

PHÁT HIỆN MẤT ĐOẠN 9 BP TRONG HỆ GEN TY THỂ Ở MỘT SỐ BỆNH NHÂN NGHI HỘI CHỨNG CƠ NÃO

Trương Thị Huệ¹, Phạm Minh Huệ¹, Lê Ngọc Yến¹,
Phạm Thị Vân Anh², Ngô Diễm Ngọc², Phan Tuấn Nghĩa^{1*}

⁽¹⁾Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, ^(*)phantn@fpt.vn

⁽²⁾Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT: Các đột biến trong hệ gen ty thể là nguyên nhân của nhiều bệnh khác nhau, đặc biệt là các bệnh cơ não ở người. Mặc dù vậy, việc chẩn đoán các bệnh này thường khó chính xác nếu chỉ thông qua các xét nghiệm lâm sàng. Phân tích DNA là phương pháp chính xác nhất để phát hiện các đột biến trong hệ gen ty thể. Trong nghiên cứu này, 72 bệnh nhân tuổi dưới 20 nghi mắc hội chứng bệnh cơ não đã được kiểm tra sự có mặt của đột biến A8344G của hội chứng MERRF, đột biến A3243G của hội chứng MELAS và sự mất đoạn 9 bp giữa gen COII và gen mã hóa cho tRNA^{Lys} bằng kỹ thuật PCR-RFLP và xác định trình tự nucleotide. DNA của máu ngoại vi được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR nhân đoạn gen 212 bp từ vị trí 8155 đến vị trí 8366 trong hệ gen ty thể. Bằng điện di gel polyacrylamide, 23 mẫu được phát hiện là có băng DNA nhân bản chạy nhanh hơn các mẫu còn lại. Các sản phẩm PCR đã được cắt bằng enzyme *BanII* và khẳng định sự sai khác giữa các mẫu. Sản phẩm PCR của 23 mẫu bệnh nhân nghi ngờ chứa đột biến cùng với bố mẹ của bệnh nhân đã được nhân dòng vào vector pGEM, plasmid tái tổ hợp đã được tách và xác định trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy, 23 mẫu bệnh nhân nghi ngờ có chứa đột biến mất đoạn 9 bp CCCCTCTA so với trình tự chuẩn đã công bố (J01415.2), đột biến mất đoạn được di truyền từ mẹ cho con và tất cả đều ở dạng đồng nhất. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, không có bệnh nhân nào trong số 72 bệnh nhân mang đột biến A8344G của hội chứng MERRF, chỉ có một bệnh nhân nam vừa mang đột biến A3243G của hội chứng MELAS vừa mang đột biến mất đoạn 9 bp, chứng tỏ là không có tương quan tin cậy nào giữa hiện tượng mất đoạn 9 bp CCCCTCTA và đột biến A8344G của hội chứng MERRF hay đột biến A3243G của hội chứng MELAS.

Từ khóa: DNA ty thể, mất đoạn 9 bp, bệnh cơ não ty thể.

MỞ ĐẦU

Ty thể là cơ quan tử có mặt trong tất cả các tế bào có nhân với chức năng chính là sản xuất năng lượng dưới dạng ATP cho tế bào. Hệ gen ty thể là DNA dạng vòng, có kích thước 16.569 bp, gồm 37 gen mã hóa cho 13 chuỗi polypeptide, 22 tRNA và 2 rRNA khác nhau liên quan đến hoạt động chức năng của ty thể [1]. So với DNA của nhân tế bào thì DNA của ty thể dễ bị tổn thương do môi trường giàu chất oxy phản ứng trong ty thể và do thiếu cơ chế sửa chữa hiệu quả. Hơn 300 đột biến khác nhau trong hệ gen ty thể đã được xác định kể từ khi đột biến đầu tiên được phát hiện vào năm 1988 [8]. Nghiên cứu các đột biến trong hệ gen ty thể cho phép phát hiện ra nguyên nhân của nhiều bệnh khác nhau.

