

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC ĐỘT BIẾN GEN *RBI* THÔNG QUA mRNA

Vũ Phương Nhung<sup>1</sup>, Lê Thúy Quỳnh<sup>2</sup>, Nguyễn Đăng Tôn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Xuân<sup>1</sup>, Nguyễn Hải Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Bệnh viện Mắt Trung ương, Bộ Y tế

Ngày nhận bài: 31.12.2015

Ngày nhận đăng: 15.4.2016

### TÓM TẮT

Ung thư nguyên bào võng mạc (retinoblastoma, Rb) là bệnh ung thư võng mạc ác tính ở trẻ em thường được phát hiện ở trẻ dưới 5 tuổi. Dạng di truyền xuất hiện ở khoảng 40% bệnh nhân UTNBVM cho thấy các phân tích di truyền gen *RBI* là một phân quan trọng trong công tác quản lý kiểm soát bệnh. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã sử dụng thành công phương pháp sàng lọc đột biến gen *RBI* bằng kỹ thuật giải trình tự gen từ nguồn DNA hệ gen. Tuy nhiên, với kích thước gen lớn lại không có các điểm nóng về đột biến gen được xác định nên việc sàng lọc gen trở nên đắt đỏ và tốn thời gian. Nhằm khắc phục nhược điểm đó, nghiên cứu này tiến hành xây dựng phương pháp sàng lọc đột biến gen *RBI* thông qua mRNA. RNA tổng số được tách từ mẫu máu tươi của một người khỏe mạnh và cDNA được tổng hợp thông qua quá trình phiên mã ngược. Toàn bộ vùng mã hóa của gen *RBI* được khuếch đại bằng sáu cặp mỗi đặc hiệu và giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Ở người khỏe mạnh, sản phẩm PCR từ cDNA là sáu băng đặc hiệu trên bản điện di gel agarose và có thể được dùng như kiểu mẫu chuẩn của bản phiên mã trải qua quá trình cắt nối bình thường của mRNA. Các sản phẩm PCR này được giải trình tự thành công và dữ liệu nhận được có thể so sánh với trình tự mRNA của gen *RBI* trên ngân hàng gen. Chúng tôi cũng đã xác định được sự phân cắt bất thường của bản sao gen *RBI* ở bệnh nhân mang đột biến c.G1960>C tại nucleotide cuối cùng trên exon 19 bằng cách khuếch đại các đoạn cDNA. Như vậy, phương pháp phân tích mRNA của gen *RBI* có thể phát hiện không chỉ các đột biến gây bệnh hay đột biến câm trong vùng mã hoá mà còn phát hiện được cả các đột biến gây ảnh hưởng tới quá trình cắt nối của phân tử mRNA. Phương pháp này giúp giảm giá thành, thời gian xét nghiệm và có thể được sử dụng như là bước sàng lọc đầu tiên khi xét nghiệm gen cho bệnh nhân.

**Từ khóa:** Đột biến tế bào dòng, gen *RBI*, ung thư nguyên bào võng mạc, RT-PCR, giải trình tự gen

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư nguyên bào võng mạc (retinoblastoma, Rb) là bệnh u ác tính mắt thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi. Rb xuất hiện với tỷ lệ khoảng 1/200000 ở Mỹ (Young *et al.*, 1999) và ở nhiều khu vực trên thế giới. Bệnh xảy ra cân bằng ở cả hai giới tính nam và nữ, không phụ thuộc nguồn gốc chủng tộc. Rb có thể xuất hiện ở dạng di truyền (~40%) hoặc không di truyền (~60%) (Balmer *et al.*, 2006). Dạng di truyền thường xảy ra ở hai mắt và nhiều ổ, trong khi dạng không di truyền chỉ xảy ra ở một mắt và một khối u. Cả hai dạng này của Rb đều liên quan đến sự mất chức năng của cả hai alen của gen áp chế khối u *RBI* (retinoblastoma 1) nằm trên nhiễm sắc thể 13q14. Dạng di truyền do bất hoạt một alen *RBI* có nguồn gốc từ dòng mầm (germline) (Cavenee *et al.*, 1983; Friend *et al.*, 1986; Knudson 1971). Protein *RBI* có vai trò quan trọng đối với sự điều khiển chu kỳ tế bào

