Xây dựng quy trình phân tích kiểu gen 6 exon của gen *NPHS2* ở bệnh nhi mắc hội chứng thận hư tiên phát

Phạm Thị Hồng Nhung#, Trần Vũ Quỳnh Giao#, Vũ Vân Nga, Phạm Văn Đếm, Đinh Đoàn Long, Vũ Thị Thơm\*

*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

*#: Tác giả có đóng góp ngang nhau*

Tóm tắt

*NPHS2* là gen mã hóa cho protein podocin. Nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra đột biến gen này là nguyên nhân chính gây nên hội chứng thận hư (HCTH) khởi phát sớm ở trẻ nhỏ và HCTH kháng corticosteroid. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích kiểu gen 6 exon của gen *NPHS2* trên nhóm 150 bệnh nhi mắc hội chứng thận hư tiên phát ở Viện Nhi trung ương. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng bao gồm tách DNA tổng số từ mẫu máu ngoại vi, khuếch đại gen bằng PCR, xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi đã xây dựng được quy trình phân tích kiểu gen 6 exon của gen NPHS2 với cùng một điều kiện phản ứng PCR và bước đầu có những kết quả với 251 SNP được phát hiện, trong đó có 2 vị trí xuất hiện SNP mới ở exon 2 và exon 3. Đây là kết quả hết sức có ý nghĩa để giúp cho những nghiên cứu sau này về mối liên quan giữa kiểu gen và nguy cơ mắc HCTH kháng corticosteroid ở trẻ em mắc HCTH tiên phát người Việt Nam.

Mã số phân loại chuyên ngành: y sinh học phân tử

Từ khóa*:* NPHS2, podocin, hội chứng thận hư

1. Đặt vấn đề[[1]](#footnote-1)\*

Hội chứng thận hư (HCTH) là bệnh về cầu thận thường gặp nhất ở trẻ em [1]. Khoảng 20% bênh nhân không có đáp ứng sau điều trị với corticosteroid (nhóm HCTH kháng steroid) và các thuốc ức chế miễn dịch khác, trong đó 50% bệnh nhân sẽ triển thành suy thận hoặc bệnh thận giai đoạn cuối gây ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe và cuộc sống của trẻ cũng như gia đình [2]. Các nghiên cứu phân tử hiện nay đã xác định được một số gen mã hóa cho các protein có vai trò chính đảm bảo tính toàn vẹn của hàng rào lọc cầu thận, trong đó phải kể đến podocin [3]. Podocin được mã hóa bởi gen *NPHS2* gồm 8 exon nằm trên vai dài của nhiễm sắc thể số 1 ở người (1q25-q31) [4]. Bằng những bằng chứng trên động vật thực nghiệm knock out gen *NPHS2* và những bằng chứng phân tích mối liên quan giữa đa hình di truyền gen này với HCTH kháng steroid ở trẻ em, các nhà khoa học đã chứng minh được đột biến gen *NPHS2* có liên quan chặt chẽ tới hội chứng thận hư tiên phát kháng corticosteroid [5][6].Phân tích đột biến gen *NPHS2* có thể giúp sáng tỏ nguyên nhân kháng thuốc để bệnh nhân không phải chịu đựng những tác dụng phụ và các biến chứng nặng nề khi phải điều trị bằng các thuốc ức chế miễn dịch. Tại Việt Nam dù đã một số nghiên cứu lâm sàng về HCTH kháng corticosteroid nhưng chưa có nghiên cứu nào về đa hình di truyền trên bệnh nhân mắc HCTH thể kháng costicosteroid được công bố*.*Từ nhu cầu lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu để thiết lập quy trình phân tích kiểu gen 6 exon của gen *NPHS2*.

 **2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

***Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm:*** 150 mẫu máu toàn phần (2ml) bảo quản trong EDTA lưu ở -20˚C đến khi sử dụng.

***Tách chiết DNA tổng số:***DNA tổng số được tách từ mẫu máu toàn phần, chúng tôi sử dụng E.Z.N.A blood DNA Mini kit (Omega-Biotek) theo quy trình khuyến cáo của hãng

***Thiết kế mồi đặc hiệu cho 6 exon của gen NPHS2:***Cặp mồi được thiết kế và đánh giá các thông số với phần mềm PerlPrimer version 1.1.14. Cặp mồi tự thiết kế được đặt tổng hợp tại hãng IDT (Mỹ) với trình tự được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi nhân dòng gen *NPHS2*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Exon** | **Trình tự mồi** | **Độ dài sản phẩm**  |
| 1 | GCA GCG ACT CCA CAG GGA CT | 414 bp |
| TCC ACC TTA TCT GAC GCC CC |
| 2 | CTCTGACTACTCTGATTTGACTT | 438 bp |
| GGCTTCCTGTTCACATTTGAG |
| 3 | CTA GGA TCA TTC TTA TGC CA | 238 bp |
| GAGGTCCATATTACA AAT CTG C |
| 4 | TCC CTG TTT ATA CCTATT GTC C | 475 bp |
| CCC ATT CCC TAG ATT GCC |
| 5 | AAA GGA GCC CAA GAA TCA AG | 292 bp |
| AAA TAT TTC AGC ATA TTG GCC |
| 6 | GTT TAG GCA TGC TCT CCT C | 228 bp |
| GATATGGCTATAGTA CTC AGT G |

***Nhân dòng 6 exon của gen NPHS2 bằng PCR:***Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn mồi, nồng độ hoạt động tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR sử dụng Pfu. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.5%, dùng thang chuẩn Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321, Thermo Scientific).