Hiện tượng mất đoạn 9 bp (CCCCTCTA) ở vùng gen giữa cytochrome oxidase II và tRNA^{Lys} trong hệ gen ty thể được xem là một dạng đột biến của hệ gen ty thể và có tỷ lệ cao ở các quần thể người Đông Nam Á [7]. Mất đoạn

9 bp trong hệ gen ty thể được di truyền theo dòng mẹ, là công cụ hữu ích để kiểm tra mối quan hệ di truyền giữa các cá thể [5, 6]. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có thông tin nào về sự liên quan của mất đoạn 9 bp với các tình trạng bệnh lý đặc trưng.

Ivanova et al. (1999) [2] bước đầu đã nghiên cứu DNA ty thể của người Việt Nam và phát hiện một số trường hợp mất đoạn 9 bp nêu trên, tuy vậy, các tác giả cũng chưa có nhận xét gì về hiện tượng mất đoạn với các triệu chứng bệnh ty thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp việc sàng lọc đột biến A3243G thuộc hội chứng MELAS và đột biến A8344G thuộc hội chứng MERRF ở các bệnh nhân nghi bị bệnh cơ não với hiện tượng mất đoạn 9 bp với hy vọng tìm ra được sự liên quan nào đó giữa các loại đột biến này trong các hội chứng bệnh ty thể.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU
Nguyên liệu hóa chất và thiết bị

Mẫu máu ngoại vi của 72 bệnh nhân, tuổi dưới 20 được chẩn đoán lâm sàng là bị một trong các bệnh cơ não phổ biến và được Bệnh viện Nhi Trung ương cung cấp. Bộ kit tách chiết DNA được mua từ hãng Qiagen, cặp môi đặc hiệu được đặt mua từ hãng Integrated DNA Technologies (IDT). Enzyme giới hạn được mua từ New England Biolabs và Fermentas. Hóa chất cho giải trình tự gen của hãng Beckman Coulter. Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Phương pháp

DNA tổng số được tách theo kit của Qiagen.

Để phát hiện đột biến A8344G thuộc hội chứng MERRF và đột biến mất đoạn 9 bp (CCCCCTCTA) ở vùng gen giữa cytochrome oxidase II và tRNA^{Lys} trong hệ gen ty thể, đoạn DNA ty thể (chứa trình tự CCCCCTCTA ở vùng gen giữa cytochrome oxidase II và tRNA^{Lys}) dài 212 bp từ vị trí 8155-8366, được nhân bản bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với cặp môi DELFw-5'GGT ATA CTA CGG TCA ATG CTC 3' (8155-8175). DELRv-5' TTT CAC TGT AAA GAG GTGTGG G 3' (8366-8345) theo trình tự của Anderson et al. (1981) [1], nucleotide không ghép cặp được gạch chân. Mỗi ngược chứa 1 nucleotide không bắt cặp (T được thay bằng G) tại vị trí 8347, tạo điểm cắt cho enzyme *BanII* khi tRNA^{Lys} bị đột biến để bộc lộ sự sai khác khi có và không có đột biến A8344G. Các thành phần PCR (25 µl) gồm 30 ng DNA khuôn, 50 ng mỗi xuôi và

50 ng mỗi ngược, 5 đơn vị Taq DNA polymerase và dNTP ở nồng độ cuối cùng là 0,2 mM. PCR được thực hiện với chế độ nhiệt: 94°C, 2 phút, tiếp nối 35 chu kỳ với 94°C, 10 giây để biến tính, 58°C, 1 phút để gắn môi và 72°C, 1 phút để kéo dài chuỗi. Sản phẩm PCR được phân cắt bằng enzyme *BanII*, DNA không đột biến chứa 2 vị trí nhận biết của *BanII*, được cắt thành 99 bp, 41 bp và 72 bp. Nếu DNA đột biến thì bằng 72 bp được cắt thành 2 băng có kích thước 52 bp và 20 bp. Sản phẩm cắt được điện di trên gel polyacrylamide 10% trong đệm Tris- Boric- EDTA, pH 8,0.

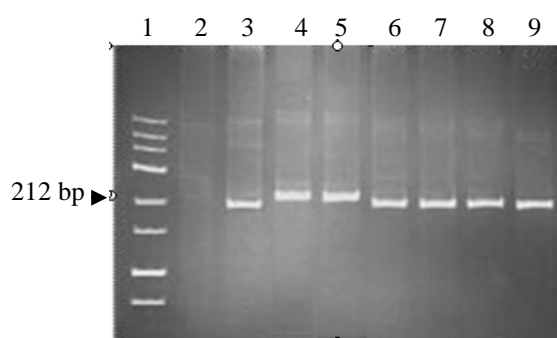
Đột biến MELAS A3243G được phát hiện bằng PCR-RFLP như đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây [4].

