsufficiency**.

Một loại đột biến làm mất chức năng của protein khác là **đột biến âm tính trội** (dominant negative mutation), loại đột biến này tạo ra sản phẩm protein không những không có chức năng mà còn ức chế chức năng của phân tử protein được tổng hợp bởi allele bình thường trong kiểu gene dị hợp. Hiện tượng này thường được thấy ở các gene mã hóa cho các phân tử protein được cấu tạo từ hai hoặc nhiều tiểu đơn vị.

V. Nguyên nhân của đột biến

Về mặt nguyên nhân đột biến được chia làm hai loại:

(1) *Đột biến cảm ứng (induced mutation)* xảy ra do tác động của các tác nhân có trong môi trường sống. Các tác nhân gây ra dạng đột biến này được gọi là tác nhân đột biến (mutagen).

(2) *Đột biến tự nhiên (spontaneous mutation)* xảy ra trong quá trình nhân đôi của DNA.

Các nghiên cứu trên súc vật thí nghiệm cho thấy phóng xạ (radiation) là một tác nhân đột biến quan trọng. Các tác nhân phóng xạ ion hoá (ionizing radiation) như tia X và bụi phóng xạ có thể làm tách các electron ra khỏi các nguyên tử do đó tạo nên các ion bị thay đổi điện tích. Khi các ion này nằm cạnh hoặc trong cấu trúc của DNA chúng có thể thúc đẩy các phản ứng hóa học làm thay đổi các base của DNA. Tác nhân phóng xạ ion hóa này cũng có thể làm phá vỡ cấu trúc xoắn kép của DNA. Dạng phóng xạ này có thể có thể tác động trên mọi loại tế bào của cơ thể bào gồm cả các tế bào mầm sinh dục.

Các tác nhân phóng xạ không ion hóa (nonionizing radiation) không làm thay đổi điện tích của các nguyên tử nhưng làm cho các electron có thể nhảy từ quỹ đạo trong ra quỹ đạo ngoài của nguyên tử làm những nguyên tử này trở nên không hằng định về mặt hóa học. Tia cực tím (UV: ultraviolet) có mặt tự nhiên trong ánh sáng mặt trời là một ví dụ cho loại phóng xạ này. Tia cực tím tạo nên các liên kết cộng hóa trị giữa các base pyrimidine nằm cạnh nhau như thymine và cytosine sẽ tạo nên các pyrimidine dimers (dimers là các phân tử có 2 tiểu đơn vị), những dimers này không thể bắt cặp chính xác với các base purine trong quá trình nhân đôi của DNA, dẫn đến kết quả là gây ra thay thế một cặp base. Vì tia cực

tím chỉ được hấp thu bởi lớp biểu bì nên chỉ có thể gây ra ung thư da mà không thể đến được các tế bào mầm sinh dục.

Một số các hóa chất cũng có thể gây ra đột biến do có cấu trúc tương tự các base của DNA, chúng được gọi là các **base tương đồng** (base analog) như 5 - bromouracyl. Loại base này có thể thay thế cho một base thật sự của DNA trong quá trình nhân đôi. Do cấu trúc của base tương đồng không giống một cách hoàn toàn như base mà nó thay thế do đó nó có thể gây ra sai sót trong quá trình bắt cặp ở những lần nhân đôi tiếp theo.

Hàng trăm loại hóa chất đã được phát hiện là có khả năng gây đột biến ở súc vật thí nghiệm như nitrogen mustard, vinyl chloride, các tác nhân alkyl hoá, formaldehyde, sodium nitrite và saccharin. Khả năng gây đột biến của chúng không giống nhau. Một số tác nhân đột biến được sản xuất bởi con người nhưng cũng có nhiều tác nhân xuất hiện tự nhiên trong môi trường như aflatoxin B1 có mặt phổ biến trong thực phẩm.

VI. Tỷ lệ đột biến

Ở mức độ nucleotide, tỷ lệ đột biến (mutation rate) được ước tính khoảng 10^{-9} cho mỗi cặp base trong mỗi lần phân chia tế bào (những đột biến này đã tránh được quá trình sửa chữa DNA). Ở mức độ gene, tỷ lệ đột biến rất thay đổi, tỷ lệ biến thiên từ 10^{-4} đến 10^{-7} đối với mỗi locus qua mỗi lần phân chia tế bào, sự biến động này là do: (1) Kích thước của các gene hết sức khác nhau; (2) Có một số đoạn nucleotide nhất định đặc biệt nhạy cảm với đột biến được gọi là các điểm nóng đột biến (mutation hot spots).

Tỷ lệ đột biến cũng thay đổi đáng kể theo tuổi của bố mẹ. Một vài bất thường NST gia tăng đáng kể so với sự gia tăng của tuổi mẹ và các đột biến đơn gene có thể gia tăng theo tuổi bố. Sự gia tăng này được thấy trong nhiều bệnh do đột biến đơn gene như hội chứng Marfan và tật loạn sản sụn bẩm sinh (achondroplasia). Nguy cơ sinh một đứa con bị hội chứng Marfan cao khoảng 5 lần hơn ở người nam trên 40 tuổi so với các người nam trong độ tuổi 20 (hình 8). Nguyên nhân của hiện tượng này được cho là liên quan tới hoạt động của các tế bào mầm sinh dục ở người nam đã thực hiện phân chia trong suốt cuộc đời tạo điều kiện cho việc tích lũy các đột biến xảy ra do sai sót trong quá trình nhân đôi.

VII. Sửa chữa DNA

Trong mỗi lần phân chia tế bào sẽ có khoảng 3 tỷ cặp base thực hiện nhân đôi nghĩa là nguy cơ xảy ra sai sót trong quá trình này để dẫn đến đột biến là rất cao tuy nhiên trong thực tế sự nhân đôi của DNA đã diễn ra một cách chính xác đến ngạc nhiên. Nguyên nhân chính của sự chính xác này

là hiện tượng sửa chữa DNA (DNA repair) xảy ra ở mọi tế bào bình thường trong cơ thể của các sinh vật bậc cao. Hàng chục loại enzyme khác nhau đã tham gia vào quá trình sửa chữa các DNA bị tổn thương. Chúng ghi nhận một cách chọn lọc một base bị thay đổi, loại bỏ nucleotide mang nó bằng cách cắt ra khỏi chuỗi DNA, sau đó thay bằng một nucleotide mang base chính xác theo nguyên tắc bổ sung và gắn DNA lại. Người ta cho rằng cơ chế này cho phép sửa chữa tới 99,9% các sai sót.

Chương 4

Một số phương pháp phát hiện các biến dị di truyền ở mức phân tử

Trong thế kỷ 20 người ta mới bắt đầu nghiên cứu về các biến dị của gene, hậu quả của các đột biến tích lũy theo thời gian. Sự đánh giá và đo lường các biến dị này trong quần thể và trong các gia đình có ý nghĩa rất quan trọng trong việc lập bản đồ gen nhằm xác định vị trí đặc hiệu của chúng trên các NST. Đây cũng là chìa khóa để xác định chức năng của gen và đặt cơ sở cho các chẩn đoán di truyền. Dưới đây sẽ mô tả các phương pháp đã được sử dụng để phát hiện các biến dị di truyền ở người.

I. Điện di protein (protein electrophoresis)

Kỹ thuật này phát triển đầu tiên vào thập niên 1930 và được áp dụng rộng rãi ở người vào các thập niên 1950 và 1960 cho phép phát hiện một cách đáng kể tính chất đa hình (polymorphism) ở người. Kỹ thuật này dựa trên nguyên tắc sự khác biệt của chỉ một amino acid trong phân tử protein xảy ra do đột biến trên DNA sẽ có thể gây ra một sự khác biệt nhẹ trong điện tích của protein. Ví dụ như trong bệnh hồng cầu hình liềm sự thay thế glutamic acid bằng valine trong chuỗi beta globin sẽ làm thay đổi điện tích của chuỗi globin vì glutamic acid có hai nhóm carboxyl trong khi đó valine chỉ có một nhóm carboxyl.

Điện di có thể được sử dụng để xác định một người có Hb bình thường (HbA) hay mang Hb bị đột biến gây bệnh hồng cầu hình liềm (HbS). Hemoglobin được cho vào trong khay gel gồm (tinh bột, agarose và polyacrylamide) để chạy điện di. Do có sự khác biệt trong điện tích nên HbS và HbA sẽ di chuyển với các tốc độ khác nhau trên gel. Sau khi cho chạy điện di trên gel trong nhiều giờ chúng được nhuộm bằng dịch hóa chất để có thể thấy được vị trí của chúng trên khay gel. Căn cứ sự phân bố của chúng trên khay gel để xác định người đó đồng hợp tử HbA, đồng hợp tử HbS hay dị hợp tử (HbA/HbS). (hình 1)

Điện di protein đã được dùng để phát hiện các biến dị amino acid trên hàng trăm loại protein người. Tuy nhiên các đột biến thay base nhưng không làm đổi nghĩa của codon và các đột biến làm thay đổi amino acid nhưng không làm thay đổi điện tích của protein sẽ không thể phát hiện được bằng phương pháp này. Vì những lý do đó điện di protein chỉ cho phép phát hiện chỉ khoảng một phần ba các đột biến xảy ra trên các codon của DNA. Các đột biến xảy ra trên các đoạn DNA không mang mã cũng

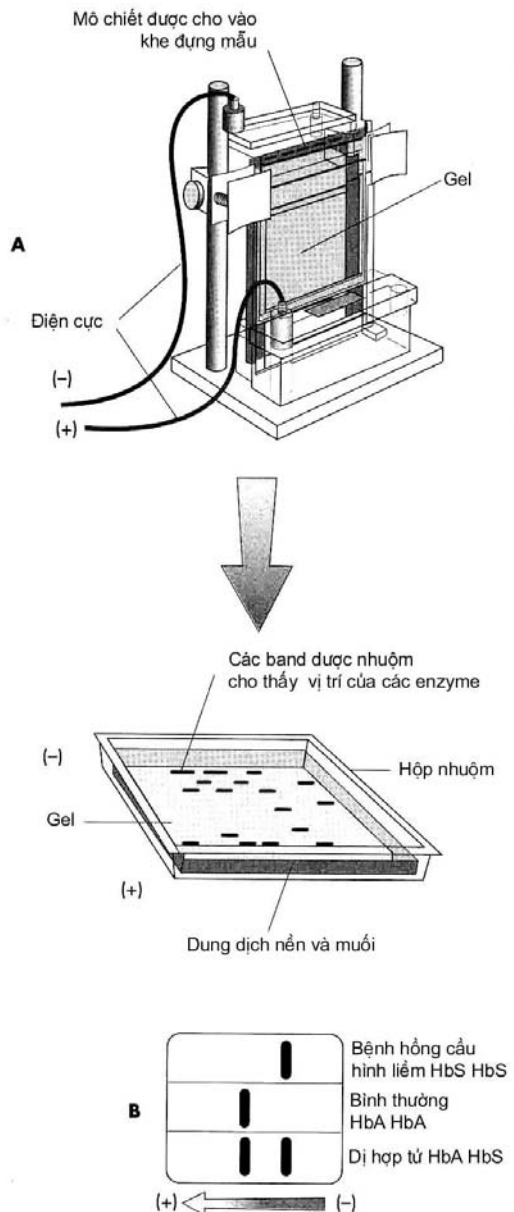
không phát hiện được bằng phương pháp này.

II. Phát hiện đột biến ở mức DNA

Biến dị trong DNA của người được ước tính thay đổi trong khoảng từ 1/300 đến 1/500 bp. Như vậy sẽ có khoảng 10 triệu vị trí đa hình (polymorphism sites) có mặt trong 3 tỷ cặp base có trong genome của người. Việc nghiên cứu các biến dị của DNA thông qua các nhóm máu và điện di protein chỉ cho phép phát hiện một tỷ lệ rất nhỏ trong số các biến dị này. Các kỹ thuật phân tử phát triển trong 20 năm qua đã giúp phát hiện thêm hàng ngàn biến dị mới ở mức DNA. Dưới đây trình bày một số phương pháp phổ biến.

1. Sự đa hình trong chiều dài các đoạn DNA giới hạn (*Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLPs*)

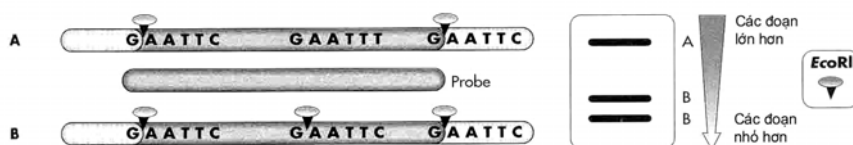
Nỗ lực đầu tiên trong việc phát hiện các biến dị di truyền ở mức độ DNA được thực hiện thông qua vai trò của các enzyme của vi khuẩn được gọi là các enzyme giới hạn (restriction endonuclease/restriction enzyme). Các enzyme này được sản xuất bởi nhiều loại vi khuẩn khác nhau nhằm mục đích ngăn chặn sự xâm nhập của các DNA lạ bằng cách cắt nhỏ những DNA này. Các DNA lạ sẽ được cắt tại những vị trí đặc hiệu trên DNA được gọi là những vị trí ghi nhận hay vị trí



Hình 1: Kỹ thuật điện di protein

giới hạn (recognition sites/restriction sites).

Ví dụ: Ở *Escherichia coli* (một loại vi khuẩn có trong ruột) có một enzyme giới hạn EcoRI ghi nhận một đoạn DNA có trình tự GAATTC. Mỗi khi bắt gặp đoạn này ở trên DNA thì EcoRI sẽ cắt giữa vị trí G và A dẫn đến việc tạo thành các đoạn DNA giới hạn.



Hình 2: Cắt DNA bằng enzyme giới hạn EcoRI

Giả sử có một đoạn DNA với chiều dài khoảng vài ngàn nucleotide và có 3 vị trí ghi nhận cho enzyme EcoRI. Nếu có 1 biến dị xảy ra ở vị trí nằm giữa làm đoạn GAATTC trở thành GAATTT, EcoRI sẽ không nhận diện được vị trí này và sẽ chỉ cắt tại 2 vị trí đầu và cuối. Do đó ở những người mang biến dị trên vị trí cắt ở giữa (A) sẽ có đoạn DNA giới hạn dài hơn so với người bình thường không mang biến dị (B). (hình 2)

Để có thể quan sát được các đoạn DNA giới hạn có chiều dài khác nhau người ta đã thực hiện kỹ thuật gồm các bước sau (hình 3):

(1) *Xử lý bằng enzyme giới hạn (restriction digestion)*

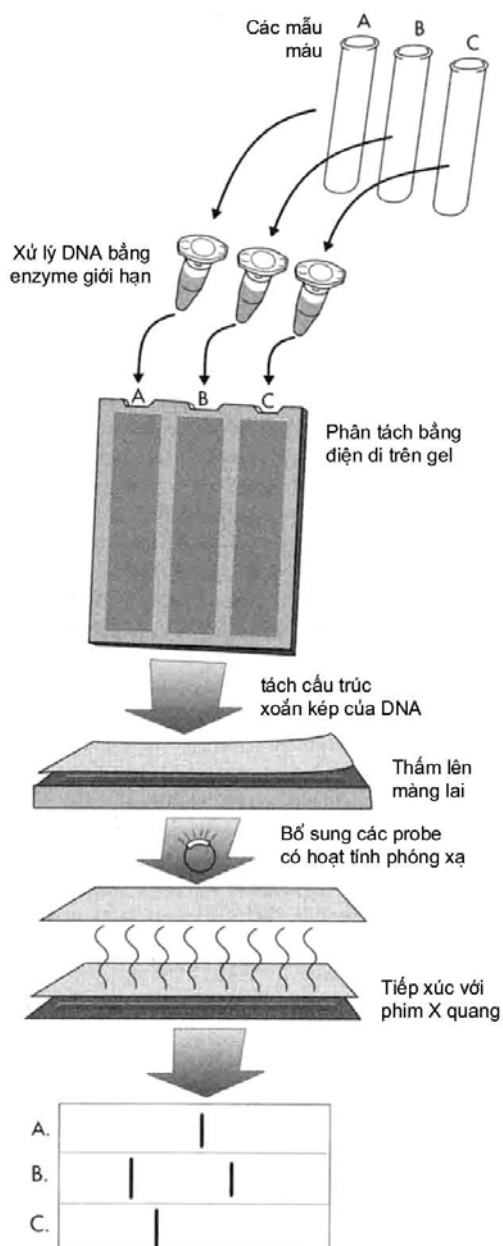
Trước tiên DNA được chiết tách từ các mẫu mô, thường là từ máu. Sau đó DNA được cho tiếp xúc với một enzyme giới hạn như EcoRI. Quá trình này sẽ tạo ra trên một triệu đoạn DNA với các chiều dài khác nhau.

(2) *Điện di*

Những đoạn này được đem điện di ở trên gel theo một quy trình tương tự như điện di protein tuy nhiên các đoạn DNA di chuyển trên gel phụ thuộc vào kích thước chứ không phụ thuộc vào điện tích. Các đoạn DNA ngắn hơn sẽ di chuyển nhanh hơn trên gel.

(3) *Tách cấu trúc xoắn kép*

Sau đó các đoạn DNA được chuyển từ cấu trúc xoắn kép thành cấu trúc mạch đơn bằng cách cho tiếp xúc với dung dịch kiềm.



Hình 3: Kỹ thuật phát hiện tính đa hình trong chiều dài của các đoạn DNA giới hạn

(4) Cố định DNA

Để cố định vị trí của các đoạn DNA này người ta thấm chuyển chúng từ gel qua một màng rắn như nitrocellulose (Southern transfer). Màng này bây giờ sẽ chứa hàng ngàn đoạn DNA phân bố theo trật tự tương tự như vị trí của chúng ở trên gel và được gọi là màng thấm Southern (Southern Blot).

(5) Xác định đoạn DNA đặc hiệu

Nếu người ta nhìn tất cả các đoạn này một lần trên màng lai sẽ khó phân biệt chúng với nhau do số lượng các đoạn DNA trên đó quá lớn. Vì vậy để có thể nhận định sự có mặt của các đoạn DNA đặc hiệu người ta dựa vào nguyên tắc bổ sung.

Một mẫu dò (probe) đặc hiệu được tạo ra nhờ kỹ thuật DNA tái kết hợp (recombinant DNA) mang một đoạn mạch đơn DNA đặc hiệu có chiều dài khoảng vài ngàn bp và được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ.

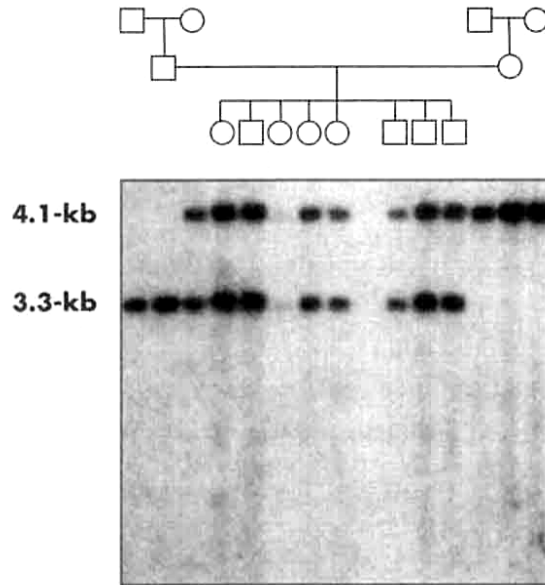
Màng thấm sẽ được cho tiếp xúc với hàng ngàn probe có hoạt tính phóng xạ. Trong những điều kiện nhất định quá trình bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung giữa các probe và các đoạn DNA đặc hiệu tương ứng sẽ xảy ra. Do chỉ có một vài kb

nên probe sẽ xác định được các đoạn DNA đặc hiệu (thường chỉ có một hoặc hai đoạn).

Để có thể quan sát được vị trí đã xảy ra quá trình lai giữa các probe và các đoạn DNA đặc hiệu, màng lai sẽ được cho tiếp xúc với phim X quang, phóng xạ phát ra từ các đoạn dò sẽ tác động lên phim tạo ra các vết sẫm màu, được gọi là các band. Phương pháp này được gọi là phương pháp phóng xạ tự chụp (autoradiogram).(hình 4)

Như vậy sự biến dị xảy ra trong trình tự của DNA tại những vị trí giới hạn đặc hiệu sẽ dẫn đến tính đa hình trong chiều dài của các đoạn DNA giới hạn (RFLPs) khi được cắt bởi cùng một loại enzyme giới hạn đặc hiệu. Hiện tượng này đã tạo ra sự đa dạng trong chiều dài của các đoạn DNA mà khi điện di chúng trên gel, chuyển lên trên màng lai và dùng các probe đặc hiệu có hoạt tính phóng xạ để phát hiện thì có thể đánh giá được các biến dị này.

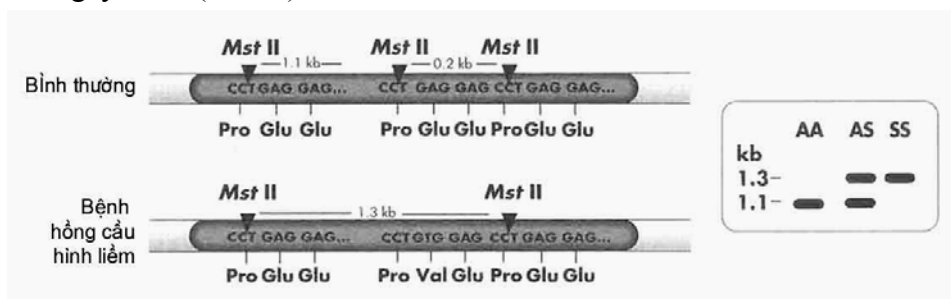
Quay trở lại với trường hợp bệnh hồng cầu hình liềm, ở người bình thường tại vị trí thứ 6 của chuỗi polypeptide globin beta trong cấu trúc của phân tử Hb là glutamic acid. Amino acid được mã hóa trên gene bằng codon GAG. Trong bệnh hồng cầu hình liềm acid này được thay bằng valin, mã hóa trên gene bằng codon GTG. Enzym giới hạn Mst II ghi nhận đoạn DNA CCTNAGG (N nghĩa là enzyme này có thể ghi nhận bất cứ loại base nào của DNA tại vị trí đó). Như vậy nó sẽ cắt đoạn DNA bình thường tại vị trí này cũng như ở các vị trí giới hạn tương tự nằm ở hai bên vị trí này. Kết quả là Mst II sẽ tạo ra hai đoạn DNA, một đoạn có chiều dài 1100 bp và một đoạn có chiều dài 200 bp. Ở các DNA mang đột biến thay GAG bằng GTG làm Mst II không ghi nhận được đoạn giới hạn đó nữa



Hình 4: Hình phóng xạ tự chụp cho thấy vị trí của 1 band 4,1kb và 1 band 3,3kb. Mỗi dây đại diện cho một thành viên trong gia đình trong gia hệ trên hình phóng xạ tự chụp

nên đoạn DNA đột biến không được cắt ở vị trí giữa, do đó chỉ tạo ra một đoạn DNA có chiều dài 1300 bp.

Trong điện di đoạn ngắn hơn sẽ di chuyển xa hơn ở trên gel nên hai đoạn DNA có kích thước khác nhau (1100 và 1300 bp) có thể phân biệt với nhau dễ dàng trên màng lai nhờ các probe mang DNA của gene beta - globin. Trong trường hợp này RFLPs đã cho phép phát hiện trực tiếp đột biến gây bệnh.(hình 5)



Hình 5: Cắt gene beta - globin bằng enzym giới hạn Mst II

Trong thực tế hiện nay đã có nhiều phương pháp hiệu quả hơn để đánh giá đột biến gây bệnh hồng cầu hình liềm. Tuy nhiên phương pháp này vẫn còn hữu ích trong việc xác định nhiều loại biến dị và các đột biến gây bệnh khác.

Hiện nay người ta đã biết được hàng ngàn enzyme giới hạn, mỗi enzyme ghi nhận một đoạn DNA đặc hiệu. Thêm vào đó hàng ngàn loại probe khác nhau đã được tổng hợp, mỗi probe đại diện cho một đoạn ngắn DNA của người. Bằng cách kết hợp giữa các enzyme và các probe khác nhau, hàng ngàn vị trí đa hình đã được phát hiện trên genome của người. Sự đa hình này được sử dụng làm công cụ trong việc định vị nhiều gene bệnh quan trọng như gene gây bệnh u xơ thần kinh type I (neuro-fibromatosis type I), bệnh Huntington, bệnh xơ nang (cystic fibrosis) v.v...

2. Sự đa hình trong số lượng của các đoạn lặp (Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism: VNTR)

Phương pháp xác định các RFLP chỉ cho phép phát hiện các biến dị có mặt hoặc không có mặt ở một vị trí hạn chế trên DNA. Các biến dị này được gọi là sự đa hình của các vị trí giới hạn (restriction site polymorphism: RSPs). trong trường hợp này mỗi biến dị chỉ có thể có 2 allele do đó cũng dẫn đến sự hạn chế khi khảo sát các biến dị di truyền.

Sự đa dạng sẽ tăng lên nếu như biến dị có thể tạo ra nhiều allele hơn, những biến dị như vậy được thấy ở các DNA tiểu vệ tinh (minisatellites). Biến dị di truyền ở đây được tính thông qua số lượng của các đoạn lặp trên

một vùng nhất định. Một vùng DNA tiểu vệ tinh có thể lặp 2, 3 lần hoặc lên đến trên 20 lần lặp. Số lượng này thay đổi rất lớn từ người này qua người khác tạo ra nhiều biến dị di truyền trong quần thể vì vậy chúng được gọi là **số lượng dao động của các đoạn lặp nối tiếp** (variable number of tandem repeats: **VNTRs**).

Các VNTR được phát hiện bằng kỹ thuật tương tự kỹ thuật dùng để phát hiện các RFLP. DNA sẽ được xử lý bằng một loại enzyme giới hạn, các đoạn DNA sau đó được điện di, tách xoắn và chuyển qua màng thấm. Tuy nhiên trong khi sự đa hình của các vị trí giới hạn chỉ cho phép phát hiện các biến dị dựa vào sự có mặt hoặc vắng mặt của các vị trí giới hạn (chỉ có 2 allele) thì các VNTR cho phép phát hiện các biến dị thông qua sự khác nhau về số lượng của các đoạn lặp giữa hai vị trí giới hạn (có thể có > 2 allele). (hình 6)



Hình 6: Tính đa hình trong số lượng của các đoạn lặp (VNTRs)

Giống như những vùng DNA tiểu vệ tinh, các DNA vi vệ tinh (microsatellite) cũng có những biến dị trong chiều dài do kết quả của sự khác nhau trong số lần lặp. Mỗi vi vệ tinh chỉ có từ 2, 3 hoặc 4 nucleotide và chúng được gọi là các đoạn lặp ngắn (short tandem repeat: STR). Mỗi đoạn lặp ngắn như vậy có thể lặp đi lặp lại hàng trăm lần. Số lần lặp của các DNA vi vệ tinh có sự khác biệt rất lớn giữa người này với người khác và giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng.

Tính chất đa hình của các đoạn lặp ngắn (short tandem repeat polymorphism: STRP) khác với các VNTR ở kích thước của đoạn lặp và chúng được phân lập không phải thông qua các vị trí giới hạn nằm cạnh các đoạn lặp mà thay vào đó là bằng kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction: phản ứng tổng hợp dây chuyền nhờ enzyme polymerase).

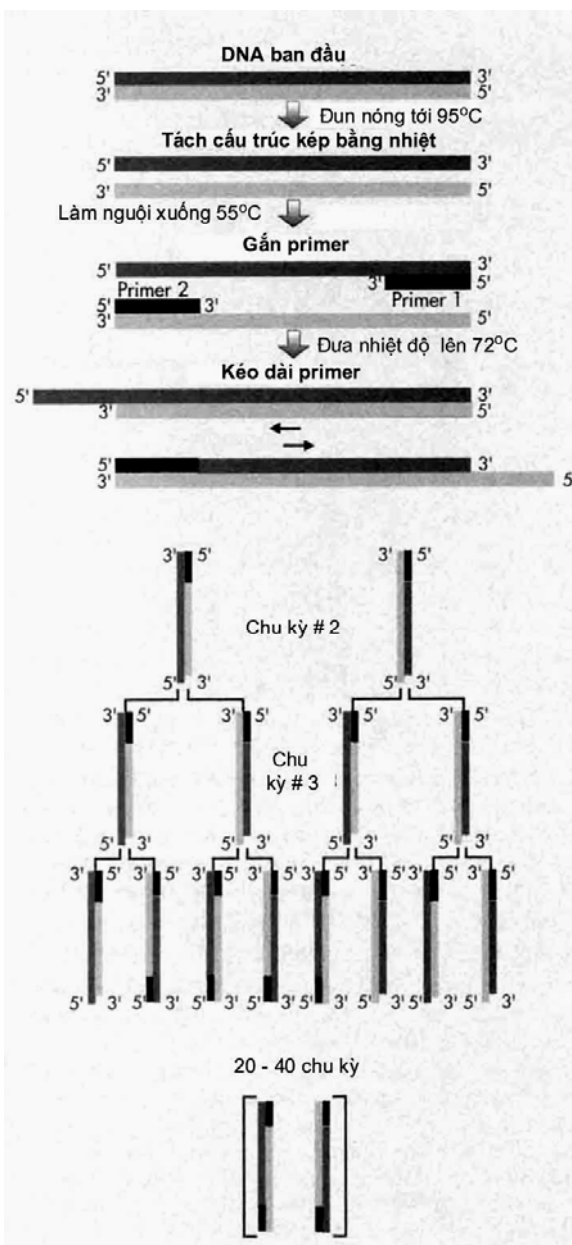
Tính đa hình về số lượng của các VNTR và của các vi vệ tinh rất hữu ích trong việc lập bản đồ gene. Đặc biệt là các DNA vi vệ tinh vì trong genome chúng có mặt nhiều hơn, phân bố đều hơn và cũng dễ đánh giá hơn trong phòng thí nghiệm. Do các đặc tính này mà các DNA vi vệ tinh trở thành các đa hình được chọn lựa trong hầu hết các nghiên cứu để lập bản đồ gene.

Ngoài ra sự đa hình của các VNTR và của vi vệ tinh cũng được sử dụng một cách hiệu quả trong lĩnh vực pháp lý như xác định người cha, xác định tội phạm.

3. Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR

Việc sử dụng các RFLP và VNTR mặc dù có ích nhưng phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật dòng hóa (cloning) và kỹ thuật chuyển và cố định DNA lên màng thấm. Những kỹ thuật này có một số hạn chế nhất định: (1) việc dòng hóa thường đòi hỏi nhiều thời gian (trung bình là 1 tuần hoặc hơn); (2) việc thực hiện kỹ thuật Southern blot đòi hỏi một lượng lớn DNA tinh khiết, thường là phải nhiều microgram (để có được số lượng này thường cần khoảng 1ml máu tươi).

Kỹ thuật PCR cho phép nhân một đoạn DNA đặc hiệu ngắn (có chiều dài khoảng vài ngàn kb hoặc ngắn hơn) nhân lên một cách nhanh chóng thành hàng triệu bản sao giống hệt nhau (hình 7) tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện các biến dị di truyền ở mức DNA hiệu quả hơn rất nhiều so với các phương pháp cổ điển.



Hình 7: Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR

Quá trình thực hiện PCR đòi hỏi các thành phần sau:

(1) *Hai đoạn mồi (primer)*, mỗi đoạn mồi là một đoạn DNA có từ 15 đến 20 base được gọi là oligonucleotide (oligo có nghĩa là "một vài"). Các primer này tương ứng với trình tự của DNA nằm ngay ở các đoạn được quan tâm như đoạn chứa một đột biến gây bệnh hoặc chứa một đa hình của đoạn lặp DNA vi vệ tinh. Các primer này được tổng hợp nhân tạo trong phòng thí nghiệm.

(2) *DNA polymerase*, đây là một loại enzyme hằng định với nhiệt độ được trích chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*. Xúc tác cho quá trình nhân đôi của DNA, trong kỹ thuật PCR quá trình này được gọi là quá trình kéo dài primer (primer extension).

(3) *Một lượng lớn các nucleotide tự do*

(4) *DNA từ một cơ thể sinh vật cần nghiên cứu*, do kỹ thuật PCR rất nhạy nên lượng DNA cần thiết có thể rất nhỏ.

Đầu tiên DNA của genome được đun nóng lên ở nhiệt độ tương đối cao (95°C hoặc hơn) để tách xoắn làm hình thành các chuỗi đơn. Sau đó các DNA này được cho tiếp xúc với một lượng lớn các primer, những primer này sẽ lai với các DNA của genome theo nguyên tắc bổ sung khi được làm lạnh tới nhiệt độ khoảng từ 35°C tới 65°C. DNA lại được đun nóng tới nhiệt độ trung gian 70 đến 75°C. Trong điều kiện có nhiều nucleotide tự do, một chuỗi đơn DNA mới sẽ được tổng hợp ở nhiệt độ này dưới sự xúc tác của DNA polymerase bắt đầu từ đoạn primer. Các DNA mới được tổng hợp sẽ có cấu trúc xoắn kép với đầu 5' mang primer được kéo dài bởi các nucleotide theo nguyên tắc bổ sung dưới sự xúc tác của enzyme DNA polymerase.

Chuỗi xoắn kép DNA này lại được đun nóng ở nhiệt độ cao trở lại để tách xoắn. Chu kỳ nóng lạnh này được lập đi lập lại nhiều lần cho phép các DNA mới được tổng hợp đóng vai trò như các khuôn mới để tổng hợp thêm các DNA mới và số lượng của các bản sao tăng lên theo lũy thừa của 2. Khi chu kỳ này được lập đi lập lại từ 20 đến 30 lần sẽ tạo ra hàng triệu bản sao của DNA ban đầu.

Tóm lại PCR là một quá trình bao gồm ba bước cơ bản:

(1) Tách cấu trúc kép DNA bằng nhiệt độ cao

(2) Lai với đoạn primer ở nhiệt độ thấp

(3) Kéo dài đoạn primer ở nhiệt độ trung gian. Kết quả là tạo ra các đoạn DNA hoàn toàn giống nhau về trình tự.

Mỗi chu kỳ chỉ đòi hỏi vài phút hoặc ít hơn cho nên từ 1 DNA ban đầu có thể khuếch đại thành hàng triệu bản sao chỉ trong vòng vài giờ.

Do tính đơn giản của kỹ thuật nên các máy PCR đã được chế tạo để thực hiện công việc này một cách tự động. Khi DNA được khuếch đại, chúng sẽ được phân tích theo những hướng khác nhau. Kỹ thuật PCR có nhiều thuận lợi hơn các kỹ thuật cổ điển do:

(1) Có thể được sử dụng với một lượng DNA ban đầu hết sức nhỏ với đơn vị tính là nanogram (10^{-9} g) hoặc picogram (10^{-12} g), số lượng DNA này có thể thu được từ các vết máu khô đã nhiều năm, trên một sợi tóc hoặc thậm chí từ mặt sau của một con tem được dán bằng nước bọt là đủ cho việc phân tích.

(2) Không đòi hỏi quá trình dòng hóa (cloning), do đó PCR cho kết quả nhanh hơn so với các kỹ thuật cũ.

(3) PCR cho phép tạo ra một lượng lớn DNA tinh khiết nên không cần phải sử dụng các probe có hoạt tính phóng xạ để phát hiện các đoạn DNA mang đột biến mà dùng các probe không có hoạt tính phóng xạ đánh dấu bằng phương pháp hóa học an toàn hơn.

Tuy nhiên PCR cũng có những bất lợi nhất định:

(1) Việc tổng hợp các primer đòi hỏi phải có sự hiểu biết về trình tự của đoạn DNA nằm cạnh đoạn DNA cần khảo sát. Khi không có những thông tin về trình tự của đoạn đó bắt buộc phải sử dụng các kỹ thuật khác.

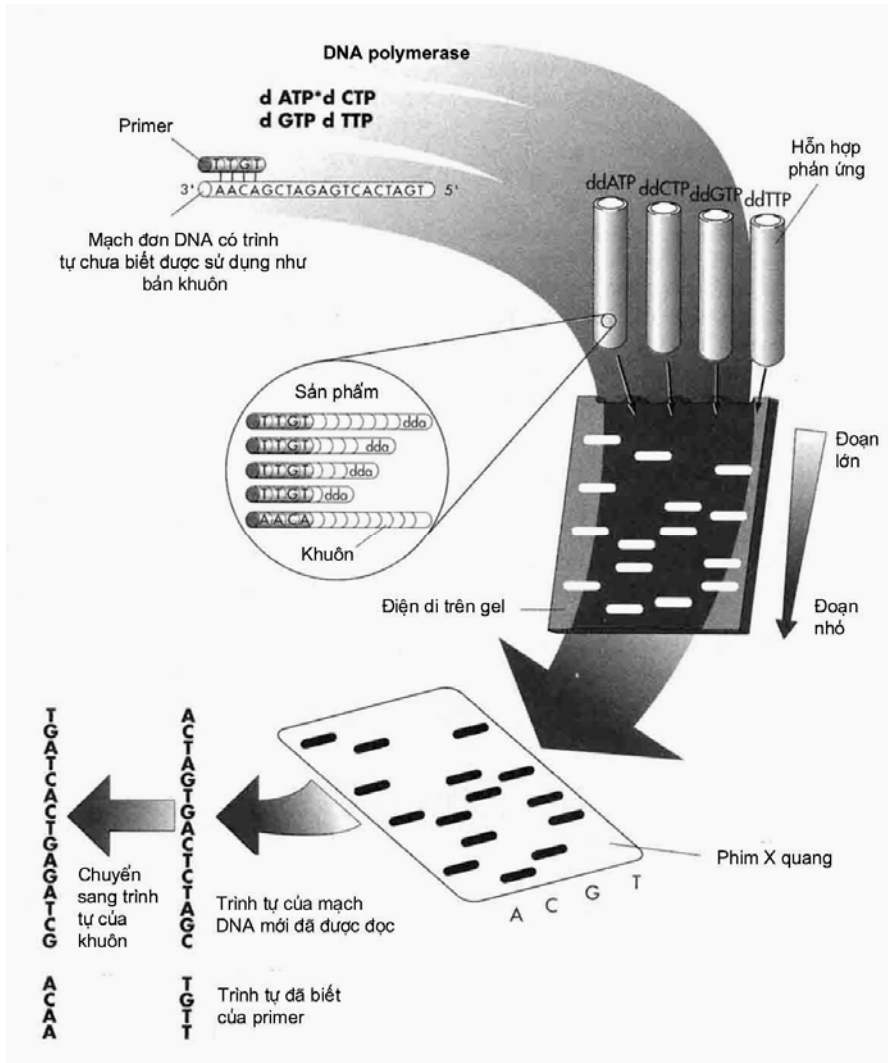
(2) Do kỹ thuật PCR hết sức nhạy nên rất dễ bị nhiễm DNA từ các nguồn khác trong phòng thí nghiệm.

(3) PCR rất khó áp dụng với các đoạn DNA dài hơn 1 đến vài kb nên kỹ thuật này không thể được sử dụng để phát hiện các đột biến mất đoạn gene lớn hơn đoạn DNA trên. Trong trường hợp này phải sử dụng kỹ thuật Southern blotting để thay thế.