và quá trình biệt hóa tế bào, tham gia vào sự chuyển pha G1/S bằng cách ức chế yếu tố phiên mã E2F cần thiết cho sự khởi đầu của pha S. Sự bất hoạt của *RBI* có tác động lớn nhất đến một quần thể nhỏ các tế bào tiền thân của tế bào nón trong quá trình phát triển võng mạc. Sự biểu hiện cao của *RBI* trong nhóm tế bào này chứng tỏ nó có vai trò rất lớn trong việc hạn chế phân chia và tăng sinh tế bào (Xu *et al.*, 2009).

Cho đến nay, hơn 900 đột biến đã được phát hiện trên gen *RBI* ở các bệnh nhân Rb (Valverde *et al.*, 2005). Các phương pháp tiếp cận như kết hợp giữa multiplex PCR định lượng và xác định trình tự, sắc ký lỏng cao áp biến tính (DHPLC) với multiplex PCR định lượng cho các đoạn huỳnh quang ngắn (QMPSF) hay PCR-RFLP với multiplex PCR định lượng và giải trình tự gen cho phép phát hiện được các đột biến tái phát, các mất đoạn/thêm đoạn lớn và các đột biến điểm trên vùng promoter, trên các exon và cả vùng biên intron-exon của gen *RBI* (Abidi *et*

*al.*, 2011; *Abouzeid et al.*, 2009; *Fernández et al.*, 2007; *Parsam et al.*, 2009). Ngoài cách tiếp cận phân tích DNA genome kể trên, một số nhóm nghiên cứu đã chọn cách phân tích mRNA của gen *RBI* nhằm xác định các biến đổi nucleotide trên vùng mã hóa của gen cũng như hệ quả của các đột biến trên gen đối với quá trình hình thành bản phiên mã trưởng thành của gen *RBI* (*Parsam et al.*, 2011; *Zhang et al.*, 2008). Hàng năm, ở Việt Nam khoảng 40 ca ung thư vòm họng mới được phát hiện. Phần lớn các bệnh nhân nhập viện ở giai đoạn muộn nên rất khó điều trị bảo tồn mắt bị bệnh. Đặc biệt, nhiều trường hợp bệnh nhân có bố hoặc mẹ đã từng bị ung thư vòm họng. Điều này cho thấy vai trò của tư vấn di truyền hoàn toàn chưa được phát huy. Năm 2005, Nguyễn Công Kiệt và Nguyễn Trí Dũng đã nghiên cứu đặc điểm di truyền trên 30 ca ung thư vòm họng. Tuy nhiên, do những hạn chế về phương pháp nghiên cứu, các tác giả mới chỉ xác định được trường hợp bệnh nhân có mất đoạn ở vị trí NST 13q14 (Kiệt, Dũng 2005). Việc xác định đột biến gen *RBI* trên các bệnh nhân Rb và gia đình mang lại các thông tin cần thiết để thực hiện điều trị hiệu quả và bảo tồn thị lực cho bệnh nhân. Ngoài ra, đây cũng là cơ sở để thực hiện tư vấn di truyền cho thân nhân các bệnh nhân. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã sử dụng phương pháp giải trình tự trực tiếp vùng promoter, các vùng biên intron-exon và toàn bộ các exon của gen *RBI* của bệnh nhi ung thư vòm họng. Mặc dù đã xác định được đột biến gen *RBI* ở một số bệnh nhân nghiên cứu, cách tiếp cận này vẫn có mặt hạn chế như thời gian phân tích mẫu bị kéo dài và giá thành cao do kích thước gen lớn (Hà *et al.*, 2014). Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đặt mục tiêu thiết lập phương pháp phân tích cDNA của gen *RBI* trên đối tượng người Việt Nam, qua đó có thể xác định được đột biến cũng như ảnh hưởng của các đột biến thay đổi/mất đoạn lớn tới bản phiên mã của *RBI*.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên một nữ khỏe mạnh (kí hiệu H), không có tiền sử gia đình bị mắc Rb và một bệnh nhi bị ung thư vòm họng (kí hiệu K24). Các cá nhân đồng ý tham gia nghiên cứu tự nguyện. Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Nghiên cứu hệ gen thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, năm 2015.

