

## SỬ DỤNG KỸ THUẬT QF-PCR TRONG CHẨN ĐOÁN MỘT SỐ NGUYÊN NHÂN DI TRUYỀN THƯỜNG GẶP Ở NAM GIỚI VÔ SINH

Cao Thị Tài Nguyên<sup>1,✉</sup>, Nguyễn Trung Kiên<sup>1</sup>, Trịnh Thị Bích Liên<sup>3</sup>, Vũ Thị Nhuận<sup>1</sup>, Nguyễn Chung Viêng<sup>3</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Bích Ngọc<sup>3</sup>, Trịnh Minh Thiết<sup>1</sup>, Cao Lương Bình<sup>1</sup>, Nguyễn Phan Vinh<sup>3</sup>, Nguyễn Văn Khuôn<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

<sup>2</sup>Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Bệnh viện Phụ sản Thành phố Cần Thơ

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: cttnguyen@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.8.2017

Ngày nhận đăng: 15.5.2018

### TÓM TẮT

Hiện nay, kỹ thuật QF-PCR (QF-PCR - Quantitative fluorescence – Polymerase chain reaction) đang được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán trước sinh một số hội chứng, bệnh tật di truyền như hội chứng Down, Patau và Edwards. Ưu điểm của kỹ thuật này là độ chính xác cao, trả kết quả xét nghiệm nhanh và khả năng áp dụng rộng trên quy mô lớn. Tại Bệnh viện Từ Dũ, Thành phố Hồ Chí Minh, kỹ thuật này đã được sử dụng để phát hiện mất đoạn AZF (AZF – Azoospermia factor) bằng kit của Devyser. Điểm mới của nghiên cứu là đã tạo ra kit với 14 chỉ dấu di truyền và xây dựng được quy trình kỹ thuật QF-PCR để phát hiện một số nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới khám vô sinh có mật độ tinh trùng  $\leq 5$  triệu/mL. Nhằm khẳng định kết quả QF-PCR là chính xác và đáng tin cậy, chúng tôi tiến hành đánh giá độ tin cậy. Nghiên cứu ứng dụng quy trình QF-PCR đã xây dựng để xét nghiệm 10 mẫu DNA nam giới có khả năng sinh sản bình thường, 2 mẫu DNA của nam giới mắc hội chứng Klinefelter, 4 mẫu DNA của nam giới mất đoạn AZFc, 1 mẫu DNA của nữ giới có khả năng sinh sản bình thường và 1 mẫu nước cất. Kiểm định cho thấy kit với 14 chỉ dấu di truyền và quy trình QF-PCR đã xây dựng có độ chính xác 100% so với kỹ thuật multiplex-PCR và phương pháp nuôi cấy bạch cầu lympho máu ngoại vi. Kết quả nghiên cứu là tiền đề quan trọng giúp phát hiện một số nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới khám vô sinh, đồng thời hỗ trợ bác sỹ xây dựng được phác đồ chữa hiếm muộn cho bệnh nhân một cách hiệu quả nhất.

**Từ khóa:** Hội chứng Klinefelter; không có tinh trùng; mất đoạn AZF; QF-PCR; thiếu tinh nạng

### GIỚI THIỆU

Có nhiều nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới, trong đó nguyên nhân di truyền chiếm 4-38% (Mafra *et al.*, 2011; Cavkaytar *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Ambulkar *et al.*, 2013; Naasse *et al.*, 2015). Tại Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về nguyên nhân di truyền gây vô sinh nam ở nam giới có mật độ tinh trùng  $\leq 5 \times 10^6$ /mL. Hội chứng Klinefelter và các mất đoạn AZF là những nguyên nhân di truyền thường gặp nhất hiện nay ở nam giới khám vô sinh (Nguyễn Minh Hà, 2011; Nguyễn Thị Việt Hà, 2012; Phan Thị Hoan, 2012; Trần Văn Khoa *et al.*, 2013; Nguyễn Đức Nhựt, 2015). Trên nhiễm sắc thể Y có các đoạn AZF liên quan đến quá trình sinh tinh ở nam giới. Các đoạn AZF gồm có AZFa, AZFb, AZFc và AZFd; trong đó đoạn AZFd

nằm trong đoạn AZFc và thường không ảnh hưởng nhiều đến quá trình sinh tinh (Li *et al.*, 2015). Nam giới bị mất đoạn AZF sẽ có kết quả tinh dịch đồ từ không có tinh trùng đến thiếu tinh nhẹ hoặc nặng (Krausz *et al.*, 2014).

Hiện nay, theo Viện Nam học Châu Âu/Mạng lưới kiểm định chất lượng Di truyền phân tử Châu Âu (EAA/EMQN - European Academy of Andrology/European Molecular Genetics Quality Network) khuyến cáo nên sử dụng 6 chỉ dấu di truyền sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 và sY255 để phát hiện mất đoạn AZFa, AZFb và AZFc (Krausz *et al.*, 2014). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Rozen *et al.*, (2012) cho thấy Việt Nam (mẫu thu thập ở Hà Nội và Huế) là nước có tỷ lệ mất một phần đoạn AZFc cao nhất (16%), thấp hơn là Tunisia và Ấn Độ (7,8% và 7,7%), kể đó là

Ba Lan (4,8%) và thấp nhất là Mỹ (3%). Tác giả sử dụng chỉ dấu di truyền sY1189, sY1191, sY1192, sY1291 để phát hiện các kiểu mất một phần đoạn AZFc. Mất đoạn kiểu gr/gr (không có sản phẩm PCR của sY1189 và sY1291) chiếm 16% (16/107) và mất đoạn b2/b3 (không có sản phẩm PCR của sY1191 và sY1192) chiếm 0,93% (1/107) (Rozen *et al.*, 2012).

Trên cơ sở đó, nghiên cứu sử dụng các chỉ dấu di truyền sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY1191, sY1192 và sY1291. Ngoài ra, để có thể phát hiện hội chứng Klinefelter và một số đoạn gen đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y, nghiên cứu sử dụng thêm các chỉ dấu di truyền AMEL, TAF9B, DAZ, CDY, SRY. Như

vậy, đề tài sử dụng 14 chỉ dấu di truyền.

Hiện nay, tại các phòng xét nghiệm di truyền sử dụng kỹ thuật nuôi cấy bạch cầu lympho máu ngoại vi và multiplex PCR để phát hiện các nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới khám vô sinh. Bệnh nhân tốn thời gian và chi phí để đến bệnh viện làm xét nghiệm 2 lần. Kỹ thuật QF-PCR có thể phát hiện đồng thời bất thường số lượng nhiễm sắc thể và mất đoạn AZF chỉ trong một lần làm xét nghiệm (Majumder *et al.*, 2015). Vì vậy, nhiều tác giả đề xuất áp dụng kỹ thuật này trong chẩn đoán tìm nguyên nhân di truyền ở nam giới vô sinh (Qi *et al.*, 2011; Yuanyuan *et al.*, 2014).