Do những ưu việt của kỹ thuật PCR, nên hiện nay PCR được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán các bệnh di truyền, trong pháp y và trong di truyền học tiến hóa. PCR đã thay thế cho kỹ thuật Southern blotting trong nhiều lĩnh vực và hiện nay thường được dùng để phân tích các RFLP và VNTR.

4. Xác định trình tự của DNA (DNA sequencing)

Trong nhiều nghiên cứu di truyền, một mục tiêu chính là xác định cho được trình tự của các base trên toàn bộ hoặc một phần của gene. Việc xác định trình tự của DNA cho phép tìm hiểu bản chất của đột biến gene, chức năng của gene, mức độ tương tự của gene với các gene khác đã biết.



Hình 8: Kỹ thuật xác định trình tự nucleotide của DNA bằng cách sử dụng phương pháp dideoxy

Một kỹ thuật được sử dụng rộng rãi để xác định trình tự của DNA là phương pháp dideoxy (dideoxy method) do Frederick Sanger đưa ra. Phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng các dideoxynucleotide chấm dứt chuỗi (chain-terminating dideoxynucleotide). Đây là các nucleotide có cấu trúc tương tự như các deoxyribonucleotide bình thường khác chỉ khác ở chỗ chúng thiếu mất một nhóm hydroxyl trong cấu trúc. Sự khác biệt này trong cấu trúc làm cho phân tử này không thể tạo

thêm liên kết phosphodiester với các nucleotide tự do. Như vậy mặc dù các dideoxynucleotide có thể gắn vào một chuỗi DNA đang được tổng hợp nhưng sau nó không có thêm nucleotide nào gắn vào thêm được nữa và chấm dứt quá trình nhân đôi ngay tại vị trí đó. Người ta sử dụng 4 loại dideoxynucleotide khác nhau, mỗi loại sẽ bổ sung với các deoxyribonucleotide A, T, G, hoặc C.

Trình tự của một chuỗi đơn DNA nào cần đọc trình tự sẽ được trộn với các primer được đánh dấu bằng các chất hoạt tính phóng xạ, DNA polymerase, các nucleotide thông thường và một loại dideoxynucleotide. Primer sẽ lai với một vị trí tương ứng trên chuỗi đơn DNA theo nguyên tắc bổ sung và DNA polymerase sẽ giúp bổ sung tiếp các nucleotide như trong kỹ thuật PCR. Dideoxynucleotide sẽ gắn vào chuỗi DNA đang được tổng hợp khi có nucleotide tương ứng theo nguyên tắc bổ sung. Tuy nhiên khi điều này xảy ra thì quá trình tổng hợp chuỗi DNA cũng bị ngừng lại.

Ở bất kỳ một vị trí nhất định nào, hoặc sẽ có một nucleotide bình thường hoặc một dideoxynucleotide có thể được thêm vào một cách ngẫu nhiên. Quá trình này cho phép tạo nên các đoạn DNA với chiều dài khác nhau, mỗi đoạn đều kết thúc bởi cùng một loại dideoxynucleotide. Những đoạn DNA có thể phân lập theo chiều dài bằng điện di như trình bày ở phần trên.

Bốn loại phản ứng khác nhau được thực hiện cho 4 loại nucleotide, các đoạn thu được từ mỗi loại phản ứng sẽ được chạy điện di bên cạnh nhau trên cùng một gel để vị trí của các đoạn có thể so sánh được với nhau. Vì mỗi band ứng với một chuỗi DNA tận cùng bởi 1 loại base duy nhất nên trình tự của DNA có thể được đọc bằng cách quan sát thứ tự của các band trên gel sau khi sử dụng kỹ thuật phóng xạ tự chụp (các primer có hoạt tính phóng xạ sẽ chỉ vị trí của các đoạn DNA trên phim). Trong mỗi quá trình phản ứng như vậy có thể đọc được trình tự của vài trăm cặp base.(hình 8)

Tuy nhiên cách đọc trình tự của DNA theo cách này tương đối chậm, khó khăn và dễ sai sót. Gần đây kỹ thuật đọc trình tự DNA tự động (automated DNA sequenced) sử dụng hệ thống phát hiện màu huỳnh quang (fluorescent), hóa chất phát sáng (chemiluminescent) hoặc hệ thống đo màu (colorimetric) đang được phát triển. Việc sử dụng các primer hoặc dideoxynucleotide được gắn huỳnh quang giúp cho phương pháp này trở nên phổ biến.

Một mạch khuôn DNA được đọc trình tự bằng cách sử dụng phương pháp tương tự bước kéo dài primer trong kỹ thuật PCR. Mỗi một trong 4 dideoxynucleotide khác nhau được gắn với một loại màu huỳnh quang cho

phép phát ra một phổ ánh sáng riêng. Các đoạn DNA đã được gắn huỳnh quang sau phản ứng tổng hợp sẽ được điện di trên gel polyacrylamide rất mỏng rồi sau đó được kích thích bằng một chùm tia laser. Ánh sáng phát ra được ghi nhận qua một camera kỹ thuật số (digital camera) để chuyển thành các tín hiệu điện tử và chuyển thành ảnh. Ảnh này được phân tích để chuyển thành dạng đồ thị trong đó mỗi một loại nucleotide khác nhau được mô tả bằng một đỉnh màu khác nhau, trình tự của các đỉnh màu này trên đồ thị cho phép đọc trình tự của đoạn DNA. Một đoạn khoảng 500 bp của 64 người khác nhau có thể được phân tích trên cùng một gel trong vòng từ 2 đến 4 giờ.

Phương pháp đọc trình tự tự động cũng được thực hiện cho việc đánh giá tính chất đa hình của các đoạn lặp ngắn (STRP), tính đa hình của đơn nucleotide (single-nucleotide polymorphism: SNP) và các dạng đa hình khác.

Một hướng đọc trình tự tự động khác là các mẫu DNA được điện di trong các ống thủy tinh rất nhỏ được gọi là các ống mao dẫn (capillary) chứ không phải trên gel polyacrylamide. Vì những ống này rất mỏng và lượng nhiệt tỏa ra trong quá trình điện di rất ít nên việc đọc trình tự diễn ra rất nhanh, kỹ thuật này cho phép đọc trình tự của 600 bp của 96 mẫu chỉ trong vòng 15 phút.

Ngoài ra một kỹ thuật mới là sử dụng sắc ký khối phổ (mass spectroscopy), đây là một kỹ thuật có độ phân giải cao trước đây dùng để phân tích protein. Sự phát triển của kỹ thuật MALDI-TOF (matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight) cho phép phân tích hàng trăm mẫu DNA trong vài phút. Hiện nay đây là kỹ thuật thu hút nhiều sự quan tâm trong việc sử dụng để đọc trình tự DNA.

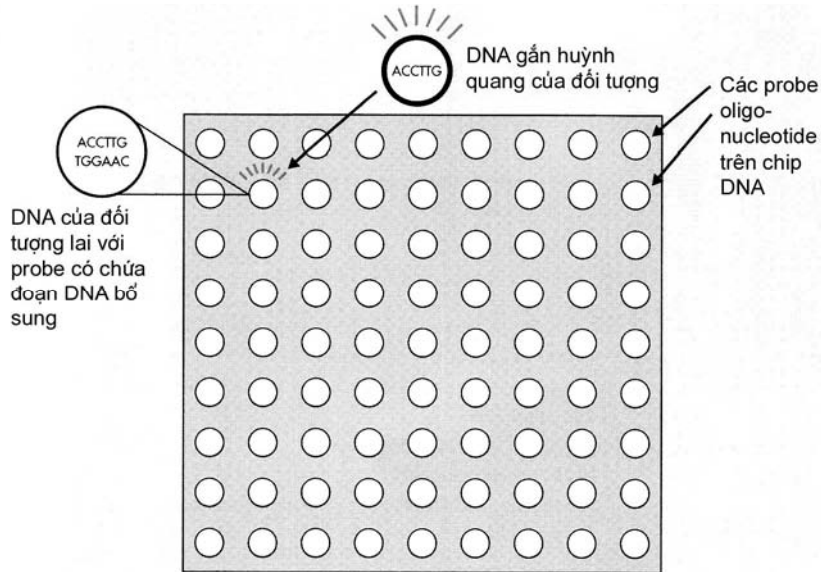
Bằng cách sử dụng vi tính và các kỹ thuật tự động đã làm tăng khả năng đọc trình tự của DNA và đã cho phép đọc được trình tự của toàn bộ 3 tỷ bp trong genome của người.

5. *Chip DNA (DNA chip)*

Chip DNA hoặc DNA microarray là một kỹ thuật mới để phát hiện các đột biến đặc hiệu với tốc độ rất nhanh, chính xác dựa trên cơ sở phân tích đột biến bằng vi tính.

Để sản xuất các chip DNA, các oligonucleotide đóng vai trò của các đoạn dò (probe) được máy cài lên một phiến kính nhỏ. Mỗi phiến kính như vậy với diện tích khoảng 1cm^2 có thể chứa từ hàng trăm đến hàng ngàn loại oligonucleotide khác nhau. Các oligonucleotide này gồm các DNA có trình tự bình thường và các DNA có trình tự mang các đột biến

gây bệnh đã biết. DNA của một đối tượng nào đó được gắn huỳnh quang và cho lai với các oligonucleotide trên phiên kính để xác định xem chúng lai với oligonucleotide bình thường hay đột biến. Mẫu lai được phân tích trên máy vi tính để xác định DNA của đối tượng là bình thường hay mang loại đột biến cụ thể nào (hình 9).



Hình 9: Sơ đồ minh họa một chip DNA.

Các oligonucleotide được đặt trên con chip, sau đó cho tiếp xúc với DNA được gắn huỳnh quang của một đối tượng. Quá trình lai xảy ra nếu có một oligonucleotide có trình tự nucleotide bổ sung với trình tự DNA của đối tượng. Vị trí phát huỳnh quang trên chip sẽ đánh dấu vị trí của đoạn oligonucleotide trên chip

Một ứng dụng khác của chip DNA là xác định xem gene có biểu hiện (nghĩa là được phiên mã) ở trong một mẫu mô nào đó không (ví dụ như từ một khối u). Người ta chiết mRNA từ mô rồi dùng nó làm bản khuôn để tạo thành các đoạn DNA theo nguyên tắc bổ sung. Sau đó đoạn này được đem lai trên phiên kính với các oligonucleotide đại diện cho nhiều loại gene khác nhau. Tín hiệu lai dương tính ở tại vị trí nào đó trên phiên kính chứng tỏ gene đó được biểu hiện trên mẫu mô.

Chương 5

Đột biến đơn gene trên nhiễm sắc thể thường

I. Các khái niệm cơ bản

1. Xác suất

Đánh giá nguy cơ là một phần hết sức quan trọng trong di truyền y học. Thầy thuốc hoặc nhà tư vấn di truyền thường phải thông tin cho các cặp vợ chồng về nguy cơ xuất hiện một bệnh lý di truyền nào đó trên con của họ. Để hiểu được làm thế nào có thể ước tính được các nguy cơ đó cần phải nhắc lại một số các khái niệm cơ bản về xác suất.

Xác suất là tỷ lệ xuất hiện của một sự kiện nhất định trong một loạt các sự kiện.

Trong giảm phân mỗi NST trong cặp tương đồng sẽ đi vào một tinh trùng hoặc trứng. Xác suất để 1 NST trong cặp được truyền cho tinh trùng hoặc trứng là $1/2$ và xác suất cho NST kia của cặp cũng là $1/2$. Xác suất này tương ứng với việc xác suất xuất hiện mặt sấp - ngửa của đồng tiền khi gieo nên chúng ta sẽ dùng việc gieo đồng tiền như một ví dụ minh họa.

Khi một đồng tiền được gieo lập đi lập lại nhiều lần, kết quả của mỗi lần gieo sẽ độc lập với nhau và xác suất xuất hiện mặt sấp hoặc mặt ngửa sẽ là $1/2$ (khi tính trên một lượng lớn lần gieo). Tương tự như vậy, xác suất để bố hoặc mẹ sẽ truyền một trong số hai allele ở 1 locus nhất định cho con sẽ độc lập với nhau trong các lần sinh. Nguyên lý độc lập cho phép chúng ta suy ra 2 quy luật căn bản của xác suất là quy luật nhân (multiplication rule) và quy luật cộng (addition rule).

1.1. Quy luật nhân

Nếu 2 (hay nhiều) thử nghiệm xảy ra độc lập với nhau thì xác suất để có được 1 kết quả nào đó cho cả hai (hay nhiều) thử nghiệm sẽ là phép nhân xác suất của kết quả đó trong mỗi thử nghiệm.

Ví dụ: Một cặp vợ chồng muốn biết khả năng sinh được cả ba đứa con đều là trai sẽ là: $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$ ($1/2$ là xác suất sinh con trai hoặc gái trong mỗi lần sinh).

1.2. Quy luật cộng

Nếu chúng ta muốn biết xác suất xuất hiện của sự kiện này hoặc của sự kiện kia thì chỉ cần cộng xác suất xuất hiện của các sự kiện đó lại với nhau.

Ví dụ: Giả sử có một cặp vợ chồng muốn có 3 đứa con, và họ muốn cả ba đứa trẻ này có chung một giới, xác suất để họ có cả ba đứa con đều là gái là $1/8$, xác suất để họ có ba đứa con đều là trai là $1/8$ do đó xác suất để họ có được 2 đứa con như ý muốn là $1/8 + 1/8 = 1/4$ và như vậy khả năng để họ có 3 đứa con với các kiểu kết hợp khác về giới tính sẽ là $3/4$.

2. Khái niệm về kiểu gen và kiểu hình

- Kiểu gen (genotype): là cấu trúc di truyền của một cá thể tại một locus.

- Kiểu hình (phenotype): là những cái chúng ta có thể quan sát được trên cơ thể hoặc trên lâm sàng.

Kiểu gene không nhất thiết phải tương ứng với kiểu hình. Hai kiểu gen khác nhau, một đồng hợp trội và một dị hợp, có thể có cùng một kiểu hình như ở bệnh xơ nang (cystic fibrosis).

Ngược lại cùng một kiểu gen nhưng có thể cho kiểu hình khác nhau trong những điều kiện ngoại cảnh khác nhau. Kiểu hình là kết quả của sự tương tác giữa kiểu gen và các yếu tố ngoại cảnh. Cũng cần nhấn mạnh chữ "ngoại cảnh" ở đây có thể bao gồm luôn cả yếu tố di truyền (Ví dụ: như gene ở một locus khác có thể tương tác với một gene đặc hiệu hoặc sản phẩm của nó).

3. Tần số kiểu gen và tần số gene

3.1. Tần số kiểu gen

Tần số kiểu gen được tính một cách đơn giản bằng cách chia số kiểu gen đó cho tổng toàn bộ số kiểu gen. Tổng tần số của các kiểu gen phải bằng 1.

Ví dụ: Chúng ta đánh giá về nhóm máu MN trên 200 người trong một quần thể. Nhóm máu này được mã hóa trên một locus của chromosome thứ 2 bởi 2 allele được ký hiệu là M và N. Trong hệ nhóm máu MN, hiệu quả của cả 2 allele đều có thể quan sát ở cơ thể dị hợp tử (heterozygote) MN vì vậy chúng được gọi là đồng trội (codominant) và tình trạng dị hợp này có thể phân biệt với hai dạng đồng hợp tử MM và NN. Bất cứ một cá thể nào trong quần thể đều thuộc về một trong ba kiểu gen MM, NN hoặc MN. Trong 120 người được nghiên cứu chúng ta có phân bố kiểu gen như sau: MM (64); MN (120); NN (16).

Tần số của kiểu gen MM là $64 / 200 (= 0,32)$; tần số của kiểu gen MN là $120 / 200 (= 0,60)$ và tần số kiểu gen NN là $16 / 200 (= 0,08)$. Lẽ dĩ nhiên tổng của toàn bộ kiểu gene phải bằng 1.

3.2. Tần số gen

Tần số gen của mỗi allele được tính bằng cách đếm số gene đó và chia cho tổng số gene. Tổng tần số của các gene allele phải bằng 1.

Tần số của allele M ở người có kiểu gen MM là : $64 \times 2 = 128$ gene M; tần số của allele N ở người có kiểu gen NN là : $16 \times 2 = 32$ gene N; tần số của gene M hoặc N ở người có kiểu gene MN là : 120, nên tổng số từng gene M và N là:

$$\text{Gene M : } 120 + 128 = 248$$

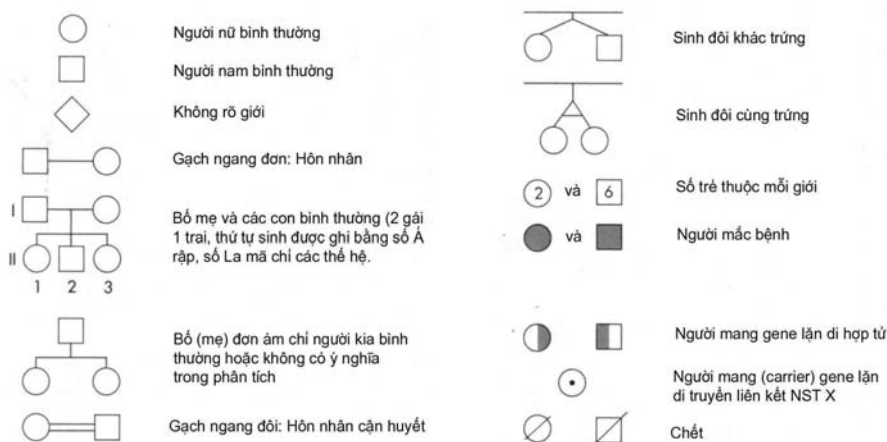
$$\text{Gene N: } 120 + 32 = 152$$

Tổng số gene M và N : $248 + 152 = 400$ gene tại locus mang gene quy định nhóm máu MN (gấp đôi số cá thể khảo sát), nên tần số gene M là $248 / 400 (= 0,62)$ và tần số gene N là $152 / 400 (= 0,38)$.

4. Nguy cơ tái phát (recurrence risk)

Các bố mẹ có nguy cơ sinh con mắc bệnh di truyền luôn luôn đặt cho nhà tư vấn di truyền câu hỏi về khả năng mắc bệnh của con họ trong tương lai. Khi họ đã có một hoặc hai đứa con mắc một bệnh di truyền bố mẹ sẽ được nhà tư vấn dự báo một nguy cơ tái phát (recurrence risk), đây là khả năng mà họ có thể sinh đứa con tiếp theo mắc bệnh di truyền đó. Nếu họ chưa có con, họ cũng có nhu cầu được biết về nguy cơ sinh ra một đứa con mắc bệnh di truyền, nguy cơ này gọi là nguy cơ xảy ra (occurrence risk).

5. Phả hệ (pedigree)



Hình 1: Các ký hiệu phả hệ cơ bản

Phả hệ là một công cụ phổ biến trong di truyền y học. Sử dụng các ký hiệu đơn giản để minh họa mối liên quan giữa các thành viên trong gia

đình (hình 1) và cho thấy những thành viên nào trong gia đình bị mắc bệnh hoặc không mắc một bệnh di truyền nào đó. Trong một phả hệ điển hình, một mũi tên được sử dụng để chỉ đối tượng đầu tiên trong phả hệ được khảo sát (proband).

6. Khái niệm " trội " và " lặn "

Thuật ngữ " trội " và " lặn " được dùng để ám chỉ cách biểu hiện của gene ở cá thể. Mặc dù sự biểu hiện của gene rất phức tạp nhưng việc dùng thuật ngữ "trội" và "lặn" cho gene được dùng phổ biến và thuận lợi trong thực tế.

Cách phân biệt đơn giản và hiệu quả bệnh di truyền gene trội và gene lặn là dựa trên sự biểu hiện hay không biểu hiện trên lâm sàng ở người dị hợp tử. Bệnh di truyền trội hầu như luôn luôn *biểu hiện trên lâm sàng trong khi đó bệnh di truyền lặn luôn luôn bình thường trên lâm sàng ở cơ thể dị hợp.*

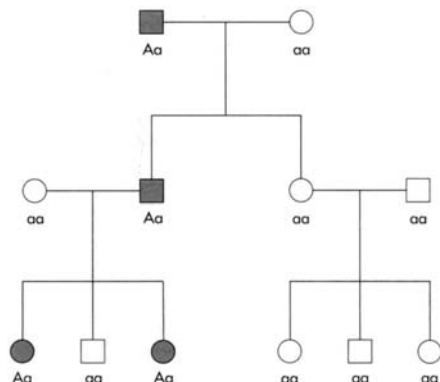
II. Sự di truyền của gene đột biến nằm trên nhiễm sắc thể thường

1. Di truyền gene trội (autosomal dominant inheritance)

1.1. Đặc điểm

		Bố (me) không mắc bệnh	
		a	a
Mẹ (bố) mắc bệnh	A	Aa	Aa
	a	aa	aa

Hình 2: Khung Punnett minh họa hôn nhân giữa người bình thường (aa) và người mắc bệnh dị hợp (Aa).



Hình 3: Một phả hệ minh họa sự di truyền tật thừa ngón sau trực

Bệnh di truyền phổ biến nhất thuộc kiểu này được gặp với tần số 1/1000.

Trẻ mắc bệnh thường được sinh ra từ hôn nhân của một người hoàn toàn bình thường và một người mắc bệnh dị hợp tử ($Aa \times aa$). (hình 2).

Một phả hệ của tật thừa ngón sau trục (postaxial polydactyly) với biểu hiện thừa ngón cạnh ngón út (hình 3) di truyền kiểu trội trên NST thường, với gene A quy định tật thừa ngón, a quy định ngón bình thường được minh họa dưới đây cho thấy nhiều đặc điểm quan trọng của các bệnh di truyền do gene trội trên NST thường (hình 4):



Hình 4: Tật thừa ngón sau trục

- Cả hai giới đều có tỷ lệ mắc xấp xỉ.
- Không có sự gián đoạn giữa các thế hệ.
- Nếu bố mẹ không mắc bệnh thì con của họ sẽ không có ai mắc bệnh trừ khi xuất hiện đột biến mới.

1.2. Nguy cơ tái phát và nguy cơ xảy ra

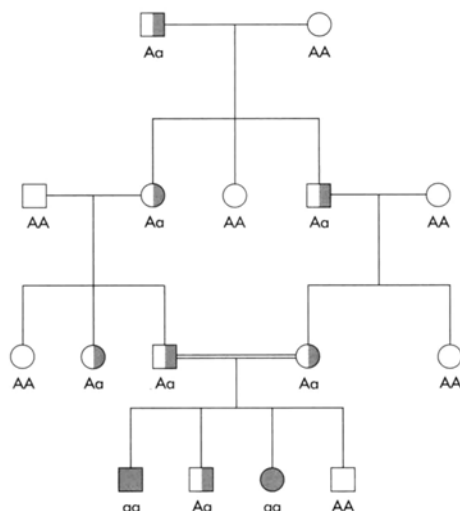
Khi một trong hai bố mẹ bị ảnh hưởng bởi một bệnh di truyền gene trội trên NST thường ở trạng thái dị hợp, người kia hoàn toàn bình thường. Nguy cơ xảy ra và nguy cơ tái phát đều là $1/2$.

2. Di truyền gene lặn trên NST thường (autosomal recessive inheritance)

2.1. Đặc điểm

		Người mang (carrier)	
		A	a
Người mang (carrier)	A	AA	Aa
	a	Aa	aa

Hình 5: Khung Punnett minh họa hôn nhân giữa hai người dị hợp tử về gene lặn đột biến



Hình 6: Một phả hệ minh họa sự di truyền bệnh bạch tạng.

Các bệnh di truyền gene lặn trên NST thường khá hiếm trong quần thể. Những người mang gene bệnh ở trạng thái dị hợp tử (Aa) phổ biến hơn nhiều so với người đồng hợp tử (aa) về gene bệnh.

Bố mẹ của người mắc bệnh di truyền gene lặn trên NST thường đều phải dị hợp tử về gene bệnh (Aa x Aa).

Ví dụ: Bệnh bạch tạng là một bệnh di truyền gene lặn gây ra do đột biến gene mã hóa cho enzyme tyrosinase chuyển hóa tyrosine. Trên phả hệ của bệnh này (hình 6) cho thấy các đặc điểm chính của các bệnh di truyền do gene lặn trên NST thường:

- Bệnh thường được thấy ở một hoặc một số anh chị em ruột nhưng không xảy ra ở các thế hệ đầu.
- Nam và nữ đều có khả năng mắc bệnh như nhau.
- Trung bình một phần tư con của cặp vợ chồng mang gene bệnh ở trạng thái dị hợp sẽ biểu hiện bệnh. (hình 5)
- Tình trạng hôn nhân đồng huyết (consanguinity), được gặp nhiều trong phả hệ của loại bệnh di truyền này hơn so với các loại bệnh di truyền khác.

2.2. Nguy cơ tái phát

Nguy cơ tái phát trong con cái của các bố mẹ mang gene bệnh (carrier) trung bình là 25%. Tỷ lệ này thay đổi trong từng gia đình nhưng khi tính trên một số lượng lớn gia đình sẽ đạt được tỷ lệ trên.

III. Các yếu tố làm ảnh hưởng đến kiểu di truyền

1. Đột biến mới

Nếu một đứa trẻ được sinh ra với một bệnh di truyền và trong gia đình của trẻ chưa hề có tiền sử về bệnh này thì có thể trẻ này là kết quả của một đột biến mới (new mutation), điều này đặc biệt đúng đối với bệnh di truyền do gene trội trên NST thường.

Trong trường hợp này nguy cơ tái phát ở lần sinh tiếp theo của cặp bố mẹ này không cao hơn mức chung của quần thể. Các nghiên cứu cho thấy một tỷ lệ lớn của các bệnh di truyền gene trội trên NST thường là kết quả của một đột biến mới. Đặc điểm này cho thấy bệnh có xu hướng giới hạn tiềm năng sinh sản của cá thể mắc bệnh.

2. Tình trạng khảm ở các tế bào dòng sinh dục (germline mosaicism)

Đôi khi trong một gia đình người ta có thể thấy trong số con của cùng một bố mẹ có tới 2 con hoặc nhiều hơn mắc cùng một loại bệnh di truyền trội NST thường trong khi tiền sử của gia đình chưa hề có ai mắc

bệnh này. Vì đột biến là một sự kiện hiếm gặp nên việc xảy ra nhiều lần một loại đột biến trong cùng một gia đình rất khó có thể xảy ra.

Cơ chế giải thích cho hiện tượng này là hiện tượng khảm của các tế bào dòng sinh dục (germline mosaicism). Trong quá trình phát triển phôi của một trong hai bố mẹ, một đột biến có thể đã xảy ra và ảnh hưởng lên tất cả hoặc một phần của các tế bào dòng tinh nhưng không ảnh hưởng hoặc chỉ ảnh hưởng đến một vài tế bào soma của phôi. Như vậy bố hoặc mẹ đã mang đột biến trong các tế bào dòng sinh dục của họ nhưng họ hoàn toàn không có biểu hiện bệnh trên kiểu hình. Kết quả là họ có thể truyền gene đột biến cho nhiều người con. Hiện tượng này mặc dù tương đối hiếm gặp nhưng ảnh hưởng rất lớn đến nguy cơ tái phát của bệnh.

3. Khởi bệnh muộn (*delayed age of onset*)

Trong khi một số bệnh di truyền biểu hiện ngay từ khi sinh hoặc chỉ một thời gian ngắn sau đó thì nhiều bệnh di truyền phải đợi cơ thể tới giai đoạn trưởng thành mới biểu hiện. Hiện tượng này được gọi là hiện tượng khởi bệnh muộn (*delayed age of onset*).

Tình trạng biểu hiện muộn dẫn đến hậu quả là người bệnh thường có con trước khi họ nhận thức được tình trạng mang gene bệnh của mình.



(a)



(b)

Hình 7: Bệnh u xơ thần kinh type I. (a) Bệnh nhân có các chấm cà phê sữa trên bụng và các u xơ thần kinh nhỏ. (b) Bệnh nhân có một u xơ thần kinh lớn phía sau lưng

4. Tính thấm giảm (*reduced penetrance*)

Một đặc điểm quan trọng của nhiều bệnh di truyền là tính thấm giảm. Tính thấm giảm là hiện tượng người mang kiểu gene của bệnh

nhưng hoàn toàn không có biểu hiện trên kiểu hình, mặc dù vậy họ vẫn truyền gene bệnh cho thế hệ sau.

5. Biểu hiện đa dạng (*variable expression*)

Một tình trạng phức tạp khác là sự biểu hiện đa dạng của bệnh. Bệnh có thể có tính thấm hoàn toàn nhưng mức độ nghiêm trọng của bệnh có sự thay đổi rất lớn.

Ví dụ trong bệnh u xơ thần kinh (neurofibromatosis) type I (còn được gọi là bệnh Von Recklinghausen). Bố hoặc mẹ có thể có bệnh rất nhẹ, nhẹ đến nỗi họ không nghĩ là mình mắc bệnh, nhưng họ có thể truyền gene bệnh cho con và đôi khi chúng có biểu hiện bệnh rất nặng (hình 7)

Giống như tình trạng khởi bệnh muộn và tính thấm giảm, biểu hiện đa dạng của bệnh cũng là một cơ chế tạo điều kiện cho gene bệnh không bị đào thải và có mặt với tần số cao trong quần thể.

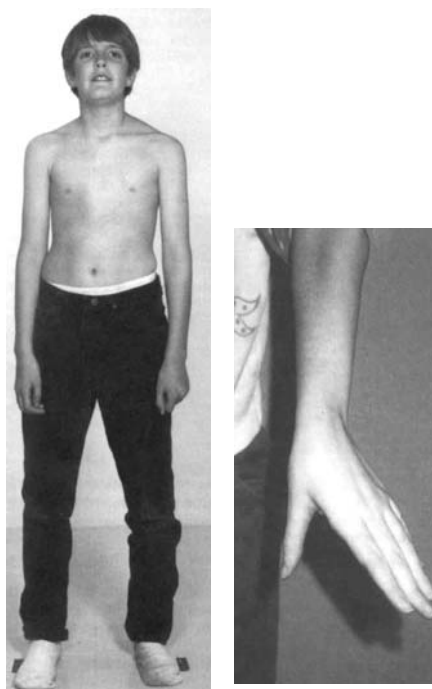
6. Tính đa hiệu (*pleiotropy*)

Một gene có thể gây ra các hiệu quả khác nhau trên cơ thể được gọi là gene đa hiệu (*pleiotropy*).

Ví dụ trong hội chứng Marfan. Đây là một bệnh di truyền gene trội trên NST thường với các biểu hiện ở mắt, xương, và hệ tim mạch. Tất cả những biểu hiện này đều xuất phát từ tình trạng tổ chức liên kết bị kéo dãn không bình thường. Gene gây ra hội chứng Marfan được định vị trên nhánh dài của NST 15 mã hóa cho fibrillin, một thành phần của mô liên kết. Đột biến gene này dẫn đến nhiều hậu quả khác nhau trên cơ thể. (hình 8)

7. Tính dị nguyên (*heterogeneity*)

Khi một bệnh nhưng có thể gây ra bởi các đột biến trên các locus khác nhau ở các gia đình khác nhau, tình trạng này được gọi là tính dị nguyên của locus (*locus heterogeneity*). Tình trạng bệnh gây ra bởi đột biến ở các gene khác nhau có thể



Hình 8: Một thiếu niên mắc hội chứng Marfan với tay chân dài, khuôn mặt hẹp. Hình ảnh bàn tay vươn (*arachnodactyly*) ở một trẻ nữ 8 tuổi mắc hội chứng Marfan.

không phân biệt được trên lâm sàng.

8. Sự khởi bệnh sớm và sự gia tăng mức biểu hiện ở thế hệ sau

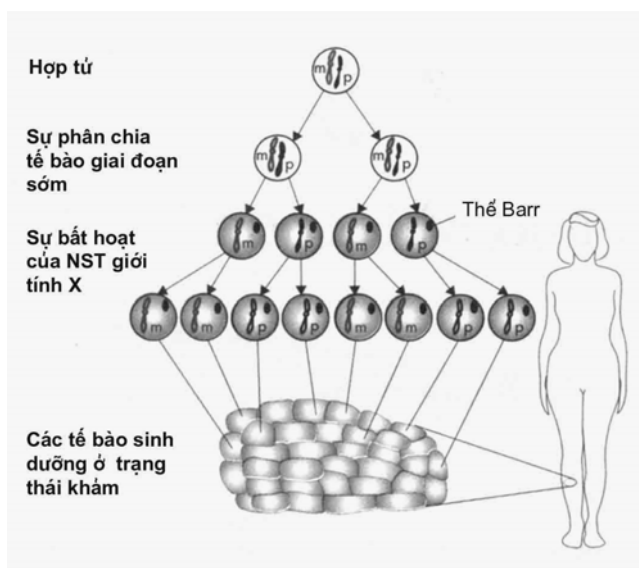
Từ trong giai đoạn đầu của thế kỷ XX người ta đã quan sát thấy một vài bệnh di truyền dường như cho thấy có tuổi khởi bệnh sớm hơn hoặc có mức độ biểu hiện bệnh nặng hơn hoặc có thể thể hiện cả hai hiện tượng này trong các thế hệ sau của mỗi gia tộc. Kiểu biểu hiện này gọi là hiện tượng khởi bệnh sớm (anticipation).

Chương 6

Đột biến đơn gene di truyền liên kết với giới tính & di truyền ty thể

Nhiễm sắc thể (NST) giới tính X của người là một NST lớn chứa khoảng 5% DNA của genome (khoảng 160 triệu bp). Có trên 700 gene đã được định vị trên NST giới tính X. Trái với NST X, NST Y rất nhỏ (khoảng 70 triệu bp) và chỉ chứa rất ít gene.

I. Hiện tượng bất hoạt NST X (X inactivity)

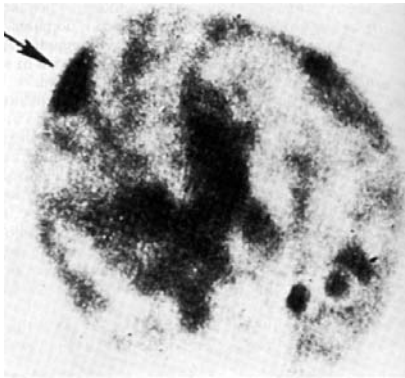


Hình 1: Giả thuyết Lyon về sự bất hoạt của NST X

Trong những năm đầu của thập niên 60, Lyon đã đưa ra giả thuyết 1 trong 2 NST X trong các tế bào sinh dưỡng ở người nữ đã bị bất hoạt. Sự bất hoạt 1 trong 2 NST X đã xảy ra rất sớm trong thời kỳ phát triển phôi của người nữ và NST X bị bất hoạt mang tính chất ngẫu nhiên, ở một số tế bào thì NST X bị bất hoạt có nguồn gốc từ bố và ở các tế bào khác thì NST X có nguồn gốc

từ mẹ bị bất hoạt. Khi hiện tượng này xảy ra thì NST có nguồn gốc từ bố (hoặc mẹ) đó sẽ bị bất hoạt trong tất cả các thế hệ tế bào sau. Như vậy hiện tượng này vừa có tính ngẫu nhiên vừa có tính cố định (hình 1).

Giả thuyết Lyon được củng cố bằng các bằng chứng tế bào học qua hình ảnh của vật thể Barr (Bar body) trong nhân tế bào ở gian kỳ (hình 2). Vật thể này là một NST X bị bất hoạt và chỉ được thấy ở các tế bào có từ 2 NST X trở lên. Số lượng vật thể Barr trong nhân tế bào luôn luôn



Hình 2: Vật thể Barr

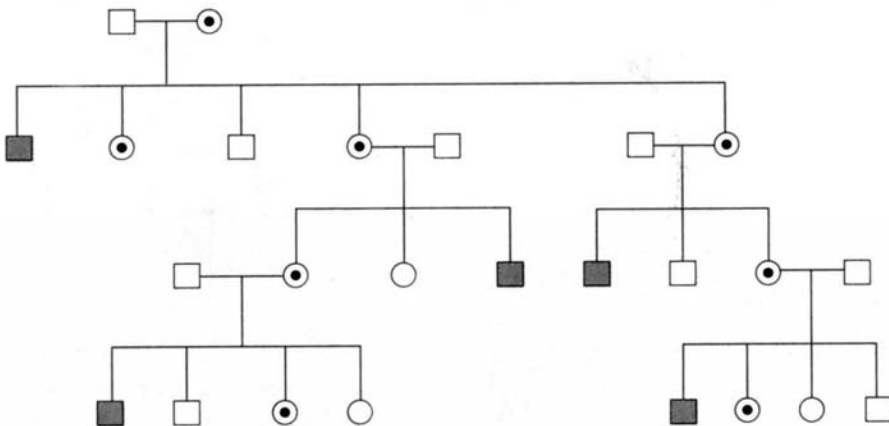
bằng số lượng NST giới tính X trừ đi 1.

Các nghiên cứu cho thấy quá trình bất hoạt xảy ra khoảng 2 tuần sau khi thụ tinh, khi phôi có khoảng vài trăm tế bào. Tuy nhiên hiện tượng bất hoạt xảy ra trên NST X là không hoàn toàn, một số vùng NST X vẫn duy trì trạng thái hoạt động trên tất cả các bản sao của nó, đặc biệt là những vùng đầu tận cùng của các nhánh dài và nhánh ngắn của NST Y. Một số vùng khác trên NST X cũng không bị bất hoạt. Những nghiên

cứ gần đây cho thấy gần 20% số gene trên NST X bất hoạt có thể vẫn hoạt động. Rất nhiều gene trên NST X thoát khỏi sự bất hoạt có allele tương đồng trên NST Y dẫn đến hiện tượng là tạo ra kiểu gene tương tự ở người nam và người nữ.

II. Di truyền gene lặn liên kết NST X

Nhiều bệnh đã được biết rõ di truyền theo kiểu gene lặn liên kết với NST giới tính X. Những bệnh phổ biến gồm bệnh ưa chảy máu A (hemophilia A), bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne muscular dystrophy), bệnh mù màu lục - đỏ (red - green color blindness).



Hình 3: Phả hệ cho thấy sự di truyền của một bệnh di truyền lặn liên kết NST giới tính X, các ký hiệu được tô đậm minh họa những người mắc bệnh, các ký hiệu có dấu chấm minh họa những người bình thường mang gene bệnh.

Đặc điểm

- Biểu hiện của bệnh được thấy phổ biến ở người nam hơn người nữ (hình 3)
- Gene bệnh được truyền dưới dạng dị hợp tử qua một loạt các người nữ dẫn đến sự ngắt quãng trong biểu hiện qua một số thế hệ.
- Bố mắc bệnh sẽ truyền gene cho 100% con gái của ông ta và những người con gái này sẽ truyền gene bệnh cho 50% số con trai của họ và làm biểu hiện bệnh.
- Kiểu hôn nhân phổ biến là hôn nhân giữa một người nữ mang gene bệnh (carrier) và một người nam bình thường. (hình 4a).
- Một kiểu hôn nhân phổ biến khác là bố mắc bệnh và mẹ bình thường, trong trường hợp này toàn bộ con trai của họ hoàn toàn bình thường và toàn bộ con gái của họ đều là carrier với kiểu gene dị hợp tử do nhận gene bệnh từ bố (hình 4b).
- Kiểu hôn nhân giữa một người nam mắc bệnh và một người nữ mang gene bệnh rất ít gặp. Con gái của họ sẽ có một nửa mang gene bệnh ở trạng thái dị hợp tử (carrier) và nửa kia mang gene bệnh ở trạng thái đồng hợp và có biểu hiện bệnh. Ở con trai cũng có một nửa hoàn toàn bình thường và một nửa mắc bệnh.