## Phương pháp nghiên cứu

### Tách chiết RNA tổng số từ máu

Mẫu máu ngoại vi của người khỏe mạnh và bệnh nhân bảo quản trên đá được tách RNA tổng số trong vòng 6 giờ sau khi lấy máu. Mẫu máu (1 ml) được chuyển vào ống falcon loại 15 ml và bổ sung đệm RBC ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$  và EDTA 0.5M, pH 7.3). Hỗn hợp được trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút để phá vỡ các tế bào hồng cầu. Sau khi ly tâm loại bỏ dịch, cặn tế bào được rửa với 1 ml PBS vô trùng. Tiếp theo, RNA tổng số được tách chiết sử dụng trizol (15596-026, Life Technologies) theo phương pháp của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết, 500 ng RNA tổng số được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, nồng độ và độ tinh sạch của RNA tổng số được xác định bằng máy quang phổ kế (Eppendorf) trước khi lưu giữ ở  $-80^\circ\text{C}$ .

### Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp sử dụng bộ kit First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real-time PCR (Affymetrix-Mỹ). Phản ứng phiên mã ngược bao gồm các thành phần sau với tổng thể tích 20  $\mu\text{l}$ : 500 ng RNA tổng số, 2  $\mu\text{l}$  primer oligodT, 2  $\mu\text{l}$  RT buffer 10X, 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  RNase-inhibitor, 1  $\mu\text{l}$  MLV-RT. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy luân nhiệt Vapo-protect (Eppendorf):  $44^\circ\text{C}$  - 60 phút,  $92^\circ\text{C}$  - 10 phút, giữ ở  $4^\circ\text{C}$ .

### PCR khuếch đại vùng gen mã hóa của *RBI*

Các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại toàn bộ cDNA của gen *RBI* được tham khảo từ Parsam và đồng tác giả (*Parsam et al.*, 2011). Các exon từ 7-27 được khuếch đại theo chu trình nhiệt được thực hiện trên máy luân nhiệt Vapo-Protect (Eppendorf):  $95^\circ\text{C}$ -5 phút, 40 chu kỳ ( $95^\circ\text{C}$ -15 giây;  $56^\circ\text{C}$ -30 giây;  $72^\circ\text{C}$ -1 phút),  $72^\circ\text{C}$ -5 phút, giữ ở  $4^\circ\text{C}$ . Riêng đối với cặp mồi sử dụng để khuếch đại exon từ 1 đến 6, nhiệt độ gắn mồi được nâng lên  $60^\circ\text{C}$ . PCR được thực hiện với tổng thể tích 25  $\mu\text{l}$  bao gồm các thành phần sau: 1  $\mu\text{l}$  cDNA, 2.5  $\mu\text{l}$  Dream Taq Buffer 10X, 1.5  $\mu\text{l}$  dNTPs (2.5 mM mỗi loại) (Bioword-Mỹ), 1  $\mu\text{l}$  mồi đặc hiệu (10 pmole/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  DMSO và 0.125  $\mu\text{l}$  Dream Taq Polymerase (5unit/  $1\mu\text{l}$ , Thermo Scientific). Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm ethidium bromide và được quan sát dưới ánh sáng UV. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch qua cột sử dụng bộ kit Gene Jet PCR purification Kit (Thermo Scientific) theo phương pháp của nhà sản xuất.

### Giải trình tự chuỗi DNA

PCR giải trình tự chuỗi được thực hiện sử dụng bộ kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem). Các mẫu được chạy trên máy xác định trình tự tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm sinh học BioEdit.