Sản phẩm PCR nghi chứa đột biến mất đoạn được nhân dòng vào vector pGEM và biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến DH5α. Plasmid tái tổ hợp được tách, cắt kiểm tra bằng các enzyme giới hạn và xác định trình tự bằng hệ thống máy tự động CEQ 8000 (Beckman Coulter).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phát hiện đột biến mất đoạn bằng phương pháp PCR-RFLP

Đầu tiên, chúng tôi đã tiến hành điều tra sự có mặt của đột biến A8344G ở 72 bệnh nhân nghi bị hội chứng cơ não (bảng 1). Chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật PCR với cặp môi được thiết kế ở trên để nhân bản đoạn gen từ 8155-8366 (212 bp) từ hệ gen ty thể của các bệnh nhân.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen chứa đột biến

Giếng 1: Thang chuẩn DNA; Giếng 2: Đối chứng âm; Giếng 3-9: Sản phẩm PCR từ mẫu DNA của các bệnh nhân.

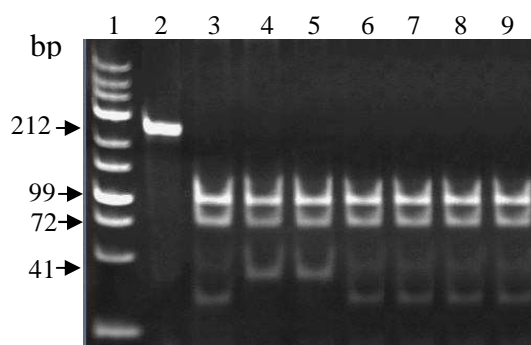
Hình 1 là kết quả điện di sản phẩm PCR của một số bệnh nhân được nghiên cứu, cụ thể,

chúng tôi đã nhân bản thành công đoạn DNA đặc hiệu với kích thước 212 bp như tính toán lý

thuyết (các mẫu ở giếng 4 và 5), đồng thời chúng tôi cũng đã phát hiện thấy 23 trường hợp (gồm 15 nam và 8 nữ) có các băng nhân bản chạy nhanh hơn (được minh họa ở các mẫu của giếng 3, 6-9, hình 1), chứng tỏ có kích thước ngắn hơn và gợi ý về khả năng mất đoạn 9 bp trong các mẫu này.

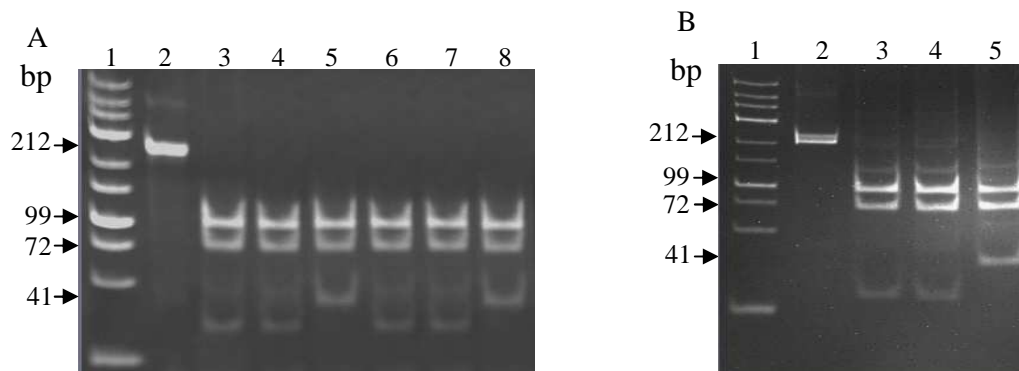
Để phát hiện đột biến A8344G, sản phẩm PCR được cắt trực tiếp bằng enzyme *BanII*. Theo cách thiết kế của thí nghiệm, sản phẩm PCR của người không mang đột biến A8344G sẽ có 3 băng 99 bp, 72 bp và 41 bp, còn nếu có đột biến A8344G thì sản phẩm PCR sẽ có 4 băng là 99 bp, 52 bp, 20 bp và 41 bp (băng 72 bp được cắt thành băng 52 bp và 20 bp). Chúng tôi đã không