**Bảng 1.** Các chỉ dấu di truyền dùng phát hiện một số nguyên nhân di truyền ở nam giới khám vô sinh.

Chỉ dấu di truyền	Vị trí nhiễm sắc thể	Trình tự mồi (5'-3')	Màu huỳnh quang	Kích thước sản phẩm PCR tham khảo (bp)	Nguồn tham khảo
sY84-F	AZFa	F: AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT	NED	328	Krausz <i>et al.</i> (2014)
sY84-R		R: GCCTACTACCTGGAGGCTTC			
sY86-F	AZFa	F: GTGACACACAGACTATGCTTC	VIC	318	Krausz <i>et al.</i> (2014)
sY86-R		R: ACACACAGAGGGACAACCCCT			
sY127-F	AZFb	F: GCACCCACTGGAATCTACC	FAM	194	Fu <i>et al.</i> (2012)
sY127-R		R: CATGGCTACACAGACAGGGA			
sY134-F	AZFb	F: GTCTGCCTCACCATAAAACG	NED	301	Krausz <i>et al.</i> (2014)
sY134-R		R: ACCACTGCCAAAACCTTCAA			
sY254-F	AZFc	F: GGGTGTACCAGAAGGCAAA	FAM	380	Krausz <i>et al.</i> (2014)
sY254-R		R: GAACCGTATCTACCAAAGCAGC			
sY255-F	AZFc	F: GTTACAGGATTCGGCGTGAT	FAM	124	Krausz <i>et al.</i> (2014)
sY255-R		R: CTCGTCATGTGCAGCCAC			
sY1191-F	AZFc	F: CCAGACGTTCTACCCTTTCG	VIC	385	Rozen <i>et al.</i> (2012)
sY1191-R		R: GAGCCGAGATCCAGTTACCA			
sY1192-F	AZFc	F: ACTACCATTCTGGAAGCCGG	NED	255	Rozen <i>et al.</i> (2012)
sY1192-R		R: CTCCTTGGTTCATGCCATT			
sY1291-F	AZFc	F: TAAAAGGCAGAAGTCCAGG	VIC	527	
sY1291-R		R: GGGAGAAAAGTTCTGCAACGT			
SRY-F	Yp11.2- p22.1	F: GAATATCCCGCTCTCCGGA	FAM	470	Fu <i>et al.</i> (2012)
SRY-R		R: GCTGGTGCTCCATTCTTGAG			
CDY-F	AZFc	F: GTTTCTTCCACTGTAGAAATCACCTCC	VIC	206	Plaseska <i>et al.</i> (2011)
CDY-R	AZFb	R: GAAGTTTGCATAGTGGACAGC		199	
AMEL-F	Xp22.1-p22.31	F: CCCTGGGCTCTGTAAGAATAGTG	FAM	106	Xingmei and Liang (2014)
AMEL-R	Yp11.2 - p22.1	R: ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG		112	
TAF9B-F	X	F: TTTGACAGGTAGTTTTGGGTCA	FAM	152	Plaseska <i>et al.</i> (2011)
TAF9B-R	Nhiễm sắc thể 3	R: TGGTTTTGCCTAGGTCCAGT		148	
DAZ-F	AZFc	F: TTAAGTACTACTGTAGACACC	FAM	214	Alimardanian <i>et al.</i> (2016)
DAZL-R	Nhiễm sắc thể 3	R: GTTCTTGATAATGTAGAAGAGTAGAGC		217	

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 10 mẫu DNA nam giới có khả năng sinh sản bình thường, 4 mẫu DNA của nam giới vô sinh bị mất đoạn AZFc đã được bộ môn Y Sinh học – Di truyền - Đại học Y Hà Nội và Học viện Quân Y Hà Nội xác định bằng kỹ thuật Multiplex-PCR; 2 mẫu ADN của nam giới vô sinh mắc hội chứng Klinefelter do Bộ môn Y Sinh học –

Di truyền – Học Viện Quân Y Hà Nội xác định bằng phương pháp nuôi cấy bạch cầu lympho máu ngoại vi, 1 mẫu DNA của nữ giới có khả năng sinh sản bình thường và 1 mẫu nước cất.

Nghiên cứu được tiến hành với sự tuân thủ về mặt y đức, được chấp thuận của Sở Khoa học Công nghệ Cần Thơ, Bệnh viện Phụ sản Thành phố Cần Thơ, Trường Đại học Cần Thơ, được sự đồng ý của đối tượng nghiên cứu. Các sinh phẩm được hủy ngay sau khi nghiên cứu, không sử dụng cho bất kỳ mục đích nào khác.

**Bảng 2.** Thành phần phản ứng QF-PCR set 1 để phát hiện một số nguyên nhân di truyền ở nam giới khám vô sinh.

Thành phần	Nồng độ cuối cùng (pmol)	Thể tích cho 1 mẫu (µL)
Multiplex PCR 5X mastermix	1X	5
sY254 – F	5	0,5
sY254 – R	5	0,5
sY255 – F	5	0,5
sY255 – R	5	0,5
sY1191 – F	5	0,5
sY1191 – R	5	0,5
sY1192 – F	5	0,5
sY1192 – R	5	0,5
Nước cất 2 lần vô trùng		Vừa đủ
ADN của bệnh nhân	10ng	1
<b>Tổng</b>		<b>25</b>

**Bảng 3.** Thành phần phản ứng QF-PCR set 2 để phát hiện một số nguyên nhân di truyền ở nam giới khám vô sinh.

Thành phần	Nồng độ cuối cùng (pmol)	Thể tích cho 1 mẫu (µL)
Multiplex PCR 5X mastermix	1X	5
AMEL – F	5	0,5
AMEL – R	5	0,5
CDY – F	5	0,5
CDY – R	5	0,5
DAZ – F	5	0,5
DAZ – R	5	0,5
TAF9B – F	5	0,5
TAF9B – R	5	0,5
SRY – F	5	0,5
SRY – R	5	0,5
Nước cất 2 lần vô trùng		Vừa đủ
ADN của bệnh nhân	10 ng	1
<b>Tổng</b>		<b>25</b>

### Phương pháp nghiên cứu

Tham khảo từ nhiều nguồn, nghiên cứu đã tạo ra kit và xây dựng quy trình QF-PCR để xác định một

số nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới khám vô sinh với 14 chỉ dấu di truyền (Bảng 1).

- Các bước tiến hành:

**Bước 1:** Tạo ra kit với 14 chỉ dấu di truyền. Kit được tối ưu theo 3 set phản ứng:

+ Set 1 sử dụng 4 chỉ dấu di truyền là sY254, sY255, sY1191 và sY1192 theo thành phần phản ứng ở bảng 2.

+ Set 2 sử dụng 5 chỉ dấu di truyền là AMEL, CDY, DAZ, TAF9B và SRY theo thành phần phản ứng ở bảng 3.