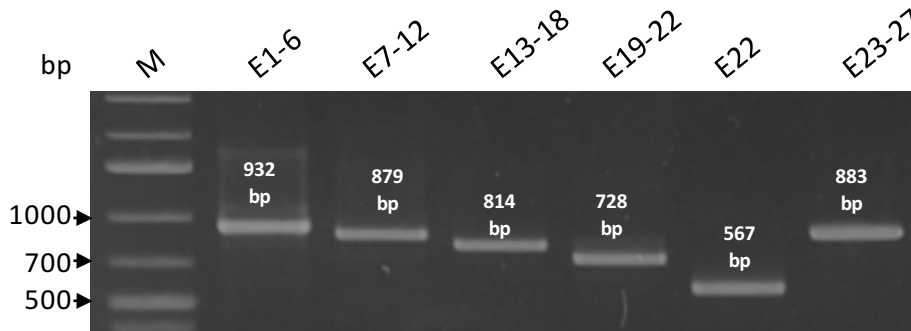
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả tách chiết RNA tổng số

Mẫu máu ngay sau khi lấy được xử lý với đệm RBC để loại bỏ hồng cầu, các tế bào bạch cầu sau đó được thu lại phục vụ cho tách RNA tổng số theo phương pháp sử dụng trizol. Kết quả điện di RNA tổng số cho thấy có ba băng tương ứng với rRNA 28S, 18S và 5S, chứng tỏ RNA không bị biến tính trong quá trình thao tác mẫu đồng thời không bị nhiễm DNA tổng số. Nồng độ RNA tổng số đạt 350 ng/ $\mu$ l với độ sạch cao thể hiện ở giá trị A260/A280 là 1,86. Như vậy, quy trình tách chiết RNA tổng số từ mẫu máu tươi đã cho kết quả đáng tin cậy và RNA có thể được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

### Kết quả PCR và phân tích trình tự vùng gen mã hóa của *RB1*

cDNA tổng hợp dựa trên mRNA được sử dụng làm khuôn cho PCR. Điều kiện PCR được thiết lập với nhiệt độ gắn mồi 56<sup>0</sup>C để khuếch đại các đoạn exon từ 1 đến 27 của gen *RB1*. Riêng exon từ 1 đến 6 được điều chỉnh nhiệt độ gắn mồi cao hơn do vùng gen cản nhân lên có nhiều GC. Năm cặp mồi đặc hiệu tham khảo từ nhóm nghiên cứu của Parsam và đồng tác giả (2011) được thiết kế gộp lên nhau, về lý thuyết sẽ khuếch đại được 6 đoạn gen bao gồm các exon từ 1 đến 27 của gen *RB1* (trình tự mồi và kích thước sản phẩm PCR xem ở bảng 1). Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy sản phẩm PCR các đoạn gen *RB1* trên mẫu người khỏe mạnh là một băng duy nhất với kích thước như dự đoán (Hình 1). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc sử dụng phương pháp khuếch đại toàn bộ vùng gen mã hóa của *RB1* thông qua mRNA. Các đoạn exon của *RB1* được giải trình tự theo cả hai chiều xuôi và ngược, sau đó trình tự cDNA của mẫu H được so sánh với trình tự cDNA chuẩn của gen *RB1* trong ngân hàng gen (mã số NM\_000231.2). Kết quả phân tích cho thấy mẫu H không có bất thường nào về trình tự nucleotide tại 6 đoạn exon của gen *RB1*. Như vậy kết quả này đã cho thấy khả năng có thể xác định trình tự vùng mã hóa của gen *RB1* thông qua giải trình tự cDNA. Ngoài ra, điện di đồ sản phẩm PCR ở hình 2 có thể được sử dụng làm hình ảnh tiêu chuẩn của gen *RB1* trên người khỏe mạnh.



Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại vùng mã hóa của gen *RB1*. M: Thang DNA chuẩn. E1-6 => E23-27: các exon từ 1 đến 27 của gen *RB1*. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0.8%.