		Mẹ		
		X_1	X_2	
Bố	X_1	X_1X_1	X_1X_2	Con gái: 50% bình thường 50% người mang
	Y	X_1Y	X_2Y	Con trai: 50% bình thường 50% mắc bệnh

(a)

		Mẹ		
		X_1	X_1	
Bố	X_2	X_2X_1	X_2X_1	Con gái: 100% người mang
	Y	X_1Y	X_1Y	Con trai: 100% bình thường

(b)

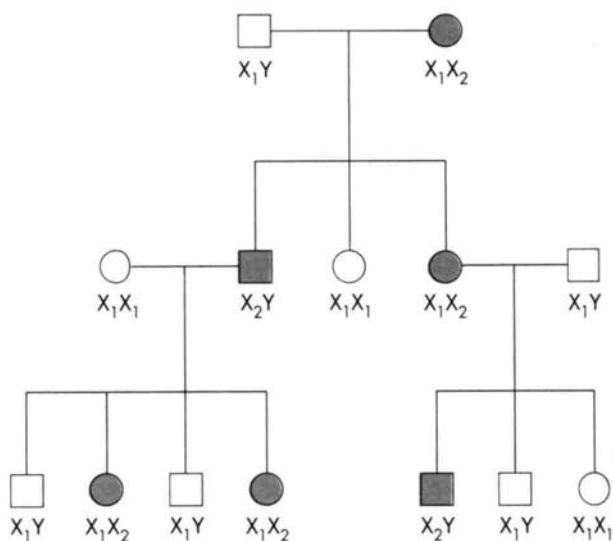
Hình 4: (a) Hôn nhân giữa một người nam bình thường và một người nữ mang gene bệnh; (b) Hôn nhân giữa một người nữ bình thường và một người nam mắc bệnh.

Đôi khi cũng có thể gặp người nữ chỉ mang một gene lặn đột biến trên NST X nhưng vẫn có biểu hiện bệnh do hiện tượng bất hoạt của NST X như trong bệnh hemophilia A có khoảng độ 5% người nữ dị hợp tử

có nồng độ yếu tố VIII thấp đủ để được coi như là mắc bệnh hemophilia thể nhẹ.

III. Di truyền gene trội liên kết NST X

Ngoại trừ trường hợp hội chứng NST X dễ gãy (fragile X syndrome), các bệnh di truyền gene trội liên kết NST X có số lượng ít hơn



Hình 5: Phả hệ minh họa sự di truyền của một gene trội liên kết NST X, X_1 là allele bình thường; X_2 là allele bệnh.

nữ dị hợp tử về gene bệnh trên NST X sẽ có biểu hiện nhẹ hơn so với người nữ đồng hợp tử.

Đặc điểm

Mỗi cá thể chỉ cần nhận một gene bệnh liên kết NST X là đủ để mắc bệnh. Vì người nữ có 2 NST X, một trong 2 NST này đều có khả năng mang gene bệnh nên người nữ có khả năng mắc bệnh cao gấp đôi người nam (trừ khi gene bệnh đó gây chết ở người nam) (hình 5).

Người bố mắc bệnh không thể truyền bệnh cho con trai nhưng con gái của họ đều mắc bệnh do nhận gene này.

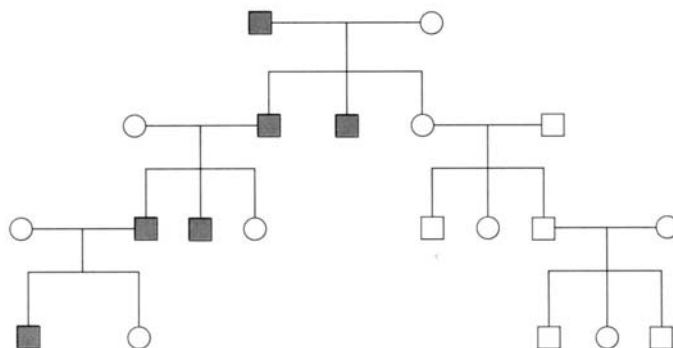
Người mẹ mắc bệnh thường ở trạng thái dị hợp. Những người này thường truyền bệnh cho con gái hoặc con trai với xác suất khoảng 50% như nhau ở cả 2 giới.

và có ý nghĩa về mặt lâm sàng không bằng trường hợp di truyền gene lặn liên kết NST X.

Ví dụ trong bệnh còi xương do giảm phosphate máu (hypophosphatemia ricket), đây là một bệnh mà thận bị suy giảm khả năng trong việc tái hấp thu phosphate dẫn đến việc cốt hóa bất thường làm xương bị cong và biến dạng.

Giống như trường hợp di truyền gene trội trên NST thường, người

IV. Di truyền liên kết với NST Y



Hình 6: Phả hệ minh họa sự di truyền của bệnh liên kết NST Y

Hiện nay đã có khoảng 24 gene liên kết với NST Y đã được xác định. Những gene này gồm có gene bắt đầu cho sự biệt hóa của phôi thành người nam, nhiều gene mã hóa cho các yếu tố sinh tinh đặc hiệu của tinh hoàn (testis - specific spermatogenesis factors) và một kháng nguyên tương hợp tổ chức phụ (minor histocompatibility antigen) được gọi là HY. Rất nhiều gene quản gia (housekeeping gene) định vị trên NST Y và tất cả những gene này đều có allele tương đồng không bị bất hoạt trên NST X. Các tính trạng liên kết với NST Y luôn luôn có kiểu di truyền bố - con trai (hình 6).

V. Các tính trạng có sự biểu hiện giới hạn bởi giới tính (sex limited trait) hoặc chịu ảnh hưởng của giới tính (sex influenced trait)

Đôi khi có sự nhầm lẫn giữa sự biểu hiện của tính trạng di truyền liên kết với giới tính với sự biểu hiện của tính trạng giới hạn bởi giới tính hoặc chịu ảnh hưởng của giới tính.

Một tính trạng có biểu hiện giới hạn bởi giới tính là tính trạng xảy ra ở chỉ một trong hai giới dẫn đến sự khác biệt về mặt giải phẫu giữa hai giới. Các khuyết tật của tử cung và tinh hoàn cũng là một ví dụ cho hiện tượng này.

Một ví dụ rất hay cho trường hợp tính trạng có sự biểu hiện chịu ảnh hưởng của giới tính là tính trạng sỏi đầu (baldness). Tính trạng này biểu hiện ở cả nam và nữ nhưng xảy ra ở nam phổ biến hơn. Tính trạng này không di truyền liên kết với giới tính mà di truyền theo kiểu gene trội trên NST thường ở người nam nhưng lại di truyền theo kiểu gene lặn trên NST thường ở người nữ. Người nữ dị hợp tử có thể truyền gene này cho con cháu của họ nhưng không biểu hiện, người nữ chỉ bị sỏi đầu khi mang

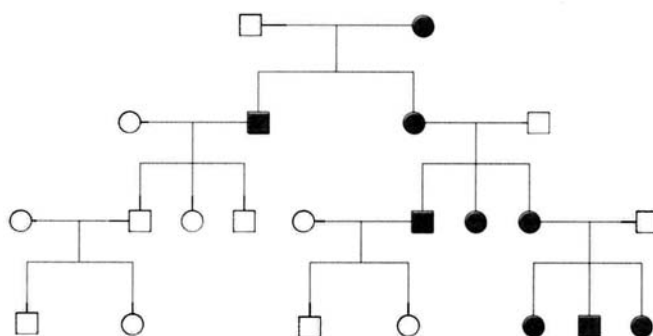
gene ở trạng thái đồng hợp, tuy nhiên ngay với kiểu gene này người nữ cũng chỉ có biểu hiện tức bị thừa một cách đáng kể hơn là sỏi hoàn toàn.

VI. Di truyền ty thể

Đa số các bệnh di truyền gây ra do các khuyết tật xảy ra trên genome trong nhân tế bào, tuy nhiên cũng có một số bệnh di truyền chiếm tỷ lệ không lớn gây ra do các đột biến của DNA ty thể (mtDNA, mt: mitochondria). Mỗi tế bào người chứa hàng trăm ty thể trong bào tương. Quá trình sao mã của mtDNA xảy ra ở trong ty thể và độc lập với nhân. Khác với DNA của nhân, mtDNA không có các đoạn intron. Tỷ lệ đột biến ở DNA trong ty thể cao hơn khoảng 10 lần so với DNA trong nhân, tình trạng này xảy ra do ty thể thiếu hệ thống enzyme sửa chữa DNA và cũng có lẽ do bởi các gốc oxy tự do (free oxygen radical) được giải phóng trong quá trình oxy phosphoryl hóa.

Đặc điểm

Do ở trong bào tương nên mtDNA được truyền theo dòng mẹ. Người nam nhận mtDNA từ mẹ và không truyền cho con (hình 7) vì tinh trùng chỉ chứa một lượng mtDNA rất ít và mtDNA không đi vào trứng qua quá trình thụ tinh để tham gia vào quá trình phát triển phôi



Hình 7: Phả hệ minh họa sự di truyền của bệnh di truyền ty thể

Vì mỗi tế bào chứa một quần thể phân tử DNA ty thể, nên mỗi tế bào có thể mang một vài phân tử có đột biến của DNA ty thể và một số phân tử khác thì không. Hiện tượng này của DNA được gọi là hiện tượng **heteroplasmy**, đây là nguyên nhân quan trọng giải thích tính đa dạng trong biểu hiện của các bệnh lý di truyền ty thể. Tỷ lệ phân tử DNA ty thể đột biến càng lớn thì mức độ nặng nề trong biểu hiện càng cao.

Cho tới nay đã xác định được trên 50 đột biến điểm và trên 100 đột biến mất đoạn hoặc nhân đoạn trên DNA của ty thể gây ra những hậu quả bệnh lý.

Chương 7

Di truyền học hóa sinh: Các rối loạn chuyển hóa

Mỗi quá trình chuyển hóa trong tế bào bao gồm một chuỗi các phản ứng nối tiếp nhau mà các bước trong chuỗi phản ứng đó được xúc tác bởi các enzyme do gene mã hóa. Bình thường các gene này được tái sinh với độ chính xác rất cao và các hệ thống enzyme do các gene này mã hóa sẽ luôn luôn hoạt động một cách hiệu quả từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Các biến dị xảy ra khá phổ biến trên các gene mã hóa cho các enzyme tuy nhiên một số ít biến dị có thể làm cho enzyme không thể thực hiện được chức năng bình thường dẫn đến các hậu quả bệnh lý.

Hiện nay đã có trên 350 loại bệnh chuyển hóa khác nhau và hầu hết đều hiếm gặp. Tuy nhiên các bất thường chuyển hóa giải thích cho một tỷ lệ đáng kể trong các bệnh di truyền gây bệnh hoặc gây tử vong. Một nghiên cứu gần đây cho thấy rằng tỷ lệ mắc các rối loạn chuyển hóa chiếm khoảng chừng 1/2.500 lần sinh hoặc 10% trường hợp bệnh lý đơn gene ở trẻ em. Việc chẩn đoán các bệnh chuyển hóa cũng rất khó khăn do đó tỷ lệ thật sự của các bệnh lý di truyền do bất thường chuyển hóa có lẽ cao hơn nhiều so với thực tế.

Hầu hết các rối loạn chuyển hóa đều được di truyền theo kiểu gene lặn NST thường, nên chỉ những người mang hai allele đột biến mới biểu hiện bệnh. Mặc dù một allele đột biến sẽ làm giảm hoặc mất hoạt tính của enzyme nhưng người mang gene đột biến ở trạng thái dị hợp thường không bị ảnh hưởng đến sức khỏe.

I. Các khuyết tật của các quá trình chuyển hóa

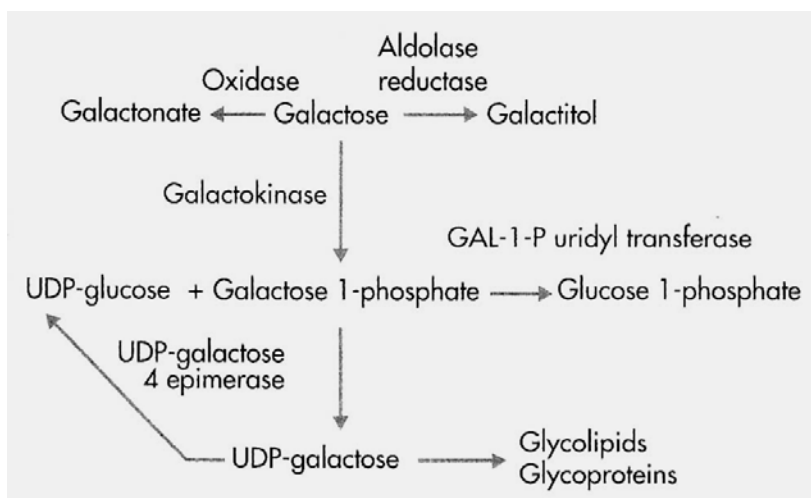
Các phân tử sinh học được phân thành 4 nhóm chính: các nucleic acid, các protein, các carbohydrat và các lipid. Các con đường chuyển hóa chính để chuyển hóa các phân tử này gồm có: quá trình glycolysis (chuyển đường D-glucose thành lactic acid), chu trình citric acid, chu trình pentose phosphate, quá trình gluconeogenesis (tạo glycogen từ các phân tử không phải carbohydrate như protein, chất béo), tổng hợp và dự trữ glycogen và acid béo, các quá trình giải phóng, tạo năng lượng và các hệ thống vận chuyển. Chúng ta sẽ xét xem bằng cách nào mà các khuyết tật trong mỗi quá trình chuyển hóa lại có thể gây bệnh cho con người.

1. Chuyển hóa carbohydrate

Do đảm nhiệm nhiều chức năng khác nhau trong tất cả mọi loại sinh vật nên carbohydrate là loại chất hữu cơ nổi trội nhất trên Trái Đất. Các carbohydrate đóng vai trò cơ chất cho việc sản xuất và dự trữ năng lượng, can thiệp vào các quá trình chuyển hóa và tham gia vào cấu trúc của DNA và RNA. Do đó các carbohydrate chiếm một tỷ lệ lớn trong khẩu phần ăn của con người và được chuyển hóa thành ba loại monosaccharide chính là glucose, galactose và fructose.

Galactose và fructose được chuyển thành glucose trước khi đi vào quá trình glycolysis. Sự thất bại trong việc sử dụng các loại đường này một cách hiệu quả giải thích cho đại đa số các khuyết tật chuyển hóa carbohydrate bẩm sinh ở người.

Tăng galactose máu (galactosemia)



Hình 1: Vai trò của enzyme galactose 1 - phosphate uridyl transferase (GAL-1-P uridyl transferase)

Đây là rối loạn đơn gene phổ biến nhất của quá trình chuyển hóa carbohydrate. Bệnh tăng galactose máu do thiếu enzyme transferase (tăng galactose máu loại cổ điển) chiếm tỷ lệ 1/55.000 trẻ sơ sinh. Bệnh này xảy ra do các đột biến trên gene mã hóa cho enzyme galactose 1 - phosphate uridyl transferase (GAL-1-P uridyl transferase) (hình 1). Do thiếu hoạt tính của enzyme này nên những người mắc bệnh không thể chuyển thành công galactose thành glucose, hậu quả là galactose sẽ được chuyển hóa theo một con đường khác để thành galactitol và galactonate. Các dấu hiệu lâm sàng phổ biến của bệnh này gồm có suy gan, đục thủy tinh thể và

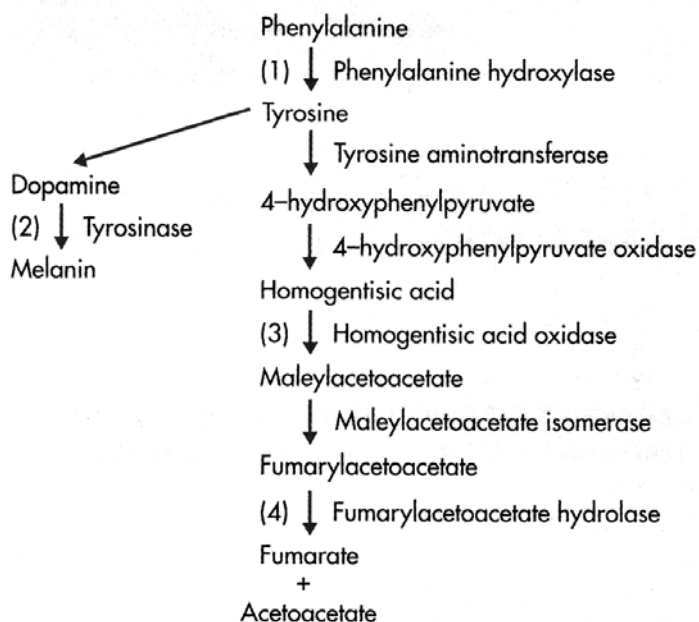
chậm phát triển. Về lâu dài, khuyết tật này sẽ dẫn đến chậm phát triển trí tuệ, phát triển kém và suy giảm buồng trứng ở người nữ.

Chương trình sàng lọc sơ sinh của bệnh này được thực hiện phổ biến và rộng rãi thông qua việc đo hoạt tính của enzyme GAL-1-P uridyl transferase huyết tương trên giọt máu khô. Việc xác định sớm giúp cho việc điều trị được thực hiện sớm, chủ yếu là loại galactose ra khỏi khẩu phần ăn và do đó giảm được nguy cơ bệnh lí xảy ra do bất thường trong quá trình chuyển hóa galactose.

2. Chuyển hóa amino acid

Các protein đóng những vai trò hết sức khác nhau trong cơ thể. Đơn vị cấu trúc cơ bản của protein là các amino acid. Một số amino acid có thể được cơ thể tổng hợp, đây là những amino acid không thiết yếu và một số amino acid cơ thể không tổng hợp được mà phải do môi trường cung cấp, đây là những amino acid thiết yếu. Rất nhiều khuyết tật của quá trình chuyển hóa amino acid đã được phát hiện.

Tăng phenylalanine máu



Hình 2: Vai trò của enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH)

Khuyết tật trong chuyển hóa phenylalanine (một amino acid thiết yếu) gây ra chứng tăng phenylalanine máu (hyperphenylalaninemias). Khuyết tật này gây ra bởi các đột biến trên các gene mã cho các thành

phần tham gia vào con đường hydroxy hóa phenylalanine. Sự gia tăng nồng độ của phenylalanine trong huyết tương sẽ làm tổn hại đến các quá trình hoạt động bình thường của tế bào trong não như myelin hóa (myelination), tổng hợp protein, gây ra tình trạng chậm trí nặng.

Hầu hết các trường hợp tăng phenylalanine máu gây ra bởi các đột biến của enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH) (hình 2) và gây ra bệnh phenylketonuria cổ điển (classical phenylketonuria, PKU). Đã có trên 400 đột biến đã được xác định trên gene PAH gồm các dạng thay thế, mất và thêm nucleotide.

Tỷ lệ mắc bệnh tăng phenylalanine máu thay đổi khá lớn giữa các nhóm chủng tộc, với tỷ lệ bệnh PKU thay đổi từ 1/10.000 ở người da trắng đến 1/90.000 ở người Châu Phi.

Việc điều trị tất cả các trường hợp tăng phenylalanine máu đều nhằm tới mục đích là duy trì nồng độ phenylalanine bình thường thông qua việc hạn chế ăn các thức ăn có chứa phenylalanine. Tuy nhiên do amino acid này là một amino acid thiết yếu và việc cung cấp đầy đủ amino acid này là hết sức cần thiết cho sự phát triển của cơ thể. Thiếu phenylalanine hoàn toàn sẽ gây chết do đó vẫn phải duy trì một cách hiệu quả ở mức cân bằng giữa việc cung cấp protein và phenylalanine cho sự phát triển và việc ngăn ngừa sự gia tăng quá cao phenylalanine máu. Hầu hết các trẻ mắc PKU đều phải theo một chế độ ăn hạn chế phenylalanine cho đến khi chúng bước vào tuổi thanh thiếu niên (khoảng từ 13 - 19 tuổi), tuy nhiên một số nghiên cứu cho thấy việc điều trị suốt cả cuộc đời đem lại nhiều lợi ích hơn cho các bệnh nhân PKU.

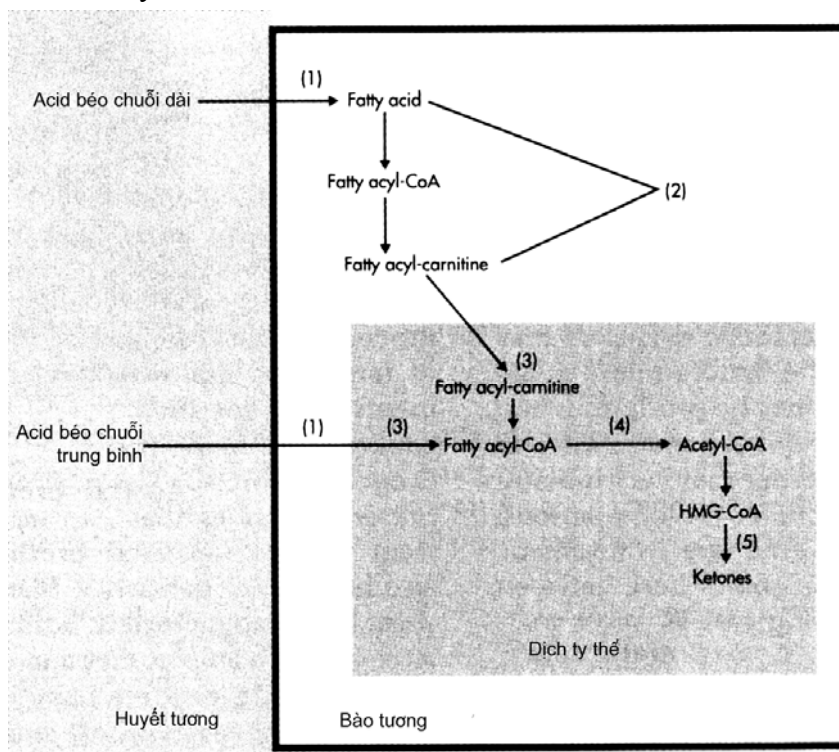
3. Chuyển hóa lipid

Lipid là một nhóm phân tử sinh học phân tử phức tạp không tan trong nước và tan dễ dàng trong các dung môi hữu cơ (như chloroform). Chúng là thành phần cấu trúc cơ bản của các phân tử phospholipid và sphingolipid có trong cấu trúc của các màng sinh học. Lipid cũng tạo nên các hormone, đóng vai trò như các thông tin nội bào và cũng là nguồn cung cấp năng lượng.

Sự gia tăng nồng độ lipid trong huyết tương (hyperlipidemia) khá phổ biến, tình trạng này xảy ra do các khiếm khuyết trong các cơ chế vận chuyển lipid. Các sai sót trong chuyển hóa acid béo (các chuỗi hydrocarbon với một nhóm tận cùng carboxylate) thường ít gặp hơn. Tuy nhiên các sai sót điển hình của quá trình chuyển hóa acid béo giúp hiểu biết một cách hiệu quả hơn cơ sở sinh hóa của quá trình dị hóa (catabolism) lipid.

Khiếm khuyết MCAD

Khuyết tật bẩm sinh phổ biến nhất của quá trình chuyển hóa acid béo là trường hợp thiếu enzyme acyl CoA dehydrogenase chuỗi trung bình (medium chain acyl CoA dehydrogenase: MCAD) (hình 3). Khiếm khuyết enzyme MCAD được đặc trưng bởi các cơn giảm glucose máu, tình trạng này dễ xảy ra hơn khi ăn kiêng. Thông thường, trẻ mắc khiếm khuyết enzyme MCAD có biểu hiện nôn mửa và hôn mê sau một thời gian ăn uống kém do mắc một bệnh thông thường nào đó như viêm đường hô hấp trên, viêm dạ dày ruột.



Hình 3: Vai trò của enzyme acyl CoA dehydrogenase chuỗi trung bình (medium-chain acyl CoA dehydrogenase: MCAD) (bước 4)

Nhịn ăn sẽ dẫn đến tình trạng tích lũy các chất trung gian của acid béo, không sản xuất đủ các keton cho nhu cầu của tổ chức và thiếu hụt nguồn cung cấp glucose. Phù não (cerebral edema) và bệnh não (encephalopathy) do các hậu quả trực tiếp hoặc gián tiếp của các chất trung gian của các acid béo trên hệ thần kinh trung ương. Tử vong thường xảy ra trừ khi có một nguồn năng lượng khác như glucose được bổ sung kịp thời. Giữa các cơn cấp tính, các trẻ mắc khiếm khuyết của MCAD

thường có các kết quả xét nghiệm bình thường. Việc điều trị bao gồm việc chăm sóc y tế trong các cơn cấp, cung cấp đầy đủ năng lượng và tránh ăn kiêng.

Hiện nay hầu hết các bệnh nhân mắc MCAD đã được báo cáo đều có nguồn gốc Tây Bắc Châu Âu và 90% số này có các allele mang một đột biến sai nghĩa do thay nucleotide A bằng G dẫn đến việc thay thế glutamate bằng lysine. Các dạng đột biến dạng thay cặp khác, mất cặp hoặc thêm cặp nucleotide đã được xác định nhưng không phổ biến.

Tính đặc hiệu trong cấu trúc phân tử của MCAD giúp chẩn đoán dễ dàng bằng test DNA trực tiếp. Phương pháp này được sử dụng làm công cụ chẩn đoán cũng như sàng lọc (screening) đáng tin cậy và rẻ tiền.

II. Bất thường của các con đường giáng hóa (degradative pathway)

Hầu hết các phân tử sinh học đều liên tục được hoàn hồi trong quá trình chuyển hóa bình thường của một tế bào. Các phân tử bị giáng hóa để tạo ra các cơ chất dùng cho việc kiến tạo nên các phân tử mới. Hơn nữa các phó phẩm (by-product) của các quá trình sản sinh năng lượng, chuyển đổi của các cơ chất và đồng hóa cần phải được xử lý và loại thải. Những sai sót trong các con đường giáng hóa này có thể dẫn đến tích lũy các chất chuyển hóa mà lẽ ra đã được loại thải hoặc hoàn hồi và gây ra các hậu quả bệnh lý.

Rối loạn tồn trữ ở lysosome

Các rối loạn tồn trữ ở lysosome là những khuyết tật chuyển hóa bẩm sinh điển hình. Bệnh xảy ra do kết quả của sự tích lũy các cơ chất. Các enzyme trong các lysosome xúc tác cho quá trình giáng hoá bậc thang của các sphingolipid, glycosaminoglycan (mucopolysaccharide), glycoprotein và glycolipid. Sự tích lũy các phân tử không bị giáng hóa sẽ làm rối loạn chức năng của tế bào, mô và cơ quan. Hầu hết các rối loạn của lysosome gây ra do khiếm khuyết của các enzyme. Mặc dù một số trường hợp xảy ra do sự bất hoạt khả năng hoạt hóa một enzyme hoặc vận chuyển một enzyme tới một cấu phần ở dưới mức tế bào (sub-cellular compartment) mà ở đó nó có thể thực hiện chức năng một cách chính xác.

Các rối loạn chuyển hóa mucopolysaccharidose (muco-polysaccharidoses : MPS disorders) là một nhóm các rối loạn gây ra do giảm khả năng giáng hóa của một hoặc vài glycosaminoglycan (như dermatan sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate and chondroitin sulfate). Các glycosaminoglycan này là các sản phẩm thoái hoá của các proteoglycan được thấy trong dịch ngoại bào. Tất cả các rối loạn MPS được đặc trưng

bởi sự hư hỏng tiến triển và mãn tính của nhiều hệ thống gây ra những rối loạn chức năng nghe, nhìn, khớp, và hệ tim mạch.

III. Bất thường trong các quá trình sản xuất năng lượng

Năng lượng cần cho hoạt động sống của tế bào được sản xuất từ nhiều cơ chất khác nhau như glucose, các ketone, các amino acid và các acid béo. Quá trình chuyển hóa các cơ chất này đòi hỏi cắt dần chúng thành những phân tử nhỏ hơn (qua các quá trình như chu trình citric acid hay beta oxy hóa) cùng với việc chuyển các ion hydrogen qua hệ thống phosphoryl oxy hóa (oxidative phosphorylation: OXPHOS). Một vài cơ chất được chuyển hóa theo con đường kỵ khí.

Trên 20 loại rối loạn khác nhau liên quan tới các khuyết tật của hệ thống OXPHOS gây ra do các đột biến thay, thêm hoặc mất nucleotide trong genome của ty thể và được di truyền theo dòng mẹ (maternal inheritance). Tuy nhiên các gene trong nhân có thể gây mất đoạn mtDNA đã được phân lập và chúng được di truyền theo kiểu gene lặn trên NST thường. Đột biến của các gene ảnh hưởng đến hệ OXPHOS gây ra những biểu hiện kiểu hình phức tạp như là kết quả của sự khác biệt trong nhu cầu chuyển hóa ở các tổ chức khác nhau và các hệ thống khác nhau ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

IV. Bất thường của các hệ thống vận chuyển

Sự vận chuyển hiệu quả của các phân tử giữa các bào quan trong tế bào và giữa tế bào với môi trường chung quanh thông qua các màng ngăn thường đòi hỏi sự có mặt của các đại phân tử đóng vai trò nối kết giữa các thành phần liên quan lại với nhau và đóng vai trò trung gian trong việc vận chuyển qua các màng đó. Những bất thường trong các hệ thống vận chuyển này sẽ gây ra vô số hậu quả khác nhau, tùy thuộc vào việc chúng đã làm các màng ngăn này đã bị thay đổi như thế nào hoặc sự tích lũy của các cơ chất đã ảnh hưởng như thế nào đến các hoạt động sinh lý bình thường của màng.

Sự vận chuyển bất thường của cystine: bệnh cystine niệu (cystinuria)

Cystine là một dẫn suất disulfide của amino acid cysteine. Sự vận chuyển bất thường của cysteine có thể gây ra hai bệnh cystinuria (cystine niệu) và bệnh cystinosis (nhiễm cystine), cả hai loại bệnh này đều di truyền theo kiểu gen lặn NST thường.

Sự vận chuyển bất thường của cystine giữa tế bào và dịch ngoại bào gây ra bệnh cystinuria, một trong những bệnh chuyển hóa di truyền phổ biến nhất. Mặc dù đây là một bệnh gây chết nhưng thường không gây chết sớm. Bệnh cystinuria là một bệnh di truyền dị nguyên (heterogeneous)

gây ra bởi một khiếm khuyết của quá trình vận chuyển amino acid dibasic (dibasic: có hai nguyên tử hydrogen có thể thay thế được) ở các tế bào biểu mô dạ dày - ruột và các ống thận. Do khiếm khuyết này mà cystine, lysine, arginine, và ornithine được bài tiết trong nước tiểu với số lượng cao hơn bình thường. Cystine là loại amino acid không tan nhất trong nước, vì vậy sự gia tăng cystine trong nước tiểu dẫn đến việc hình thành sỏi thận. Tình trạng này sẽ dẫn đến các biến chứng nhiễm trùng, cao huyết áp và suy thận. Việc điều trị bệnh cystinuria bao gồm việc giảm sản xuất và bài tiết cystine, làm thay đổi khả năng hòa tan của cystine và chuyển cystine thành một phức hợp có khả năng hòa tan cao hơn.

Chương 8

Bộ nhiễm sắc thể người và các dạng đột biến nhiễm sắc thể

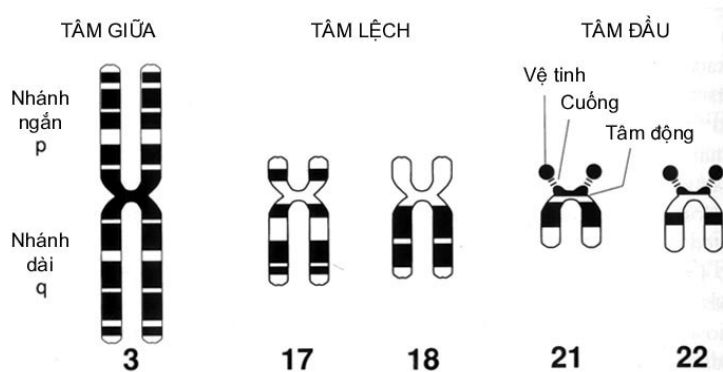
Ở người bình thường, mỗi tế bào lưỡng bội ($2n$) (diploid) mang 46 nhiễm sắc thể (NST) chia thành 23 cặp, trong đó có 22 cặp NST thường (autosome) và 1 cặp NST giới tính (sex chromosome). Tinh trùng và trứng được hình thành qua quá trình giảm phân (meiosis) mang bộ NST đơn bội (n) với 23 NST.

I. Lập karyotype bộ nhiễm sắc thể người

Karyotype được lập để mô tả đặc điểm bộ NST của một cá thể dựa trên bộ NST của tế bào ở kỳ giữa (metaphase) hoặc kỳ giữa sớm (pro-metaphase) của nguyên phân.

1. Phân loại NST

Việc xác định và phân loại từng NST được thực hiện dựa trên các đặc điểm sau đây của mỗi NST:



Hình 1: Các loại vị trí của tâm động

(1) Chiều dài.

(2) Vị trí của tâm động (centromere) (hình 1): Tâm động chia NST làm hai nhánh được gọi là nhánh ngắn (nhánh p, p: petite) và nhánh dài (nhánh q). Tùy theo vị trí của tâm động trên NST mà chia thành ba loại:

- NST tâm giữa (metacentric): tâm động nằm giữa, hai nhánh p và q tương đối bằng nhau.

- NST tâm lệch (submetacentric): tâm động nằm lệch, sự khác biệt giữa nhánh p và q khá rõ.
- NST tâm đầu (acrocentric): NST nằm ở một đầu của NST. Các NST tâm đầu thường có mang các vệ tinh (sattelite) nối với tâm động bằng các cuống.

(3) Sự phân bố của các band sáng tối (trong kỹ thuật nhuộm band)

(4) Màu sắc huỳnh quang bắt màu trên NST (trong kỹ thuật nhuộm màu huỳnh quang)

2. Karyotype (kiểu nhân)

2.1. Giai đoạn thích hợp để lập karyotype



Hình 2: Một cụm NST ở kỳ giữa

Kỳ giữa (metaphase) hoặc tiền kỳ giữa (pro- metaphase) của nguyên phân là giai đoạn NST cho hình ảnh rõ nét nhất giúp đánh giá số lượng và cấu trúc của các NST một cách dễ dàng (hình 2).

2.2. Loại tế bào được sử dụng

Về mặt lý thuyết karyotype có thể được lập từ bất cứ loại tế bào nào có thể nguyên phân tuy nhiên trong thực tế karyotype được lập từ việc nuôi cấy 4 loại tế bào chính:

- Các tế bào lympho.
- Các nguyên bào sợi thu được từ sinh thiết da.
- Các tế bào nước ối thu được qua việc chọc dò nước ối vào tuần lễ thứ 13 - 14 của thai kỳ.
- Các tế bào của lớp nhung mao màng đệm (chorionic villi) được lấy từ bánh nhau vào tuần lễ thứ 7-8 của thai kỳ

Việc lựa chọn loại tế bào phụ thuộc vào yêu cầu chẩn đoán. Đa số trường hợp việc lập karyotype được thực hiện thông qua việc nuôi cấy tế bào lympho của máu ngoại vi.

2.3. Cách lập karyotype (hình 3)

22 cặp NST thường được chia thành 7 nhóm được ký hiệu bằng các chữ cái la tinh A, B, C, D, E, F, G. Mỗi nhóm gồm các NST có kích thước gần giống nhau và dễ nhầm lẫn với nhau khi phân loại. Các NST thường được sắp xếp theo kích thước từ lớn tới nhỏ dần và được đánh số từ 1 đến

22 và cặp NST giới tính được ký hiệu là XX (người nữ) và XY (người nam) được xếp riêng ở góc dưới phải của karyotype hoặc NST X được xếp theo nhóm C và NST Y được xếp theo nhóm G.

Các NST từ 1 đến 22 được sắp xếp theo dựa kích thước từ lớn đến nhỏ dần.

Nhóm A: gồm 3 cặp số 1, 2, 3, đây là 3 cặp lớn nhất và có tâm giữa

Nhóm B: gồm 2 cặp số 4 và 5, đây là 2 cặp lớn có tâm lệch

Nhóm C: gồm 7 cặp số 6, 7, 8, 9 10, 11, 12 với chiều dài trung bình và tâm lệch.

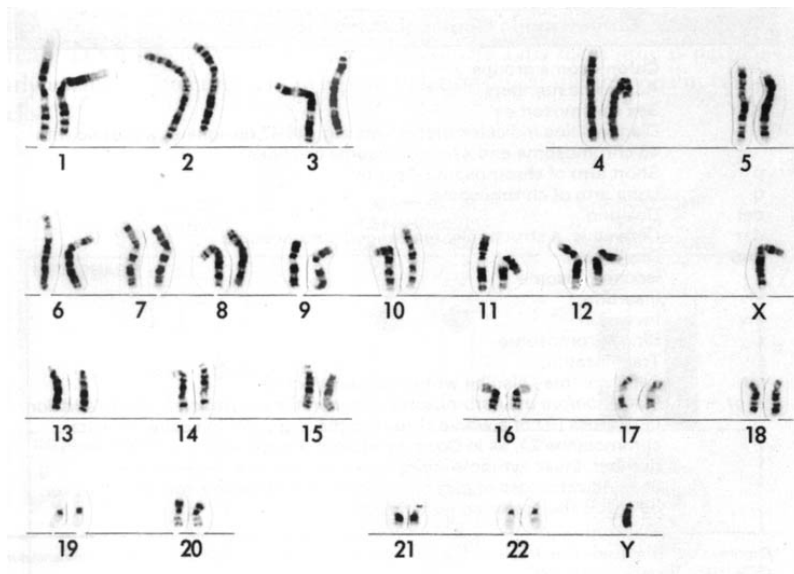
Nhóm D: gồm 3 cặp số 13, 14, 15 có chiều dài trung bình và tâm đầu.

Nhóm E: gồm 3 cặp số 16, 17, 18 có chiều dài bé, các NST có tâm lệch hoặc tâm giữa.

Nhóm F: gồm 2 cặp số 19 và 20 có chiều dài bé và tâm lệch.

Nhóm G: gồm 2 NST 21 và 22 có chiều dài bé và tâm đầu.

NST X giống các NST của nhóm C và NST Y giống NST của nhóm G.