+ Set 3 sử dụng 5 chỉ dấu di truyền là sY84, sY86, sY127, sY1291 và sY134 theo thành phần phản ứng ở bảng 4.

**Bảng 4.** Thành phần phản ứng QF-PCR set 3 để phát hiện một số nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới vô sinh.

Thành phần	Nồng độ cuối cùng (pmol)	Thể tích cho 1 mẫu (µL)
Multiplex PCR 5X mastermix	1X	5
sY84 – F	5	0,5
sY84 – R	5	0,5
sY127 – F	5	0,5
sY127 – R	5	0,5
sY1291 – F	5	0,5
sY1291 – R	5	0,5
sY134 – F	5	0,5
sY134 – R	5	0,5
Nước cất 2 lần vô trùng		Vừa đủ
ADN của bệnh nhân	10 ng	1
<b>Tổng</b>		<b>25</b>

**Bước 2:** Xây dựng và tối ưu quy trình kỹ thuật QF-PCR với kit trên.

+ Spin down các tuýp chứa các set phản ứng với 800 vòng/phút trong 5 giây.

+ Phản ứng được thực hiện trên máy PCR Mastercycler Pro S-Eppendorf (Đức). Chu trình nhiệt PCR của set 1 và set 2 như sau:

94°C - 2 phút; [94°C - 30 giây, 56°C - 1 phút, 68°C - 1 phút 30 giây], 30 chu kỳ; 68°C- 10 phút

Chu trình nhiệt PCR của set 3 thực hiện tương tự nhưng nhiệt độ gắn mồi là 58°C.

+ Điện di mao quản đã xây dựng và tối ưu: Trộn 3 set phản ứng QF-PCR lại vào chung 1 tuýp để chuẩn bị điện di. Điện di mao quản sản phẩm PCR huỳnh quang trên máy phân tích di truyền ABI 3500: cho 4 µL size standard (LIZ600) và 200 µL Hi-Di Formamide vào tuýp 1,5 mL, vortex và spin down 800 vòng/phút trong 5 giây, cho 10 µL hỗn hợp trên vào đĩa có 96 giếng, thêm vào 0,5 µL sản phẩm PCR huỳnh quang và đặt vào máy phân tích di truyền ABI 3500 ở điều kiện sau: application type fragment, cap 50 cm, polymer Pop 7, dyeset G5, over temperature 60 giây, run time 1300 giây, run voltages 19,5 Kvol, prerun time 180 giây, prevoltage 15 Kvol, injection time 15 giây, injection voltage 3,0 Kvol; data delay 1

giây. Bảo quản sản phẩm PCR huỳnh quang vào ngăn mát 4°C.

+ Phân tích kết quả bằng phần mềm Genemarker V2.6.3.

**Bước 3:** Ứng dụng quy trình đã tối ưu vào kiểm tra các mẫu ADN.

**Bước 4:** So sánh kết quả QF-PCR với các kết quả của kỹ thuật khác.

**Bước 5:** Đánh giá độ tin cậy quy trình đã xây dựng và tối ưu của kỹ thuật QF-PCR.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhằm khẳng định kết quả QF-PCR là chính xác và đáng tin cậy, đề tài đã so sánh kết quả QF-PCR với kết quả của các kỹ thuật khác. Đồng thời, kết quả QF-PCR được so sánh với kích thước sản phẩm PCR tham khảo trên ngân hàng cơ sở dữ liệu của NCBI (Phiên bản GRCh38.p7) và một số nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng kỹ thuật QF-PCR trong phát hiện một số bệnh tật di truyền ở người.

Kết quả QF-PCR được thể hiện bằng kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang được khuếch đại bằng các chỉ dấu di truyền. Kết quả nghiên cứu các kích thước này được chia làm 3 nhóm là bằng, ngắn

hơn hoặc dài hơn so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo. Kích thước sản phẩm PCR tham khảo là kích thước đoạn gen được công bố trên NCBI (Phiên bản GRCh38.p7). Nhóm 1 có kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang bằng kích thước sản phẩm PCR tham khảo (4 chỉ dấu di truyền là sY84,

sY254, sY1191 và sY1192) (Bảng 5). Nhóm 2 có kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang ngắn hơn khoảng 2-5 bp so với kích thước PCR tham khảo (8 gen *SRY*, *sY86*, *sY127*, *sY255*, *CDY2/CDY1*, *AMELX/AMELY*, *TAF9B3/TAF9BX* và *DAZ/DAZL*) (Bảng 5).

**Bảng 5.** Kích thước sản phẩm PCR của các gen được khuếch đại bằng các chỉ dấu di truyền.

Nhóm	Gen	Màu huỳnh quang	Kích thước sản phẩm PCR tham khảo (NCBI, GRCh38.p7) (bp)	Kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang trong nghiên cứu này (bp)
1	<i>sY254</i>	FAM	380	380
	<i>sY84</i>	NED	328	328
	<i>sY1191</i>	VIC	385	385
	<i>sY1192</i>	NED	255	255
2	<i>SRY</i>	FAM	470	465
	<i>CDY1</i>	VIC	206	204
	<i>CDY2</i>		199	198
	<i>AMELX</i>	FAM	106	103
	<i>AMELY</i>		112	109
	<i>TAF9BX</i>	FAM	152	148
	<i>TAF9B3</i>		148	144
	<i>DAZ</i>	FAM	214	210
	<i>DAZL</i>		217	214
	<i>sY86</i>	VIC	318	316
	<i>sY127</i>	FAM	194	192
	<i>sY255</i>	FAM	124	122
	3	<i>sY134</i>	NED	301
Khác	<i>sY1291</i>	VIC	527	507
				512
				523
				527

Nhóm 3 có kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang dài hơn so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo (chỉ dấu di truyền sY134) (Bảng 5). Ngoài 3 nhóm trên, kết quả nghiên cứu ghi nhận chỉ dấu di truyền sY1291 có kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang có thể ngắn hơn từ 4-20 nucleotid (507 bp, 512 bp, 523 bp) hoặc bằng với kích thước sản phẩm PCR tham khảo (527 bp) (Bảng 5).

Khi so sánh với kích thước PCR tham khảo, kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới. So sánh với nghiên cứu của Plaseska *et al.*, (2011), kết quả có sự phù hợp về kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang ở nhóm 2 và nhóm 3. Ở nhóm 2, tác giả ghi nhận kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của chỉ dấu di truyền SRY

là 243 bp, ngắn hơn 5 nucleotid so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo là 248 bp. Sở dĩ có sự khác nhau về kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của chỉ dấu di truyền SRY trong nghiên cứu của chúng tôi với tác giả là do chúng tôi sử dụng trình tự đoạn mồi khác nhau.

Kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của gen *AMELX/AMELY* trong nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn giống với nghiên cứu của Plaseska *et al.*, (2011) và Papoulidis *et al.*, (2012) là 103 bp và 109 bp, ngắn hơn 3 bp so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo là 106 bp và 112 bp. Một nghiên cứu khác của Fodor *et al.*, (2007) và Majumder *et al.*, (2015) cũng ghi nhận kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của chỉ dấu di truyền này là 104 bp và 110 bp.