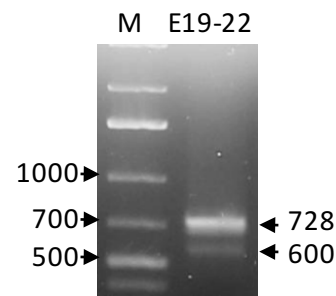
### Kết quả phân tích mRNA trên mẫu bệnh nhân UTNBVM

Bệnh nhi (kí hiệu K24) sinh năm 2012, mắc bệnh Rb với khối u mắt phải và không có tiền sử bố hoặc mẹ bị bệnh này. Kết quả phân tích DNA genome trước đây

đã phát hiện đột biến dị hợp tử c.G1960>C, đây là một đột biến thay thế xảy ra tại vị trí nucleotide cuối cùng của exon 19. Đột biến này cũng đã được báo cáo trong cơ sở dữ liệu về các đa hình/đột biến của gen *RB1* trên Leiden Open Variation Database, nó làm thay đổi quá trình cắt nối của mRNA. Do vậy, sự thay đổi về kích

thước bản sao mRNA của gen *RBI* được tập chung kiểm tra. Chúng tôi đã tách chiết RNA tổng số từ mẫu máu của bệnh nhi này. Sau phản ứng tổng hợp cDNA, các exon thuộc gen *RBI* được khuếch đại sử dụng 6 cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1). Kết quả PCR cho thấy, chúng tôi đã khuếch đại thành công 5 đoạn cDNA của gen *RBI* với kích thước đúng như dự đoán. Riêng đoạn cDNA chứa các exon 19-22, kết quả PCR cho thấy xuất hiện 2 băng, một băng có kích thước lý thuyết là 728bp và một băng thấp hơn có kích thước khoảng 600bp (Hình 3). Kết quả này đã thể hiện sự biến đổi bất thường trong quá trình cắt nối-chế biến mRNA của gen *RBI* ở bệnh nhi K24 dẫn tới hình thành 2 bản phiên mã khác nhau. Như vậy, chúng tôi đã bước đầu thành công trong hướng tiếp cận phân tích mẫu bệnh nhân ung thư võng mạc sử dụng nguồn là mRNA. Phân tích các bản phiên mã của mRNA gen *RBI* có giá trị lớn trong việc phát hiện các đột biến gây bệnh có ảnh hưởng tới phân cắt mRNA như: các đột biến xảy ra trong vùng trình tự cắt liên ứng, đột biến trong intron và các đột biến câm trong các exon. Mặt khác, phân tích mRNA còn có thể cho biết các hậu quả ngoài dự đoán của một số dạng đột biến khác như đột biến vô nghĩa, nhầm nghĩa đối với phân cắt mRNA, từ đó cung cấp các thông tin hữu ích về các yếu tố trình tự có vai trò điều hòa quá trình cắt nối mRNA. Các ảnh hưởng của đột biến lên quá trình phân cắt mRNA đã được nghiên cứu trong một số bệnh di truyền. Người ta đã tìm thấy một số đột biến tế bào mầm dạng nhầm nghĩa, vô nghĩa và dịch khung gây bất thường trong phân cắt mRNA của gen *ATM* gây hội chứng Louis-Bar và gen *NFI* gây u sợi thần kinh (Ars *et al.*, 2000; Teraoka *et al.*, 1999). Năm 2007, sử dụng phương pháp phân tích bản phiên mã của *RBI*,

Dehainault và đồng tác giả đã xác định được một đột biến trong intron 23 ở hai anh em mắc bệnh ung thư võng mạc mà sàng lọc DNA genome trước đó không có kết quả. Đột biến này gây hậu quả một đoạn intron 23 bị chèn vào giữa exon 23 và 34 của gen này (Dehainault *et al.*, 2007). Cũng bằng cách tiếp cận này, Parsam và đồng tác giả đã phát hiện các bất thường trong cắt nối mRNA ở 1 bệnh nhân mà trước đó không tìm thấy đột biến nào khi sử dụng DNA hệ gen (Parsam *et al.*, 2011). Điều này cho thấy phương pháp tiếp cận thông qua phân tích mRNA của gen *RBI* còn có thể xác định được những đột biến mà phân tích DNA hệ gen không thể hiện được. Việc xây dựng thành công phương pháp phân tích bản phiên mã của gen *RBI* góp phần quan trọng trong việc giảm giá thành và thời gian xét nghiệm. Đồng thời, đây cũng là một phương pháp hữu dụng có thể được sử dụng kết hợp với phân tích nguồn DNA trong sàng lọc đột biến ở các bệnh nhân ung thư võng mạc.