Hình 3: Karyotype của một người nam bình thường

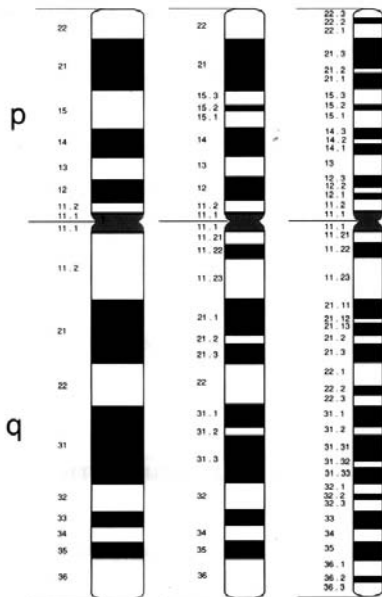
3. Các kỹ thuật di truyền tế bào

NST được phân tích dựa trên việc nuôi cấy mô (thường là máu ngoại vi) trong các điều kiện và thời gian thích hợp (thường từ 48 đến 72 giờ đối với tế bào lympho trong máu ngoại vi). Colcemid được sử dụng để làm đình chỉ quá trình phân bào ở kỳ giữa nguyên phân. Sau đó các tế bào

được xử lý nhuộm tương để phá vỡ màng tế bào, lên tiêu bản, nhuộm bằng các loại thuốc nhuộm nhân và quan sát bằng kính hiển vi (độ phóng đại 1000 lần), các cụm NST được chụp ảnh (hình 2) và được sử dụng để lập karyotype.

Hiện nay với việc sử dụng các chương trình vi tính chuyên dụng việc lập karyotype được thực hiện nhanh chóng và hiệu quả hơn.

3.1. Các kỹ thuật nhuộm



Hình 4: Các mức độ phân giải band trên NST (band G)

Để có thể đánh giá được các bất thường NST về số lượng và cấu trúc, nhiều kỹ thuật nhuộm đã được sử dụng để hiển thị các NST.

Kỹ thuật nhuộm band G (G-band): nhuộm NST bằng thuốc nhuộm Giemsa sau khi đã xử lý NST bằng Trypsin. Đây là phương pháp nhuộm được sử dụng rộng rãi để đánh giá các bất thường của NST về số lượng và cấu trúc (hình 4).

Kỹ thuật nhuộm band Q (Q-band): nhuộm NST bằng thuốc nhuộm huỳnh quang, Kỹ thuật cho hiển thị band tương tự như nhuộm band G.

Kỹ thuật nhuộm band R (reverse band, R-band): đòi hỏi phải xử lý NST bằng nhiệt trước khi nhuộm. Kỹ thuật này cho phép hiển thị các band sáng tối ngược

với phương pháp nhuộm band Q và G tạo thuận lợi cho việc đánh giá các bất thường ở các đầu cùng của NST.

Kỹ thuật nhuộm band C (C-band): cho phép nhuộm và đánh giá các vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin) nằm cạnh tâm động.

Kỹ thuật nhuộm NOR (nucleolar organizing region: vùng cấu tạo nên hạch nhân) (NOR stain): cho phép nhuộm các vệ tinh và các cuống ở các NST tâm đầu.

Kỹ thuật nhuộm band G với độ phân giải cao (high resolution banding): NST được nhuộm khi đang ở kỳ đầu (prophase) hoặc vào giai đoạn sớm của kỳ giữa (prometaphase) sau khi xử lý bằng các hóa chất thích hợp, do đó tổng số band của NST có thể tăng lên đến 800 band cho phép phát hiện các bất thường nhỏ trong cấu trúc của các NST (hình 4).

Kỹ thuật FISH (fluorescence in situ hybridization: lai tại chỗ bằng kỹ thuật huỳnh quang): Một đoạn DNA được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu với một vị trí trên NST đóng vai trò của một đoạn dò (probe) đem lai với các NST ở kỳ giữa, giai đoạn sớm của kỳ giữa, kỳ đầu hoặc gian kỳ rồi sau đó quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Kỹ thuật này thường được sử dụng để phát hiện các trường hợp xảy ra tình trạng mất đoạn NST, thừa NST hoặc tái sắp xếp NST như chuyển đoạn. Kỹ thuật đòi hỏi tính đặc hiệu cao của các DNA dò và định hướng trong chẩn đoán lâm sàng.

Kỹ thuật lập karyotype quang phổ (SKY: spectral karyotype): Đây là kỹ thuật nhuộm sử dụng sự phối hợp của 5 loại màu huỳnh quang khác nhau. với 5 màu khác nhau sẽ có thể tạo ra $2^5 - 1 = 31$ màu khác nhau cho phép tạo nên đủ số probe cho 22 NST thường và 2 NST giới tính X và Y. Với kỹ thuật này mỗi NST sẽ có một màu đặc hiệu sau khi sử dụng hệ thống chụp ảnh và phần mềm xử lý ảnh đặc hiệu sẽ làm cho việc đánh giá các bất thường về số lượng và một số loại bất thường cấu trúc của NST một cách hiệu quả.

4. Danh pháp

Dưới đây là các danh pháp được sử dụng phổ biến trong việc mô tả NST trong karyotype:

A-G : Các nhóm NST

1-22: Số của các NST

X, Y: Các NST giới tính

/ : Ký hiệu để minh họa trạng thái khảm (vd: 46/47 mô tả cơ thể ở trạng thái khảm với 2 dòng tế bào 46 và 47 NST).

p : Nhánh ngắn của NST

q : Nhánh dài của NST

del : Mất đoạn (deletion)

dup : Nhân đoạn (duplication)

i : NST đều (isochromosome)

ins : chèn đoạn (insertion)

inv: : Đảo đoạn (inversion)

r : NST hình nhẫn (ring chromosome)

t : Chuyển đoạn (translocation)

ter : Đầu tận cùng (cũng có thể được viết pter hoặc qter để mô tả đầu tận cùng của nhánh ngắn hoặc nhánh dài).

+ / - : Được đặt trước số NST , các ký hiệu này dùng để minh họa hiện tượng thêm (+) hoặc bớt (-) của nguyên một NST nếu đặt trước số NST. Nếu được đặt sau NST được dùng để mô tả hiện tượng thêm hoặc bớt một phần của NST.

Để minh họa một karyotype người ta tuân theo thứ tự sau:

Số lượng NST trong một tế bào tiếp theo bởi dấu phẩy.

NST giới tính

Dấu + hoặc - trước số của NST để minh họa hiện tượng thừa hoặc thiếu NST đó.

Trong các trường hợp cần mô tả chi tiết, nhất là trong các trường hợp có bất thường về cấu trúc, thứ tự được ghi như sau:

Số của NST.

Tên nhánh (p hoặc q) của NST đó.

Các số Ả rập minh họa vùng xảy ra các biến cố trên NST. Số này được ghi theo hướng từ tâm động ra hai đầu cùng.

Một số ví dụ về cách ký hiệu cho các karyotype bình thường và bệnh lý:

<i>Karyotype</i>	<i>Mô tả</i>
47,XX,+21	Người nữ thừa một NST 21, hội chứng Down
47,XY,+21/46XY	Người nam dạng khảm với một dòng tế bào thừa một NST 21 và một dòng tế bào bình thường.
46,XY,del(4)(p14)	Người nam mất đoạn nhánh ngắn NST số 4, vùng band 14 (band 4 của vùng1)
46XX,dup(5p)	Người nữ bị nhân đoạn nhánh ngắn của NST số 5.
45,XY,-13,-14,t(13q;14q):	Người nam bị chuyển đoạn cân bằng Robertson của NST 13 và 14. Karyotype mô tả thiếu hai NST 13 và 14.

II. Các loại bất thường NST

Các bất thường nhiễm sắc thể (NST) bao gồm 2 loại: (1) Bất thường về số lượng và (2) bất thường về cấu trúc. Chúng được gặp với tỉ lệ 1/150 trẻ sinh sống và là nguyên nhân hàng đầu của các trường hợp chậm phát triển trí tuệ và sảy thai.

1. Một số thuật ngữ

- Lưỡng bội (diploid) ($2n = 46$): Bộ NST có trong các tế bào sinh dưỡng và sinh dục chưa giảm phân
- Đơn bội (haploid) ($n = 23$) Bộ NST có trong các giao tử sau giảm phân.
- Dị bội (heteroploid): mô tả tất cả các trường hợp bất thường về số lượng NST
- Chính bội (euploid): Số lượng NST trong tế bào là một bội số của n bao gồm cả trường hợp $2n$, n , đa bội.
- Đa bội (polyploid): Trường hợp bất thường về toàn bộ số lượng của các NST, số lượng NST trong bộ NST đa bội là một bội số của n và lớn hơn $2n$.
- Lệch bội (aneuploid): Bất thường số lượng của một hoặc một số NST. Trường hợp tăng thêm 1 NST được gọi là thể tam nhiễm (trisomy), thiếu 1 NST được gọi là thể đơn nhiễm (monosomy).

2. Bất thường về số lượng NST

2.1. Đa bội

Đa bội hiếm gặp ở người, hai trường hợp đa bội đã được báo cáo ở người là tam bội (triploid, $3n = 69$) karyotype 69,XXX (69XYY hoặc 69XXY) và tứ bội (tetraploid, $4n = 92$) karyotype 92,XXXX (92XXYY).

Tam bội

Trường hợp tam bội được gặp với tỷ lệ 1/10.000 trẻ sinh sống nhưng chiếm tỷ lệ tới 15% trong số các loại bất thường NST trong thai kỳ. Đa số các trường hợp tam bội đều bị sảy thai ngẫu nhiên. Nguyên nhân phổ biến của hiện tượng tam bội là do một trứng được thụ tinh bởi 2 tinh trùng (dispermy), một số ít còn lại do 1 trứng và một thể cực (polar cell) được thụ tinh bởi một tinh trùng hoặc do rối loạn phân ly của toàn bộ NST trong giảm phân tạo ra 1 tinh trùng hoặc trứng lưỡng bội ($2n$) rồi qua thụ tinh với giao tử n để tạo thành hợp tử $3n$.

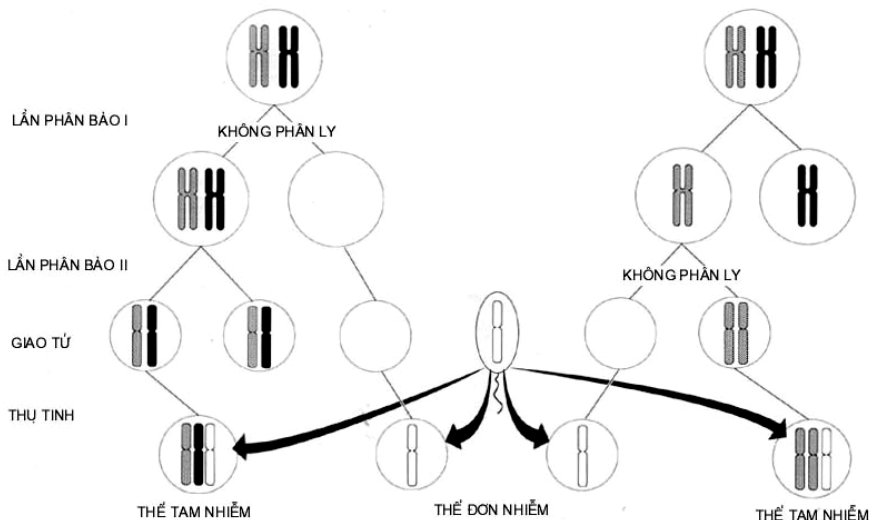
Tứ bội

Trường hợp tứ bội hiếm hơn rất nhiều cả ở các trẻ sinh sống và trong các trường hợp sảy thai ngẫu nhiên. Trường hợp này chỉ được ghi nhận ở một vài trẻ sinh sống nhưng cũng chỉ sống được trong một thời gian rất ngắn sau sinh. Tứ bội được tạo thành do rối loạn phân ly của toàn bộ NST trong hợp tử hoặc do sự kết hợp của 2 loại giao tử mang bộ NST $2n$.

2.2. Lệch bội

Cơ chế

Bất thường lệch bội xảy ra do rối loạn phân ly của các NST trong quá trình phân chia tế bào nguyên phân hoặc giảm phân. Mặc dù nguyên nhân của sự rối loạn này chưa rõ nhưng có một sự liên quan chặt chẽ giữa hiện tượng này với sự gia tăng tuổi mẹ. Các tế bào lệch bội mang thừa hoặc thiếu một hoặc vài NST, thông thường chỉ có 1 NST bị ảnh hưởng ($2n \pm 1$) (hình 5).



Hình 5: Cơ chế hình thành thể tam nhiễm, đơn nhiễm do rối loạn phân ly của NST trong giảm phân

Sự không phân ly NST trong quá trình giảm phân có thể xảy ra ở lần phân bào thứ nhất hoặc thứ hai của giảm phân và qua đó tạo ra các hậu quả khác nhau:

Nếu sự không phân ly của một cặp NST xảy ra trong lần phân bào thứ nhất, giao tử tạo thành sẽ mang cả hai NST với một của bố và một của mẹ hoặc không mang NST nào cả.

Nếu sự không phân ly của một cặp NST xảy ra trong lần phân bào thứ hai của giảm phân, giao tử tạo thành sẽ mang hai NST hoặc đều có nguồn gốc từ bố hoặc có nguồn gốc từ mẹ hoặc không mang NST nào cả.

Sự không phân ly xảy ra sau khi thụ tinh (rối loạn phân ly trong nguyên phân) sẽ tạo ra trạng thái khảm (mosaic), trong cơ thể sẽ có 2 hoặc hơn các dòng tế bào khác nhau về bộ NST.

Các yếu tố ảnh hưởng

Có một sự kết hợp giữa sự gia tăng tuổi mẹ với sự gia tăng nguy cơ sinh con mang thể tam nhiễm. Nhiều giả thuyết đã được đưa ra để giải thích hiện tượng này:

- Mẹ càng lớn tuổi khả năng đào thải các thai mang thể tam nhiễm càng giảm.
- Sự gia tăng sự không phân ly của các NST trong quá trình giảm phân tạo trứng ở các bà mẹ lớn tuổi.
- Vai trò của các yếu tố như nồng độ của các hormone, hút thuốc, uống rượu, bệnh tuyến giáp tự miễn và phóng xạ đã được nghiên cứu nhưng không cho thấy có liên quan đến tình trạng rối loạn phân ly của các NST.

Thể đơn nhiễm và thể tam nhiễm

Thể đơn nhiễm (monosomy) của NST được gặp rất ít trong số các trẻ sinh sống do đa số không sống được tới khi sinh trừ trường hợp thể đơn nhiễm X do hiện tượng bất hoạt bình thường của 1 trong 2 NST X.

Thể tam nhiễm (trisomy) được gặp ở trẻ sinh sống với tần số cao hơn do cơ thể có thể dung nạp tình trạng thừa vật liệu di truyền tốt hơn trường hợp thiếu vật liệu di truyền.

3. Bất thường cấu trúc NST

3.1. Cơ chế

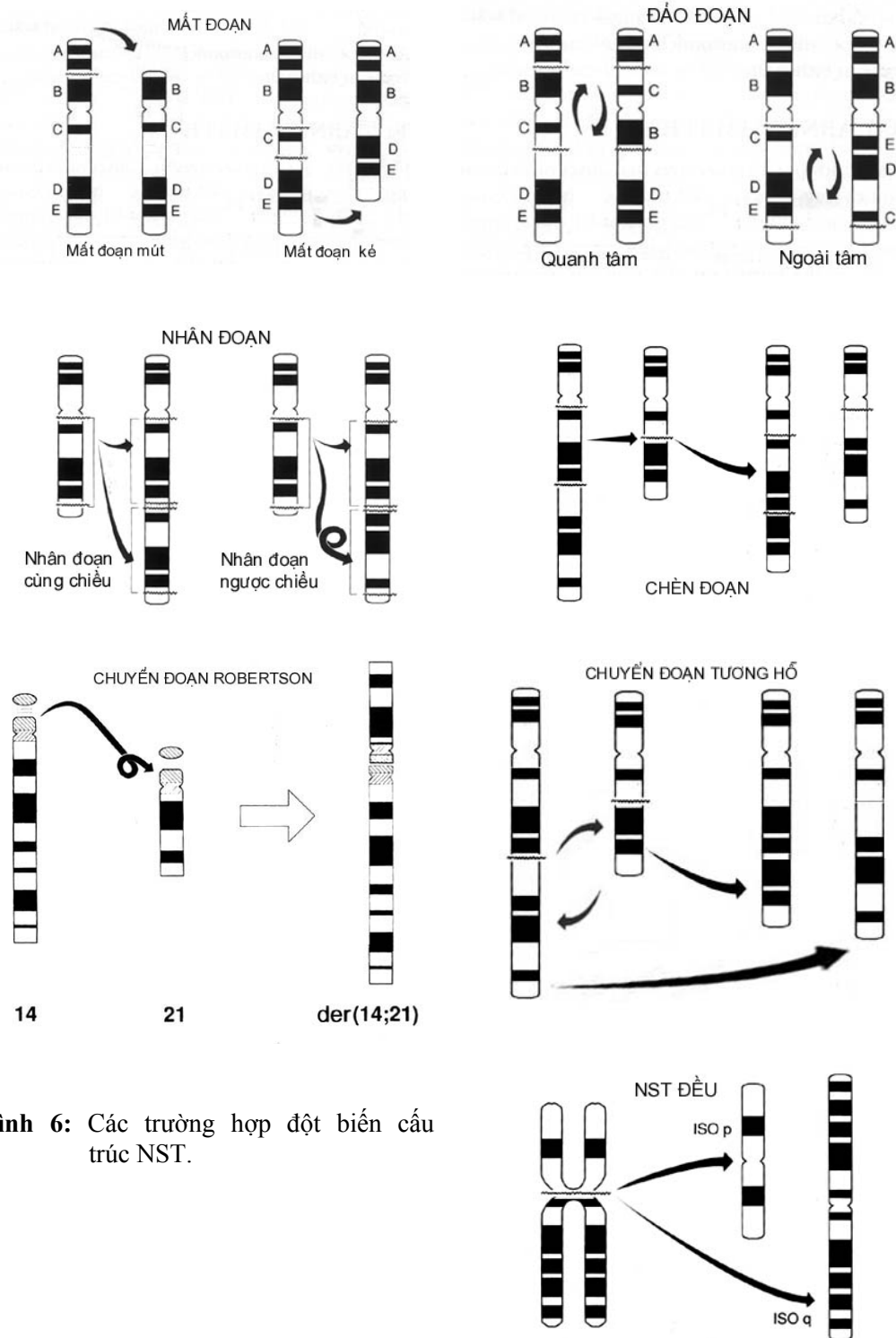
Các bất thường cấu trúc của NST có thể ảnh hưởng đến 1, 2 NST hoặc nhiều hơn. Các bất thường cấu trúc NST thường xảy ra do bất thường của quá trình tiếp hợp và trao đổi chéo giữa các NST tương đồng trong quá trình giảm phân hoặc do đứt gãy xảy ra trên NST trong nguyên phân hoặc giảm phân.

Bình thường những đứt gãy này được sửa chữa tuy nhiên trong một số trường hợp những tổn thương này không được sửa chữa, làm thay đổi cấu trúc của NST và truyền cho thế hệ sau.

3.2. Các dạng đột biến cấu trúc NST (hình 6)

Mất đoạn (deletion)

Một đoạn NST bị mất, đoạn mất có thể nằm ở một đầu cùng hoặc là một đoạn kẻ nằm trong nhánh ngắn hoặc nhánh dài của NST. Đôi khi mất đoạn xảy ra ở cả hai đầu cùng của NST, trường hợp này thường dẫn đến việc tạo thành NST hình nhẫn (ring chromosome). Hiện tượng mất đoạn còn được gọi với tên thể đơn nhiễm một phần (partial monosomy)



Hình 6: Các trường hợp đột biến cấu trúc NST.

Đảo đoạn (inversion)

Một đoạn NST bị đảo ngược vị trí, tùy theo việc đoạn đảo có hoặc không ảnh hưởng đến tâm động mà được chia ra hai loại: (1) Đảo đoạn quanh tâm (pericentric) với đoạn đảo bao gồm cả tâm động và (2) đảo đoạn ngoài tâm (paracentric) với đoạn đảo chỉ khu trú trên nhánh p hoặc q của NST

Nhân đoạn (duplication)

Một đoạn của NST bị lặp lại, đoạn lặp có thể nằm cạnh nhau hoặc xa nhau, cùng chiều (tandem dup.) hoặc ngược chiều (mirror dup.).

NST đều (iso chromosome)

Xảy ra do bất thường trong việc tách NST sau khi nhân đôi dẫn đến hình thành 2 NST, một NST gồm 2 nhánh p và một NST gồm 2 nhánh q.

Chèn đoạn (insertion)

Một đoạn NST được chuyển từ NST này đến chèn vào NST khác.

Chuyển đoạn tương hỗ (reciprocal trans.)

Có sự trao đổi đoạn giữa 2 NST không tương đồng.

Chuyển đoạn Robertson (Robertsonian trans.)

Còn gọi là chuyển đoạn hòa hợp tâm (centrifusion trans.). Chuyển đoạn xảy ra giữa 2 nhánh dài của 2 NST tâm đầu, phần vệ tinh bị mất.

3.3. Hậu quả của các đột biến NST lên chất liệu di truyền

Căn cứ vào sự biến đổi chất liệu di truyền trong các loại đột biến NST người ta chia làm hai loại:

Đột biến cân bằng (balanced mutation)

Đột biến NST không làm mất hoặc thêm chất liệu di truyền như các trường hợp chuyển đoạn, đảo đoạn. Do không làm mất hoặc thêm chất liệu di truyền nên những đột biến này thường không ảnh hưởng lên kiểu hình.

Đột biến không cân bằng (unbalanced mutation)

Bao gồm các đột biến NST làm mất chất liệu di truyền như thể đơn nhiễm, đột biến mất đoạn hoặc làm tăng chất liệu di truyền như thể tam nhiễm, thể tam bội, nhân đoạn. Đây là những đột biến gây ra những hậu quả trên kiểu hình.

Chương 9

Di truyền tế bào học lâm sàng

I. Các bệnh lý phổ biến liên quan đến bất thường NST

Những bất thường NST được thể hiện dưới các dạng sau:

1. Sảy thai ngẫu nhiên

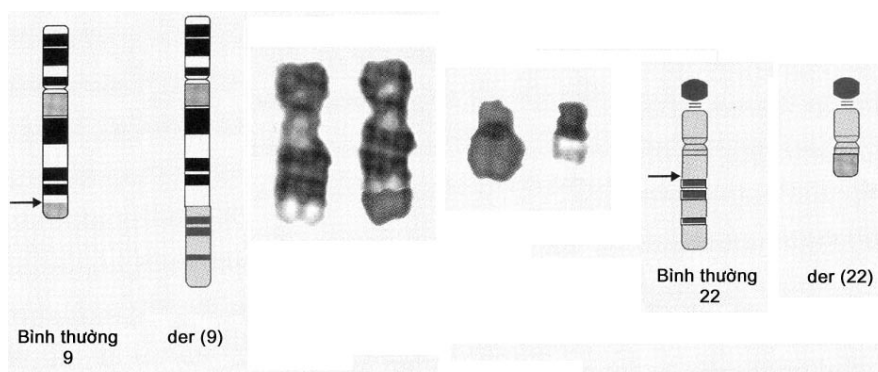
Khoảng 50% trường hợp sảy thai ngẫu nhiên có nguyên nhân bất thường NST. Các trường hợp trisomy 16 không bao giờ gặp ở các trẻ sinh sống và trường hợp tam bội rất hiếm gặp ở các trẻ sinh sống và trường hợp này thường chết ngay sau khi sinh. Các trường hợp trisomy 13, 18, 21 được gặp trong khoảng 9% sảy thai ngẫu nhiên.

2. Các dị tật bẩm sinh

Dị tật bẩm sinh là một hậu quả lâm sàng khác do các bất thường của NST gây ra. Mặc dầu các loại bất thường NST rất đa dạng nhưng tất cả chúng đều có những biểu hiện chung như sau:

- Tình trạng chậm phát triển ở trẻ và chậm trí.
- Có những thay đổi đặc thù của khuôn mặt.
- Lùn có thể kèm theo nhẹ cân.
- Có sự gia tăng tần số của các dị tật bẩm sinh, đặc biệt là các dị tật bẩm sinh của tim.

3. Ung thư



Hình 1: Chuyển đoạn tương hỗ giữa nhánh dài của NST 22 và nhánh dài của NST 9

Các bất thường của NST xảy ra ở các tế bào sinh dưỡng là nguyên nhân của một số loại ung thư ở người. Đến nay đã có hơn 100 trường hợp tái sắp xếp NST được thấy trên 40 loại bệnh ung thư khác nhau.

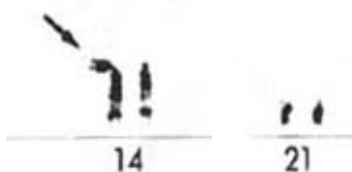
Ví dụ như ở bệnh nhân bị bệnh bạch cầu thể tủy mãn (CML: chronic myelogenous leukemia) có sự chuyển đoạn tương hỗ của một đoạn nhánh dài của NST số 22 lên nhánh dài của NST số 9 và một phần nhỏ trên đầu tận cùng nhánh dài NST số 9 được chuyển đến NST 22 tạo ra một hình ảnh NST 22 nhỏ hơn bình thường (NST Philadelphia). Hậu quả của hình thức chuyển đoạn này là dẫn đến sự cô lập của các gen nằm cạnh điểm đứt gãy (break point). Một gen tiền ung thư (proto-oncogene) được gọi là *abl* được chuyển từ vị trí bình thường trên 9q sang 22q (hình 1). Sự thay đổi vị trí này sẽ làm thay đổi sản phẩm của gen *abl*, làm tăng hoạt tính của enzyme tyrosine kinase gây ra hiện tượng ác tính của các tế bào tạo máu (hematopoietic cells).

IV. Các hội chứng thường gặp liên quan đến bất thường NST

1. Hội chứng Down

1.1. Nguyên nhân và tần số

Đây là trường hợp bất thường NST được gặp phổ biến nhất. Khoảng 95% trường hợp xảy ra do thừa một NST 21 (trisomy 21), 4% do chuyển đoạn không cân bằng liên quan đến nhánh dài của NST 13, 14, 15 (đa số trường hợp là NST 14) (hình 2) và nhánh dài của NST 21 hoặc giữa NST 21 và 22. Khoảng từ 1 đến 3% trường hợp Down ở dạng khảm với sự có mặt của 2 dòng tế bào, một dòng bình thường và một dòng thừa 1 NST 21.



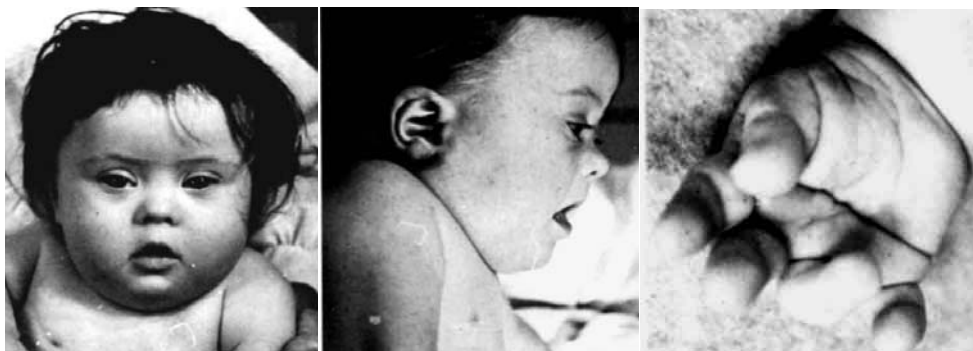
Hình 2: Hội chứng Down do chuyển đoạn NST 14, 21; 46,XX,-14,+t(14q;21q)

Khoảng 90 - 95% trường hợp trisomy 21 có NST 21 thừa được nhận từ mẹ và có sự liên quan chặt chẽ giữa sự gia tăng tuổi mẹ với nguy cơ sinh con bị trisomy 21. Ở những bà mẹ dưới 30 tuổi nguy cơ sinh con bị thể tam nhiễm 21 là 1/1000, ở các bà mẹ trong độ tuổi 35 nguy cơ này là 1/400, ở các bà mẹ 40 tuổi là 1/100 và ở các bà mẹ 45 tuổi là 1/50.

1.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 3)

Trẻ mắc hội chứng Down có khuôn mặt khá điển hình với mũi tẹt, mắt xếch, có nếp quặt ở góc trong của mắt, gáy phẳng, tai nhỏ, lưỡi dày v.v.... 50% trẻ này có rãnh khỉ trong lòng bàn tay (simian crease), giảm trương lực cơ. Chậm phát triển tinh thần - vận động. Trẻ mang karyotype dạng khảm có biểu hiện nhẹ nhàng hơn. 40% trẻ Down bị tật tim bẩm

sinh, khoảng 3% số trẻ bị dị tật của ống tiêu hóa. Trẻ có nguy cơ bị bệnh bạch cầu cao gấp 15 đến 20 lần hơn trẻ bình thường, dễ mắc các bệnh nhiễm khuẩn đặc biệt là nhiễm khuẩn hô hấp.



(a)

(b)

(c)

Hình 3: Khuôn mặt của trẻ mắc hội chứng Down: (a) nhìn thẳng; (b) nhìn nghiêng; (c) bàn tay với rãnh khi

1.3. Nguy cơ tái phát

Nguy cơ sinh thêm con bị trisomy 21 ở cặp bố mẹ đã có con bị trisomy 21 khoảng 1%, nguyên nhân của sự gia tăng này không được rõ. Đối với những người mang chuyển đoạn cân bằng, nếu mẹ là người mang nguy cơ sinh con mắc hội chứng Down vào khoảng 10 - 15% và khoảng 1 - 2% nếu bố là người mang.

2. Hội chứng Edward (thể tam nhiễm 18) ($47,XY,+18$)($47,XX,+18$)

2.1. Nguyên nhân và tần số

Thể tam nhiễm 18 là loại thể tam nhiễm được gặp phổ biến vào hàng thứ hai trong số các trường hợp thể tam nhiễm của NST thường.

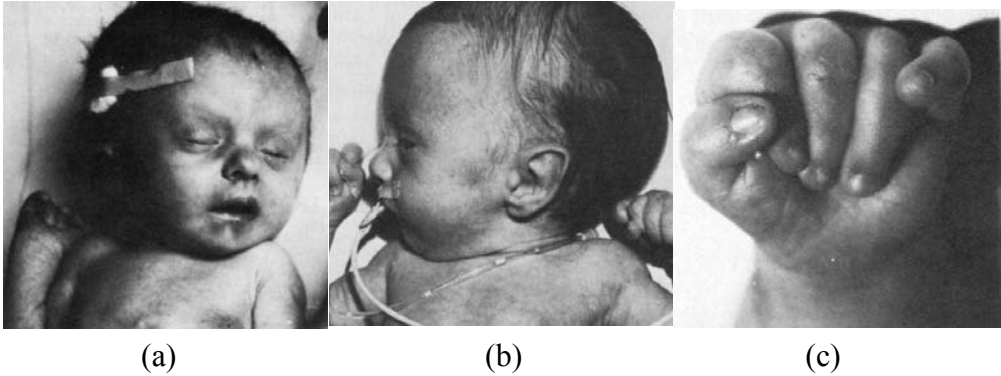
Hơn 95% trường hợp hội chứng Edwards là do thể tam nhiễm 18, dạng khảm chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ. Sự xuất hiện thể tam nhiễm 18 liên quan tới sự gia tăng tuổi mẹ và 90% trường hợp NST 18 thừa được nhận từ mẹ. Trên 95% trường hợp thai mang thể tam nhiễm 18 bị sảy ngẫu nhiên trong thai kỳ.

2.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 4)

Trẻ có trọng lượng sơ sinh thấp. Khuôn mặt điển hình với tai nhỏ, vành tai vênh ra ngoài, miệng nhỏ, há ra khó khăn. Xương ức ngắn. Bàn tay điển hình với ngón trỏ đề lên trên ngón giữa. Hầu hết các trẻ này đều mắc các dị tật bẩm sinh quan trọng như tật tim bẩm sinh (thường là khuyết tật của vách ngăn tâm thất), thoát vị rốn, thoát vị hoành v.v...

Khoảng 50% trẻ mắc hội chứng này chết trong tháng đầu tiên, chỉ có

khoảng 10% sống đến 12 tháng tuổi. Các trường hợp thể tam nhiễm 18 sống tới tuổi thiếu nhi có hiện tượng chậm phát triển nặng nề, hầu hết trẻ không thể đi được.

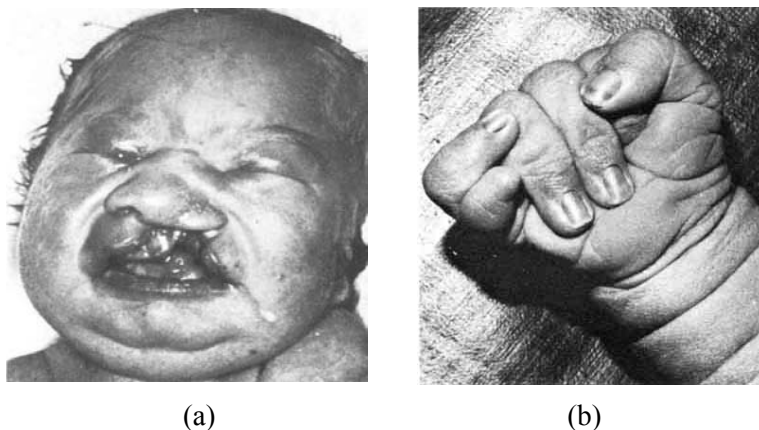


Hình 4: Khuôn mặt của trẻ mắc hội chứng Edward: (a) nhìn thẳng; (b) nhìn nghiêng; (c) bàn tay điển hình với ngón trỏ đè lên ngón giữa

3. Hội chứng Patau (thể tam nhiễm 13) ($47,XY, +13$)($47,XX, +13$)

3.1. Nguyên nhân và tần số

Khoảng 80% trường hợp do thừa một NST 13, số còn lại do thể ba nhiễm cục bộ (partial trisomy) của NST 13 gây ra do đột biến chuyển đoạn. Giống như trường hợp thể ba nhiễm 21 và 18, sự xuất hiện thể ba nhiễm 13 cũng có sự liên quan chặt chẽ với sự gia tăng tuổi mẹ. Trên 95% trường hợp thai mang thể ba nhiễm 13 bị sảy ngẫu nhiên trong thai kỳ.



Hình 5: (a) Khuôn mặt của trẻ mắc hội chứng Patau; (b) bàn tay thừa ngón sau trục

3.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 5)

Trẻ có khuôn mặt điển hình với tật khe hở môi hàm, mắt nhỏ, thừa

ngón sau trục (post axis) (thừa ngón út). Dị tật của hệ thần kinh trung ương được gặp phổ biến, đôi khi có thể gặp tình trạng bất sản da đầu vùng chẩm sau. 90% trẻ này chết trong năm đầu sau sinh. Trẻ bị tật này nếu sống tới tuổi thiếu nhi thường bị chậm phát triển nặng.

4. Hội chứng Turner (45,X)

4.1. Nguyên nhân và tần số

Tần số xuất hiện hội chứng này là 1/5000 trong số trẻ gái sinh sống nhưng tần số thể đơn nhiễm X trong thai kỳ chiếm tới 4% nghĩa là có trên 99% thai mang thể đơn nhiễm X đã bị sảy thai ngẫu nhiên.

Bất thường NST ở những người mắc hội chứng Turner khá đa dạng. Khoảng 50% bệnh nhân có karyotype 45,X khi đánh giá trên tế bào lympho ở máu ngoại vi. Khoảng từ 30% đến 40% ở dưới dạng khảm, phổ biến là 46,XX/45,X, dạng 46,XY/45,X ít gặp hơn (khoảng 5%). Khoảng 10% đến 20% bệnh nhân có bất thường NST X như mất đoạn một phần hoặc toàn bộ nhánh ngắn của NST X. Sự đa dạng này giải thích sự khác biệt rất lớn trong biểu hiện kiểu hình của những người mắc hội chứng này.



Hình 6: Người nữ với hội chứng Turner

4.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 6)

Người mắc hội chứng này chỉ có 1 NST giới X trong karyotype, kiểu hình là nữ với các biểu hiện đặc trưng sau: (1) lùn cân đối; (2) nữ hóa về giới tính và loạn sản buồng trứng; (3) mang một số các dị tật lớn hoặc nhỏ. Bệnh nhân có khuôn mặt hình tam giác, lỗ tai ngoài quay về phía sau, cổ rộng và có “màng”, ngực rộng và có hình khiên. Có thể quan sát thấy tình trạng phù bạch mạch ở bàn tay và bàn chân của trẻ mắc hội chứng này sau sinh. Nhiều bệnh nhân bị bệnh tim bẩm sinh. Người mắc hội chứng này không bị chậm phát triển trí tuệ và hầu hết đều vô sinh.

5. Hội chứng Klinefelter

5.1. Nguyên nhân và tỷ lệ

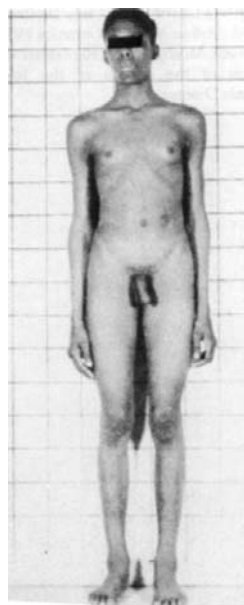
Hội chứng được gặp với tần số 1/1000 trẻ sơ sinh nam, 50% trường hợp Klinefelter có NST X thừa xuất phát từ mẹ và có sự gia tăng tỉ lệ theo tuổi mẹ. Dạng khảm được thấy trong khoảng 15% trường hợp. Mặc dù

biểu hiện kiểu hình tương đối nhẹ nhưng người ta ước tính có tối thiểu 50% số thai mang karyotype 47,XXY bị sảy ngẫu nhiên.

5.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 7)

Người nam mắc hội chứng này có xu hướng cao trên trung bình, tay và chân dài không cân đối với cơ thể. Khám lâm sàng bệnh nhân sau tuổi dậy thì cho thấy tinh hoàn nhỏ và hầu hết đều bị vô sinh do teo các ống sinh tinh. Biểu hiện vú lớn (gynecomasty) được thấy trên khoảng một phần ba bệnh nhân. Mặc dù người nam mắc hội chứng Klinefelter thường không bị chậm phát triển trí tuệ nhưng cũng có biểu hiện khó khăn về học và có trí thông minh dưới mức trung bình.

Do biểu hiện của hội chứng không rõ ràng nên phần lớn bệnh nhân được chẩn đoán muộn, thường là sau tuổi dậy thì và đôi khi bệnh nhân đến khám với lý do vô sinh.



Hình 7: Người nam với hội chứng Klinefelter

6. Thể tam nhiễm X (trisomy X)

6.1. Nguyên nhân và tỷ lệ

Karyotype 47,XXX được gặp với tỷ lệ 1/1000 người nữ. Đa số trường hợp thể tam nhiễm X xảy ra do sự không phân ly NST của mẹ và cũng có sự gia tăng tỉ lệ của hội chứng này với sự gia tăng tuổi mẹ.