phát hiện được sự sai khác này trong tổng số 72 mẫu nghiên cứu, điều này chứng tỏ các đối tượng này không mang đột biến A8344G. Tuy vậy, kết quả điện di sản phẩm PCR cắt bằng *BanII* (hình 2) cho thấy, các mẫu có băng nhân bản chạy chậm thu được ở hình 1 (giếng 4 và 5) có 3 băng là 99 bp, 72 bp và 41 bp theo như tính toán lý thuyết, còn các mẫu cho băng nhân bản chạy nhanh hơn (giếng 3, 6-9) có 3 băng là 99 bp, 72 bp và 1 băng ngắn hơn băng 41 bp. Kết quả này một lần nữa gợi ý về khả năng mất đoạn 9 bp. Ngoài ra, kết quả ở hình 2 cũng cho thấy, các mẫu nghi mất đoạn đều không có băng 41 bp, chứng tỏ tính đồng nhất về loại cấu trúc này ở tất cả các bản copy của DNA ty thể.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR được cắt bằng *BanII* của một số bệnh nhân

1. Thang chuẩn DNA; 2. Sản phẩm PCR không cắt bằng *BanII*; 3-9. Sản phẩm PCR từ mẫu DNA của các bệnh nhân được cắt bằng *BanII*.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR được cắt bằng enzym *BanII*

1. Thang chuẩn DNA; 2. Sản phẩm PCR không cắt bằng *BanII*, 3A-8A: Sản phẩm PCR được cắt bằng *BanII* tương ứng của bệnh nhân, mẹ bệnh nhân và bố bệnh nhân của gia đình I và gia đình II, 3B-5B: Sản phẩm PCR được cắt bằng *BanII* tương ứng của bệnh nhân, mẹ bệnh nhân và bố bệnh nhân của gia đình III.

Để khẳng định tính chất di truyền theo dòng mẹ của các gen trên hệ gen ty thể. Chúng tôi đã kiểm tra 3 gia đình (ký hiệu I, II và III) trong số

các gia đình có bệnh nhân mang dấu hiệu mất đoạn phát hiện được qua PCR trên đây. Kết quả điện di ở hình 3 cho thấy, sản phẩm PCR với

mẫu DNA khuôn của bố bệnh nhân ở 3 gia đình sau khi cắt bằng *BanII* có 3 băng DNA 99 bp, 72 bp và 41 bp giống như mẫu bình thường (hình 3A, giếng 5 và giếng 8; hình 3B, giếng 5). Trong khi đó, sản phẩm PCR với DNA khuôn của mẹ bệnh nhân ở 3 gia đình được cắt bằng *BanII* đều cho phổ băng DNA có kích thước giống như mẫu bệnh nhân chứa đột biến mất đoạn (hình 3A, giếng 4 và giếng 7; hình 3B, giếng 4). Kết quả này chứng tỏ sự tương đồng về kích thước của đoạn gen nhân bản giữa mẹ

và bệnh nhân.

Xác định trình tự nucleotide của đoạn gen nhân bản nghi mất đoạn

Để khẳng định chắc chắn sự tồn tại của đột biến mất đoạn và kích thước của đoạn mất, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn DNA có kích thước 212 bp từ vector pGEM tái tổ hợp. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự đoạn gen tương ứng đã được công bố trên ngân hàng gen thế giới với mã số J01415.2 bằng phần mềm Genetyx.