Bên cạnh đó, Plaseska *et al.*, (2011) cũng ghi nhận một số kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang dài hơn so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo như sản phẩm của gen *CDY2/CDY1*, *TAF9B3/TAF9BX*, *DAZ/DAZL*, *sY134* (nhóm 3). So sánh với tác giả, chúng tôi chỉ ghi nhận kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của *sY134* dài hơn 1 bp so với kích thước sản phẩm PCR tham khảo, còn

những gen *CDY2/CDY1*, *TAF9B3/TAF9BX*, *DAZ/DAZL* có kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang ngắn hơn so với ban đầu. Sự khác biệt trên có lẽ là do điều kiện thực hiện phản ứng QF-PCR của chúng tôi khác nhau. Một số kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang của các gen trong đề tài so với kết quả đã công bố của Plaseska *et al.*, (2011) được thể hiện ở bảng 6.

**Bảng 6.** So sánh kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang với kích thước sản phẩm PCR tham khảo.

Gen	Plaseska <i>et al.</i> (2011)		Trong nghiên cứu này	
	Kích thước sản phẩm PCR tham khảo (bp)	Kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang (bp)	Kích thước sản phẩm PCR tham khảo (bp)	Kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang (bp)
<i>AMELX</i>	106	103	106	103
<i>AMELY</i>	112	109	112	109
<i>CDY2</i>	194	197	199	198
<i>CDY1</i>	200	203	206	204
<i>TAF9BX</i>	144	147	152	148
<i>TAF9B3</i>	140	143	148	144
<i>DAZ</i>	208	211	214	210
<i>DAZL</i>	211	214	217	214
<i>SRY</i>	248	243	470	465
<i>sY86</i>	326	317	318	316
<i>sY134</i>	301	303	301	302

Ngoài ra, hiện nay chỉ mới có Devyser sản xuất ra kit để phát hiện mất đoạn AZF (sử dụng 8 chỉ dấu di truyền để khuếch đại 8 gen là *SRY*, *ZFX/ZFY*, *sY84*, *sY86*, *sY127*, *sY134*, *sY254* và *sY255*). Hãng này cũng đưa ra khuyến cáo, kết quả QF-PCR có thể ngắn hoặc dài hơn từ 2-5 bp so với kích thước PCR tham khảo.

Khi kiểm tra trên NCBI (Phiên bản GRCh38.p7) với mỗi đoạn môi của chỉ dấu di truyền sẽ khuếch đại các đoạn gen với kích thước đặc trưng. Kết quả nghiên cứu chỉ trình bày những sản phẩm PCR huỳnh quang với kích thước tối đa là 600bp vì thang chuẩn Liz sử dụng để điện di mao quản trong kỹ thuật QF-PCR chỉ phát hiện tối đa ở kích thước này.

Như đã trình bày ở bảng 1, màu huỳnh quang của các chỉ dấu di truyền được đánh dấu là FAM, VIC và NED. Do đó, kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang được khuếch đại bằng cặp môi của các chỉ dấu di truyền sẽ thể hiện trên 3 màu huỳnh quang là FAM, VIC và NED và nằm trong các khung màu xanh lá cây.

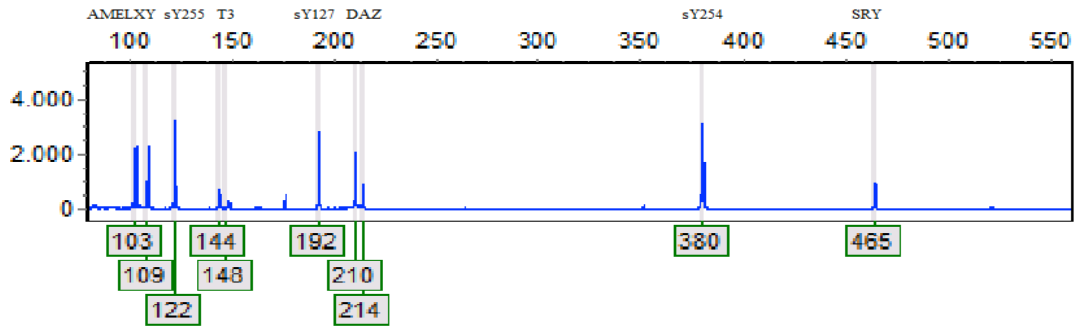
Nam giới không có bất thường di truyền (có khả năng sinh sản), màu FAM gồm có sản phẩm PCR

huỳnh quang của 7 gen sắp xếp theo thứ tự lần lượt là *AMELX/AMELY* (tại vị trí tương ứng là 103 bp và 109 bp) với tỷ lệ đỉnh 1:1 (nam giới có 1 NST X và 1 NST Y), *sY255* xuất hiện 1 đỉnh (122 bp), *TAF9B3/TAF9BX* kí hiệu là T3 (144-148 bp) với tỷ lệ đỉnh là 2:1 (nam giới có 2 NST số 3 và 1 NST X), *sY127* xuất hiện 1 đỉnh (192 bp), *DAZ/DAZL* (210-214 bp) với tỷ lệ đỉnh là 4:2 (nam giới bình thường có 4 gen *DAZ* trên nhiễm sắc thể Y và 2 gen *DAZL* trên 2 NST 3), *sY254* xuất hiện 1 đỉnh (380 bp) và *SRY* xuất hiện 1 đỉnh (465 bp). Với quy trình đã tối ưu, kết quả QF-PCR mẫu ADN nam giới có khả năng sinh sản bình thường được thể hiện ở hình 1.

Nam giới không có bất thường di truyền, gen *AMELX/AMELY* sẽ xuất hiện 1 đỉnh trên nhiễm sắc thể X (103 bp) và 1 đỉnh trên nhiễm sắc thể Y (106 bp). Gen *sY255* khuếch đại 7 đoạn gen đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y với kích thước bằng nhau (Bảng 7), do đó sản phẩm PCR huỳnh quang xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí 122 bp. Bên cạnh đó, chỉ dấu di truyền này còn có thể khuếch đại đoạn gen không đặc hiệu trên nhiễm sắc thể 13 với kích thước 445 bp (NCBI, GRCh38.p7); tuy nhiên, kết quả QF-PCR không thấy đỉnh xuất hiện tại vị trí

trên. Gen *TAF9B* có ở nhiễm sắc thể 3 và nhiễm sắc thể X. Như vậy, kết quả QF-PCR sẽ xuất hiện 1 đỉnh của nhiễm sắc thể 3 (mỗi người bình thường đều có 2 nhiễm sắc thể 3 tương đồng) và 1

đỉnh của nhiễm sắc thể X (nam giới có 1 nhiễm sắc thể X) theo tỷ lệ 2:1. Riêng những trường hợp có 2 nhiễm sắc thể X, kết quả QF-PCR sẽ xuất hiện tỷ lệ của gen *TAF9B3:TAF9BX* là 2:2.