6.2. Biểu hiện lâm sàng

Người nữ mang 3 NST X có biểu hiện khá nhẹ nhàng, rất hiếm khi gặp các bất thường của cơ thể. Những người này thường bị vô sinh, kinh nguyệt không đều hoặc chậm phát triển trí tuệ nhẹ nên rất khó phát hiện sớm và bệnh nhân thường đến khám vì lý do vô sinh.

7. Hội chứng 47,XXY

7.1. Nguyên nhân và tỷ lệ

Tỉ lệ người mắc hội chứng này trong quần thể bình thường là 1/1000 trong khi đó ở đối tượng là tù nhân nam trong một số nghiên cứu tỷ lệ này lên tới 1/30.

7.2. Biểu hiện lâm sàng

Người nam với karyotype 47,XXY có xu hướng cao trên trung bình, giảm chỉ số trí tuệ, có xu hướng hung bạo, đặc điểm này giải thích tại sao hội chứng này có tỷ lệ cao trong số tù nhân nam.

8. Hội chứng NST X dễ gãy và trường hợp chậm trí liên kết với NST giới tính X

8.1. Nguyên nhân và tần số



Hình 8: NST X gãy ở nhánh dài khi nuôi cấy tế bào máu ngoại vi trong điều kiện thiếu folat



Hình 9: Khuôn mặt người mắc hội chứng NST X dễ gãy, nhìn nghiêng và nhìn thẳng

Bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào máu ngoại vi trong điều kiện thiếu folat hoặc làm rối loạn quá trình chuyển hóa thymidine sẽ làm xuất hiện các chỗ gãy trên nhánh dài của NST X (Xq27.3) ở những người nam bị chậm trí liên kết với NST giới tính X do đó được gọi là hội chứng NST X dễ gãy (Fragile X syndrome) (hình 8). Hội chứng này được thấy với tỉ lệ khoảng 1/1250 ở người nam và 1/2000 ở người nữ, tỉ lệ này không có sự khác biệt theo chủng tộc. Với tỉ lệ này hội chứng NST X dễ gãy là dạng chậm trí di truyền được gặp phổ biến nhất ở người.

8.2. Biểu hiện lâm sàng (hình 9)

Người mắc hội chứng này có biểu hiện khuôn mặt bất thường với khuôn mặt hẹp và dài, trán vồ, hàm nhô, tai to và vểnh. Tình hoàn lớn (macroorchidism) được thấy trong khoảng 90% trường hợp sau tuổi dậy thì, tình trạng chậm trí thay đổi từ mức độ nhẹ đến trung bình. Người nữ mắc hội chứng này có biểu hiện chậm trí nhẹ.

V. Các chỉ định cho việc phân tích NST

Việc phân tích NST được chỉ định trong các trường hợp sau:

- Các trường hợp liên quan đến các bất thường NST đã biết hoặc có biểu hiện gợi ý mang bất thường NST.
- Các trường hợp có từ hai dị tật bẩm sinh chính trở lên đặc biệt là khi đi kèm với chậm phát triển tinh thần - vận động.

- Các bất thường liên quan đến biệt hóa giới tính, bất thường của cơ quan sinh dục.
- Các trường hợp chậm trí không rõ nguyên nhân.
- Các bệnh máu ác tính.
- Sảy thai liên tiếp.
- Bố mẹ và con cái của những người mang bất thường NST dạng chuyển đoạn, mất đoạn, lặp đoạn.
- Các trường hợp thai lưu với thai mang dị dạng hoặc thai chết lưu không rõ nguyên nhân.
- Những người nữ lùn và vô kinh nguyên phát.
- Những người nam có tinh hoàn nhỏ hoặc vú to đáng kể.
- Những người nam nghi ngờ mắc hội chứng NST X dễ gãy.

Chương 10

Di truyền đa yếu tố

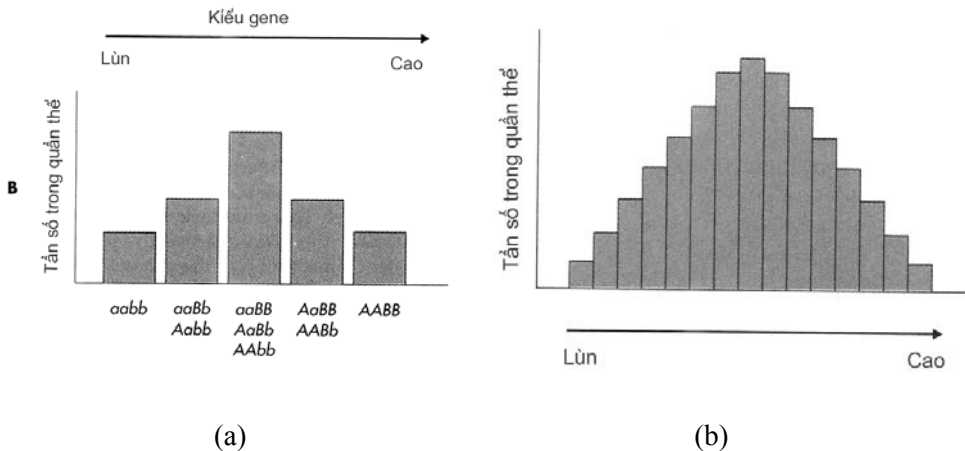
Di truyền đa yếu tố là kiểu di truyền trong đó tính trạng hoặc bệnh là kết quả của sự phối hợp phức tạp giữa các yếu tố di truyền và môi trường. Hầu hết các dị tật bẩm sinh như tật khe hở môi, hàm, các khuyết tật của ống thần kinh v.v... và rất nhiều bệnh phổ biến ở người trưởng thành như ung thư, bệnh tim mạch, tâm thần phân liệt, đái đường v.v... đều được di truyền theo kiểu này.

I. Các đặc tính của kiểu di truyền đa yếu tố

1. Kiểu di truyền cơ bản (*the basic model*)

Các gene riêng lẻ chỉ phối các tính trạng như tính trạng chiều cao trong trường hợp di truyền đa yếu tố cũng phân ly và tổ hợp theo kiểu Mendel trong quá trình di truyền, sự khác nhau cơ bản ở đây là chúng không tác động riêng rẽ mà phối hợp với nhau để cùng chi phối một thứ tính trạng.

Trong quần thể, kiểu di truyền này có kiểu phân bố hình chuông. Để dễ hiểu chúng ta hãy xét một ví dụ minh họa cho kiểu phân bố này bắt đầu bằng trường hợp đơn giản nhất.



Hình 1: Đồ thị mô tả sự phân bố chiều cao trong quần thể với sự chi phối của (a) 2 cặp gene và (b) nhiều cặp gene.

Giả sử chiều cao được quy định bởi 2 gene không allele A,a và B,b nằm trên 2 locus khác nhau. Trong quần thể khi đó sẽ có 9 kiểu tổ hợp gene với các tần số khác nhau: AABB, AAbb, aaBB, aabb, AaBB, AABb,

Aabb, aaBb và AaBb. Chúng sẽ cho 5 kiểu hình khác nhau trong quần thể ứng với số gene trội trong kiểu gene. Trên đồ thị có thể thấy sự phân bố như hình 1a.

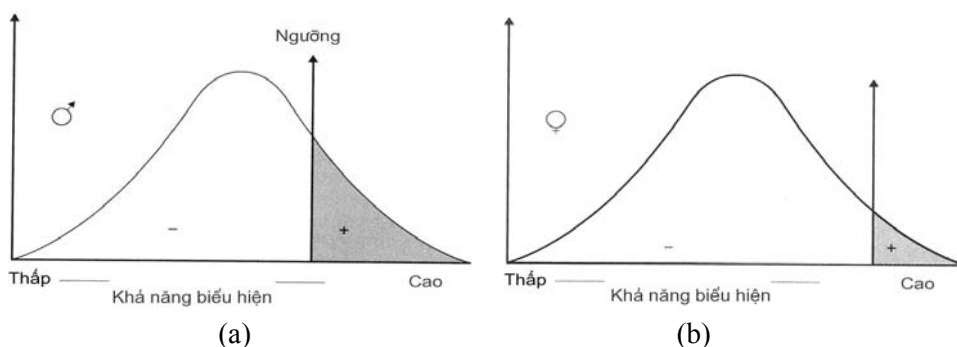
Trong trường hợp có nhiều gene và nhiều yếu tố môi trường cùng tham gia vào việc hình thành tính trạng chiều cao. Mỗi yếu tố sẽ đóng một vai trò nhỏ trong việc hình thành nên chiều cao của cá thể. Khi đó trong quần thể sẽ quan sát thấy rất nhiều kiểu hình khác nhau, giữa các kiểu hình chỉ có một sự khác biệt rất nhỏ làm cho đồ thị phân bố của tính trạng chiều cao có hình chuông (hình 1b).

2. Ngưỡng tác động (the threshold model)

Các bệnh di truyền đa yếu tố biểu hiện theo kiểu có hoặc không biểu hiện trên cá thể. Sự biểu hiện này của bệnh được giải thích dựa trên sự phân bố khả năng mắc (liability distribution) của bệnh này trong quần thể (hình 2 a và b). Những người ở phía thấp của phân bố sẽ có ít nguy cơ phát triển bệnh (nghĩa là có ít allele hoặc yếu tố môi trường gây bệnh). Trong khi đó những người ở phía cao của đồ thị sẽ có nhiều nguy cơ mắc bệnh hơn (do có nhiều gene và các yếu tố môi trường gây bệnh hơn).

Đối với các bệnh di truyền đa yếu tố, một bệnh muốn biểu hiện phải vượt qua được ngưỡng mắc bệnh (threshold of liability). Dưới ngưỡng này cá thể vẫn bình thường nhưng nếu trên ngưỡng này thì cá thể sẽ mắc bệnh.

Một ví dụ cho kiểu biểu hiện theo ngưỡng này là tật hẹp môn vị (pyloric stenosis) bẩm sinh, một bệnh gây ra do hẹp hoặc trít môn vị. Trẻ có biểu hiện lâm sàng nôn mửa, táo bón và giảm cân, bệnh đôi khi khởi tự nhiên nhưng đôi khi cần phải phẫu thuật



Hình 2: (a) Phân bố khả năng biểu hiện của một bệnh di truyền đa yếu tố trong quần thể đối với người nam và (b) Phân bố khả năng biểu hiện của một bệnh di truyền đa yếu tố trong quần thể đối với người nữ (trong tật hẹp môn vị bẩm sinh)

Tỷ lệ mắc của bệnh này khoảng 3/1000 trẻ sinh sống ở người da trắng, phổ biến ở nam hơn ở nữ (1/200 nam và 1/1000 nữ). Sự khác nhau

trong tỷ lệ mắc giữa hai giới phản ánh hai ngưỡng khác nhau trong sự phân bố khả năng mắc bệnh: thấp hơn ở nam và cao hơn ở nữ (hình 2 a và b). Ngưỡng thấp hơn ở người nam chứng tỏ rằng cần ít yếu tố gây bệnh (gene và môi trường) hơn để bệnh có thể biểu hiện được ở người nam và trái lại ngưỡng cao hơn ở người nữ chứng tỏ rằng muốn gây bệnh ở người nữ cần phải có sự tham gia của nhiều yếu tố gây bệnh hơn so với người nam.

II. Nguy cơ tái phát

Trong khi nguy cơ tái phát có thể được đưa ra một cách chắc chắn đối với các bệnh di truyền đơn gene thì đối với bệnh di truyền đa yếu tố việc đưa ra nguy cơ tái phát thường khó khăn hơn rất nhiều. Nguyên nhân là do không biết rõ (1) số lượng gene đã đóng góp vào quá trình gây bệnh; (2) cấu trúc kiểu gene chính xác của bố mẹ và (3) phạm vi tác động của các yếu tố môi trường.

Đối với hầu hết các bệnh di truyền đa yếu tố, nguy cơ tái phát được đưa ra dựa trên việc quan sát trực tiếp các dữ kiện liên quan đến sự xuất hiện của bệnh đã thu thập được trên một số lượng lớn gia đình có người mắc bệnh vì vậy nó được gọi là nguy cơ kinh nghiệm (empiric risk).

Ví dụ: ở Anh qua nghiên cứu cho thấy có khoảng 5% anh chị em ruột của người mắc tật của ống thần kinh có nguy cơ mắc bệnh. Như vậy một cặp bố mẹ người Anh nếu đã có một đứa con mắc tật của ống thần kinh thì nguy cơ tái phát sẽ là 5%.

Vì các yếu tố nguy cơ thay đổi giữa các loại bệnh khác nhau nên nguy cơ kinh nghiệm cũng mang tính đặc hiệu cho từng loại bệnh thuộc nhóm di truyền đa yếu tố và có thể thay đổi đáng kể từ quần thể này sang quần thể khác. Điều này xảy ra do tần số của các gene cũng như các yếu tố môi trường có thể khác nhau giữa các quần thể.

Ví dụ: nguy cơ tái phát của các khuyết tật của ống thần kinh ở Bắc Mỹ khoảng từ 2 - 3%, thấp hơn so với ở Anh (5%).

Đôi khi cũng khó phân biệt giữa các bệnh di truyền đa gene (polygenic) hay bệnh di truyền đa yếu tố với các bệnh di truyền đơn gene có độ thâm thấp hoặc có biểu hiện đa dạng. Để có thể phân biệt phải cần một lượng lớn thông tin và các số liệu đáng tin cậy về mặt dịch tễ.

Các điều kiện dưới đây được sử dụng để đánh giá mức nguy cơ tái phát của các bệnh di truyền đa yếu tố :

(1) Nguy cơ tái phát sẽ cao hơn nếu có trên một thành viên trong gia đình mắc bệnh.

Ví dụ: Nguy cơ tái phát ở anh chị em ruột trong một gia đình đã có

một anh chị em mắc khuyết tật của vách tâm thất (ventricular septal defect) là 3%. Tỷ lệ này sẽ gia tăng lên khoảng 10% nếu trong gia đình đã có 2 anh chị em bị tật này.

(2) Nếu bệnh có biểu hiện bệnh càng nặng thì nguy cơ tái phát càng cao.

Ví dụ: Người mắc tật khe hở môi hai bên sẽ có nguy cơ tái phát ở người thân cao hơn so với người chỉ bị khe hở môi một bên.

(3) Nguy cơ tái phát sẽ cao hơn nếu giới tính của người mắc bệnh thuộc về giới có tỷ lệ mắc bệnh thấp hơn.

(4) Nguy cơ tái phát của bệnh thường giảm dần theo khoảng cách giữa những người có quan hệ họ hàng

(5) Nếu tỷ lệ mắc của bệnh trong một quần thể là f thì nguy cơ cho con và anh chị em của người mắc bệnh sẽ xấp xỉ căn bậc hai của f . Đây không phải là một quy luật tuyệt đối cho các tính trạng di truyền đa yếu tố, nhưng nhiều bệnh cho thấy có xu hướng tuân theo dự báo này.

III. Vai trò của gene và môi trường

Mặc dù có một số tính trạng chỉ chịu ảnh hưởng của gene hoặc chỉ chịu ảnh hưởng của môi trường nhưng hầu hết đều chịu ảnh hưởng của cả hai yếu tố này. Việc xác định mức độ ảnh hưởng tương đối của các yếu tố môi trường và di truyền lên sự hình thành tính trạng sẽ giúp hiểu biết tốt hơn về bệnh căn cũng như giúp xây dựng các chiến lược y tế cộng đồng.

Có hai hướng nghiên cứu thường được dùng để đánh giá mức độ ảnh hưởng tương đối của các gene và môi trường là (1) nghiên cứu con sinh đôi (twin research) và (2) nghiên cứu con nuôi (adoption study).

1. Nghiên cứu con sinh đôi

Do sinh đôi cùng trứng có sự tương đồng về mặt di truyền, bất kỳ sự khác nhau nào giữa chúng đều chỉ có thể do kết quả tác động của môi trường. Các trẻ sinh đôi cùng trứng rất giống nhau về các tính trạng chỉ do gene quy định. Các trẻ sinh đôi khác trứng trở thành một mẫu chứng phù hợp cho nghiên cứu vì sự khác nhau về các yếu tố môi trường sẽ tương tự như trong trường hợp sinh đôi cùng trứng nhưng chúng lại có sự khác nhau về mặt di truyền tương tự như trong các anh chị em ruột.

Trong nghiên cứu con sinh đôi, việc so sánh giữa các trẻ sinh đôi cùng trứng và khác trứng sẽ được thực hiện. Nếu cả hai trẻ sinh đôi đều có cùng chung một tính trạng hoặc bệnh (ví dụ như đều mắc tật khe hở môi) chúng ta gọi đó là có tương hợp (concordant) còn nếu hai trẻ không có cùng biểu hiện chúng ta gọi đó là không tương hợp (disconcordant).

Tỷ lệ tương hợp (hoặc hệ số tương quan) ở các cặp sinh đôi cùng trứng và khác trứng cũng có thể được dùng để đo khả năng di truyền (heritability: h) của các tính trạng di truyền đa yếu tố. Một công thức đơn giản dùng để đánh giá khả năng di truyền h từ tỷ lệ tương hợp là :

$$h = 2(CMZ - CDZ)$$

Trong đó:

- CMZ: tỷ lệ tương hợp ở các trẻ sinh đôi cùng trứng
- CDZ: tỷ lệ tương hợp ở các trẻ sinh đôi khác trứng

Các tính trạng được quy định chủ yếu bởi yếu tố di truyền sẽ có h xấp xỉ bằng 1,0, nghĩa là $CMZ = 1,0$ và $CDZ = 0,5$. Khi sự khác biệt giữa các tỷ lệ tương hợp bé hơn, khả năng di truyền sẽ tiến tới bằng 0,0.

Tỷ lệ tương hợp (hoặc hệ số tương quan) của một số tính trạng hoặc bệnh được trình bày trong bảng 1. Giá trị h có tính đặc hiệu cho từng quần thể mà trong đó chúng được đánh giá.

Bảng 1: Tỷ lệ tương hợp của một số tính trạng hoặc bệnh
(CT: cùng trứng; KT: khác trứng; h : khả năng di truyền)

Tính trạng hoặc bệnh	Tỷ lệ tương hợp		h
	Sinh đôi CT	Sinh đôi KT	
Bệnh tự kỷ	0,92	0,0	>1,0
Chứng nghiện rượu	>0,6	<0,3	0,6
Khe hở môi / hàm	0,38	0,08	0,6
Tật chân khoèo	0,32	0,03	0,58
Nếp vân da (số đếm vân ngón tay)	0,95	0,49	0,92
Đái đường thể tùy (type I)	0,35 - 0,5	0,05 - 0,10	0,6 - 0,8
Đái đường thể tùy (type II)	0,7 - 0,9	0,25 - 0,4	0,9 - 1,0
Động kinh	0,69	0,14	>1,0
Chiều cao	0,94	0,44	1,0
Bệnh sỏi	0,95	0,87	0,16
Tâm thần phân liệt	0,47	0,12	0,7
Tật nứt gai đốt sống	0,72	0,33	0,78

Các cặp sinh đôi cùng trứng thường có điều kiện sống tương tự nhau hơn so với ở các cặp sinh đôi khác trứng, điều này làm cho các cặp sinh đôi cùng trứng thường có độ tương hợp cao hơn đối với một tính trạng nào đó và do đó làm thổi phồng lên thêm ảnh hưởng của các yếu tố di truyền. Để có thể giải quyết phần nào hạn chế này người ta tiến hành nghiên cứu các cặp sinh đôi cùng trứng nhưng lớn lên trong những môi trường khác nhau, khi đó sự tương hợp giữa các cặp sẽ do các yếu tố di truyền chi phối nhiều hơn so với yếu tố môi trường. Tuy nhiên trong thực tế cũng khó tìm được nhiều cặp sinh đôi như vậy.

2. Nghiên cứu con nuôi (*Adoption Study*)

Các nghiên cứu về con nuôi cũng được sử dụng để đánh giá đóng góp của các yếu tố di truyền trong các trường hợp di truyền đa yếu tố. Các trẻ con của các bố mẹ do mắc bệnh nên được những bố mẹ không mắc bệnh nhận làm con nuôi sẽ được nghiên cứu để xem chúng có phát triển bệnh hay không. Trong một vài trường hợp những trẻ này có xu hướng mắc bệnh nhiều hơn nhóm chứng (nhóm các trẻ sinh bởi các bố mẹ không mắc bệnh được cho làm con nuôi). Điều này cung cấp một số bằng chứng cho thấy vai trò của gene trong nguyên nhân gây bệnh mặc dù chúng không chia sẻ chung môi trường sống với bố mẹ ruột mắc bệnh. Khoảng 8% đến 10% trẻ, con của các bố hoặc mẹ bị tâm thần phân liệt được cho làm con nuôi phát triển bệnh trong khi đó chỉ có 1% trẻ con của các bố mẹ không mắc bệnh được cho làm con nuôi bị mắc bệnh này.

Khi phân giải kết quả nghiên cứu con nuôi cũng cần phải thận trọng với những vấn đề sau:

- (1) Ảnh hưởng của môi trường ở giai đoạn trước sinh cũng có thể có hậu quả lâu dài lên trẻ con nuôi.
- (2) Đôi khi trẻ được nhận làm con nuôi sau khi đã nhiều tuổi, như vậy có nghĩa là trẻ cũng đã chịu một số ảnh hưởng nhất định của các yếu tố môi trường giống như bố mẹ ruột.
- (3) Đôi khi các trung tâm chịu trách nhiệm cho việc nhận con nuôi thường tìm các cặp bố mẹ nuôi có các điều kiện gần giống với bố mẹ ruột của trẻ.

Tất cả những vấn đề trên đều có thể làm phóng đại ảnh hưởng của sự di truyền lên tính trạng hoặc bệnh.

Tuy nhiên cả hai phương pháp nghiên cứu trên đều không cung cấp những biện pháp hữu hiệu để đánh giá, đo lường vai trò của các gene trong các bệnh di truyền đa yếu tố cũng như không giúp xác định các gene đặc hiệu gây bệnh. Thay vào đó chúng chỉ giúp nhận định vai trò của các yếu tố di truyền đối với một bệnh di truyền đa yếu tố.

Chương 11

Di truyền học quần thể

Di truyền học quần thể (population genetics) nghiên cứu sự phân bố của các gene trong quần thể cũng như sự duy trì và thay đổi tần số của các gene và kiểu gen qua các thế hệ. Di truyền học quần thể không những liên quan đến những yếu tố di truyền như đột biến, sinh sản mà còn liên quan đến những yếu tố xã hội và môi trường như sự chọn lọc, tình trạng di dân và đương nhiên liên quan đến việc nghiên cứu tần số và sự phân bố các bệnh di truyền trong gia đình và trong cộng đồng.

I. Tính đa dạng di truyền trong quần thể loài người

Trái đất với trên 6 tỷ con người được phân thành những chủng tộc khác nhau, những quần thể dân cư khác nhau. Mặc dù tất cả đều mang bộ nhiễm sắc thể giống nhau, sự phân bố của các gene trên NST cũng như nhau nhưng bản chất của các allele và tần số của các allele tại mỗi vị trí của gene trên NST là rất khác nhau giữa các dân tộc, các chủng tộc.

Sự chọn lọc của các đột biến có lợi dưới tác động của môi trường, cơ hội sống sót của các cá thể mang các đột biến có hại, các đột biến trung tính cùng với sự cách ly sinh sản giữa các nhóm tạo nên sự khác biệt di truyền rất lớn giữa các quần thể.

II. Cách xác định tần số của các allele trong quần thể

Nếu chúng ta có thể biết được kiểu gen thật sự của mỗi cá thể trong một gia đình đang cần tư vấn di truyền, chắc chắn chúng ta có thể thông báo cho họ về nguy cơ tái phát của bệnh đó với độ chính xác cao. Tuy nhiên trong thực tế nhiều trường hợp chỉ có kiểu hình của bệnh là cái duy nhất mà chúng ta có thể quan sát và đánh giá. Do đó tỷ lệ của một bệnh lý di truyền hoặc một đặc điểm di truyền thường được sử dụng để xác định tần số của một kiểu gen đặc hiệu rồi qua đó suy ra tần số của các allele đặc hiệu chịu trách nhiệm cho các kiểu gen khác nhau.

Dưới đây là ví dụ về một đặc điểm được chi phối bởi một cặp allele nằm trên NST thường minh họa cho cách thức xác định tần số của các allele trong quần thể.

Gen *CCR5* chịu trách nhiệm mã hóa cho một receptor cytokin trên bề mặt tế bào, receptor này đóng vai trò như một điểm vào của các chủng virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS). Một đột biến mất 32 cặp nucleotide trong gen *CCR5* làm xuất hiện allele $\Delta CCR5$

mã hóa cho một protein không có chức năng do đã bị thay đổi trong cấu trúc và bị chấm dứt sớm việc tổng hợp.

Những người đồng hợp tử về allele $\Delta CCR5$ ($\Delta CCR5/\Delta CCR5$) sẽ không có loại receptor cytokin trên bề mặt tế bào và tạo nên khả năng đề kháng với HIV. Việc mất chức năng của gene $CCR5$ là một đặc điểm lành tính và được xác định dựa trên khả năng đề kháng với HIV. Allele bình thường và allele đột biến mất 32 cặp base $\Delta CCR5$ được phân biệt một cách dễ dàng qua phân tích gene bằng kỹ thuật PCR. Một mẫu nghiên cứu trên 788 người Âu châu đã cung cấp số lượng thông tin đầy đủ về số cá thể đồng hợp hoặc dị hợp của 2 allele nói trên

Bảng 1: Tần số gene và kiểu gene của allele bình thường $CCR5$ và allele đột biến $\Delta CCR5$

Kiểu gene	Số người	Tần số tương đối của các kiểu gene	Allele	Tần số của các allele
$CCR5/CCR5$	647	0,821		
$CCR5/\Delta CCR5$	134	0,1682	$CCR5$	0,906
$\Delta CCR5/\Delta CCR5$	7	0,0108	$\Delta CCR5$	0,094
Tổng	788	1,000		1,000

Dữ kiện của Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC và cộng sự (1997): *Global distribution of the CCR5 gene 32 basepair deletion*. *Nat Genet* 16:100-103

Trên cơ sở tần số kiểu gen quan sát được chúng ta có thể trực tiếp xác định tần số của các allele một cách đơn giản thông qua việc đếm các allele. Khi chúng ta tính toán tần số trong quần thể của một allele, chúng ta sẽ xem vốn gen (gene pool) như là một tập hợp tất cả các allele ở một locus đặc hiệu trong toàn bộ quần thể. Đối với các locus trên NST thường, kích cỡ của vốn gene ở một locus sẽ gấp đôi số cá thể trong quần thể vì mỗi kiểu gen trên NST thường sẽ gồm có hai allele, nghĩa là người có kiểu gene $\Delta CCR5/\Delta CCR5$ sẽ có 2 allele $\Delta CCR5$, và người có kiểu gen $CCR5/\Delta CCR5$ sẽ có 1 allele $CCR5$ và 1 allele $\Delta CCR5$.

Trong ví dụ này tần số của các allele $CCR5$ sẽ là:

$$(2 \times 647 + 1 \times 134) / 788 \times 2 = 0,906$$

Tương tự, người ta có thể tính toán được tần số của allele $\Delta CCR5$ là 0,094, hoặc bằng cách tính trực tiếp từ số cá thể:

$(2 \times 7 + 1 \times 134) = 148$ trong tổng số 1576 allele, hoặc đơn giản là lấy 1 trừ cho tần số của allele $CCR5$: $1 - 0,906 = 0,094$.

III. Định luật Hardy - Weinberg

Một câu hỏi được đặt ra là làm thế nào để có thể tính được tần số của các kiểu gene khác nhau trong quần thể khi biết được tần số của các allele? Làm thế nào để có thể tính được tần số của các allele, tần số của các kiểu gene đồng hợp và dị hợp khi chỉ có thể biết được tỷ lệ của một kiểu hình hoặc một bệnh di truyền trong quần thể ?

Định luật Hardy-Weinberg, được nhà toán học Geoffrey Hardy (Anh) và bác sĩ Wilhelm Weinberg (Đức) đồng thời phát hiện năm 1908, cho phép đánh giá tần số của các kiểu gene từ tần số của các allele qua một công thức toán học đơn giản nếu quần thể thỏa mãn một số điều kiện nhất định và đây là định luật đặt nền tảng cho di truyền học quần thể.

Định luật Hardy-Weinberg gồm 2 tính chất quan trọng:

(1) Giả sử gọi p là tần số của allele A , q là tần số của allele a và các allele kết hợp với nhau một cách ngẫu nhiên trong quần thể thì tần số của các kiểu gene AA , Aa , aa được thể hiện qua nhị thức:

$$p^2 + q^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Bảng 2: Tần số của các kiểu kết hôn và tần số các kiểu gene ở thế hệ sau theo định luật Hardy-Weinberg.

Kiểu kết hôn			Con		
Bố	Mẹ	Tần số	AA	Aa	aa
AA	AA	$p^2 \times p^2 = p^4$	$1(p^4)$		
AA	Aa	$p^2 \times 2pq = 2p^3q$	$1/2(2p^3q)$	$1/2(2p^3q)$	
Aa	AA	$2pq \times p^2 = 2p^3q$	$1/2(2p^3q)$	$1/2(2p^3q)$	
AA	aa	$p^2 \times q^2 = p^2q^2$		$1(p^2q^2)$	
aa	AA	$q^2 \times p^2 = p^2q^2$		$1(p^2q^2)$	
Aa	Aa	$2pq \times 2pq = 4p^2q^2$	$1/4(4p^2q^2)$	$1/2(4p^2q^2)$	$1/4(4p^2q^2)$
Aa	aa	$2pq \times q^2 = 2pq^3$		$1/2(2pq^3)$	$1/2(2pq^3)$
aa	Aa	$q^2 \times 2pq = 2pq^3$		$1/2(2pq^3)$	$1/2(2pq^3)$
aa	aa	$q^2 \times q^2 = q^4$			$1(q^4)$
Tổng			p^2	$2pq$	q^2

(2) Tần số của các kiểu gen sẽ không đổi qua các thế hệ miễn là tần số của các allele không đổi. Nghĩa là nếu tần số của các kiểu gene AA , Aa

và aa phân bố trong quần thể theo tỷ lệ $p^2 : 2pq : q^2$ thì tần số này ở các thế hệ sau cũng sẽ là $p^2 : 2pq : q^2$. Trạng thái này được gọi là trạng thái cân bằng của quần thể (Bảng 2).

Trong ví dụ về gene *CCR5* và *ΔCCR5* nói trên với tần số của allele *CCR5* là 0,906 và *ΔCCR5* là 0,094 thì theo định luật Hardy-Weinberg tần số tương đối của các tổ hợp allele sẽ là:

$$CCR5/CCR5: p^2 = 0,906 \times 0,906 = 0,821$$

$$CCR5/\Delta CCR5: 2pq = 2 \times 0,906 \times 0,094 = 0,170$$

$$\Delta CCR5/\Delta CCR5: q^2 = 0,094 \times 0,094 = 0,009$$

Sự phân bố này cũng tương tự với tần số thực tế (647 : 134 : 7). Như vậy chúng ta thấy định luật Hardy - Weinberg là một nhị thức với hai allele của một gene, trong đó $p + q = 1$ và $n = 2$ (n là số allele). Trong trường hợp gene nằm trên NST giới tính X thì tần số của các kiểu gene của người nữ (có 2 NST X) và người nam (có 1 NST X) sẽ được tính riêng (Bảng 3)

Nếu một gene có tới 3 allele ($n = 3$) : p, q và r thì sự phân bố tần số của các allele sẽ tuân theo công thức: $(p + q + r)^2$. Nói chung với n allele ($p_1, p_2, p_3 \dots p_n$) thì công thức sẽ là $(p_1 + p_2 + p_3 + \dots p_n)^2$.

1. Ứng dụng của định luật Hardy-Weinberg

Ứng dụng chính của định luật Hardy-Weinberg trong di truyền y học là tư vấn di truyền cho các bệnh di truyền gene lặn NST thường.

Ví dụ trong bệnh Phenylketonuria (PKU), tần số của người mắc bệnh ở trạng thái đồng hợp sẽ được xác định chính xác trong quần thể qua chương trình sàng lọc trên trẻ sơ sinh ở Ireland là 1/4.500, định luật Hardy-Weinberg cho phép xác định tần số của những người dị hợp tử có biểu hiện hoàn toàn bình thường:

$$\text{vì } q^2 = 1/4500 \text{ nên } q = 0,015$$

$$(p = 1 - 0,015 = 0,985 \text{ do đó } 2pq = 0,029 \approx 0,03).$$

Như vậy tần số của người dị hợp tử mang gene bệnh PKU ở quần thể người Ireland là khoảng 3%, nghĩa là nguy cơ để một người bố hoặc mẹ mang gene bệnh trong một hôn nhân sẽ là khoảng 3%.

2. Tần số gene và kiểu gene trong trường hợp gene liên kết với NST giới tính X

Đối với gene nằm trên NST giới tính X thì ở người nữ sẽ có 3 kiểu gene khác nhau trong khi đó ở người nam chỉ có 2 kiểu gene do NST Y không mang gene do đó việc áp dụng định luật Hardy - Weinberg có chút thay đổi. Lấy bệnh mù màu làm ví dụ với allele đột biến được kí hiệu là x^b

và allele bình thường được kí hiệu là (+). Tần số của các kiểu gene được trình bày trong bảng 3.

Qua bảng 3 có thể nhận thấy tần số mắc bệnh mù màu ở người nữ thấp hơn nhiều so với người nam, mặc dù tần số allele là như nhau ở cả hai giới. Chưa tới 1% người nữ mắc bệnh mù màu nhưng tần số này ở người nam là 8%. Tần số người nữ dị hợp mang gene bệnh là 15% những người này sẽ có nguy cơ sinh ra con trai mắc bệnh mù màu.

Bảng 3: Tần số gene và kiểu gen trong trường hợp bệnh mù màu, di truyền liên kết với NST giới tính X.

Giới	Kiểu gene	Kiểu hình	Tần số
Nam	X^+	bình thường	$p = 0,92$
	X^{cb}	Mù màu	$q = 0,08$
Nữ	X^+/X^+	Bình thường (đồng hợp)	$p^2 = (0,92)^2 = 0,8464$
	X^+/X^{cb}	Bình thường (dị hợp)	$2pq = 2.(0,92).(0,08) = 0,1472$
		Bình thường (tổng cộng)	$p^2 + 2pq = 0,9936$
	X^{cb}/X^{cb}	Mù màu	$q^2 = (0,08)^2 = 0,0064$

IV. Các yếu tố ảnh hưởng đến trạng thái cân bằng của định luật Hardy - Weiberg

1. Điều kiện nghiệm đúng cho định luật Hardy - Weinberg

- Quần thể phải lớn và sự kết hôn xảy ra một cách ngẫu nhiên
- Tần số của các allele được duy trì không đổi qua các thế hệ nghĩa là: (1) không xảy ra đột biến làm xuất hiện allele mới; (2) mọi cá thể đều có cơ hội như nhau trong kết hôn và sinh sản, nghĩa là tác động của chọn lọc xem như là đồng đều với mọi kiểu gen; (3) không xảy tình trạng nhập cư đáng kể từ những quần thể có vốn gene hoàn toàn khác.

2. Các yếu tố ảnh hưởng

Trong thực tế có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tần số của các allele trong quần thể.

- Sự khác biệt về chủng tộc trong một quần thể sẽ ảnh hưởng nhiều đến các quyết định tình trạng hôn nhân. Tình trạng kết hôn đồng huyết và sự lựa chọn bạn đời phù hợp cũng là những yếu tố làm cho sự kết hôn không thể diễn ra một cách ngẫu nhiên.
- Dưới tác động của chọn lọc, đột biến, sự di dân cũng sẽ làm ảnh hưởng ít nhiều đến định luật Hardy-Weinberg mặc dù xảy ra chậm.

- Sự phiêu bạt di truyền (genetic drift): Sự phiêu bạt di truyền dẫn đến sự thay đổi ngẫu nhiên tần số của các allele trong một quần thể nhỏ. Khi xảy ra một đột biến mới trong một quần thể nhỏ, ban đầu có thể chỉ ở một cá thể trong quần thể. Những yếu tố ngẫu nhiên không liên quan đến tình trạng mang gene đột biến có thể làm gia tăng khả năng sống, khả năng sinh sản của người mang đột biến và nhanh chóng làm gia tăng tần số allele đột biến này trong quần thể đó qua các thế hệ. Trong khi đó trong một quần thể lớn thì các yếu tố đó không ảnh hưởng nhiều đến tần số của các allele trong quần thể.

Hiện tượng tương tự cũng xảy ra khi một nhóm cá thể tách ra khỏi quần thể lớn hơn. Khi đó tần số của các allele trong quần thể mới này khác biệt ít nhiều so với tần số allele ở quần thể gốc. Sau khi trải qua vài thế hệ mặc dù kích thước của quần thể cũng chưa lớn nhưng sự khác biệt về tần số allele sẽ trở nên đáng kể. Nếu một trong số các cá thể trong nhóm cá thể tách ra đó mang một allele hiếm thì về sau tần số của allele này sẽ cao hơn trong quần thể mới so với tần số của allele đó trong quần thể cũ.

- Dòng chảy của gene (gene flow): Ngược với hiện tượng phiêu bạt di truyền, hiện tượng dòng chảy của gene là sự phát tán chậm chạp của gene qua biên giới (chữ biên giới được hiểu theo nghĩa rộng không chỉ là biên giới về địa lý mà có thể là sự cản trở trong sinh sản vì lý do chủng tộc, tôn giáo, văn hoá ...), một quá trình ảnh hưởng đến cả một quần thể lớn và làm thay đổi dần tần số của các allele. Các gene của quần thể nhập cư với những đặc trưng riêng của nó dần dần được đưa vào vốn gene của quần thể tiếp nhận và làm thay đổi tần số của các allele trong quần thể này.

Chương 12

Lập bản đồ gene

Việc lập bản đồ gene là một bước quan trọng trong việc tìm hiểu, chẩn đoán và điều trị các bệnh di truyền. Hiện nay đã có trên 14.000 gene trong số khoảng từ 30.000 đến 40.000 gene trong genome của người đã được xác định vị trí trên nhiễm sắc thể và chỉ khoảng 1.500 bệnh do đột biến gene đã xác định được đột biến trên các gene đặc hiệu. Như vậy rõ ràng là vẫn còn rất nhiều việc phải làm để tìm hiểu các biến đổi xảy ra trên gene làm gây ra những bệnh di truyền.

Có hai cách lập bản đồ gene chính: (1) Lập bản đồ di truyền (genetic mapping) là phương pháp trong đó tần số hoán vị giữa các locus trên NST qua giảm phân được sử dụng để đánh giá khoảng cách giữa các locus và (2) lập bản đồ vật lý (physical mapping) liên quan tới việc sử dụng các kỹ thuật phân tử và di truyền tế bào để xác định vị trí vật lý của các gene trên NST.