A [95.283%/212 bp] INT/OPT.Score : <504/762 >
 1' GGTATA

 8101" AGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCACTTTCACCGCTACACGACCGGGGTATA
 7' CTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGA

 8161" CTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGA
 67' ATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCCTATAGCA-----

 8221" ATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCCTATAGCACCCCTCTA
 118' CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTTAAGTTAAAGATTAAG

 8281" CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTTAAGTTAAAGATTAAG
 178' AGAACCCACACCTCTTTACAGTGAAA

 8341" AGAACCAACACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCCACCAT

B [99.528%/212 bp] INT/OPT.Score : < 842/842
 1' GGTATA

 8101" AGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCACTTTCACCGCTACACGACCGGGGTATA
 7' CTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGA

 8161" CTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGA
 67' ATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCCTATAGCACCCCTCTA

 8221" ATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCCTATAGCACCCCTCTA
 127' CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTTAAGTTAAAGATTAAG

 8281" CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTTAAGTTAAAGATTAAG
 187' AGAACCCACACCTCTTTACAGTGAAA

 8341" AGAACCAACACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCCACCAT

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 8155-8366 của ty thể bệnh nhân so với trình tự gen chuẩn đã được công bố

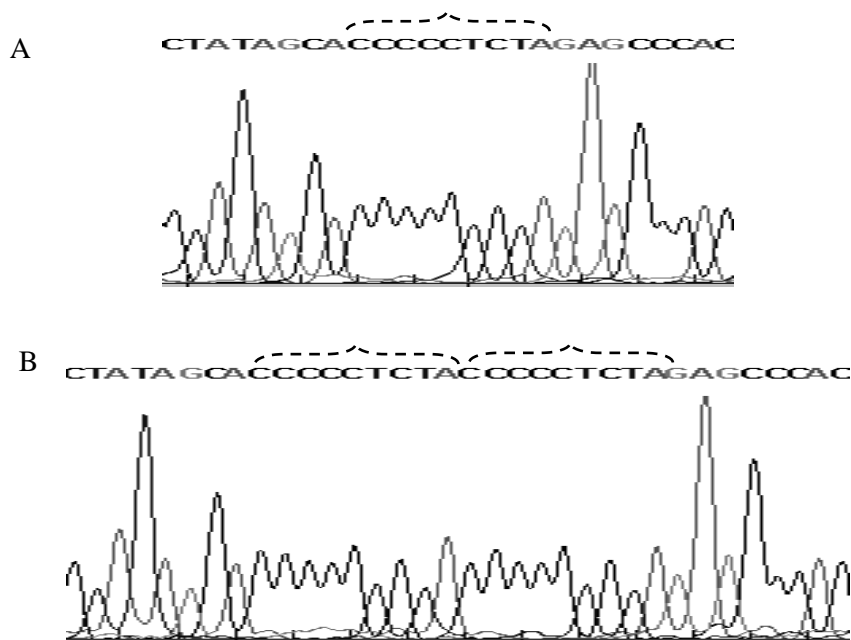
- A. Trình tự nucleotide của trường hợp có băng PCR nhân bản chạy nhanh;
- B. Trình tự nucleotide của trường hợp có băng PCR nhân bản chạy chậm.

Kết quả so sánh đoạn gen quan tâm (hình 4) cho thấy, đoạn gen nghiên cứu từ các mẫu bệnh

nhân có sự sai khác so với trình tự chuẩn đã công bố, vị trí 8347 do chúng tôi chủ động thay

thể nucleotide trong quá trình thiết kế mồi nên có một sự sai khác so với trình tự gen chuẩn (C được thành bằng A), mẫu có băng DNA nhân bản chạy nhanh bị mất 9 bp với trình tự CCCCCTCTA (8272-8280) so với mẫu chuẩn cũng như so với mẫu có băng DNA nhân bản chạy chậm được phát hiện ở hình 1. Chúng tôi cũng giải trình tự đoạn gen trên từ bố và mẹ bệnh nhân, kết quả thu được (không nêu ở đây)

cho thấy, hiện tượng mất đoạn chỉ có ở DNA ty thể của mẹ và không có ở bố bệnh nhân, phù hợp với kết quả PCR cũng như PCR-RFLP ban đầu. Điều này đã khẳng định tính chất di truyền theo dòng mẹ của các gen trên hệ gen ty thể. Kết quả giải trình tự đoạn DNA (8155-8366) trên hệ gen ty thể đã chứng tỏ rằng việc phát hiện các bệnh nhân có đột biến mất đoạn theo phương pháp PCR-RFLP là tin cậy.