Hình 1. Kết quả QF-PCR của nhóm chỉ dấu di truyền sử dụng màu FAM ở nam giới không có bất thường di truyền.

Bảng 7. Số lượng các đoạn gen được khuếch đại bằng cặp mồi của các chỉ dấu di truyền sử dụng màu FAM.

Chỉ dấu di truyền	Nhiễm sắc thể (Đoạn)	Gen	Vị trí các đoạn sản phẩm PCR (bp) (NCBI, GRCh38.p7)	Số lượng đoạn gen được khuếch đại	
AMEL	Y	<i>AMELY</i>	6.869.847-6.869.958	1	
	X	<i>AMELX</i>	11.296.874-11.296.979	1	
sY255	Y (AZFc)	<i>sY255</i>	24.804.741-24.804.864	7	
			23.190.358-23.190.481		
			23.179.510-23.179.633		
			23.168.670-23.168.793		
			24.853.313-24.853.400		
			24.842.465-24.842.552		
	13	23.228.078-23.228.165	1		
	56.023.135-56.023.545				
TAF9B	X	<i>TAF9B</i>	78.130.661-78.130.772	1	
	3	<i>TAF9B</i>	25.756.478-25.756.625	1	
sY127	Y (AZFb)	<i>sY127</i>	20.408.556-20.408.750	1	
DAZ	Y	<i>DAZ1</i>	23.132.909-23.133.122	4	
			<i>DAZ2</i>		23.287.589-23.287.802
			<i>DAZ3</i>		24.766.622-24.766.835
			<i>DAZ4</i>		24.903.274-23.903.487
DAZL	3	<i>DAZL</i>	16.590.118-16.590.334	1	
sY254	Y (AZFc)	<i>sY254</i>	23.226.429-23.226.808	7	
			23.170.046-23.170.425		
			23.180.886-23.181.265		
			23.191.734-23.192.113		
			24.806.117-24.806.496		
			24.840.816-24.841.195		
			24.851.664-24.852.043		
SRY	Y	<i>SRY</i>	2.787.066- 2.787.535	1	

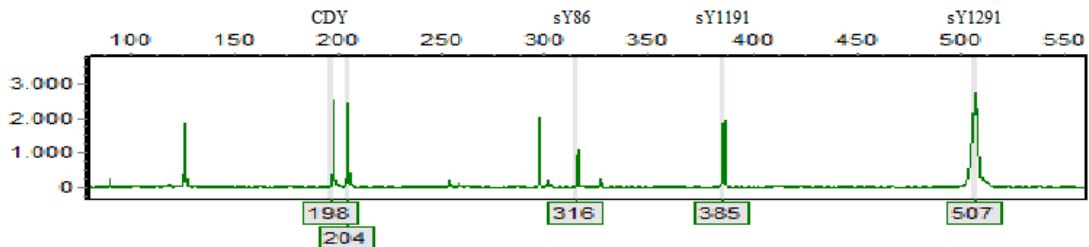
Chỉ dấu di truyền sY127 khuếch đại 1 đoạn gen đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y nên sản phẩm PCR

huỳnh quang xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí 192 bp. Gen *DAZ* có 4 gen đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y là

*DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4* và với chỉ dấu di truyền *DAZ* sẽ khuếch đại 4 đoạn nằm trên các gen *DAZ* với kích thước bằng nhau (210 bp) (Bảng 7). Vì gen *DAZ* có tương đồng với gen *DAZL* trên nhiễm sắc thể 3 nên với trình tự mẫu sử dụng trong nghiên cứu có thể đồng khuếch đại đoạn gen *DAZL* trên nhiễm sắc thể 3. Đoạn gen *DAZL* trên nhiễm sắc thể 3 xuất hiện 1 đỉnh (214 bp). Do đó, ở nam giới bình thường sản phẩm PCR huỳnh quang xuất hiện 2 đỉnh của gen *DAZ/DAZL* theo tỷ lệ là 4:2. Chỉ dấu di truyền *sY254* khuếch đại 7 đoạn gen đặc hiệu trên nhiễm sắc thể Y ở đoạn *AZFc* với kích thước như nhau nên sản phẩm PCR huỳnh quang xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí 380 bp (Bảng 7). Tương tự, chỉ dấu di truyền *SRY* khuếch đại 1 đoạn gen đặc hiệu trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể Y và sản phẩm PCR huỳnh quang xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí 465 bp.

Kết quả QF-PCR của các chỉ dấu di truyền với màu FAM thể hiện ở hình 1, bên cạnh các đỉnh của các gen *AMELX/AMELY, sY255, sY127, DAZ/DAZL, sY254* và *SRY* còn có đỉnh phụ khác tại vị trí khoảng 180 bp (gần *sY127*). Đỉnh phụ này có thể là sản phẩm PCR huỳnh quang không đặc hiệu của chỉ dấu di truyền *sY255* hoặc các chỉ dấu di truyền khác vì một số chỉ dấu di truyền có thể khuếch đại những sản phẩm với kích thước > 600 bp nhưng không đặc hiệu nên kích thước xuất hiện là những sản phẩm phụ ngắn hơn.

Nhóm chỉ dấu di truyền sử dụng màu VIC gồm có gen *CDY2/CDY1, sY86, sY1191* và *sY1291*. Ở nam giới không có bất thường di truyền, kết quả QF-PCR xuất hiện các đỉnh tại các vị trí 198 bp (*CDY2* ở đoạn *AZFb*), 204 bp (*CDY1* ở đoạn *AZFb*), 316 bp (*sY86*), 385 bp (*sY1191*) (Hình 2).



Hình 2. Kết quả QF-PCR của nhóm chỉ dấu di truyền màu VIC ở nam giới không có bất thường di truyền.

Gen *CDY2/CDY1* xuất hiện 1 đỉnh trên đoạn *AZFb* và 1 đỉnh trên đoạn *AZFc* theo tỷ lệ 2:2 với kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang tương ứng là 198 bp và 204 bp. Tỷ lệ 2:2 của gen này là do trên đoạn *AZFb* có 2 gen *CDY2* (17.888.458-17.888.609 bp và 18.017.367-18.017.565 bp) và đoạn *AZFc* cũng có 2 gen *CDY1*

(24.057.513-24.057.718 bp và 25.612.413-25.612.618 bp). Chỉ dấu di truyền *sY86* khuếch đại đoạn gen có kích thước 316 bp nên xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí này, và *sY1191* xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí 385 bp. Số lượng các đoạn gen được khuếch đại bằng cặp mẫu của các chỉ dấu di truyền được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Số lượng các đoạn gen được khuếch đại bằng cặp mẫu của các chỉ dấu di truyền sử dụng màu VIC.