**Hình 3** Phân tích mRNA exon 19-22 mẫu K24. M: Thang DNA chuẩn.

**Bảng 1.** Trình tự mồi sử dụng cho phản ứng PCR.

Số thứ tự	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước PCR (bp)
1	RB-E-1-6-FP	GAGGGCGCGTCCGGTTTTTC	932
	RB-E-1-6-RP	CGTGCACTCCTGTCTGACCTCGC	
2	RB-E-7-12-FP	CAGCAAATTGGAAGGACATGTGA	879
	RB-E-7-12-RP	CGGGTAATACAAGCGAACTCCAAG	
3	RB-E-13-18-FP	AATTCCTCCACACACACTCCAGTTAG	814
	RB-E-13-18-RP	CTGGGTCTGGAAGGCTGAGGT	
4	RB-E-19-22-FP	AAAGGACCGAGAAGGACCAAACCTG	728
	RB-E-19-22-RP	GACCTTCTGAAATTTTATATGGACTCTT	
5	RB-E-22-FP	CGCCTTCTGTCTGAGCACCC	567
	RB-E-22-RP	GTCGCTGTTACATACCATCTGATTTA	
6	RB-E-23-27-FP	ATGCAAAGTGAAGAATATAGACCTT	883
	RB-E-23-27-RP	ATGGCAGGATTTACACAAGATTTTCA	

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được các điều kiện kỹ thuật cho phép xác định trình tự cDNA của gen *RB1*. Cụ thể, sử dụng phương pháp tách chiết RNA tổng số và kỹ thuật RT-PCR, chúng tôi đã khuếch đại thành công 6 đoạn exon thuộc gen *RB1* của một người khỏe mạnh và kết quả giải trình tự cho thấy đó là toàn bộ vùng mã hóa của gen này. Kết quả phân tích kiểm chứng trên một mẫu bệnh nhi ung thư võng mạc thông qua nguồn mRNA cho thấy phương pháp này đã phát hiện được sự bất thường trong quá trình cắt nối mRNA của gen *RB1*. Kết quả thu được góp phần hữu ích trong việc hướng tới áp dụng như một phương pháp chẩn đoán cho các bệnh nhân ung thư võng mạc với chi phí tiết kiệm hơn, đồng thời giúp phát hiện các đột biến mà không xác định được thông qua phân tích DNA hệ gen.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện từ nguồn kinh phí của Đề tài cấp cơ sở năm 2015 của Viện Nghiên cứu hệ gen.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abidi O, Knari S, Sefri H, Charif M, Senechal A, Hamel C, Rouba H, Zaghoul K, El Kettani A, Lenaers G, Barakat A (2011) Mutational analysis of the *RB1* gene in Moroccan patients with retinoblastoma. *Mol Vis* 17:3541-3547.

Abouzeid H, Schorderet DF, Balmer A, Munier FL (2009) Germline mutations in retinoma patients: Relevance to low-penetrance and low-expressivity molecular basis. *Mol Vis* 15:771-777.

Ars E, Serra E, García J, Kruyer H, Gaona A, Lázaro C, Estivill X (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9(2): 237-247.

Balmer A, Zografos L, Munier F (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 25(38): 5341-5349.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305(5937): 779-784.

Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, Doz F, Desjardins L, Couturier J, Parent P, Stoppa-Lyonnet D, Gauthier-Villars M, Houdayer C (2007) A deep intronic mutation in the *RB1* gene leads to intronic sequence exonisation. *Eur J Hum Genet* 15(4): 473-477.

Fernández C, Repetto K, Dalamon V, Bergonzi F, Ferreira V, Szijan I (2007) *RB1* Germ-Line Deletions in Argentine Retinoblastoma Patients. *Mol Diagn Ther* 11(1): 55-61.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323(6089): 643-646.