Hình 5. Một phần trình tự nucleotide của đoạn DNA ty thể (8155-8366)

A. Đoạn DNA ty thể chứa đột biến mất đoạn; B. Đoạn DNA ty thể không chứa đột biến mất đoạn.

Bảng 1. Thông tin bệnh nhân và kết quả xác định các đột biến gen ty thể

Số lượng	Giới tính		Kết quả xác định mất đoạn 9 bp	Ghi chú
	Nam	Nữ		
72	42	30	23 (31,9%) (15 nam và 8 nữ)	1 nam có chứa mất đoạn 9 bp và đồng thời mang đột biến MELAS A3243G

Kết quả xác định đột biến mất đoạn 9 bp của 72 bệnh nhân được nghiên cứu (bảng 1) cho thấy rằng, trong số 72 bệnh nhân nghi bị bệnh cơ não có tới 23 hay 31,9% bệnh nhân có hiện tượng mất đoạn 9 bp trong hệ gen ty thể. Trong số này có tới 15 bệnh nhân nam và chỉ có 8 bệnh nhân nữ. Ngoài ra, khi điều tra sự có mặt của đột biến A3243G thuộc hội chứng MELAS, chúng tôi chỉ phát hiện thấy một bệnh nhân nam vừa mang đột biến A3243G vừa có hiện tượng mất đoạn 9 bp.

Zhuo et al. (2010) [8] khi xác định sự liên quan giữa hiện tượng mất đoạn 9 bp CCCCCTCTA ở các bệnh nhân đa nang buồng trứng thì thấy tỷ lệ có mất đoạn là 23,5%, so với người khỏe mạnh thì tỷ lệ này chỉ có 7,1% và các tác giả nhận định có sự liên quan giữa mất đoạn và bệnh đa nang buồng trứng. Theo nghiên cứu trước đây của Ivanova et al. (1999) [2] cho thấy, tỷ lệ mất đoạn 9 bp ở vùng gen giữa COII và tRNA^{Lys} ở người Việt Nam khỏe mạnh là 20%, còn nghiên cứu của Liu et al. (2005) [3] ở

các bệnh nhân người Đài Loan thuộc hội chứng MELAS và MERRF cho thấy tỷ lệ mất đoạn 9 bp là 47%, trong khi đó, tỷ lệ này ở người khỏe mạnh là 21%. Một số tác giả cho rằng có sự bất ổn định của vùng gen COII/tRNA^{Lys} ở các bệnh nhân bị bệnh ty thể và là điểm nóng cho sự mất đoạn [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa phát hiện thấy sự liên quan tin cậy nào giữa hiện tượng mất đoạn 9 bp với mức độ bị đột biến A3243G trong hội chứng MELAS hay đột biến A8344G thuộc hội chứng MERRF.

Hiện tượng mất đoạn 9 bp trong hệ gen ty thể có lẽ được di truyền cùng với một số đột biến DNA ty thể gây bệnh trong quá trình di truyền và tiến hóa lâu dài của hệ gen ty thể. Tuy nhiên, cần có sự nghiên cứu dịch tễ học phân tử bệnh ty thể để khẳng định chắc chắn về mối liên quan giữa sự mất đoạn 9 bp trong hệ gen ty thể và sự xuất hiện bệnh ty thể ở người Việt Nam.

KẾT LUẬN

Hiện tượng mất đoạn 9 bp trong hệ gen ty thể có thể phát hiện nhanh và chính xác bằng phương pháp PCR-RFLP. Sử dụng phương pháp thiết lập được, chúng tôi đã phát hiện 23 trường hợp mất đoạn 9 bp (8272-8280) trong hệ gen ty thể trong tổng số 72 bệnh nhân nghi hội chứng cơ não ty thể, chiếm 31,9%. Các trường hợp mất đoạn 9 bp trong hệ gen ty thể phát hiện được ở 23 bệnh nhân đều thể hiện tính chất di truyền theo dòng mẹ và ở dạng đồng nhất (homoplasmy).