Chỉ dấu di truyền	Nhiễm sắc thể (Đoạn)	Gen	Vị trí các đoạn sản phẩm PCR (bp) (NCBI, GRCh38.p7)	Số lượng đoạn gen được khuếch đại
CDY	Y (AZFb)	<i>CDY2</i>	17.888.458-17.888.609	2
		<i>CDY2</i>	18.017.367-18.017.565	
	Y (AZFc)	<i>CDY1</i>	25.612.413-25.612.618	2
		<i>CDY1</i>	24.057.513-24.057.718	
sY86	Y (AZFa) 6	<i>sY86</i>	12.495.697-12.496.014	1
			24.384.331-24.384.568	1
sY1191	Y (AZFc)	<i>sY1191</i>	22.729.473-22.729.857	1
sY1291	Y (AZFc)	<i>sY1291</i>	23.358.923- 23.359.449	1

Không giống với những sản phẩm PCR huỳnh quang của các gen *CDY2/CDY1, sY86* và *sY1191*, sản phẩm khuếch đại của gen *sY1291* cho thấy có sự đa hình về chiều dài với 4 kích thước khác nhau 507

bp hoặc 512 bp hoặc 523 bp hoặc 527 bp. Như vậy, kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang khuếch đại bằng cặp mẫu của chỉ dấu di truyền *sY1291* thể hiện đa hình về chiều dài, dao động từ 507-527 bp. Sự đa

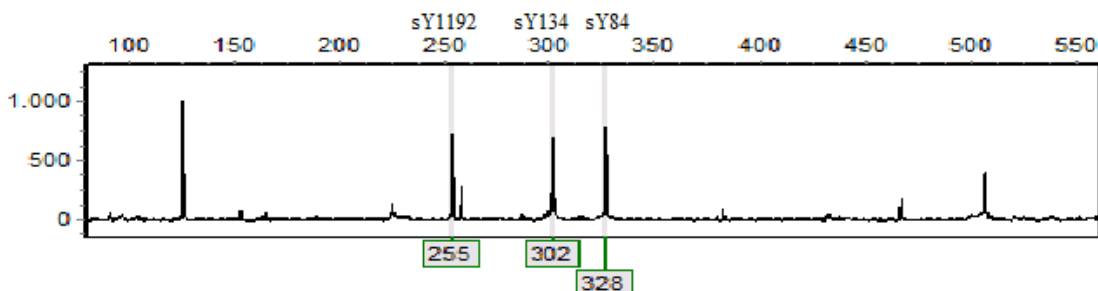


hình về chiều dài của đoạn gen này phù hợp với nghiên cứu của Lin *et al.*, (2006) và Evguenia *et al.*, (2016). Nghiên cứu của Lin *et al.*, (2006) thấy rằng kích thước sản phẩm PCR là 565 bp và 580 bp ở người Trung Quốc. Tương tự, nghiên cứu của Evguenia *et al.*, (2016) ghi nhận sự đa hình về chiều dài với kích thước sản phẩm PCR huỳnh quang là 517 bp và 538 bp ở người Mỹ. Qua đó, thấy rằng sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi của chỉ dấu di truyền này có sự đa hình về chiều dài tùy theo chủng tộc và vùng địa lý.

Kết quả thể hiện ở hình 2 cho thấy bên cạnh các đỉnh của các gen *CDY2/CDY1*, *sY86*, *sY1191* và *sY1291* còn có những đỉnh phụ khác. Tương tự như các chỉ dấu di truyền sử dụng màu FAM, một số chỉ dấu di truyền sử dụng màu VIC cũng có những sản phẩm PCR huỳnh quang không đặc hiệu với các kích thước > 600 bp.

Nhóm chỉ dấu di truyền sử dụng màu NED gồm có sY1192, sY134 và sY84. Ở nam giới không có bất thường di truyền, sản phẩm PCR huỳnh quang của các gen *sY1192*, *sY134* và *sY84* đều xuất hiện 1 đỉnh tại vị trí tương ứng là 255 bp, 302 bp và 328 bp (Hình 3).

Kiểm tra trên NCBI (Phiên bản GRCh38.p7) cho thấy nhóm chỉ dấu di truyền này có thể xuất hiện nhiều sản phẩm PCR của nhiều nhiễm sắc thể khác. Chẳng hạn như chỉ dấu di truyền sY84, có thể khuếch đại đoạn gen có kích thước 129bp của nhiễm sắc thể 11 hay 585 bp của nhiễm sắc thể 5 và sY1192 có thể khuếch đại một số đoạn gen nằm trên nhiễm sắc thể 1, 4, 5, 9, 17...với kích thước từ 381-539bp (Bảng 9). Có lẽ vì lý do đó mà kết quả QF-PCR của nhóm chỉ dấu di truyền này xuất hiện nhiều đỉnh phụ hơn 2 nhóm chỉ dấu di truyền sử dụng màu FAM và VIC.



Hình 3. Kết quả QF-PCR của nhóm chỉ dấu di truyền sử dụng màu NED ở nam giới không có bất thường di truyền.

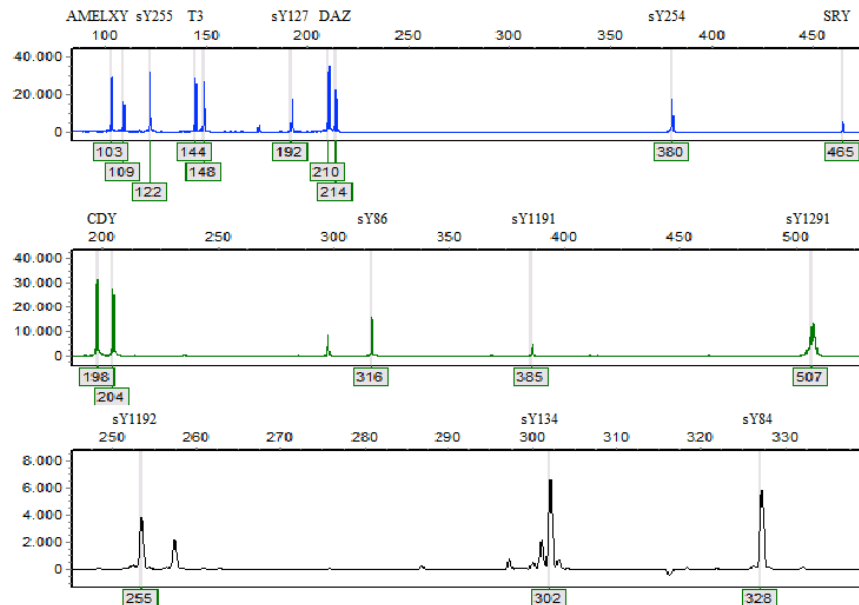
Bảng 9. Số lượng các đoạn gen được khuếch đại bằng cặp mồi của các chỉ dấu di truyền sử dụng màu NED.