Hà NH, Hung ĐM, Quỳnh LT, Dương NT, Tôn ND (2014) Phát hiện đột biến gen *rb1* ở trẻ em ung thư nguyên bào võng mạc. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 12(1): 23-29.

Kiệt NC, Dũng NT (2005) Đặc điểm di truyền trong ung thư nguyên bào võng mạc *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh* 9(1): 99-103.

Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(4): 820-823.

Parsam V, Ali M, Honavar S, Vemuganti G, Kannabiran C (2011) Splicing aberrations caused by constitutional *RB1* gene mutations in retinoblastoma. *J Biosci* 36(2): 281-287.

Parsam V, Kannabiran C, Honavar S, Vemuganti G, Ali M (2009) A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the *RB1* gene in retinoblastoma. *J Genet* 88(4): 517-527.

Price EA, Price K, Kolkiewicz K, Hack S, Reddy MA, Hungerford JL, Kingston JE, Onadim Z (2014) Spectrum of *RB1* mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet* 51(3): 208-214.

Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengüt S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P (1999) Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, *ATM*: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64(6): 1617-1631.

Valverde JR, Alonso J, Palacios I, Pestaña Á (2005) *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet* 6:53-53.

Xu XL, Fang Y, Lee TC, Forrest D, Gregory-Evans C, Almeida D, Liu A, Jhanwar SC, Abramson DH, Cobrinik D (2009) Retinoblastoma Has Properties of a Cone Precursor Tumor and Depends Upon Cone-Specific MDM2 Signaling. *Cell* 137(6): 1018-1031.

Young J, Smidth M, Roffers S, Liff J, Bunin J (1999) Cancer incidence and survival among children and adolescent. *In Retinoblastoma (ed. L. A. Ries): 1975-1995*

Zhang K, Nowak I, Rushlow D, Gallie BL, Lohmann DR (2008) Patterns of missplicing caused by *RB1* gene mutations in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat* 29(4): 475-484.

## DEVELOPMENT OF *RB1* MUTATION DETECTION METHOD BASED ON mRNA

Vu Phuong Nhung<sup>1</sup>, Le Thuy Quynh<sup>2</sup>, Nguyen Dang Ton<sup>1</sup>, Nguyen Thi Xuan<sup>1</sup>, Nguyen Hai Ha<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Vietnam National Institute of Ophthalmology, Hanoi, Vietnam*

### SUMMARY

Retinoblastoma (Rb) is a malignant tumor of the retina, occurring usually in children before age five. The heritable form accounting for about 40% of Rb making genetic analysis of *RB1* gene is an important part of disease management. In previous study, we have successfully employed a method of direct sequencing for *RB1* mutation screening from genomic DNA. However, given the large size of this gene and no reported mutation hotspots, the testing can be costly and time consuming method. To overcome this problem, we have developed a method to detect mutation from *RB1* mRNA. Total RNA was isolated from blood leukocytes of a healthy individual and a Rb patient, cDNA was subsequently synthesized using reverse-transcriptase PCR. Whole cDNA of *RB1* was amplified using six specific primer pairs and sequenced by Sanger method. The PCR products from healthy individual were shown as six specific bands on the agarose gel and could be used as the standard pattern of the normally spliced transcripts. Those of PCR products were sequenced successfully and data can be aligned with the reference sequence of *RB1* cDNA on the Genebank to identify nucleotide variants. We also identified an abnormal splicing of *RB1* gene in the Rb patient harboring a c. G1960>C mutation at the end of the exon 19 by amplification of the *RB1* cDNA fragments. Hence using *RB1* mRNA test can reveal not only the silent/pathogenic mutations in the coding region of *RB1*, but also mutations that affect the normal splicing of *RB1* mRNA. This method reduces cost and time, can be used as the first step of *RB1* analysis in Rb patients.

**Keywords:** *Retinoblastoma, RB1 gene, germline mutation, RT-PCR, Sanger sequencing*

---

✉ *Authors for correspondence: E-mail: [nguyenhaiha@igr.ac.vn](mailto:nguyenhaiha@igr.ac.vn)*