I. Lập bản đồ di truyền (genetic mapping)

1. Hiện tượng trao đổi chéo (crossing over) giữa các gen liên kết

Trong giảm phân giữa các NST tương đồng đôi khi xảy ra sự trao đổi các đoạn DNA trong kỳ đầu của lần phân bào I gọi là trao đổi chéo. Một NST có kích thước trung bình sẽ có từ 1 đến 2, 3 vị trí trao đổi chéo trong giảm phân qua đó có thể làm xảy ra sự tái kết hợp của các allele trên cặp NST tương đồng.

2. Tần số hoán vị

Sự trao đổi chéo xảy ra giữa các locus nằm xa nhau trên 1 NST nhiều hơn giữa các locus nằm cạnh nhau (hình 2). Như vậy khoảng cách giữa 2 locus có thể được tính toán được bằng cách đánh giá tần số tái tổ hợp xảy ra trong các gia đình (hiện tượng hoán vị gene). Nếu trong một số lượng lớn các lần giảm phân được nghiên cứu trên các gia đình, các allele A và B đã trải qua tái tổ hợp 5% lần thì tần số hoán vị giữa A và B sẽ là 5% (0,05).

Khoảng cách di truyền giữa 2 locus được đo bằng đơn vị centiMorgan (cM) để tưởng nhớ tới Morgan, người đã phát hiện ra hiện tượng bất chéo của các NST vào năm 1910. Một cM tương đương với 1% tần số hoán vị, mỗi 1cM tương ứng với khoảng độ 1 triệu bp (1Mb). Nếu 2 locus liên kết cách nhau 50cM thì được coi như là không liên kết, vì trong trường hợp này tần số hoán vị của chúng bằng với khi chúng di truyền

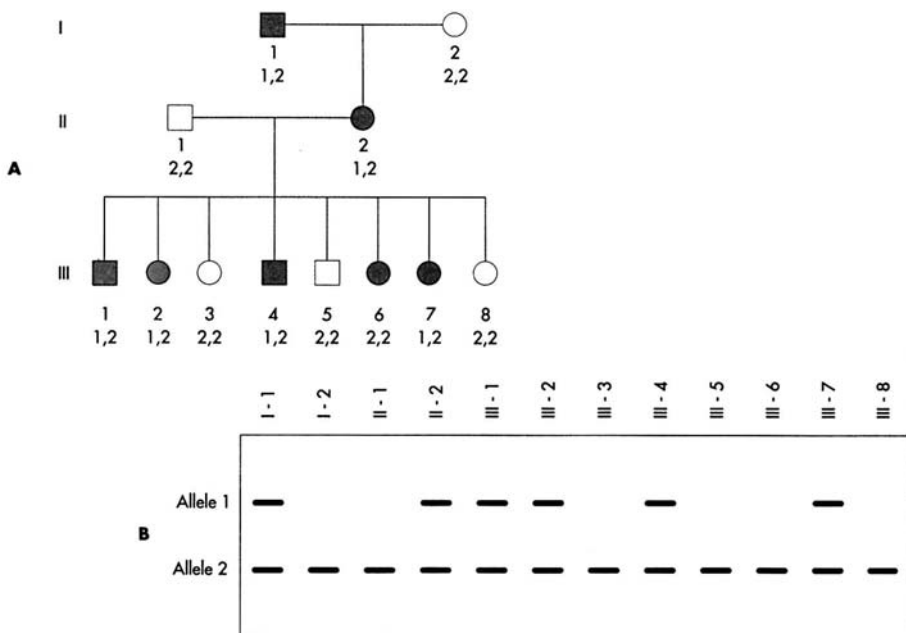
phân ly độc lập với nhau.

3. Cách tính tần số hoán vị

Tần số hoán vị được đánh giá thông qua việc khảo sát sự di truyền các gene trong phả hệ.

Hình 1 là một phả hệ của bệnh u xơ thần kinh type 1 (NF1) trong đó các thành viên được phân loại theo một RFLP có hai allele gọi là *IF10* (ký hiệu là 1 và 2), RFLP này cùng nằm trên NST 17 với gene *NF1*. Kiểu gene *IF10* được ghi ở phía dưới mỗi cá thể trong phả hệ.

Khảo sát thế hệ thứ nhất và thế hệ thứ hai cho thấy gene *NF1* phải liên kết với allele 1 của *IF10* trên cùng 1 NST trong gia đình này, vì cá thể I-2 đồng hợp tử về allele 2 (2,2) không mắc bệnh. Người bố mắc bệnh (I-1) dị hợp tử ở locus *IF10* (1,2) đã truyền một NST chứa cả allele bệnh và allele 1 của *IF10* cho con gái (II-2).



Hình 1: A, Một phả hệ của bệnh NF1 trong đó mỗi thành viên được phân loại dựa trên tính đa hình của *IF10*. Kiểu gene của locus marker gồm 2 allele này được ghi dưới mỗi cá thể trong phả hệ. Các thành viên trong phả hệ bị mắc bệnh được bôi đen. B, Hình phóng xạ tự chụp của các allele của marker *IF10* trong phả hệ này.

Sự sắp xếp của các allele này trên mỗi NST được gọi là phase liên kết (linkage phase). Khi đã biết về phase liên kết rồi thì kiểu gene của cô

con gái II-2 khi đó sẽ là $N1/n2$ (với N là allele gây bệnh NF1 và n là allele bình thường). Chồng của cô này (II- 1) không mắc bệnh và đồng hợp tử về allele 2 ở locus *IF10* (2,2) do đó có kiểu gene là $n2/n2$. Những đứa con của cuộc hôn nhân này (thế hệ III) nếu mắc bệnh NF1 thì sẽ mang allele bệnh N đi cùng với allele 1 của locus *IF10* trong khi đó những đứa trẻ không mang bệnh sẽ mang allele 2 của locus *IF10* đi cùng với allele lành n . 7 trong 8 đứa trẻ của thế hệ thứ ba cho thấy điều này hoàn toàn đúng.

Tuy nhiên đã có một trường hợp xảy ra hiện tượng tái kết hợp (người III-6). Điều này cho thấy một tần số hoán vị $1/8$ hay 12,5%. Tần số này giữa các locus không allele đã hỗ trợ cho giả thuyết về sự liên kết giữa locus *NF1* và *IF10*. Nếu ở đây xuất hiện một tần số tái tổ hợp là 50% sẽ hỗ trợ cho giả thuyết là hai locus này không liên kết với nhau tức là di truyền phân ly độc lập với nhau.

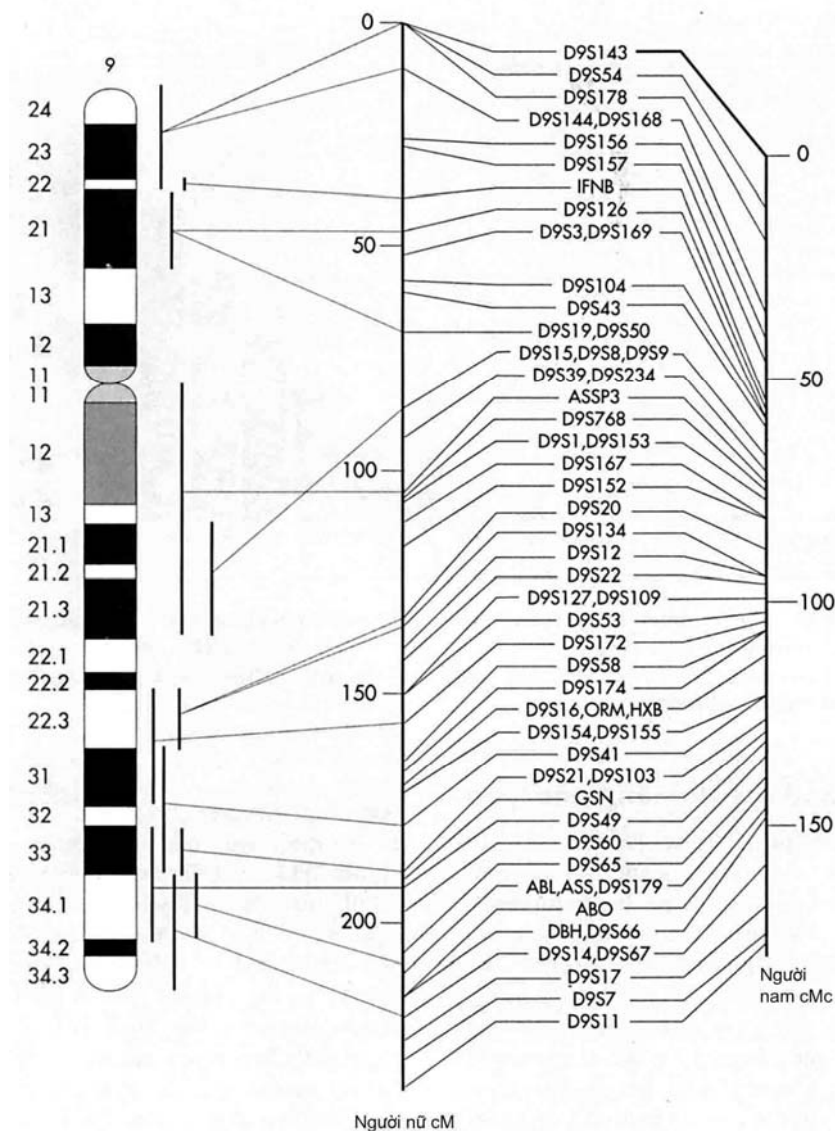
Trong thực tế một mẫu lớn hơn gồm nhiều gia đình sẽ được sử dụng để đảm bảo giá trị về mặt thống kê của kết quả này. Như vậy việc đánh giá tần số tái kết hợp bằng cách khảo sát sự di truyền của các allele trong nhiều gia đình và việc xác định phase liên kết đã giúp nghiên cứu vị trí của các gene trên NST và qua đó lập được bản đồ gene.

4. Vai trò của các marker

Hiện tượng đa hình (polymorphism) trên locus *IF10* được sử dụng để theo dõi một gene bệnh nào đó trong gia đình được gọi là các marker. Chúng được dùng để đánh dấu NST có mang allele bệnh. Vì các marker này có thể được xác định trong mỗi một cá thể ở bất kỳ độ tuổi nào thậm chí ở giai đoạn bào thai nên chúng rất có ích trong việc chẩn đoán sớm các bệnh di truyền. Tuy nhiên cần lưu ý rằng một marker được sử dụng để đánh dấu trên một NST nào đó sẽ được di truyền cùng với gene bệnh chứ không có nghĩa là nó chính là nguyên nhân của bệnh.

5. Lập bản đồ gene dựa trên phân tích hiện tượng di truyền liên kết

Hơn một thập niên trước, việc phân tích liên kết rất ít có cơ may thành công vì các nhà di truyền học chỉ có trong tay vài chục marker đa hình (polymorphic markers) hữu dụng cho việc tìm kiếm hiện tượng liên kết trong toàn bộ genome của người như các allele của các gene quy định các nhóm máu. Như vậy sẽ không chắc rằng một gene bệnh sẽ nằm đủ gần với một marker để có thể đạt tới được một sự liên kết có ý nghĩa hay không. Tình trạng này đã thay đổi một cách ngoạn mục trong hơn một thập niên gần đây, khi hàng ngàn marker đa hình mới (RFLP, VNTR và STRP) đã được khám phá.



Hình 2: Bản đồ di truyền của NST số 9 cho thấy vị trí của một lượng lớn các marker đa hình. Vì tần số tái tổ hợp ở nữ thường cao hơn ở nam nên khoảng cách giữa các marker (tính bằng cM) ở người nữ lớn hơn so với người nam.

Nhờ kỹ thuật xác lập kiểu gene hiệu quả và có một lượng lớn các marker, việc lập bản đồ cho một gene bệnh trở thành một công việc bình thường và chỉ tiêu tốn một thời gian ngắn chừng vài tuần hoặc vài tháng thông qua các phân tích thống kê và phân tích trong phòng thí nghiệm. Để có thể phục vụ cho việc lập bản đồ gene các marker phải có các đặc

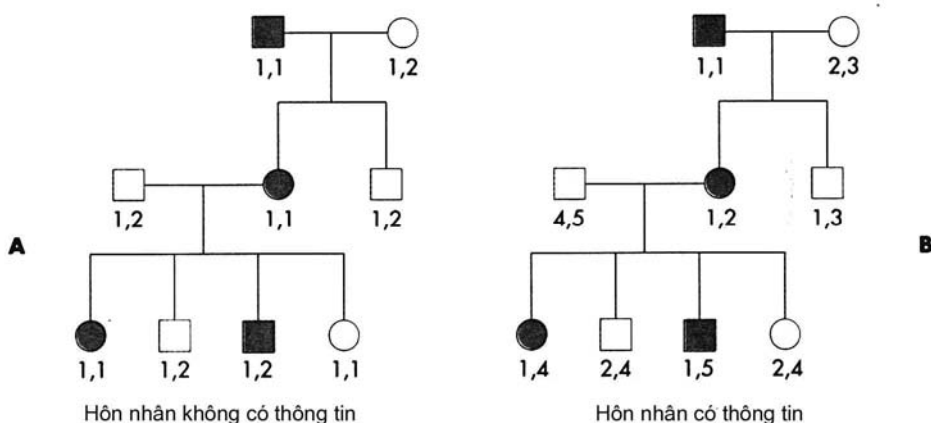
tính sau:

(1) Chúng phải đồng trội (codominant), tức là có thể dễ dàng phân biệt được giữa dị hợp tử và đồng hợp tử. Điều này giúp dễ xác định phase liên kết (linkage phase). Các RFLP, VNTR và STRP hoàn toàn thỏa mãn tiêu chuẩn này, trong khi các loại marker cổ điển như nhóm máu ABO, nhóm máu Rh không có.

(2) Các locus marker phải nhiều để có thể có được những marker nằm gần gene bệnh. Hiện nay chúng ta đã có đầy đủ các locus như vậy cho tất cả các NST. (hình 2)

(3) Các locus marker càng có ích khi chúng có độ đa hình càng cao tức là có nhiều allele khác nhau trong quần thể. Một mức độ đa hình cao sẽ đảm bảo tất cả các bố mẹ sẽ dị hợp tử ở các locus marker, điều này tạo điều kiện thuận lợi hơn trong việc xác lập phase liên kết trong các gia đình. Sự đa hình trong các đoạn lặp vì vậy tạo ra rất nhiều allele và rất dễ đánh giá, tính chất này làm chúng trở thành một công cụ hết sức hữu ích trong việc lập bản đồ gene.

Ví dụ dưới đây minh họa cho ứng dụng của các đặc điểm này trong việc lập bản đồ gen:



Hình 3: Phả hệ minh họa sự di truyền của một bệnh di truyền trội NST thường. A, Một marker RFLP gồm 2 allele liên kết gần với locus mang gene bệnh được lập cho từng thành viên của gia đình, nhưng không xác định được phase liên kết. B, Một marker đa hình vi vệ tinh với 6 allele liên kết gần với locus mang gene bệnh được lập cho từng thành viên của gia đình, cho phép xác định dễ dàng phase liên kết

Trên phả hệ A ở hình 3, một người đàn ông mắc bệnh đồng hợp tử về 2 allele RFLP liên kết gần với locus của gene bệnh (cần nhớ rằng hầu

hết các RFLP xuất hiện là do sự có mặt hoặc vắng mặt của các vị trí giới hạn và do đó chỉ có 2 allele trong quần thể). Vợ ông ta dị hợp tử. Con gái mắc bệnh của họ đồng hợp tử về allele marker. Dựa trên các kiểu gene, người ta không thể xác định phase liên kết trong thể hệ này, vì thể sẽ không thể dự đoán được đứa trẻ nào sẽ bị mắc bệnh và đứa trẻ nào sẽ không mắc bệnh đó. Cuộc hôn nhân ở thể hệ thứ nhất được gọi là một hôn nhân không có thông tin (uninformative mate).

Trái lại, một đa hình của đoạn lặp vi vệ tinh với 6 allele đã được phân loại trong cùng một gia đình (phả hệ B) sẽ cho phép xác định dễ dàng phase liên kết. Vì người mẹ trong thể hệ I có 2 allele khác với 2 allele của người bố mắc bệnh, do đó chúng ta có thể xác định rằng người con gái mắc bệnh của họ ở thể hệ II đã được truyền gene bệnh qua một NST mang allele 1 của marker. Vì cô ta lấy một người chồng có allele 4 và 5, chúng ta có thể dự báo rằng đứa con nào của họ nhận allele 1 từ cô ta sẽ bị mắc bệnh, trong khi đứa con nào nhận allele 2 sẽ bình thường, trừ trường hợp xảy ra tái tổ hợp gene do trao đổi chéo. Ví dụ này cho thấy giá trị của các marker có tính đa hình cao không những trong việc phân tích hiện tượng liên kết mà còn trong việc chẩn đoán bệnh di truyền.

II. Lập bản đồ vật lý (physical mapping)

Việc phân tích liên kết chỉ cho chúng ta xác định khoảng cách tương đối giữa các locus, nhưng không cho phép xác định các vị trí đặc hiệu của các marker hay các gene bệnh. Việc lập bản đồ vật lý cho phép giải quyết hạn chế này. Tới nay đã có nhiều tiến bộ đáng kể về mặt kỹ thuật cho phép thực hiện được việc lập bản đồ vật lý với độ phân giải cao.

1. Lập bản đồ dựa trên hình thái nhiễm sắc thể

Một phương pháp trực tiếp và đơn giản để lập bản đồ của các gene bệnh là xác định sự kết hợp hằng định giữa một bệnh với một bất thường di truyền tế bào học, như nhân đoạn, mất đoạn hoặc những bất thường khác của NST. Những bất thường như vậy có thể tự nó không có hậu quả trên lâm sàng (do đó nó có thể đóng vai trò như một marker) hoặc có thể gây bệnh.

1.1. Tính dị hình (heteromorphisms)

Tính dị hình là một biến dị trong hình thái của một NST. Sự dị hình cũng tương tự như tính đa hình, chúng là những biến dị tự nhiên xảy ra giữa các cá thể trong quần thể. Tuy nhiên sự khác biệt cơ bản ở đây là tính dị hình có thể phát hiện được bằng kính hiển vi quang học còn tính đa hình không thể phát hiện được bằng phương tiện này.

Tính dị hình cũng tương tự như các locus marker, không gây ra một biến dị hay một bệnh di truyền nào cả nhưng nó có thể luôn luôn đi kèm với một biến dị hay một bệnh di truyền nào đó trong gia đình và qua đó giúp xác định vị trí của gene. Tuy nhiên do không phổ biến nên trong việc lập bản đồ di truyền tính dị hình chỉ có ích trong một vài trường hợp.

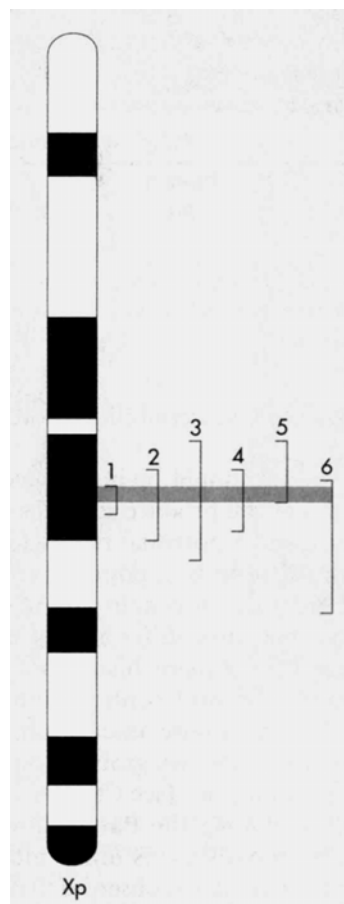
1.2. Hiện tượng mất đoạn (deletion)

Khác với tính đa hình, hiện tượng mất đoạn NST là nguyên nhân trực tiếp của một số bệnh di truyền. Karyotype của những bệnh nhân mắc bệnh di truyền đôi khi cho thấy có liên quan đến mất đoạn của một số vùng đặc hiệu trên một NST. Đột biến này cung cấp một mối liên hệ mật thiết giữa vị trí của locus mang gene bệnh với vùng bị mất đoạn.

Mức độ mất đoạn có thể thay đổi giữa các bệnh nhân mắc cùng một bệnh. Sự mất đoạn được so sánh giữa các bệnh nhân khác nhau để có thể xác định vùng bị mất chung giữa tất cả các bệnh nhân, vì vậy sẽ thu hẹp được vùng có khả năng mang gene bệnh (hình 4).

Vùng mất đoạn đã được sử dụng để lập bản đồ dựa trên sự mất đoạn của các gene chịu trách nhiệm cho bệnh u nguyên bào võng mạc (retinoblastoma), hội chứng Prader-Willi và Angelman, U Wilm (một loại u của thận ở trẻ em có thể gây ra do đột biến trên NST số 11).

Cần lưu ý là hiện tượng mất đoạn chỉ ảnh hưởng trên một trong hai NST tương đồng và bệnh nhân có biểu hiện dị hợp tử về tình trạng mất đoạn. Thường nếu có một vùng bị mất có kích thước đủ lớn để quan sát bằng kính hiển vi quang học xảy ra trên cả hai NST tương đồng sẽ có tác dụng gây chết cho các cá thể mang kiểu đột biến đó.



Hình 4: Định vị một gene bệnh thông qua hiện tượng mất đoạn.

Một loạt các trường hợp mất đoạn gây ra cùng một kiểu bệnh gộp lên nhau được nghiên cứu. Vị trí tương đối của gene bệnh sẽ nằm trên vùng gộp lên nhau của 6 trường hợp mất đoạn

1.3. Hiện tượng chuyển đoạn (translocation)

Hiện tượng chuyển đoạn cân bằng thường không gây hậu quả trên kiểu hình do vẫn giữ được nguyên vẹn vật liệu di truyền. Tuy nhiên nếu đột biến này làm đứt ngang một gene nào đó nó có thể gây ra một bệnh di truyền. Dựa vào đặc điểm này có thể xác định được vị trí tương đối của gene bệnh trên vùng bị đứt gãy của NST.

Bằng việc phân tích liên kết đã lập được bản đồ của gene *NFI* một cách phòng chừng trên nhánh dài của NST 17. Vị trí chính xác hơn của gene này được xác định dựa trên hai bệnh nhân trong đó một bệnh nhân mang chuyển đoạn cân bằng giữa NST 17 và 22 và một bệnh nhân khác mang chuyển đoạn cân bằng giữa NST 17 và 1. Các điểm gãy của những chuyển đoạn này trên NST 17 nằm rất gần với vùng được gợi ý qua việc phân tích liên kết. Hiện tượng này đã cung cấp một điểm mốc vật lý cho các thí nghiệm từ đó dẫn đến việc dòng hóa được gene này.

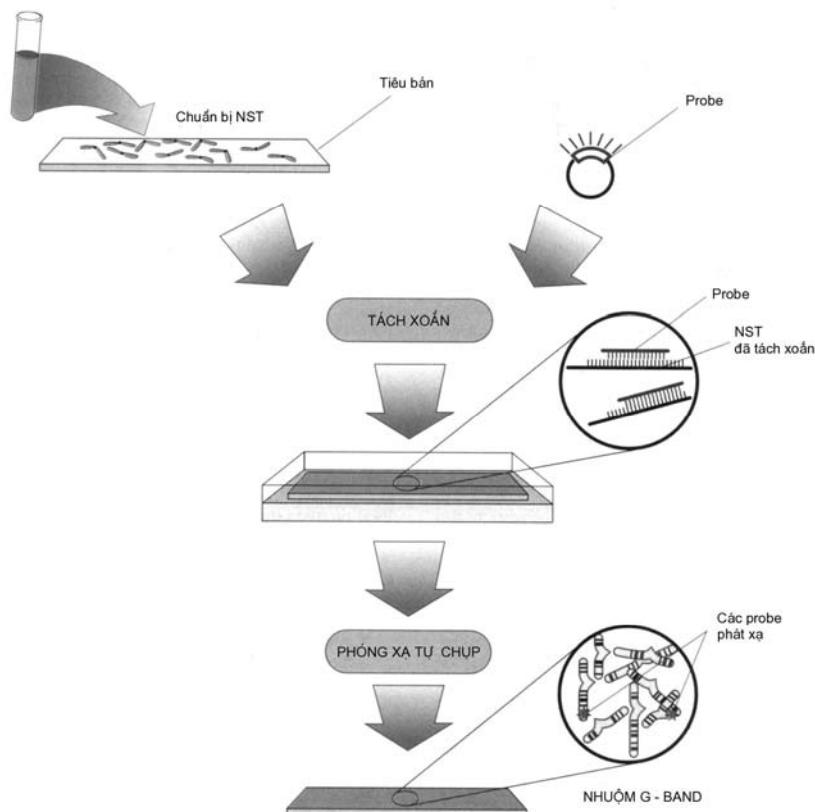
2. Lập bản đồ bằng phương pháp lai tại chỗ (*in situ hybridization*)

Phương pháp lai tại chỗ (hình 5) là một phương pháp đơn giản cho phép lập bản đồ của các đoạn DNA một cách trực tiếp. Do có độ phân giải cao và dễ sử dụng nên kỹ thuật FISH đã được sử dụng rộng rãi để lập bản đồ vật lý của gene.

Giả sử chúng ta có một đoạn DNA mang một gene bệnh mà chúng ta muốn biết vị trí, DNA này sẽ được dòng hóa để làm probe, sau đó probe này sẽ được cho tiếp xúc với tiêu bản mang các NST ở kỳ giữa với các DNA đã được tách xoắn. Probe gắn huỳnh quang sẽ bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung với DNA đã tách xoắn của NST tại một vị trí đặc hiệu do đó có thể định vị một cách chính xác vị trí của probe trên NST với độ phân giải khoảng 1Mb.

Bằng cách sử dụng các NST trong gian kỳ, do trong kỳ này NST ít kết đặc hơn so với trong kỳ giữa nên độ phân giải trong kỹ thuật FISH sẽ có thể lên tới 25 đến 250kb.

Kỹ thuật fiber FISH là một cải tiến của kỹ thuật FISH, trong kỹ thuật này người ta sử dụng các biện pháp hóa học và vật lý tác động lên các NST ở gian kỳ để kéo duỗi sợi chromatin để làm từng quai (loop) chromatin có thể nhìn thấy được. Với kỹ thuật này, các probe có kích thước chỉ một vài kb cũng có thể được sử dụng.

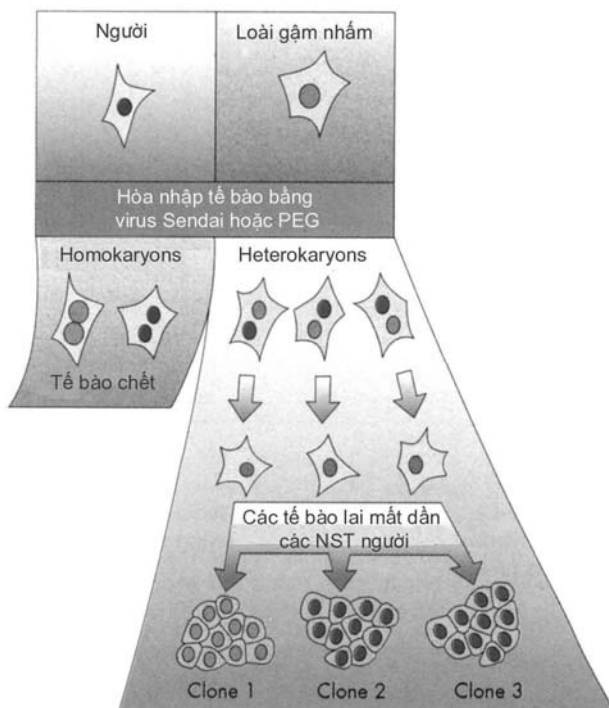


Hình 5: Sử dụng phương pháp lai tại chỗ để định vị một đoạn DNA trên NST đặc hiệu

3. Kỹ thuật lai tế bào sinh dưỡng (*somatic cell hybridization*)

Kỹ thuật lai tế bào sinh dưỡng (hình 6) là một phương pháp định vị gene trên NST dựa trên hiện tượng các tế bào sinh dưỡng thuộc các loài khác nhau nếu được nuôi cấy trong cùng một môi trường với sự có mặt của các tác nhân như polyethylene glycol hay virus Sendai đôi khi sẽ hòa nhập với nhau để tạo thành các tế bào lai.

Khi nuôi cấy tế bào chuột và người với nhau theo cách này, các tế bào lai sẽ chứa 86 NST với 46 NST của người và 40 NST của chuột. Những tế bào này sẽ được đưa vào môi trường chọn lọc như HAT (hypoxanthine, amino-pterine, và thymidine) để loại bỏ những tế bào không hòa nhập. Các tế bào lai sau đó sẽ được cho nhân lên, qua quá trình nguyên phân những tế bào này sẽ bắt đầu mất dần các NST người trong nhân tế bào và hình thành những tế bào có bộ NST đầy đủ của chuột nhưng chỉ có một hoặc vài NST của người.



Hình 6: Lập bản đồ gene bằng kỹ thuật lai tế bào sinh dưỡng.

Các tế bào của người và tế bào của loài gặm nhấm được hòa lẫn và chọn lọc. Các tế bào lai có xu hướng mất dần các tế bào người qua quá trình nguyên phân, kết quả là mỗi dòng (clone) chỉ mang 1 hoặc vài NST người. Mỗi dòng được đánh giá để xét xem có 1 loại gene nhất định nào đó hay không, qua đó xác định được gene đó nằm trên NST nào

Các tế bào khi đó sẽ được lập karyotype để xác định đang mang NST nào của người (các NST của người và chuột được phân biệt với nhau thông qua kích thước và các mẫu band trên NST). Những nhóm tế bào này sau đó được nghiên cứu để xác định xem nhóm nào luôn luôn mang gene nào (Hình 7).

Clone	Đoạn DNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
4	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
7	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
8	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Hình 7: Bảng phân tích lai tế bào sinh dưỡng. Lưu ý là đoạn DNA đang được đánh giá cho thấy có sự kết hợp với clone 1, 3, 4, và 7. Tất cả các dòng này đều chứa NST số 9 trong khi các dòng 2, 5, 6 và 8 không mang NST này. Kết quả phân tích này cho phép kết luận đoạn DNA này nằm trên NST số 9.

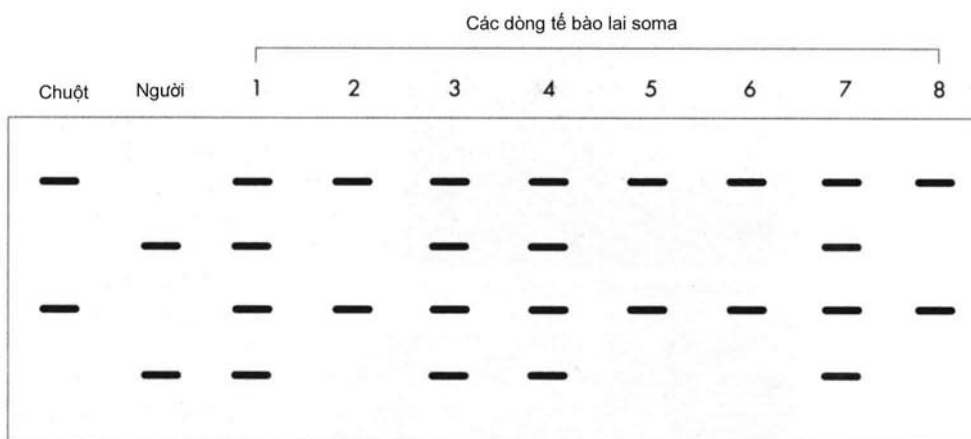
Ví dụ nếu gene luôn luôn được thấy ở nhóm tế bào mang NST số 1 của người nhưng không bao giờ thấy ở các nhóm tế bào mang các NST

khác thì chúng ta có thể kết luận rằng gene đó phải nằm trên NST số 1.

Sự có mặt của gene trong tế bào lai có thể được xác định theo nhiều cách khác nhau:

(1) Nếu người ta đã biết một enzyme (do một gene nào đó chưa biết vị trí mã hóa) thì việc phân tích enzyme đó sẽ được tiến hành trên các dòng tế bào. Điện di protein có thể được sử dụng để phát hiện một sản phẩm protein của người và phân biệt nó với protein tương ứng của chuột. Hướng nghiên cứu này đòi hỏi phải phát hiện được protein đã biết đó trong các dòng tế bào.

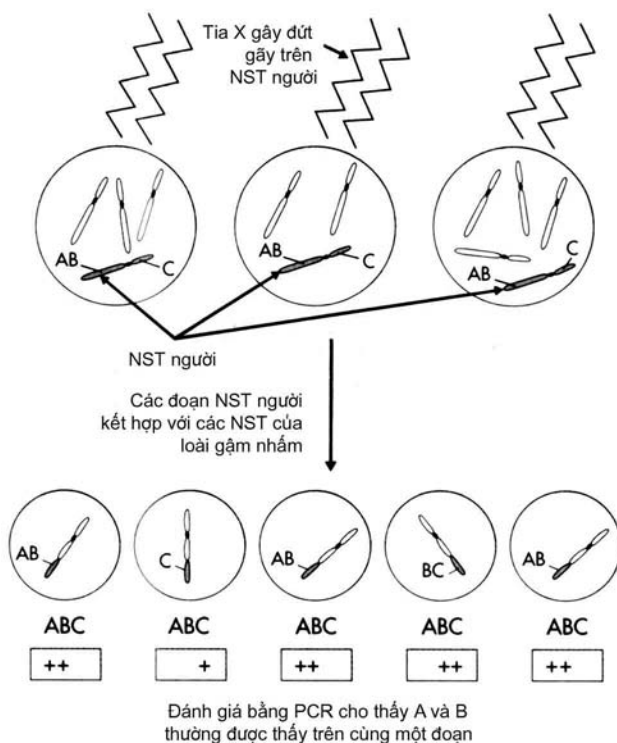
(2) Hiện nay người ta thường dùng phổ biến phương pháp lai giữa DNA của một dòng tế bào lai với một probe đã được đánh dấu mang đoạn DNA quan tâm và sau đó sử dụng kỹ thuật Southern blotting hoặc kỹ thuật PCR để phát hiện NST nào mang đoạn DNA đó (hình 8).



Hình 8: Kỹ thuật Southern Blotting được sử dụng trong việc lập bản đồ gene bằng kỹ thuật lai tế bào sinh dưỡng (đối chiếu với hình 8). Sự khác nhau trong vị trí cắt giới hạn dẫn đến sự khác nhau trong kích thước của các đoạn DNA giữa người và chuột. Probe của gene người chỉ lai với các dòng tế bào lai 1, 3, 4 và 7 chứng tỏ probe chỉ lai khi có sự có mặt của NST số 9.

4. Lập bản đồ bằng phương pháp lai phóng xạ (radiation hybrid mapping)

Đây là một kỹ thuật hiệu quả và được sử dụng một cách rộng rãi (hình 9). Phương pháp này được bắt đầu bằng một tế bào lai sinh dưỡng chỉ mang một NST của người. Các tế bào này được chiếu xạ bằng tia X hoặc tia gamma để gây ra nhiều chỗ đứt trên chuỗi xoắn kép trên các NST. Những đoạn NST người bị đứt ra này để có thể tiếp tục tồn tại chúng phải



Hình 9: Kỹ thuật lập bản đồ gene bằng phương pháp lai phóng xạ. Một dòng tế bào lai chỉ chứa một NST người được chiếu xạ để gây đứt gãy trên NST đó, những đoạn đứt gãy này sẽ hoà nhập với NST của loài gặm nhấm để tồn tại. Các locus gần nhau như A và B sẽ thường được thấy trên cùng một đoạn NST, trong khi đó những locus xa nhau như A và C sẽ ít khi được thấy nằm trên cùng một NST.

PCR có thể được dùng để xác định những tế bào lai do phóng xạ nào mang các kết hợp đặc hiệu của các locus của người (nghĩa là các đoạn mỗi PCR đặc hiệu cho locus sẽ được sử dụng để khuếch đại locus nếu nó có mặt trong tế bào). Sau đó các kỹ thuật thống kê được sử dụng để đánh giá từng cặp locus thường được gặp trên cùng một đoạn NST để qua đó cung cấp một đánh giá về khoảng cách tương đối giữa các locus. Người ta cũng gia tăng mức chiếu xạ để tạo ra những đoạn nhỏ hơn và nhờ đó có thể tăng độ phân giải của kỹ thuật.

hoà nhập với các NST của loài gặm nhấm.

Các tế bào sau khi hoà nhập được gọi là các tế bào lai do chiếu xạ (radiation hybrids) mang các đoạn nhỏ NST người hoà nhập với NST của loài gặm nhấm. Sự có mặt của các NST người trong những tế bào này có thể được phát hiện bằng cách sàng lọc các đoạn *Alu* (cứ vài kb trên NST người có thể gặp các đoạn lặp *Alu* nhưng lại không thấy trên NST của loài gặm nhấm).

Vì việc chiếu xạ gây đứt gãy trên NST người ở những khoảng cách ngẫu nhiên do đó các locus càng nằm gần nhau bao nhiêu sẽ được gặp nhiều hơn bấy nhiêu so với các locus nằm xa nhau trên cùng một đoạn NST.

Các kỹ thuật như

5. Dòng hóa theo vị trí (*positional cloning*)

Trong nghiên cứu di truyền đôi khi sản phẩm của một gene chịu trách nhiệm cho một bệnh di truyền nào đó được biết trước khi gene được xác định.

Ví dụ trong trường hợp bệnh hồng cầu hình liềm, người ta biết nguyên nhân của bệnh là do bất thường trên chuỗi polypeptide beta - globin. Từ trình tự của các amino acid trên chuỗi polypeptide này người ta có thể suy ra trình tự của DNA, trình tự này được sử dụng để tổng hợp probe nhân tạo. Các probe này sẽ được dùng để định vị gene bệnh theo các kỹ thuật như đã được mô tả ở trên.

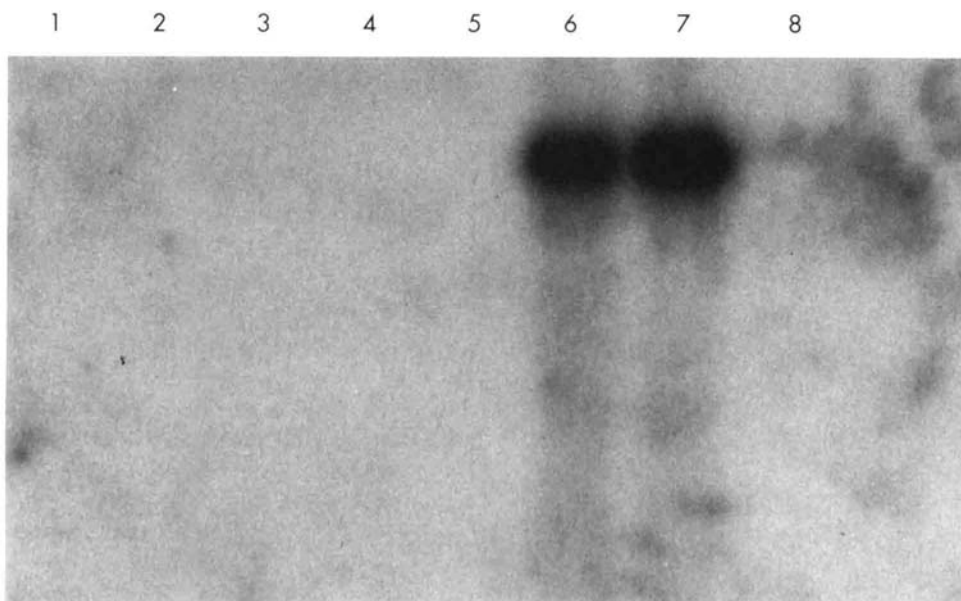
Cách xác định vị trí của gene dựa trên sản phẩm của gen và chức năng của sản phẩm này được gọi là kỹ thuật dòng hóa dựa vào chức năng (*functional cloning*).