Chỉ dấu di truyền	Nhiễm sắc thể (Đoạn)	Vị trí các đoạn sản phẩm PCR (bp) (NCBI, GRCh38.p7)	Kích thước sản phẩm PCR tham khảo (bp)	Số lượng đoạn gen	
sY1192	Y (AZFc)	22.726.650-22.726.865	255	1	
		20	32.813.002-32.813.444	481	1
		22	29.286.598- 29.286.257	380	1
		22	46.713.420- 46.712.951	508	1
		1	155.992.375-155.992.903	567	1
		9	85.655.934-85.656.340	445	1
		4	153.484.575-153.485.030	494	1
		17	45.153.937-45.154.437	539	1
		5	60.857.202-60.857.615	452	1
		5	171.341.740-171.342.082	381	1
sY134	Y (AZFb)	21.394.175-21.394.477	303	1	
		22.322.336-22.322.636	301	1	
	Y	8.788.235-8.788.496	300	1	
		7.671.217-7.670.958	298	1	
		10.021.957-10.021.691	305	1	
sY84	Y (AZFa)	12.678.105-12.678.432	328	1	
		11	3.240.658-3.240.786	129	1
		5	31.814.355-31.814.939	585	1

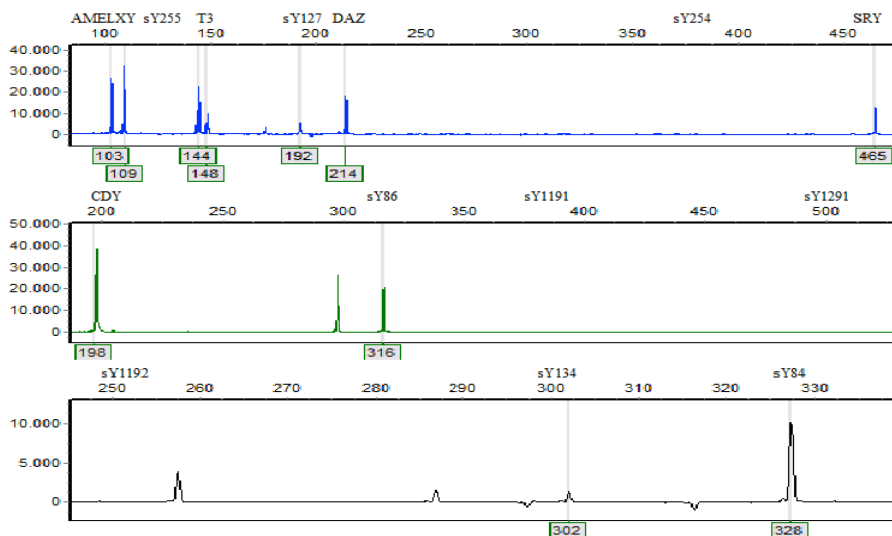
Như vậy, kết quả QF-PCR của nam giới không có bất thường di truyền thể hiện tỷ lệ đỉnh của gen *AMELX/AMELY* (103/106 bp) là 1:1, *DAZ/DAZL* (210/214 bp) là 4:2, *TAF9B3/TAF9BX* (144/148 bp) là 2:1, *CDY2/CDY1* (198/204) là 2:2. Các đỉnh của các gen *SRY*, *sY84*, *sY86*, *sY127*, *sY134*, *sY254*, *sY255*, *sY1191*, *sY1192* xuất hiện tại các vị trí tương ứng là 465 bp, 328 bp, 316 bp, 192 bp, 302 bp, 380 bp, 122 bp, 385 bp, 255 bp. Sản phẩm PCR huỳnh quang của gen *sY1291* xuất hiện 1 trong 4 vị trí sau 507 bp, 512 bp, 523 bp và 527 bp.

So sánh kết quả QF-PCR của mẫu chứng dương nam giới mắc hội chứng Klinefelter do Học viện Quân Y xác định bằng kỹ thuật nuôi cấy bạch cầu lympho máu ngoại vi và nam giới bị mất hoàn toàn đoạn AZFc của Đại học Y Hà Nội xác định bằng kỹ thuật multiplex PCR có sự phù hợp.

Cụ thể, nam giới mắc hội chứng Klinefelter có tỷ lệ đỉnh của gen *AMELX/AMELY* xuất hiện với tỷ lệ là 2:1 và *TAF9B3/TAF9BX* xuất hiện với tỷ lệ là 2:2. Các đỉnh của những chỉ dấu di truyền khác giống như ở nam giới không có bất thường di truyền (Hình 4).



Hình 4. Kết quả QF-PCR mẫu chứng dương nam giới mắc hội chứng Klinefelter.



Hình 5. Kết quả QF-PCR mẫu chứng dương nam giới bị mất hoàn toàn đoạn AZFc.

Tương tự, kết quả QF-PCR của mẫu chứng dương nam giới bị mất hoàn toàn đoạn AZFc phù hợp với kỹ thuật Multiplex-PCR (kết quả của kỹ thuật này do Bộ môn Y Sinh học – Di truyền – Đại học Y Hà Nội thực hiện). Mất hoàn toàn đoạn AZFc: kết quả QF-PCR không có peak của sY254, sY255, sY1191, sY1192 và sY1291; *CDY2/CDY1* xuất hiện peak theo tỷ lệ 2:0 và *DAZ/DAZL* là 0:2; các peak khác đều xuất hiện như ở nam giới không có bất thường di truyền (Hình 5).

## KẾT LUẬN

Trên những cơ sở đó, kit với 14 chỉ dấu di truyền và quy trình QF-PCR được xây dựng để xác định một số nguyên nhân di truyền trong nghiên cứu của chúng tôi có độ chính xác cao và đáng tin cậy. Chính vì vậy, cần ứng dụng quy trình QF-PCR với bộ kit trên vào chẩn đoán một số nguyên nhân di truyền ở nam giới khám vô sinh có mật độ tinh trùng  $\leq 5$  triệu/mL.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ về tài chính của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Cần Thơ và trang thiết bị của Bệnh viện Phụ sản Thành phố Cần Thơ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alimardanian L, Saliminejad K, Razi S, Ahani A (2016) Analysis of partial azoospermia factor c deletion and *DAZ* copy number in azoospermia and severe oligozoospermia. *Andrology* 1–5

Ambulkar PS, Waghmar JE, Tarnekar AM, Shende MR, Pal AK (2013) A cytogenetic and molecular analysis of Y chromosome microdeletions in idiopathic cases of human male infertility. *Perspect Cytol Gent* 16: 1-10.

Cavkaytar S, Batioglu S, Gunel M, Ceylaner S, Karaer A (2012) Genetic evaluation of severe male factor infertility in Turkey: A cross-sectional study. *Hum Fertil* 15(2): 100-106.

Choi DK, IH Gong, JH Hwang, JJ Oh, JJ Hong (2013) Detection of Y chromosome microdeletions is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia: sperm retrieval rate and birth rate. *Korean J Urol* 54: 111-116.