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ kinh phí (Đề tài mã số 106.06.123.09) để thực hiện nghiên cứu này, cảm ơn Bệnh viện Nhi Trung ương đã cung cấp các mẫu bệnh phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., deBruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Rose B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R. and Young I. G., 1981. Sequence
2. Ivanova R., Astrinidis A., Lepage V., Djoulah S., Wijnen E., Vu-Trieu A., Hors J., Charron D., 1999. Mitochondrial DNA polymorphism in the Vietnamese population Eur. J. Immunogenet., 26: 417-422.
3. Liu C. S., Cheng W. L., Chen Y. Y., Ma Y. S., Pang C. Y., Wei Y. H., 2005. High prevalence of the COII/tRNA^{Lys} intergenic 9-bp deletion in mitochondrial DNA of Taiwanese patients with MELAS or MERRF syndrome. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1042: 82-87.
4. Trịnh Lê Phương, Chu Văn Mẫn và Phan Tuấn Nghĩa, 2009. Phân tích đột biến gen A3243G của hội chứng MELAS bằng phương pháp PCR-RFLP cải tiến. Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, 4: 6-9.
5. Vassilina A. S., Vadim B. V., Thomas D., Catherine H., Dominique R., Catherine G., 2002. A Russian family of Slavic origin carrying mitochondrial DNA with a 9-bp deletion in region V and a long C-stretch in D-loop. Mitochondrion, 1: 479-483.
6. Watkins W. S., Bamshad M., Dixon M. E., Rao B. B., Naidu J. M., Reddy P. G., Prasad B. V. R., Das P. K., Reddy P. C., Gai P. B., Bhanu A., Kusuma Y. S., Lum J. K., Fischer P., Jorde L. B., 1999. Multiple Origins of the mtDNA 9-bp Deletion in Populations of South India. Am. J. Phys. Anthropol., 109: 147-158.
7. Yao Y. G., Watkins W. S., Zhang Y. P., 2000. Evolutionary history of the mtDNA 9-bp deletion in Chinese populations and its relevance to the peopling of east and southeast Asia. Hum. Genet., 107: 504-512.
8. Zhuo G., Feng G., Leng J., Yu L., Jiang Y., 2010. A 9-bp deletion homoplasmy in women with polycystic ovary syndrome revealed by mitochondrial genome-mutation screen. Biochem. Genet., 48: 157-163.

**DETECTION OF 9-BP DELETION IN MITOCHONDRIAL GENOME
IN VIETNAMESE PATIENTS WITH SUSPECTED MITOCHONDRIAL
ENCEPHALOMYOPATHY**

**Truong Thi Hue¹, Pham Minh Hue¹, Le Ngoc Yen¹,
Pham Thi Van Anh², Ngo Diem Ngoc², Phan Tuan Nghia¹**

⁽¹⁾Hanoi University of Science, VNU

⁽²⁾National Hospital of Pediatrics

SUMMARY

Mutations in the mitochondrial genome are the cause of many different diseases, especially encephalomyopathies in humans. However, it is difficult to diagnose the diseases with clinical examinations. DNA analysis is the most reliable method for detection of the mutations. In this study, 72 patients under 20 years old with encephalomyopathies were checked for the presence of the A8344G mutation of MERRF syndrome, the A3243G mutation of MELAS syndrome and a 9-bp deletion between the COII and tRNA^{Lys} genes in their mitochondrial genome by using PCR-RFLP and DNA sequencing methods. DNA from peripheral blood samples was used as templates for PCR amplification of mitochondrial DNA (212 bp) fragment starting from 8155 to 8366 position of the human mitochondrial genome. By the polyacrylamide gel electrophoresis, 23 samples were shown to have a bit faster running amplified DNA band than the others. The PCR products were then digested with *Ban*II restriction enzyme, the *Ban*II-digested PCR products again confirmed the difference between the samples. The PCR products of the 23 suspected samples and those from their parents were cloned into pGEM vector, recombinant plasmids were isolated and used for nucleotide sequencing analysis. The obtained nucleotides of the 23 suspected samples were shown to have a 9 bp deletion (CCCCCTCTA) compared with the published reference sequence (J01415.2) and this deletion was inherited from the mother to her child(ren), and appeared in homoplasmy in all the cases. It was also found from this study that none of the 72 subjects carried the A8344G mutation of MERRF syndrome, but only one male patient carried both the 9 bp deletion and A3243G mutation of MELAS syndrome, indicating that there is no reliable relation between the 9 bp (CCCCCTCTA) deletion and A8344G or A3243G mutations.

Keywords: Mitochondrial DNA, 9-bp deletion, mitochondrial encephalomyopathy.

Ngày nhận bài: 15-7-2011