Tuy nhiên để định vị các gene thường chúng ta phải dựa vào phân tích hiện tượng liên kết gene, với phương pháp này gene bệnh chỉ được định vị trong vùng có kích thước khoảng 1Mb hoặc lớn hơn. Với kích thước này những vùng đó có thể chứa tới hàng chục gene, xen kẽ với những vùng DNA không mang mã. Để có thể xác định chính xác vị trí của một gene bệnh trên vùng đó người ta phải thực hiện việc phân tích từ một marker liên kết (*linked marker*) trên vùng rồi sau đó phân tích lần tới các vùng hai bên marker này để định vị và dòng hóa gene bệnh. Kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật dòng hóa theo vị trí (*positional cloning*).

Giả sử rằng chúng ta biết vị trí ăng chùng của một marker đa hình thái liên kết chặt chẽ với một gene bệnh mà chúng ta muốn phân lập (nghĩa là chúng nằm cách nhau khoảng 1Mb). Để làm được việc này người ta dùng một kỹ thuật được gọi là "đi dọc NST" (*chromosome walking*) để tiến dần về phía gene bệnh. Đoạn DNA của marker được dùng làm probe để nhặt ra các đoạn gồi đầu lên nhau một phần trong thư viện genome. Các đoạn gồi đầu có thể được xác định bằng kỹ thuật PCR, qua kỹ thuật này sẽ cho thấy một phần của probe và của đoạn DNA tách từ thư viện genome đều có thể khuếch đại bằng cùng các đoạn mồi (*primer*) giống nhau (hình 11).

Ngay sau khi được xác định, đoạn gồi đầu DNA vừa được lấy ra từ thư viện genome được sử dụng trở lại như một probe để nhặt tiếp một đoạn DNA khác gồi đầu một phần với nó ở phía đầu kia từ thư viện genome. Bằng cách này người ta lần lượt dùng các đoạn DNA gồi một phần lên nhau để đi dọc trên NST hết đoạn này tới đoạn khác cho tới khi đi đến được gene bệnh. Do đôi khi chúng ta không chắc gene bệnh nằm ở phía bên này hay phía bên kia của marker nên kỹ thuật đi dọc NST sẽ

được tiến hành ở cả hai phía.

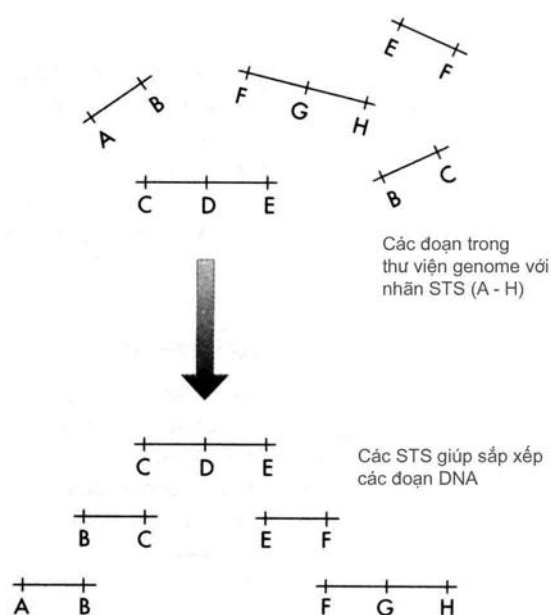


Hình 10: Một probe được kiểm tra qua 8 dòng tế bào lấy từ thư viện YAC. Probe đã lai với hai trong số 8 dòng đó (dãy 6 và 7), chứng tỏ có sự gối đầu giữa DNA của của probe và DNA ở mỗi một trong hai dòng YAC thuộc clone 6 và 7.

Việc xác định đoạn gối đầu giữa các đoạn DNA hiện nay được thực hiện khá dễ dàng thông qua việc định vị hàng chục ngàn vị trí được gọi là các vị trí nối đoạn (sequence tagged sites: STSs) và tổng hợp được chúng bằng con đường nhân tạo, STSs là các đoạn dài vài trăm bp nằm tại các vị trí đã được xác định trên NST. Chúng nằm cạnh các primer PCR đã biết, do đó bất cứ phòng xét nghiệm nào cũng có thể dùng kỹ thuật PCR để khuếch đại chúng lên (nhờ các primer đặc hiệu) để phục vụ cho việc phân tích. Bằng cách này chúng trở thành các "biển báo" cho những đoạn DNA đã biết trên toàn bộ genome mà sự gối đầu nhau của các STS giữa các đoạn DNA khác nhau trong thư viện genome sẽ cho phép lắp ghép chúng lại với nhau theo một trình tự nhất định (hình 11). Các STS được định vị trên các NST đặc hiệu bằng cách sử dụng các kỹ thuật như lập bản đồ bằng phương pháp lai phóng xạ.

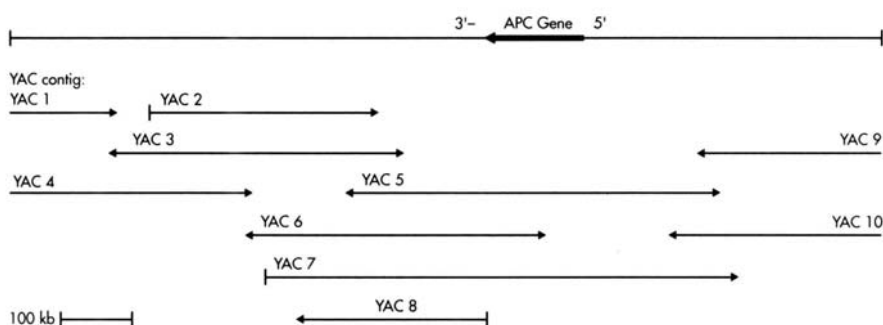
Các đoạn DNA được dùng trong kỹ thuật "đi dọc NST" có thể được dòng hóa thành các vector như plasmid, cosmid hoặc NST nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome: YACs). Các plasmid thích hợp đối với việc cài các đoạn DNA nhỏ nhất, trong khi YACs thích hợp cho các DNA lớn nhất với kích thước từ 200 - 2000kb.

Các vector khác đã được dòng hóa có thể ổn định hơn nhưng mang đoạn cài DNA nhỏ hơn như: các NST nhân tạo của vi khuẩn (bacterial artificial chromosome: BACs); NST nhân tạo của thể thực khuẩn P1 (bacteriophage P1 artificial chromosomes : PACs), cả hai vector này đều tiếp nhận được các đoạn DNA dài với kích thước từ 50 - 200 kb. Chúng thường được dùng kết hợp với YACs trong kỹ thuật dòng hóa theo vị trí.



Hình 12 mô tả một bản đồ của các đoạn YAC và cosmid gối đầu nhau trong vùng mang gene gây bệnh polyp đại tràng u tuyến (adenomatous polyposis)

Hình 11: Sử dụng các STS để xác định các vị trí gối đầu giữa các đoạn DNA trong kỹ thuật "đi dọc NST". Sự gối đầu được xác định khi các primer của một STS đặc hiệu được sử dụng để khuếch đại DNA từ các đoạn DNA khác nhau lấy ra từ thư viện genome



Hình 12: Một ví dụ về "contig map" của các YAC được sử dụng trong kỹ thuật "đi dọc". NST số 5 trong vùng mang gene gây bệnh polyp đại tràng u tuyến

coli). Bản đồ của các đoạn DNA kế tiếp (contiguous DNA) nhau như thế này được gọi là "contig map".

Tóm lại kỹ thuật "đi dọc NST" liên quan đến việc phân lập các đoạn DNA gối đầu nhau một phần (partial overlapping DNA segments) từ thư viện genome để đi dọc trên NST về phía vị trí của gene bệnh.

Khi việc "đi dọc NST" đã hoàn tất, làm thế nào mà chúng ta biết là mình đã tới được gene bệnh ? Để biết được điều này người ta áp dụng các cách sau:

5.1. Phân tích sự bảo tồn đoạn DNA mang mã giữa các loài (Cross - Species Conservation)

Khi đi dọc trên một đoạn DNA để tìm kiếm một gene nào đó, chúng ta muốn tránh những phần không mang mã tuy nhiên phần lớn đoạn DNA này lại là phần không mang mã. Phần DNA mang mã mà chúng ta muốn tìm nhìn chung không thay đổi nhiều trong lịch sử tiến hóa do chức năng quan trọng của nó đối với sự sống còn của sinh vật, do vậy nó đã được bảo tồn và giải thích vì sao trình tự DNA lại có sự tương đồng giữa một số lớn các loài khác nhau. Trái lại những đoạn không mang mã thay đổi nhanh chóng và có sự khác biệt rất lớn giữa các loài. Như vậy nếu trình tự mà chúng ta đang xem xét trong kỹ thuật "đi dọc NST" gồm những đoạn mang mã, chúng có thể lai với các đoạn DNA của các loài khác (theo kiểu bổ sung giữa các base) và ngược lại.

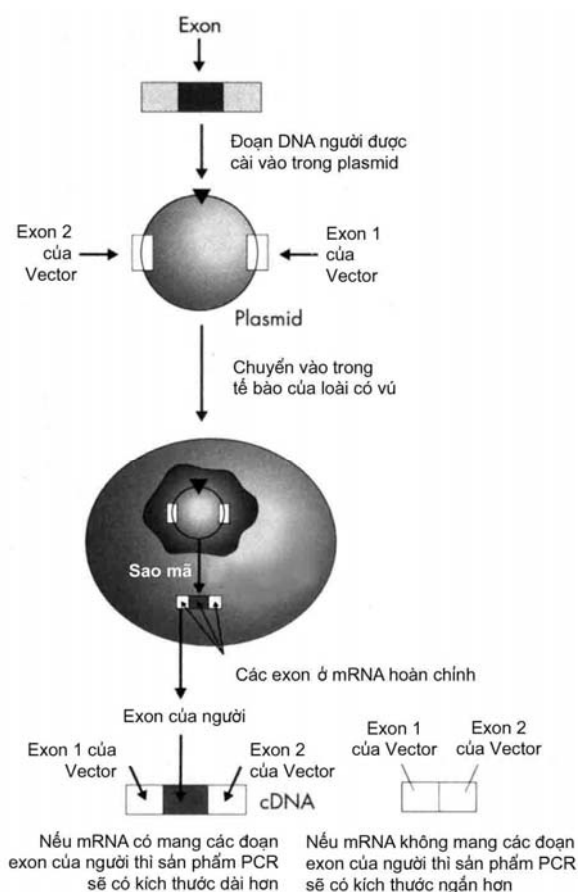
Để đánh giá xem một đoạn DNA có được bảo tồn trong các loài không, một probe mang một đoạn DNA đó được tổng hợp và cho tiếp xúc với các đoạn DNA đã tháo xoắn thuộc các loài khác nhau để xem có xảy ra quá trình lai hay không, nếu có thì đoạn DNA này có khả năng là một đoạn DNA mang mã (phương pháp này được gọi là "zoo blot"). Mặc dù điều này tự nó không giúp xác định vị trí gene bệnh nhưng nó giúp dự báo khả năng đoạn DNA mà chúng ta đang khảo sát là một vùng mang mã của gene.

5.2. Xác định các đảo CG (Identification CG Islands)

Như đã được giới thiệu trong các bài trước, hầu hết các dinucleotide CG đều được methyl hóa. Tuy nhiên khoảng 60% gene người, bao gồm gần như tất cả các gene quản gia (housekeeping genes) và hầu hết các gene hoạt động, đều có các dinucleotide CG không bị methyl hóa (unmethylated) ở đầu 5'. Những dinucleotide này được gọi là các đảo CG (CG island). Có lẽ khi không bị methyle hóa ở đầu 5' sẽ làm gene dễ tiếp xúc hơn với các yếu tố thúc đẩy quá trình sao mã.

Khi chúng ta xác định được một dãy các đảo CG có nghĩa là đã định vị được một gene mã hóa.

6. Các kỹ thuật xác định đoạn exon



Hình 13: Kỹ thuật bẫy exon.

Trong kỹ thuật này một exon hay nhiều exon trong một đoạn DNA được phát hiện bằng cách cài đoạn DNA đó vào trong một vector plasmid bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp mà những vector tái tổ hợp này cho phép đoạn DNA đó sao mã trong các tế bào của loài có vú hoặc nấm men (hình 13). Khi quá trình hoàn thiện mRNA xảy ra tất cả các đoạn RNA không mang đoạn exon sẽ bị cắt. Nếu đoạn DNA mà chúng ta đang khảo sát có các mang các đoạn exon thì sau khi hoàn thiện mRNA sẽ có kích thước dài hơn (do có mang các đoạn exon của người từ đoạn DNA cài vào), nhưng nếu đoạn DNA mà chúng ta khảo sát không có các đoạn

Nhiều kỹ thuật hiện nay đang được dùng để xác định các đoạn exon trong trình tự DNA của genome. Một trong những kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật bẫy exon (exon trapping). Đoạn DNA của người được đặt vào trong một vector plasmid bằng kỹ thuật DNA tái kết hợp. Vector plasmid được dòng hóa trong tế bào của loài có vú hay của nấm men có mang hệ thống sao mã thích hợp. Phân tử mRNA hoàn chỉnh được phân lập và chuyển thành cDNA. cDNA sau đó được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR để xác định chiều dài. Nếu đoạn DNA của người có chứa một hoặc nhiều đoạn exon, cDNA sẽ có kích thước dài hơn so với trường hợp không có.

Trong kỹ thuật này một exon hay nhiều exon

exon thì mRNA sau khi hoàn thiện sẽ có kích thước ngắn hơn.

Một kỹ thuật phát hiện exon phổ biến khác được gọi là kỹ thuật chọn lọc cDNA trực tiếp (direct cDNA selection). Trong kỹ thuật này các đoạn DNA của genome được đưa vào trong YAC. Các YAC sau đó được lai với các dòng cDNA được lấy từ thư viện cDNA của người. Nếu đoạn DNA trong YAC có mang các exon, chúng sẽ bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung với các đoạn trong thư viện cDNA. Do cDNA được làm từ các đoạn DNA mã hóa thông qua các mRNA đã hoàn chỉnh nên nếu đoạn DNA không mang các exon, chúng sẽ không bắt cặp được với cDNA. Sau một vài chu kỳ lai các dòng cDNA tương ứng với các exon trong đoạn DNA sẽ được làm giàu đủ để cho phép xác định chúng. Một nhược điểm của phương pháp này là nó có thể không phát hiện được các gene hiếm vì không có trong thư viện cDNA.

7. Phân tích trình tự DNA bằng kỹ thuật vi tính

Việc phân tích bằng kỹ thuật vi tính (còn được gọi là nghiên cứu in silico) đã đem lại một phương pháp hữu hiệu cho việc xác định gene. Các phần mềm vi tính phức tạp như GRAIL, có thể kiểm tra một đoạn DNA để xác định sự có mặt của những vị trí trọng yếu như vị trí bắt đầu sao mã, các codon kết thúc, các đoạn ranh giới giữa intron - exon v.v... để từ đó xác định vai trò mang mã của gene.

Biện pháp này đã đã được dùng để xác định và mô tả đặc điểm của một trong số các gene gây bệnh thận đa nang ở người trưởng thành (adult polycystic kidney disease gene).

Hơn nữa, các phần mềm này còn ghi nhận các mẫu gene điển hình mã cho các loại protein đặc hiệu như các yếu tố sao mã, các protein màng tế bào v.v...

Cơ sở dữ liệu (database) về những đoạn DNA đã biết được vi tính hóa đóng một vai trò quan trọng trong việc xác định gene. Khi nghiên cứu một đoạn nào đó của DNA để tìm một gene, người ta sẽ tìm sự tương đồng giữa đoạn DNA của vùng này với các thông tin đã được lưu trữ về trình tự của DNA đã biết trong cơ sở dữ liệu của máy. Các thông tin này được lấy từ các gene đã biết chức năng hoặc từ các mRNA được tổng hợp tại các mô đặc hiệu.

Giả sử chúng ta đã sử dụng việc phân tích liên kết để xác định một vùng chứa một gene gây ra sự rối loạn phát triển như dị dạng của chi chẳng hạn. Khi thực hiện kỹ thuật "đi dọc NST" chúng ta sẽ tìm kiếm sự tương đồng giữa 1 đoạn DNA lấy từ vùng này với một đoạn DNA có trong cơ sở dữ liệu như trình tự DNA của một gene mã cho một protein liên

quan đến sự phát triển của xương như một yếu tố phát triển nguyên bào sợi (fibroblast growth factor). Vì các gene mã hóa cho các sản phẩm protein tương tự thường có trình tự DNA tương tự. Sự tương đồng trong trình tự DNA giữa đoạn DNA lấy từ vùng này với một đoạn trong cơ sở dữ liệu gợi ý đoạn DNA này thực sự là một phần của gene gây dị dạng chi.

Các cơ sở dữ liệu được dùng trong việc tìm kiếm các đoạn tương đồng thường là trình tự của các đoạn DNA nhỏ đã được gọi là expressed sequence tags (ESTs). ESTs thu được từ việc đọc trình tự của hàng trăm bp từ hai đầu của các dòng cDNA lấy từ thư viện cDNA. Vì các clone này chỉ gồm các DNA bổ sung chính xác với mRNA nên ESTs đại diện cho các phần biểu hiện (expressed) của gene. Thường chúng chỉ biểu hiện ở một số mô nhất định ở những thời điểm nhất định.

Các EST có thể được lập bản đồ trên các NST đặc hiệu bằng cách sử dụng các kỹ thuật lập bản đồ vật lý đã được mô tả ở phần trước như lập bản đồ gene bằng kỹ thuật lai phóng xạ (radiation hybrid mapping) hoặc kỹ thuật FISH. Khi đó các nhà nghiên cứu có thể tìm kiếm trình tự tương đồng giữa các đoạn DNA tại một vùng đang được quan tâm với các ESTs đã biết. Nếu có sự tương đồng, vị trí của đoạn DNA trên NST sẽ ở cùng một vùng với ESTs đó và qua đó cũng có thể biết loại mô liên quan tới loại bệnh đang khảo sát (nơi gene đó hoạt động sao giải mã). Việc xác định các ESTs đã và đang được thực hiện một cách nhanh chóng và hiện đã có gần 2 triệu ESTs trong các dữ liệu trên máy. Kỹ thuật này đã được sử dụng để xác định một trong số các gene gây bệnh Alzheimer.

Việc tìm kiếm sự tương đồng về trình tự không nhất thiết đòi hỏi phải sử dụng gene người. Người ta thấy có sự tương ứng giữa trình tự của một số gene đã biết chức năng ở người với các gene của chuột nhắt hoặc thậm chí của nấm men hoặc vi khuẩn. Vì các gene mã hóa cho các sản phẩm protein quan trọng có xu hướng được bảo tồn trong quá trình tiến hóa nên sự xác định sự tương đồng giữa gene người với gene của một sinh vật khác có thể cung cấp những thông tin quan trọng về chức năng của gene đó ở người. Ví dụ nhiều gene liên quan đến việc điều hòa chu kỳ sinh sản tế bào hoàn toàn tương tự giữa người và nấm men như giữa các đoạn của gene *NFI* người với gene *IRA2* của nấm men.

Có khoảng một phần ba số gene gây bệnh ở người đã được xác định là có sự tương đồng với các gene ở nấm men. Các gene này và các sản phẩm của nó có thể được thí nghiệm một cách dễ dàng trên các sinh vật thí nghiệm. Qua những hiểu biết về chức năng của chúng trên các sinh vật thí nghiệm sẽ giúp hiểu biết tốt hơn về chức năng của chúng trên người. Một số các gene bệnh quan trọng ở người đã được xác định bởi vì có các gene

gây ra biểu hiện tương ứng đã được xác định trước đó ở các sinh vật khác. Ví dụ sự tương ứng giữa gene gây bệnh mắt nhỏ ở chuột và gen gây tật không có mống mắt (aniridia) ở người.

8. Sàng lọc các đột biến trên trình tự DNA

Ngay khi một phần của DNA mang mã đã được phân lập, nó có thể được đánh giá các đột biến bằng cách sử dụng các kỹ thuật như SSCP (single - strand conformation polymorphism), DGGE (denature gradient gel electrophoresis) và đọc trình tự DNA trực tiếp (direct DNA sequence) v.v.... Nếu một đoạn DNA đại diện cho gene bệnh thì nó chỉ thấy ở các cá thể mang bệnh chứ không thể thấy ở những người bình thường.

Để giúp phân biệt các đột biến gây bệnh với các tính đa hình vốn có mặt một cách bình thường ở mọi cá thể, người ta so sánh DNA của bệnh nhân mắc bệnh do một đột biến mới gây ra với DNA của bố mẹ không mắc bệnh. Trong khi tính đa hình không có hại sẽ được thấy ở cả bố mẹ không mắc bệnh và cả con cái mắc bệnh, một đột biến mới gây bệnh sẽ chỉ thấy ở con mà không thấy ở bố mẹ. Đây là phương cách hữu ích trong việc xác định các đột biến gây ra các bệnh di truyền trội NST thường có tính thấm cao như bệnh u xơ thần kinh type 1 (NF1).

Một loại đột biến khác có thể được đánh giá là các trường hợp mất đoạn dưới hiển vi (submicroscopic deletion), đây là những mất đoạn quá nhỏ do đó không thể quan sát bằng kính hiển vi được. Các mất đoạn này chỉ có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật Southern Blot. Một mất đoạn như vậy sẽ làm hình thành một đoạn giới hạn (restriction fragment) nhỏ hơn bình thường làm nó di chuyển nhanh hơn trên gel.

Đôi khi các mất đoạn lớn hơn có thể được phát hiện thông qua kỹ thuật điện di trên gel giống như trong kỹ thuật Southern Blot nhưng cải tiến bằng việc cắt giới hạn (restriction digest) được thực hiện bằng các enzyme cắt ở vị trí giới hạn (recognition site) hiếm gặp do đó số lần DNA bị cắt sẽ ít đi, do vậy sẽ làm xuất hiện các đoạn giới hạn có chiều dài từ vài chục đến vài trăm kb. Những đoạn này do có kích thước quá lớn nên khó phân biệt với nhau khi thực hiện điện di trên gel theo cách thông thường nhưng bằng cách thay đổi chiều của xung điện ngang qua gel (xung sau được thực hiện ở góc 90^0 so với xung trước), các đoạn này sẽ di chuyển một cách khác nhau phụ thuộc vào kích thước của chúng và cho phép phân biệt chúng dễ dàng hơn. Vì vậy phương pháp điện di này được gọi là phương pháp điện di trường xung điện (pulsed field gel electrophoresis).

9. Test phát hiện sự hoạt động sao mã của gene

Để kiểm tra xem một gene có phải nó chịu trách nhiệm cho một bệnh nào đó không, người ta có thể kiểm tra ở các mô khác nhau để xác định xem gene đó hoạt động sao mã ở mô nào. Việc kiểm tra được thực hiện bằng cách tinh khiết mRNA chiết từ một loại mô nào đó, đặt nó trên miếng thấm (blot) và cho lai với một probe làm từ gene này để phát hiện. Kỹ thuật này được gọi là Northern blotting (ý muốn nói tương tự như kỹ thuật Southern blotting nhưng thay vì các đoạn DNA thì ở đây là mRNA) (hình 14). Nếu gene này chính là nguyên nhân gây bệnh thì phân tử mRNA của nó sẽ có mặt ở các mô là chịu ảnh hưởng của bệnh (nguyên lý của phương pháp này cũng giống như nguyên lý của việc phân tích bằng ESTs).

Ví dụ enzyme phenylalanine hydroxylase được tổng hợp ở gan do đó gene mã cho phenylalanine hydroxylase (đột biến sẽ gây bệnh phenylketonuria, PKU) sẽ hoạt động sao mã ở tổ chức này.



Hình 14: Một ví dụ về kỹ thuật Northern Blot. Trên ảnh cho thấy hiện tượng lai giữa một probe cDNA từ gene *EVI2A* (một gene cài vào trong một đoạn intron của gene *NFI*) với mRNA được lấy từ tuyến thượng thận, não, và các nguyên bào sợi. Kết quả cho thấy *EVI2A* được biểu hiện ở não ở mức độ cao hơn ở hai loại mô kia.

Một test khác cho phép đánh giá trực tiếp sự biểu hiện của gene là đưa một đoạn DNA bình thường vào trong một tế bào bị khiếm khuyết lấy ra từ một cá thể mắc bệnh (hoặc từ các mô hình bệnh tương tự ở sinh vật

thí nghiệm) bằng kỹ thuật DNA tái kết hợp. Nếu đoạn DNA bình thường này khắc phục được khiếm khuyết của tế bào có nghĩa là nó có thể đại diện cho gene bệnh mà chúng ta quan tâm. Kỹ thuật này đã được dùng để chứng minh các đột biến trên gene *CFTR* có thể gây bệnh xơ nang (cystic fibrosis).

Tuy nhiên việc dòng hóa các gene đôi khi rất phức tạp và khó khăn do nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như việc phân lập các đoạn DNA gối đầu (overlapping) có thể trở nên rất khó khăn khi gặp phải các đoạn lặp dài trên DNA. Những khó khăn này làm cho việc dòng hóa các gene trở thành một công việc tiêu tốn nhiều thời gian và công sức.

Mặc dầu gene gây bệnh Huntington được xác định là nằm trên nhánh ngắn của NST số 4 từ năm 1983 nhưng phải mất 10 năm làm việc vất vả của một nhóm gồm nhiều nhà nghiên cứu gene này mới được dòng hóa. Việc dòng hóa gene gây bệnh xơ nang (cystic fibrosis) cũng mất 4 năm.

Việc dòng hóa các gene hiện đã được tiến hành với nhiều thuận lợi hơn nhờ các kỹ thuật dòng hóa tốt hơn và các vector mới được phát minh (như BACs, PACs và YACs có khả năng cài các đoạn DNA lớn hơn nhiều so với các cosmid). Việc sử dụng các mốc vật lý dùng để lập bản đồ gene (STSs) cũng làm tăng tốc độ và hiệu quả của việc dòng hóa gene.

10. Các gene ứng viên (candidate genes)

Việc săn tìm gene được tiến hành hiệu quả hơn nhiều khi đã có sẵn một gene ứng viên. Như tên gọi đây là một gene mà sản phẩm protein của nó làm nó trở thành một ứng viên cho một bệnh đang cần tìm nguyên nhân. Ví dụ như các gene mã cho các loại collagen khác nhau được xem là các ứng viên có thể là nguyên nhân của hội chứng Marfan vì collagen là một thành phần quan trọng của tổ chức liên kết. Tuy nhiên việc phân tích liên kết bằng cách sử dụng các marker của gene collagen trên các gia đình mắc hội chứng này đã không đem lại kết quả.

Khi gene fibrilline - 1 được xác định trên NST 15, nó đã trở thành một gene ứng viên cho hội chứng này (fibrilline cũng là một thành phần của mô liên kết). Việc phân tích liên kết cũng đã định vị được gene gây hội chứng Marfan trên NST 15 vì vậy gene fibrilline - 1 trở thành một ứng viên có nhiều khả năng đã gây ra hội chứng đó.

Việc phân tích các đột biến trên gene fibrilline - 1 đã chứng tỏ những đột biến này kết hợp một cách hằng định với hội chứng Marfan và cho phép khẳng định những đột biến này là nguyên nhân gây bệnh.

Chương 13

Di truyền học ung thư

Khoảng một phần tư các trường hợp tử vong là do ung thư. Tần suất của nhiều loại ung thư đã tăng lên do tỷ lệ người già trong dân số ngày càng tăng. Nguyên nhân của ung thư bao gồm cả các yếu tố môi trường và di truyền. Những tiến bộ đáng kể trong sinh học phân tử và di truyền đã làm sáng tỏ quá trình hình thành ung thư ở mức phân tử và tế bào, những hiểu biết này sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát, dự phòng và điều trị ung thư.

I. Nguyên nhân của ung thư

Tế bào trong cơ thể được "lập chương trình" để phát triển, biệt hóa, và chết đáp ứng với một hệ thống phức tạp của các tín hiệu hóa sinh. Ung thư xuất hiện là do có một dòng tế bào thoát khỏi sự phát triển theo chương trình được lập sẵn và trở nên có khả năng sinh sản một cách không hợp lý.

1. Nguyên nhân di truyền

Các biến đổi di truyền của các hệ thống điều hòa tế bào là cơ sở đầu tiên của quá trình phát sinh ung thư. Hầu hết các biến cố di truyền gây ra ung thư xảy ra trong suốt cuộc đời của mỗi người, ở các tổ chức sinh dưỡng của họ. Tần suất của các biến cố này có thể bị thay đổi do phơi nhiễm với các chất gây ung thư vì thế tạo nên một mối liên kết với các chất gây ung thư của môi trường. Tuy nhiên, do các đột biến này xảy ra ở các tế bào sinh dưỡng nên chúng không truyền lại cho các thế hệ sau.

Các đột biến gây ung thư cũng có thể xảy ra đối với các tế bào sinh dục và truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, tạo nên những gia đình có tần suất ung thư cao. Ở những gia đình này, sự thừa hưởng một allele đột biến dường như là đủ ý nghĩa để gây nên một dạng ung thư đặc hiệu, Ví dụ trong ung thư nguyên bào võng mạc ở trẻ em (retinoblastoma), 90% số người mang gen đột biến tương ứng có khả năng bị ung thư.

2. Nguyên nhân môi trường

Người ta đã xác định được nhiều tác nhân môi trường có khả năng gây ung thư, như việc hút thuốc lá gây ung thư phổi và các loại ung thư khác. Vai trò của các tác nhân khác trong các ung thư đặc trưng cũng được ghi nhận như bụi uranium gây ra ung thư phổi ở thợ mỏ, phơi nhiễm với amiăng (asbestos) gây ra ung thư phổi và ung thư trung biểu mô.

Có nhiều loại ung thư xuất hiện với những tần suất khác nhau ở

những quần thể khác nhau. Ung thư vú gặp nhiều ở phụ nữ Bắc Âu và Mỹ nhưng lại hiếm gặp ở những nước đang phát triển. Ung thư đại tràng hiếm gặp ở những người Nhật sống tại Nhật nhưng lại chiếm hàng thứ hai trong số các ung thư ở người Nhật sống tại Hoa Kỳ.

Thực tế trên cho thấy các yếu tố môi trường đóng một vai trò quan trọng trong việc gây ung thư. Tuy nhiên sự khác biệt trong khả năng bị ung thư giữa người này và người kia trong những điều kiện sống giống nhau nói lên sự khác biệt về mặt di truyền giữa các cá thể, sự có mặt của những gene làm tăng khả năng bị ung thư. Nói chung nguy cơ bị ung thư của một cá thể tùy thuộc vào sự phối hợp của cả hai yếu tố di truyền và môi trường

II. Các gene ung thư

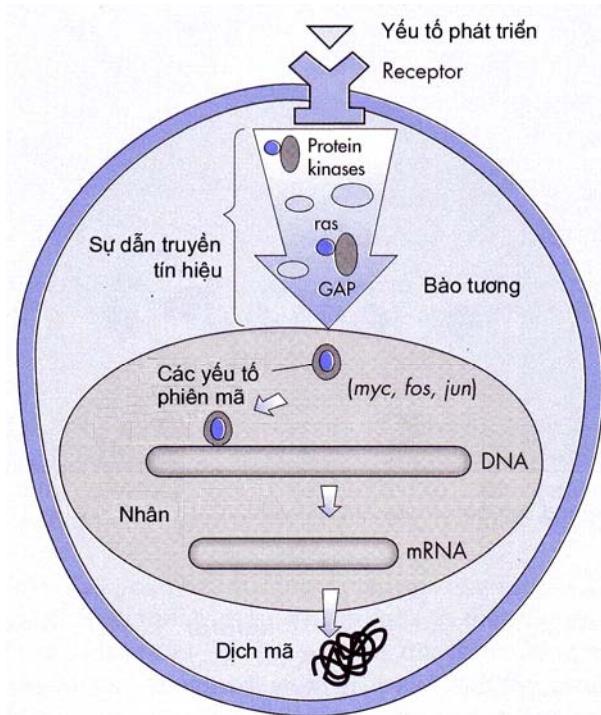
1. Kiểm soát di truyền đối với sự tăng trưởng và biệt hóa tế bào

Ung thư được hình thành khi có một dòng tế bào bị mất kiểm soát sự tăng trưởng và biệt hóa bình thường. Quá trình điều hòa tăng trưởng và biệt hóa tế bào diễn ra qua các bước sau (hình 1):

- Các yếu tố tăng trưởng có bản chất là polypeptide đóng vai trò của các tín hiệu ngoại bào, truyền tín hiệu từ tế bào này đến tế bào khác (như yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng biểu bì, các hormone steroid) tác động lên các receptor đặc hiệu trên bề mặt tế bào.
- Các yếu tố tăng trưởng sau khi gắn vào các receptor đặc hiệu trên bề mặt tế bào sẽ hoạt hóa chúng, khởi động các phân tử có nhiệm vụ truyền tín hiệu đến nhân tế bào. Các phân tử truyền tín hiệu này bao gồm các protein kinase như src tyrosine kinase, protein kinase hoạt hoá mitogen (MAPK) và jun kinase (junK). Các enzyme này làm thay đổi hoạt tính của các protein đích bằng cách phosphoryl hóa.
- Các protein đặc hiệu sau khi được phosphoryl hóa trong quá trình trên sẽ tương tác với các yếu tố phiên mã của nhân, điều hòa hoạt động của các gene đặc hiệu. Các gene này mã hóa cho các protein liên quan đến sự tăng trưởng và sinh sản tế bào. Gene mã hóa cho yếu tố phiên mã này bao gồm *MYC*, *FOS* và *JUN*.

Mỗi tế bào liên tục bị tác động bởi các tín hiệu hoá học và phải tích hợp và xử lý tất cả các tín hiệu này để quyết định tiếp tục tăng trưởng và phân chia hay ngừng tăng trưởng để biệt hóa thành những tế bào chuyên biệt. Người ta đã nhận dạng được hơn 100 gene mã hóa các protein tham gia vào sự điều hòa tăng trưởng và biệt hóa tế bào. Các đột biến có thể xảy ra ở bất kỳ các bước nào liên quan đến quá trình điều hoà sự tăng trưởng

và biệt hóa tế bào. Một tế bào ung thư sẽ nổi lên từ một quần thể tế bào đang trưởng thành thông qua việc tích tụ các đột biến ở các gene điều hòa. Tế bào mang đột biến sẽ mất đáp ứng với tín hiệu biệt hóa và cứ tiếp tục phân chia thay vì đi vào chương trình biệt hóa bình thường với hậu quả là hình thành nên khối u.



Hình 1: Quá trình điều hòa tăng trưởng và biệt hóa tế bào

2. Gene ung thư di truyền và gene ung thư ở tế bào sinh dưỡng

Mặc dù loại "ung thư có tính gia đình" đã được nhận dạng từ lâu nhưng mãi đến những năm đầu của thập kỷ 1970, người ta mới bắt đầu hiểu được mối quan hệ giữa những rối loạn chất liệu di truyền được truyền cho thế hệ sau và những sự cố sinh ung thư xảy ra trong tổ chức sinh dưỡng.

Năm 1971, A.G. Knudson đã đưa ra một giả thuyết "two-hit" về cơ chế sinh ung thư khi phân tích các trường hợp ung thư nguyên bào võng mạc (retinoblastoma). Trong dạng di truyền của ung thư này, bố hoặc mẹ có thể bị bệnh và con cái có 50% khả năng nhận đột biến từ họ. Trong dạng tản phát (không di truyền), cả bố lẫn mẹ đều không bị bệnh và không làm tăng nguy cơ cho con cái họ. Một yếu tố quan trọng giúp phân biệt hai dạng này là trong ung thư võng mạc di truyền thường cả hai mắt đều bị

ảnh hưởng, trong khi đó ở dạng tản phát thường chỉ có một khối u và vì vậy chỉ có một mắt bị ảnh hưởng.

Knudson cho rằng phải có ít nhất hai đột biến để gây nên ung thư nguyên bào võng mạc. Đột biến thứ nhất làm thay đổi gene gây ung thư võng mạc; nếu đột biến này xảy ra ở dòng tế bào sinh dục thì nó sẽ hiện diện trong tất cả các tế bào của người con nhận allele đột biến. Đột biến thứ hai là một sự cố di truyền không đặc hiệu xảy ra trên một tế bào đã bị biến đổi trước đó.

Trong trường hợp ung thư nguyên bào võng mạc có tính gia đình, toàn bộ tế bào của cơ thể đều mang sẵn một gene đột biến (đột biến tổng thể: constitutional mutation), những người mang dạng đột biến này sẽ chỉ cần thêm một sự cố đột biến bổ sung trên một nguyên bào võng mạc là đủ để tế bào này phát triển thành một dòng tế bào ung thư. Trong các trường hợp tản phát, hai loại đột biến này phải xảy ra độc lập trên cùng một nguyên bào võng mạc, đây là một tình huống ngẫu nhiên vô cùng hiếm gặp trong tổ chức võng mạc, vì vậy đứa trẻ bị ung thư võng mạc theo kiểu này khó có thể phát triển thêm khối u thứ hai. Đối với người mang đột biến di truyền gen đột biến ung thư nguyên bào võng mạc chỉ cần thêm một đột biến bổ sung trên một nguyên bào võng mạc nào đó là đủ để một khối u phát triển, khả năng xảy ra đột biến thứ hai này có thể xảy ra không chỉ ở một nguyên bào võng mạc, điều này giải thích tại sao dạng này có thể gây u ở cả hai mắt.

Từ giả thuyết của Knudson có thể rút ra một nhận định quan trọng là các gene đột biến gây ung thư được di truyền có tính gia đình có lẽ cũng giống như các gene đột biến gây ra các loại ung thư phổ biến xảy ra ở các tế bào sinh dưỡng. Do đó nếu hiểu được bản chất của các allele đột biến được di truyền trong các gia đình mắc ung thư sẽ giúp chúng ta hiểu hơn về bản chất của các gene đột biến ở các tế bào sinh dưỡng gây ra những loại ung thư phổ biến và ngược lại.

3. Các nhóm gene ung thư chính

Các gene ung thư được chia thành ba nhóm chính là:

- Các gene bình thường ức chế sự sinh sản tế bào (gene ức chế sinh ung thư).
- Các gene hoạt hóa sự sinh sản tế bào (gene gây ung thư).
- Các gene tham gia vào quá trình sửa chữa DNA.