Evgenia A, W Schempp, D Corach (2016) Characterization of the AZF region of the Y chromosome in Native American haplogroup Q. *Master Thesis Dissertation for the degree of Master of Science (M.Sc.) International Master Program in Biomedical Sciences*. 58pp.

Fodor F, Kamory E, Csokay B, Kopa Z, Kiss A, Lantos I, Tisza T (2007) Rapid detection of sex chromosomal aneuploidies by QF-PCR: application in 200 men with severe oligozoospermia or azoospermia. *Mary Ann Liebert, Inc* 11(2): 139-145.

Fu L, Xiong DK, Ding XP, Li C, Zhang LY, Ding M, Nie SS, Quan Q (2012) Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Gent* 29:521–527.

Nguyễn Minh Hà (2011) Bước đầu áp dụng kỹ thuật Multiplex PCR tìm đột biến mất đoạn vùng AZF của NST Y ở một số bệnh nhân nam vô sinh vô căn. *Tạp chí nghiên cứu Y học TP HCM*, Tập 15, Phụ bản của số 1, trang 217-219.

Nguyễn Thị Việt Hà (2012) Nghiên cứu đứt đoạn nhỏ nhiễm sắc thể Y ở người bệnh vô sinh do không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng. *Luận văn Thạc sĩ*, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phan Thị Hoan, Trần Đức Phần, Lương Thị Lan Anh (2013) Phát hiện mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y ở các bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng hoặc ít tinh trùng. *Y học Việt Nam*, Số đặc biệt, tr. 623-629.

Trần Văn Khoa, Triệu Tiến Sang, Quân Hoàng Lâm, Ngô Trường Giang, Nguyễn Thị Việt Hà (2013) Đặc điểm và phân bố mất đoạn nhỏ nhiễm sắc thể Y ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng và ít tinh trùng. *Y Dược học Quân sự*, số 1 tr.58-62.

Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttmann F (2014) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2: 5–19.

Li LX, Dai HY, Ding XP, Zhang YP, Zhang XH, Ren HY, Chen ZY (2015) Investigation of AZF microdeletions in patients with Klinefelter syndrome. *Gent Mol Res* 14(4): 15140-15147.

Lin YW, Hsu CL, Yen PH (2006) A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome. *Mol Hum Reprod* 12(5):347-351.

Mafrá FA, Christofolini DM, Bianco B, Gava MM, Glina S, Belangero SI, Barbosa CP (2011) Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. *Int Braz J Urol* 37 (2): 244-251.

Majumder AK, Khaleque MA, Hasan KN, Meem LS, Akhteruzzaman S (2015) Two cases of Klinefelter syndrome identified by quantitative fluorescence PCR (QF-PCR) method. *Biores Commun* 1(1): 17-21.

Naasse Y, Charoute H, Houate BE, Elbakkay C, Razoki L, Malki A, Barakat A, Rouba H (2015) Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *BMC Urol* 15: 95.

Nguyễn Đức Nhựt (2015) Nghiên cứu bất thường nhiễm sắc thể và phát hiện mất đoạn AZFabcd ở những nam giới vô tinh và thiểu tinh nặng. *Luận án Tiến sĩ*, Trường Đại học Y Hà Nội.

Papoulidis I, Siomou E, Sotiriadis A, Efstathiou G, Psara A, Sevastopoulou E, Anastasakis E, Sifakis S, Tsiligianni T, Kontodiou M, Malamaki C, Tzimina M, Petersen MB, Manolagos E, Athanasiadis A (2012) Dual testing with QF-PCR and karyotype analysis for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Evaluation of 13500 cases with consideration of using QF-PCR as a stand-alone test according to referral indications. *Prenat Diagn* 32: 1–6.

Plaseska KD, P Noveski, T Plaseski (2011) *Detection of the most common genetic causes of male infertility by quantitative fluorescent (QF)-PCR analysis*. In Plaseska-Karanfilska. *Human genetics diseases*, Intech. 298pp.

Qi ML, YY Zhang, XL Liu, R He, YY Zhao (2011) Chromosomal abnormality diagnosis of male infertility by QF-PCR. *Yi Chuan* 33(8): 895-900.

Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, Silber SJ, Ardlie K, Page DC (2012) AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 91: 890–896.

Xingmei, Liang (2014). Establishment of a 10-Plex quantitative fluorescent-PCR assay for rapid diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Plos One* 9(9): e106307.

Yuanyuan Z, Qiang D, Xiaoliang L, Wanting C, Rong H, Yanyan Z (2014) Screening of azoospermia factor microdeletions on Y chromosome in infertile men by QF-PCR. *Yi Chuan* 36(6): 552-557.

## USING QF-PCR ASSAY IN DETECTION OF COMMON GENETIC CAUSES IN INFERTILE MALES

**Cao Thi Tai Nguyen<sup>1</sup>, Nguyen Trung Kien<sup>1</sup>, Trinh Thi Bich Lien<sup>3</sup>, Vu Thi Nhuan<sup>1</sup>, Nguyen Chung Vieng<sup>3</sup>, Nguyen Dac Khoa<sup>2</sup>, Nguyen Phan Vinh<sup>3</sup>, Nguyen Thi Bich Ngoc<sup>3</sup>, Trinh Minh Thiet<sup>1</sup>, Cao Luong Binh<sup>1</sup>, Nguyen Van Khuon<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Can Tho University of Medicine and Pharmacy

<sup>2</sup>Can Tho University

<sup>3</sup>Can Tho Obstetrics and Gynecology Hospital

### SUMMARY

At present, quantitative fluorescent - polymerase chain reaction (QF-PCR) technology is widely being used in prenatal diagnosis of some common genetic syndromes such as Down syndrome, Patau syndrome and Edwards syndrome. The advantages of this technique are its high accuracy, rapid test results and wide applicability. It has used this technique to detect AZF (Azoospermia factor) micro-deletions by Devyser's kit at Tu Du Hospital, Ho Chi Minh City. The novelty of the study was to create a kit with 14 genetic markers and to develop a QF-PCR protocol to detect some common genetic causes in men seeking medical for their infertility with the sperm concentration of  $\leq 5$  million/ml. We conducted an evaluation in reliability in order to confirm whether the QF-PCR results from the set-up protocol were accurate and reliable. We developed the research on the application of QF-PCR to test for the DNA samples of patients. They were 10 normal reproductive men, 2 patients with Klinefelter syndrome, 4 patients with AZFc micro-deletions, 1 female with normal reproduction. Cordially, we used a sample of water to control the experiment. The results have shown that the kit with 14 genetic markers and the built-in QF-PCR protocol for detecting some common genetic causes in men seeking medical care for their infertility were accurate 100% compared to multiplex-PCR and peripheral blood lymphocyte cultures. The study results are important for identifying some common genetic causes in men seeking medical care for their infertility and helping doctors build the most inferior treatment regimens for their patients.

**Keywords:** AZF microdeletion; azoospermia; Klinefelter syndrome; QF-PCR; severe oligozoospermia