3.1. Các gene ức chế sinh ung thư (tumor suppressor genes)

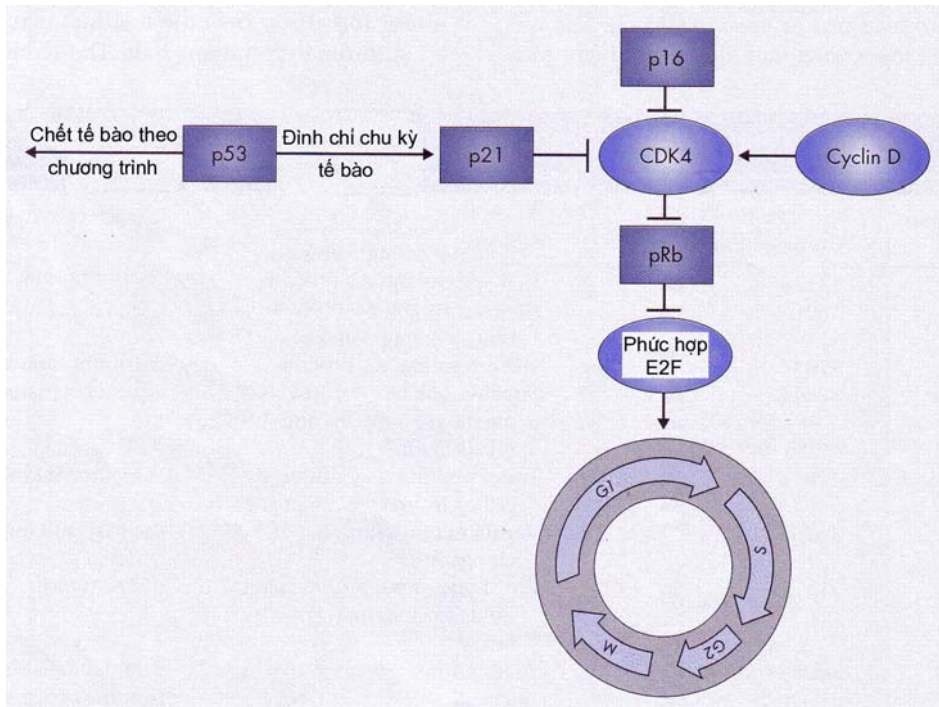
Các gene ức chế sinh ung thư có một tính chất chung là bình thường

chúng ức chế sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào do đó ngăn ngừa ung thư. Hoạt động này thường được thực hiện qua con đường điều hòa chu kỳ sinh sản tế bào. Khi chúng bị đột biến làm mất đi khả năng kiểm soát hoạt động sinh sản của tế bào sẽ làm phát sinh ung thư.

Đặc điểm biểu hiện của gene đột biến trong trường hợp này khá phức tạp. Ở mức độ cơ thể, các allele đột biến có biểu hiện kiểu di truyền trội, nghĩa là bệnh sẽ biểu hiện ở trạng thái dị hợp, nhưng ở mức độ tế bào allele đột biến này lại biểu hiện kiểu di truyền lặn, nghĩa là những tế bào mang kiểu gene ở trạng thái dị hợp sẽ không có biểu hiện bệnh. Sự phức tạp này được giải thích trên cơ sở của giả thuyết "two hit" của Knudson. Các cá thể nếu đã mang sẵn gene đột biến thứ nhất (cú "hit" thứ nhất) do di truyền thì lần đột biến thứ hai (cú "hit" thứ hai) xảy ra ở bất kỳ một tế bào nào đó sẽ gây ra ung thư, dẫn đến kiểu di truyền trội trong biểu hiện với tính thấm (penetrance) giảm do cơ thể đã mang cú "hit" thứ nhất có thể không xảy ra cú "hit" thứ hai. Trong trường hợp cú "hit" thứ nhất chỉ xảy ra ở một tế bào nào đó trong cơ thể thì để có thể phát sinh ung thư phải có một cú "hit" thứ hai xảy ra trên cùng tế bào đó, khả năng này rất hiếm và làm xuất hiện kiểu biểu hiện di truyền lặn ở mức tế bào.

Hầu hết các đột biến trên gene ức chế sinh ung thư xảy ra ở các tế bào dòng sinh dục do đó gây ra những hội chứng ung thư di truyền như trong trường hợp ung thư nguyên bào vồng mạc.

Một ví dụ cho sự mất khả năng kiểm soát chu kỳ sinh sản của tế bào là protein do gene *Rb1* trên NST 13 mã hóa (gọi là pRb) bị ức chế khi bị phosphoryl hóa bởi các enzyme kinase phụ thuộc cyclin (cyclin dependent kinases) nhưng sẽ ở trạng thái hoạt động khi không bị phosphoryl hóa một cách tương đối. Ở trạng thái hoạt động, pRb gắn với các thành viên trong phức hệ phiên mã E2F và bất hoạt chúng, phức hệ này có một vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy tế bào bước vào giai đoạn S (S: synthesis), giai đoạn tổng hợp DNA trong chu kỳ tế bào cho nên khi pRb hoạt động sẽ làm đình chỉ quá trình tăng sinh tế bào. Với tính năng như vậy bình thường pRb hoạt động như một cái "hãm" cho hoạt động sinh sản tế bào và khi pRb bị bất hoạt do bị phosphoryl hóa thì hoạt động sinh sản tế bào mới bắt đầu trở lại. Khi xảy ra các đột biến làm mất chức năng của gene *Rb1* hoặc trong những trường hợp gia tăng sự methyl hóa vùng 5' của gene này có thể dẫn tới tình trạng bất hoạt thường xuyên của gene, khi đó cơ chế kìm hãm hoạt động sinh sản của tế bào sẽ không còn nữa, tế bào sẽ tăng sinh không kiểm soát gây ra ung thư. (hình 2)



Hình 2: Tác động phức tạp giữa các tác nhân hoạt hoá và ức chế lên chu kỳ sinh sản của tế bào để điều hoà hoạt động sinh sản của tế bào.

pRb đóng vai trò như một cái "hãm" chính lên chu kỳ tế bào bằng cách gắn với phức hợp phiên mã E2F và làm ngừng tế bào trước khi vào pha S (giai đoạn nhân đôi DNA). Phức hợp cyclin D-CDK4 bất hoạt pRb bằng cách phosphoryl hóa protein này, vì thế giải phóng phức hợp E2F và cho phép tế bào thực hiện việc tổng hợp DNA để chuẩn bị cho việc nguyên phân. Các yếu tố ức chế CDK như p16 và p21 làm bất hoạt CDK, vì thế chúng cũng được xem là những bộ phận hãm khác trong chu kỳ sinh sản tế bào. p53 tác động thông qua p21, cũng có thể làm ngừng chu kỳ tế bào hoặc gây nên sự chết của tế bào theo chương trình (apoptosis) khi đáp ứng với thương tổn của DNA.

Một số gene ức chế sinh ung thư mã hoá cho chất ức chế kinase phụ thuộc cyclin, do đó ức chế hoạt động của các enzyme kinase phụ thuộc cyclin bằng cách ngăn cản hiện tượng phosphoryl hoá các enzyme này và bất hoạt các yếu tố như pRb vì vậy khi các gene đó bị đột biến sẽ dẫn đến hậu quả tương tự như khi xảy ra đột biến trên gene *RBI*.

Người ta đã phát hiện ra khoảng hơn 20 gene ức chế sinh ung thư. Đó là các gene mã hóa cho các yếu tố phiên mã (gene *TP53*), các yếu tố điều hòa chu kỳ tế bào (gene *RBI*), các yếu tố điều hoà việc tạo khung xương tế bào (gene *NF2*) v.v...

3.2. Gene sinh ung thư (oncogene)

Hầu hết các gene sinh ung thư có nguồn gốc từ các gene tiền ung thư (proto-oncogene). Đó là những gene liên quan đến bốn yếu tố cơ bản điều hòa sự tăng trưởng tế bào (yếu tố tăng trưởng, receptor của yếu tố tăng trưởng, các phân tử dẫn truyền tín hiệu, yếu tố phiên mã ở nhân). Khi đột biến xảy ra trong một gene tiền ung thư, gene này có thể trở thành gene sinh ung thư mà sản phẩm của nó sẽ gây ra tình trạng không kiểm soát được sự tăng trưởng và biệt hóa tế bào. Hiện tượng một tế bào chuyển từ dạng được kiểm soát sang trạng thái không được kiểm soát được gọi là hiện tượng chuyển dạng tế bào (transform).

Khác với gene ức chế sinh ung thư, các gene sinh ung thư mang tính trội ở mức tế bào với kiểu đột biến tăng chức năng (gain of function), nghĩa là chỉ cần một gene bị đột biến (trạng thái dị hợp) là đã có thể gây nên sự hình thành khối u. Các gene sinh ung thư thường thấy trong các dạng ung thư tân phát do đột biến xảy ra ở tế bào sinh dưỡng. Dạng đột biến loại này xảy ra trên các tế bào sinh dục gây ra các hội chứng ung thư di truyền được gặp không phổ biến. Để xác định các gene sinh ung thư (oncogene) đặc hiệu người ta thường sử dụng ba cách tiếp cận sau:

3.2.1. Nghiên cứu retrovirus

Retrovirus là loại virus RNA có khả năng sử dụng enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) để phiên mã ngược RNA thành DNA. Bằng cách này bộ gene RNA của retrovirus có thể được chuyển thành DNA và cài vào một nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ.

Khi gây nhiễm cho vật chủ các retrovirus có thể kết hợp một gen sinh ung thư của vật chủ vào bộ gene của nó và khi xâm nhập vào tế bào của một vật chủ khác nó có thể chuyển gene sinh ung thư này vào genome của vật chủ mới, làm chuyển dạng tế bào bình thường của vật chủ thành tế bào sinh ung thư.

Thông qua nghiên cứu các gene sinh ung thư được mang bởi các retrovirus gây chuyển dạng tế bào một số sản phẩm của gene có vai trò tiếp nhận và phiên giải các tín hiệu ngoại bào chỉ phối sự tăng trưởng và biệt hoá của tế bào đã được xác định.

3.2.2. Các thí nghiệm tải nhiễm (transfection experiment)

Việc nhận dạng và xác định vai trò của các gene sinh ung thư đã được bổ sung bằng các thí nghiệm mà trong đó các dạng đột biến của các gene tiền ung thư được chuyển từ các tế bào khối u sang tế bào bình thường (tải nhiễm) làm gây chuyển dạng các tế bào nhận.

Một nghiên cứu tải nhiễm đầu tiên là sự chuyển DNA từ dòng tế bào

ung thư bàng quang của người vào các tế bào chuột nhắt đã làm một số tế bào nhận bị chuyển dạng hoàn toàn. Việc dòng hoá và đánh giá các chuỗi DNA đặc hiệu của người hiện diện trong tế bào chuột đã chuyển dạng cho thấy gene gây chuyển dạng là một allele đột biến giống gene sinh ung thư Harvey *RAS* trước đây đã được nhận dạng qua các nghiên cứu retrovirus.

Việc tìm hiểu đặc tính của protein do dạng đột biến của gene *RAS* mã hoá đã cho thấy một cơ chế quan trọng trong việc điều hoà sự dẫn truyền các tín hiệu nội bào. Protein RAS bình thường (do gene tiền ung thư mã hoá) tương tác với các co-factor nucleotide guanine (co-factor: chất kết hợp với enzyme để gây ra phản ứng hoá học) và chuyển đổi giữa dạng hoạt động do gắn với GTP (guanosine triphosphate) làm kích thích sự tăng trưởng của tế bào và dạng không hoạt động do gắn với GDP (guanosine diphosphate). Dạng đột biến của protein này đã làm cho nó không thể chuyển từ dạng hoạt động (gắn với GTP) sang dạng không hoạt động (gắn với GDP) và vì vậy không thể đình chỉ được sự tăng trưởng tế bào được nữa.

3.2.3. Lập bản đồ gene trong khối u (mapping in tumors)

Một số loại ung thư liên quan đến các trường hợp tái sắp xếp nhiễm sắc thể đặc hiệu. Sự kết hợp giữa các trường hợp đột biến chuyển đoạn nhiễm sắc thể với các dạng ung thư này đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu chức năng của các gene sinh ung thư do những trường hợp chuyển đoạn như vậy có thể đã làm đứt gãy các gene trọng yếu kiểm soát việc tăng trưởng của tế bào. Thông qua việc nghiên cứu các vị trí tái sắp xếp của các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể trong trường hợp ung thư sẽ cho phép xác định các gene sinh ung thư mới.

Một ví dụ điển hình cho trường hợp này là nhiễm sắc thể Philadelphia, một chuyển đoạn giữa nhiễm sắc thể số 9 và số 22 làm hoạt hoá gene tiền ung thư *ABL* gây bệnh bạch cầu thể tuỷ mạn tính.

3.3. Gene sửa chữa DNA

Cơ chế sửa chữa DNA đóng một vai trò quan trọng trong việc đảm bảo cho tế bào thực hiện mọi chức năng một cách bình thường vì sự sao chép của DNA nhờ cơ chế này sẽ diễn ra một cách chính xác. Nhiều bệnh lý di truyền hiện đã được ghi nhận là do khiếm khuyết trong hệ thống sửa chữa DNA làm dẫn đến tính không ổn định của bộ gene (genomic instability), với biểu hiện đột biến xảy ra trên diện rộng, kể cả đứt gãy nhiễm sắc thể, lệch bội

Một số bệnh như khô da nhiễm sắc tố, hội chứng Bloom, hội chứng Werner... có một đặc điểm là sự gia tăng tỷ lệ của nhiều loại ung thư. Điều

này xảy ra do tính không ổn định của bộ gene trong các tế bào sinh dưỡng có thể đã ảnh hưởng đến quá trình điều hòa hoạt động của tế bào làm hình thành khối u. Nhiều hội chứng ung thư có tính di truyền, bao gồm ung thư vú gia đình và ung thư đại trực tràng không do polyp, xảy ra do liên quan đến các khiếm khuyết trong cơ chế sửa chữa DNA.

4. Sự tử vong của các tế bào ung thư

Ngay cả khi đã thoát khỏi sự kiểm soát của các chất ức chế sự hình thành khối u hoặc các protein sửa chữa DNA, các tế bào ung thư còn phải vượt qua thêm một trở ngại nữa trước khi có thể tăng sinh không giới hạn: đó là sự giới hạn nội sinh hạn chế sự tăng sinh của tế bào. Bình thường mỗi tế bào chỉ có thể nguyên phân từ 50 đến 70 lần, sau đó nó sẽ bị lão hoá (senescent) và không thể tiếp tục phân chia được nữa. Sở dĩ xảy ra hiện tượng này là do mỗi lần nguyên phân các đầu tận cùng của nhiễm sắc thể (telomere) sẽ ngắn đi một ít khi DNA thực hiện nhân đôi trong giai đoạn tổng hợp DNA ở mỗi chu kỳ tế bào. Khi chiều dài các đầu tận cùng này giảm đến một mức độ nhất định sẽ làm xuất hiện tín hiệu gây ra sự lão hoá tế bào. Quá trình này có một ý nghĩa quan trọng trong việc hạn chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư.

Các tế bào ung thư có khả năng vượt qua trở ngại này bằng cách hoạt hóa một gene mã hoá cho enzyme telomerase, enzyme này đóng vai trò thay thế cho các đoạn tận cùng của nhiễm sắc thể bình thường mất đi qua quá trình phân chia tế bào. Enzyme này hiếm khi có mặt trong tế bào bình thường nhưng luôn luôn có mặt trong các tế bào ung thư. Sự hoạt hoá của nó cho phép các tế bào ung thư sinh sản không hạn chế vì vậy khối u sẽ ngày mỗi lớn hơn và tích lũy ngày mỗi nhiều các đột biến trong bộ gene để làm nặng nề thêm tiến triển của tổ chức ung thư.

III. Nhận dạng các gene gây ung thư di truyền

Các phương pháp được nêu ở trên đã cho phép nhận dạng khá thành công nhiều gene sinh ung thư tuy nhiên chúng không cho phép xác định được các gene ức chế sinh ung thư gây ra hầu hết các dạng ung thư có tính di truyền. Có lẽ do những phương pháp đó đòi hỏi có sự biểu hiện theo kiểu trội trên kiểu hình của cơ thể mang đột biến trong khi đó các trường hợp đột biến gene ức chế sinh ung thư lại chủ yếu có biểu hiện theo kiểu lặn ở mức tế bào. Do đó để có thể nhận dạng những gene này đòi hỏi phải có những phương pháp khác.

Khi các gene đột biến gây ra các bệnh di truyền được truyền qua các thế hệ không thể xác định được bằng các phương pháp sinh hoá đã biết thì chúng sẽ được xác định dựa vào việc lập bản đồ gene và phát hiện các đột biến trên bệnh nhân. Để lập bản đồ của gene ung thư, cách phổ biến nhất

là thông qua việc phân tích sự di truyền của các cá thể mắc ung thư để xác định sự di truyền của gene đột biến. Các đoạn nhiễm sắc thể mang đột biến có thể được xác định thông qua phân tích sự liên kết với các marker đa hình (polymorphic marker).

Một cách khác để lập bản đồ của gene ung thư là dựa trên các trường hợp mất đoạn nhiễm sắc thể thường gặp trong các trường hợp ung thư do đột biến gene ức chế sinh ung thư. Như đã nói các đột biến di truyền loại này có tính lặn ở mức tế bào do đó nó không biểu hiện thành kiểu hình ung thư trừ khi ở trạng thái đồng hợp. Gene đột biến sẽ biểu hiện thành kiểu hình ung thư khi xảy ra mất đoạn một phần hay toàn bộ đoạn tương đồng trên nhiễm sắc thể tương đồng mang allele bình thường. Do đó bằng cách đánh giá các đoạn nhiễm sắc thể đặc hiệu bị mất trong các trường hợp ung thư sẽ giúp định vị gene đột biến. Trong trường hợp ung thư nguyên bào võng mạc, hiện tượng mất đoạn nhánh dài nhiễm sắc thể 13 ở những bệnh nhân này đã giúp tìm được gene ung thư nguyên bào võng mạc.

Tuy nhiên việc lập bản đồ gene này chỉ cho phép xác định một vùng trong đó có mất gene ung thư. Việc phát hiện các đột biến có mặt trên DNA của bệnh nhân mắc bệnh mới cho phép xác định các gene gây bệnh đặc hiệu.

Bằng cách này người ta đã xác định được một số gene gây ung thư như (1) gene (*NFI*) chịu trách nhiệm cho u xơ thần kinh type 1 được lập bản đồ ở trên nhánh dài nhiễm sắc thể 17 qua việc phân tích liên kết trong gia đình và được nhận dạng thông qua các dạng đột biến chuyển đoạn và các đột biến điểm ở bệnh nhân. (2) Các đột biến của gene *TP53* được tìm thấy trong hơn 50 loại ung thư khác nhau và chiếm hơn 50% ung thư. Gene này mã hoá cho yếu tố phiên mã mà có thể gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào hoặc cái chết tế bào theo chương trình (apoptosis) khi có thương tổn DNA. (3) Gene đa polyp có tính gia đình (*APC*) được phát hiện trong hơn 85% ung thư đại tràng. (4) Các gene đột biến gây ung thư đại tràng di truyền không polyp liên quan đến chức năng sửa chữa các sai sót trong quá trình bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung giữa các base nitric trong quá trình nhân đôi của DNA. (5) Các đột biến của gene *BRCA1* và *BRCA2* chịu trách nhiệm cho phần lớn các trường hợp ung thư vú di truyền, sản phẩm protein bình thường của các gene này tương tác với RAD51 là một loại protein sửa chữa sai sót trên DNA. (6) Đột biến mất chức năng của gene ức chế sinh ung thư (*CDKN2A*) có thể gây ra ung thư hắc tố (melanoma) có tính gia đình. Loại ung thư này cũng có thể xảy ra do đột biến làm hoạt hoá gene tiền đột biến (*CDK4*) v.v...

IV. Cơ sở phân tử của ung thư

Mỗi một gene có liên quan với các hội chứng ung thư di truyền đã được nhận dạng cung cấp cho chúng ta sự hiểu biết về cơ chế di truyền của quá trình sinh ung thư. Đó là những yếu tố quan trọng trong điều hoà hoạt động phiên mã của chu kỳ tế bào (gene *RBI*, *TP53*), dẫn truyền tín hiệu nội bào (*NFI*), sửa chữa DNA (*BRCA1*, *BRCA2*...), điều này hứa hẹn sẽ mang lại những hiểu biết sâu hơn về các quá trình này.

Một đặc điểm nổi bật của gần như tất cả các gene gây bệnh ung thư có tính di truyền đã được biết cho tới nay dường như đều có tính lặn ở mức tế bào. Nhận xét này gợi ý sự có mặt của một allele đột biến gây ung thư ở trạng thái dị hợp sẽ không được cơ thể dung nạp trong quá trình phát triển. Quan điểm này cũng được củng cố do sự phân bố khắp mọi loại tế bào của các sản phẩm của chúng. Vì chúng được biểu hiện gần như trong mọi loại tế bào nên có thể chúng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của phôi. Trong tương lai, sự hiểu biết đầy đủ về các gene này và chức năng của chúng sẽ góp phần quan trọng trong việc chẩn đoán sớm ung thư và can thiệp sớm.

Mặc dù những nghiên cứu về gene ung thư di truyền đã cung cấp nhiều hiểu biết lý thú, nhưng vẫn còn rất nhiều câu hỏi chưa trả lời được. Ví dụ, các gene ung thư di truyền được biểu hiện trong nhiều tổ chức, nhưng tại sao hầu hết các hội chứng ung thư di truyền lại được đặc trưng bởi những loại khối u rất đặc hiệu (ung thư vòm họng, ung thư xương đối với *RBI*; ung thư vú và ung thư buồng trứng đối với *BRCA1*)?. Tại sao các loại khối u liên quan đến sự biến đổi có tính di truyền của các gene ung thư lại khác với các loại khối u liên quan đến sự biến đổi trong tế bào sinh dưỡng của cùng gene đó? Mức độ liên quan và cách thức liên quan giữa các gene ung thư di truyền và các loại ung thư phổ biến không di truyền như thế nào ?

Nói chung các gene gây ra ung thư đã xác định được xếp thành ba nhóm: (1) Các gene đột biến sinh ung thư hoạt động như một yếu tố khởi động sự sinh sản của tế bào; (2) các gene ức chế sinh ung thư khi bị đột biến làm mất khả năng ức chế sự sinh sản của tế bào và (3) đột biến của các gene sửa chữa DNA gây ra sự gia tăng tần số đột biến của các gene sinh ung thư và ức chế sinh ung thư.

Các kỹ thuật mới hiện nay trong lĩnh vực di truyền và sinh học phân tử cho phép xác định các gene đột biến đặc hiệu liên quan đến những loại ung thư đặc hiệu, những thông tin trong lĩnh vực này sẽ giúp các nhà nghiên cứu và nhà lâm sàng tìm ra những biện pháp hữu hiệu hơn trong chẩn đoán và điều trị bệnh nhân ung thư.

Chương 14

Phòng và chẩn đoán bệnh di truyền & dị tật bẩm sinh

I. Chẩn đoán trước sinh

1. Mục tiêu và lợi ích của chẩn đoán trước sinh

Mục tiêu chính của chẩn đoán trước sinh (prenatal diagnosis) là cung cấp cho các gia đình có nguy cơ các thông tin cần thiết để họ có thể lựa chọn trong quá trình mang thai.

Những lợi ích của chẩn đoán trước sinh bao gồm:

- Tái khẳng định cho các gia đình có nguy cơ yên tâm khi kết quả chẩn đoán là bình thường.
- Cung cấp thông tin về nguy cơ đối với các cặp vợ chồng mà nếu không có những thông tin như thế họ sẽ không dám mang thai.
- Chuẩn bị về mặt tâm lý cho cặp vợ chồng trước việc ra đời một đứa trẻ khuyết tật.
- Giúp các nhà chuyên môn lên kế hoạch can thiệp trong cuộc đẻ, quản lý và săn sóc sức khỏe cho trẻ sau khi đã chẩn đoán trẻ mắc một bệnh di truyền nào đó.
- Cung cấp thông tin về nguy cơ đối với các cặp vợ chồng mà việc chấm dứt thai kỳ là một vấn đề có thể phải đặt ra.

2. Các test trong chẩn đoán trước sinh

Chẩn đoán trước sinh bao gồm các test sàng lọc (screening test) và test chẩn đoán (diagnostic tests).

2.1. Test sàng lọc

Test sàng lọc là test có độ chính xác không lớn nhưng giá thành thấp, dễ thực hiện, do đó cho phép thực hiện trên một lượng lớn cá thể. Một kết quả bất thường của test sàng lọc sẽ chỉ định cho các test chẩn đoán tiếp theo.

Ví dụ: đánh giá alpha - Fetoprotein (AFP) trong máu mẹ vào tuần thứ 15 của thai kỳ để sàng lọc các trường hợp bất thường ống thần kinh của thai nhi.

2.2. Test chẩn đoán

Test chẩn đoán được sử dụng để chẩn đoán xác định các trường hợp

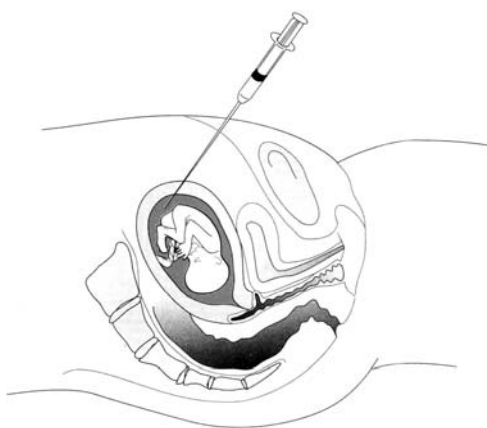
ngihtừngmangbấthướng.

Ví dụ: Thựchiệntestchẩndóánbằngruờicẩytếbàonướcoĩđốivớinhữngsảnpựtừ35tuổitrởlêndepháthiệncáctrườghợthainhi mắctrisomy.

3. Cáckỹthuậtrongchẩndóántrướcsinh

Cónhiềukỹthuậphứcvựchocôngtápchẩndóántrướcsinh, trongphầnnàychỉđềcậptđếncáckỹthuậphổbiệndượcsửdụngtrongchẩndóán trướcsinh: (1) Ruờicẩytếbàonướcoĩ; (2) Lấymẫunhưngmaomàng đẹm; (3) Siêủâm.

3.1. Ruờicẩytếbàonướcoĩ (amniocentesis)



Hình 1: Kỹ thuật lấy nước ối để phục vụ việc nuôi cấy tế bào nước ối

Việcruờicẩytếbàonướcoĩđượcthựchiệnvàotuầnlễthứ15đếnc17củathai kỳtínhtừlầnhànhkinhcuối (last menstrual period: LMP).

Kỹthuậnnàyđượcthựchiệnbằncách

1. Đưakimxuyêncủathànhbụngvàotrongkhoangổisaukhiđãsửdụngsiêủâmdểđịnhvịbánnhauvàxácdịnhvịtrícủathainhi(hình1).

2. Rútratừ20đếnc30mlnướcoĩ, trongdịchnàycó cáctế

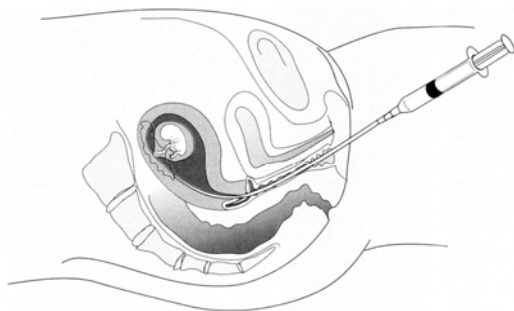
bàosốngbongratừthainhiđượcgóilà cáctếbàonướcoĩ (amniocyte).

3. Cácnghiêncứudi truyềntếbàohócsẽđượcthựchiệnsaukhiruờicẩytếbàodegiatăngsốlượngtếbào. Kếtkhảxét nghiệmtườngthườngthôngbáosautừ10đếnc12ngày.

Cáctếbàocũngcóthểđượcsửdụngchocácxét nghiệmsinh hóa, FISH haychẩndóánDNA. XétnghiệmalphaFetoprotein củadịchổicũng đượcthựchiệndeđánh giá cáckhuyếttậtcủatởngthầnkinh.

3.2. Lấymẫunhưngmaomàng đẹm (chorionic villus sampling: CVS)

Kỹthuậnlấymẫunhưngmaomàng đẹmđượcthựchiệnbằncách hút từ mô lá ruời (trophoblast tissue) củathainhi quathườngổ tử cung hoặccủathànhbụng(hình2).



Hình 2: Kỹ thuật lấy mẫu nhung mao màng đệm

Vì kỹ thuật này thường được thực hiện vào tuần lễ thứ 10 tới 11 sau lần có kinh cuối do đó cho phép chẩn đoán nhanh hơn so với kỹ thuật nuôi cấy tế bào nước ối. Điều này đặc biệt quan trọng đối với các cặp vợ chồng nằm trong đối tượng cần xem xét khả năng chấm dứt thai kỳ.

Việc nuôi cấy tế bào được thực hiện như trong kỹ thuật

nuôi cấy tế bào nước ối và có thể phân tích trực tiếp các tế bào lá nuôi (do đang phát triển một cách nhanh chóng nên chúng trở thành vật liệu cho các nghiên cứu phân tích di truyền tế bào).

Một hạn chế của kỹ thuật này là không đánh giá được AFP của nước ối do đó những sản phụ đã thực hiện CVS sẽ được đo nồng độ AFP trong máu vào tuần lễ thứ 15 đến 16 tính từ lần có kinh cuối để sàng lọc các khuyết tật của ống thần kinh.

4. Siêu âm (ultrasonography)

Hiện nay siêu âm đã trở thành một công cụ được sử dụng rộng rãi nhất để quan sát thai nhi và hết sức hữu ích trong việc phát hiện nhiều loại dị dạng của thai (bảng 1). Đây cũng là phương tiện hỗ trợ đắc lực cho việc thực hiện các kỹ thuật lấy nước ối, CVS, và PUBS.

Thông thường các bất thường của thai được phát hiện trong khi sử dụng siêu âm để đánh giá một số các chỉ định trong sản khoa như xác định tuổi thai, thai phát triển kém hay bất thường của dịch ối.

Nhiều nước châu Âu đã thực hiện thường quy việc sàng lọc bằng siêu âm cho tất cả các trường hợp mang thai ở 3 tháng giữa của thai kỳ.

II. Tư vấn di truyền

1. Mục đích của công tác tư vấn di truyền

Tư vấn di truyền là công việc nhằm giải quyết mối liên hệ giữa con người với sự xuất hiện hoặc nguy cơ xuất hiện của một bệnh di truyền trong một gia đình. Công việc này liên quan đến sự nỗ lực của một hoặc một số người được đào tạo chuyên ngành để giúp đỡ cho một cá nhân hay một gia đình với những mục đích sau:

Bảng 1: Một số các dị dạng bẩm sinh có thể được chẩn đoán bằng siêu âm

<i>Triệu chứng phức tạp</i>	<i>Hệ thần kinh trung ương</i>
Thai nước (hydrop) Thiếu ối (oligohydramnios) Đa ối (polyhydramnios) Chậm phát triển trong tử cung	Quái thai vô não (anencephaly) Thoát vị não (encephalocele) Não úng thủy (hydrocephalus) Não trước không phân chia (holoprosencephaly)
<i>Bụng / khung chậu</i>	<i>Hệ xương</i>
Trật hẹp dạ dày ruột (gastro-intestinal atresis) Tật nứt bụng (gastroschisis) Tật bọc rốn (omphalocele) Thận nang (cystic kidneys) Không phát triển thận (renal agenesis) Tật thận ứ nước (hydronephrosis)	Các khuyết tật giảm sản chi (limb reduction defects) Nhiều loại tật loạn dưỡng sụn (chondro-dystrophies)
<i>Sọ mặt (craniofacial)</i>	<i>Lồng ngực</i>
Khe hở môi (cleft lip)	Bệnh tim bẩm sinh Thoát vị cơ hoành (diaphragmatic hernia)

1. Cung cấp những thông tin trong lĩnh vực y học bao gồm chẩn đoán, diễn biến của bệnh, các phương tiện hỗ trợ và điều trị hiện có.
2. Thông tin về khả năng di truyền của bệnh, nguy cơ tái phát ở những thành viên trong gia đình cũng như những thay đổi có thể xảy ra liên quan đến nguy cơ này.
3. Giúp lựa chọn những biện pháp thích hợp với nguy cơ của bệnh, mục đích của gia đình bệnh nhân, phù hợp với các tiêu chuẩn về đạo đức, tôn giáo của gia đình.
4. Thực hiện những biện pháp can thiệp tốt nhất trong khả năng cho phép đối với người mắc bệnh di truyền và với nguy cơ tái phát của bệnh đó trong gia đình.

2. Các chỉ định cho công tác tư vấn di truyền

Công tác tư vấn di truyền được chỉ định trong những trường hợp sau:

1. Trước đây gia đình đã có một trẻ với nhiều dị tật bẩm sinh, chậm phát triển trí tuệ hoặc một dị tật chính như khuyết tật của ống thần kinh, khe hở môi hàm.
2. Có tiền sử gia đình đối với một bệnh di truyền như hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy, đái đường v.v...
3. Chẩn đoán trước sinh trong trường hợp mẹ lớn tuổi hoặc những chỉ định khác.
4. Tình trạng hôn nhân đồng huyết.
5. Phơi nhiễm với các tác nhân gây quái thai như các hoá chất công nghiệp, rượu, các loại dược phẩm.
6. Vô sinh hoặc sảy thai liên tiếp
7. Một bệnh lý di truyền hoặc bất thường mới được chẩn đoán
8. Trước khi thực hiện các test di truyền và sau khi nhận được kết quả của các test đó, đặc biệt là những test đánh giá tình trạng khởi bệnh muộn như ung thư hoặc các bệnh liên quan đến hệ thần kinh.
9. Khi theo dõi một trẻ sơ sinh được chẩn đoán dương tính với một bệnh di truyền nào đó như bệnh PKU hay được xác định là ở trạng thái dị hợp tử nhờ test sàng lọc.

Thông thường những người tìm đến với nhà tư vấn di truyền là bố mẹ của trẻ mắc một khuyết tật di truyền hoặc nghi ngờ là di truyền, nhưng đôi khi họ có thể là những người trưởng thành mang một bất thường nào đó hoặc có tiền sử gia đình đối với bất thường đó. Tư vấn di truyền cũng không thể thiếu trong trường hợp thực hiện các test chẩn đoán trước sinh, test chẩn đoán các bệnh di truyền và các chương trình sàng lọc.

3. Ngăn ngừa sự tái phát trong gia đình

Đối với nhiều gia đình, mục đích chính của họ khi tìm kiếm sự tư vấn di truyền là xác định nguy cơ của bệnh di truyền trên con cái của họ và tìm hiểu về những khả năng hiện có để ngăn ngừa sự tái phát của một bệnh di truyền nào đó. Chẩn đoán trước sinh là một biện pháp hữu hiệu thường được đưa ra để giải quyết vấn đề này nhưng đây không phải là một giải pháp chung cho mọi loại bệnh lý di truyền. Nhiều bệnh lý di truyền không thể thực hiện được bằng chẩn đoán trước sinh và nhiều bố mẹ vì những lý do khác nhau không chấp nhận biện pháp này cho dù tính hiệu quả của nó. Dưới đây giới thiệu một số biện pháp khác được thực hiện

nhằm ngăn ngừa sự tái phát của bệnh:

1. Các xét nghiệm di truyền học như lập bộ nhiễm sắc thể, phân tích các chỉ số hoá sinh, phân tích DNA v.v...đôi khi cho phép tái khẳng định cho các cặp vợ chồng có tiền sử gia đình mắc một bệnh di truyền nào đó là họ không có nguy cơ sinh ra đứa con mắc loại bệnh đó. Trong những trường hợp khác, những xét nghiệm trên xác định ai là người có nguy cơ trong việc truyền bệnh. Tư vấn di truyền được thực hiện cả trước và sau các xét nghiệm trên để giúp định hướng trong việc thực hiện các xét nghiệm di truyền và phiên giải các kết quả xét nghiệm đó.
2. Nếu các bố mẹ có kế hoạch không có thêm con hoặc không có con, việc ngừa thai hoặc triệt sản là những biện pháp được lựa chọn, và họ cần được thông tin đầy đủ về những biện pháp này.
3. Đối với các bố mẹ muốn có con hoặc có thêm con thì việc xin con nuôi là một khả năng được đề nghị.
4. Thụ tinh nhân tạo bằng nguồn tinh trùng khác là một giải pháp phù hợp nếu người bố sở hữu một gene bệnh trội nằm trên NST thường hoặc di truyền liên kết với NST giới tính X, tuy nhiên đây không phải là một chỉ định đúng đối với trường hợp mẹ mang gen đột biến như vậy. Biện pháp này cũng tốt đối với trường hợp cả hai bố mẹ đều là người mang gene lặn đột biến trên NST thường. Việc sử dụng trứng hiến tặng cũng là một giải pháp phù hợp đối với trường hợp mẹ mang gene đột biến hoặc mang gene bệnh di truyền liên kết với NST giới tính X. Lẽ tất nhiên việc tư vấn di truyền và các xét nghiệm di truyền cần thiết đối với tình trạng và trứng hiến tặng là một việc làm cần thiết.
5. Trong một số bệnh lý di truyền, việc phân tích DNA của phôi trước khi bước vào giai đoạn làm tổ có thể được thực hiện bằng kỹ thuật PCR từ DNA của một tế bào phôi tách ra trong quá trình cấy phôi trong kỹ thuật thụ tinh nhân tạo. Đối với một số cặp vợ chồng quyết định không sử dụng phôi do mang bất thường về di truyền sẽ dễ chấp nhận hơn so với quyết định phải phá thai trong giai đoạn muộn hơn.
6. Nếu bố mẹ quyết định chấm dứt thai kỳ họ cần được tư vấn đầy đủ và theo dõi sau khi thực hiện quyết định này. ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Hồ Huỳnh Thuỳ Dương. *Sinh Học Phân Tử*. 1998. Nhà xuất bản Giáo dục.
2. Phạm Thành Hồ. *Di Truyền Học*. 1998. Nhà xuất bản Giáo dục.
3. Ngô Gia Thạch, Trịnh Văn Bảo, Phạm Văn Phùng. *Từ Điển Di Truyền Y Học*. 1983. Nhà xuất bản Y học

Tiếng Anh

4. John H.D. *Medical Dictionary for the Health Professional*. 1997, 3rd edition. Williams & Wilkins
5. Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., Raymond L.W. *Medical Genetics*, 2003. 3rd edition, Mosby.
6. Peter D.T.; Sian E. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 2005, 12th edition, Elsevier Churchill Livingstone.
7. Peter S.H. *Practical Genetic Counselling*. 2004, 6th edition. Arnold.
8. Ricki L. *Human Genetics: Concepts and Applications*. 2002, 4th edition. McGrall- Hill.
9. Robert L.N., Roderick R.M., Huntington F.W. *Genetics in Medicine*. 2004, 4th edition. Thompson & Thompson.
10. Thomas D.G., Francis S.C.; David G. *Medical Genetics*, 1998. 2nd edition, Williams & Wilkins