***Xác định kiểu gen 6 exon gen NPHS2 bằng phương pháp giải trình tự:***20 µl sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega-biotek) và giải trình tự sử dụng máy phân tích phân đoạn DNA tự động 3500 (Applied Biosystems) và kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự được mở bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, qua đó xác định kiểu gen của bệnh nhân.

**3. Kết quả và thảo luận**

*Tách chiết DNA tổng số*: 150 mẫu máu toàn phần đều tách được DNA tổng số nhờ sử dụng kit E.Z.N.A blood DNA Mini kit (Omega-Biotek). Nồng độ DNA dao động từ 31.7 – 353.65 ng/µl. Mẫu có độ tinh sạch cao, 131/150 (87.33%) mẫu có chỉ số A260/280 trong khoảng 1.7-2.0 đủ điều kiện để tiến hành phản ứng nhân dòng tiếp theo bằng phương pháp PCR.

*Nhân dòng 6 exon của gen NPHS2 bằng PCR:* cả 6 exon đều nhân dòng thành công với cùng một điều kiện PCR được trình bày trong bảng 2:

|  |  |
| --- | --- |
| Hóa chất | Nồng độ |
| dNTP Mix | 0.2 mM |
| Pfu DNA polymerase | 0,05 u/µl  |
| Mồi (mỗi loại) | 0.3 µM |
| DNA | 50 - 100 ng/µl |

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 95˚C trong 3 phút; 35 chu kì: 95˚C trong 30 giây, gắn mồi ở 56˚C trong 30 giây, 72˚C trong 1 phút; thời gian kéo dài cuối 72˚C trong 5 phút. Chất lượng PCR được minh họa bằng ảnh điện di cho exon 2 ở hình 1.



Hình 1. Ảnh điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm PCR exon 2 của gen *NPHS2*.

Trong tối ưu quy trình để xác định trình tự của một gen kích thước lớn với nhiều exon, việc đưa được phản ứng PCR để nhân dòng tất cả các exon về cùng một điều kiện có ý nghĩa rất quan trọng trong ứng dụng thực tế để chẩn đoán bệnh. Ở nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện được việc nhân dòng thành công 6 exon của gen NPHS2 trong cùng một điều kiện như trình bày ở trên, qua đó tiết kiệm thời gian và công sức của người thực hiện một cách đáng kể.

*Xác định kiểu gen NPHS2 bằng phương pháp giải trình tự:* Dựa vào kết quả giải trình tự, kết hợp với cơ sở dữ liệu trên NCBI chúng tôi xác định được các SNP xuất hiện ở 6 exon như trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Các SNP xuất hiện trong 6 exon thuộc gen *NPHS2*

|  |  |
| --- | --- |
| Exon | Các SNP |
| 1 | 72 SNP; rs1079292; rs7585644 xuất hiện đa hình di truyền |
| 2 | 44 SNP; rs3738423 xuất hiện đa hình di truyền; xuất hiện đột biến mới (A/T) ở vị trí 161 với kiểu gen dị hợp tử |
| 3 | 32 SNP; rs200437667 xuất hiện đa hình di truyền; xuất hiện đột biến mới (T/A) ở vị trí 130 với kiểu gen đồng hợp tử đột biến  |
| 4 | 37 SNP; rs12401711; rs12401708; rs528833893 xuất hiện đa hình di truyền |
| 5 | 49 SNP; không xuất hiện đa hình di truyền |
| 6 | 17 SNP; không xuất hiện đa hình di truyền |

Trên thế giới, đã có nhiều công bố về giải trình tự toàn bộ exon của gen NPHS2, tuy nhiên, đây là lần đầu tiên chúng tôi công bố về giải trình tự toàn bộ exon trên gen NPHS2 ở bệnh nhân nhi người Việt Nam mắc hội chứng thận hư tiên phát. Trong đó, chúng tôi phát hiện có hai đột biến mới nằm trên exon 2 và exon 3 của gen NPHS2. Liệu hai đột biến mới này có ý nghĩa gì trong hội chứng thận hư tiên phát kháng corticosteroid hay không, cần có những nghiên cứu tiếp theo để kiểm chứng giả thuyết này.

4. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định kiểu gen trên 6 exon thuộc gen *NPHS2*, áp dụng thành công quy trình này phân tích gen trên nhóm bệnh nhân nhi mắc hội chứng thận hư tiên phát.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Đại học Quốc gia Hà Nội cho đề tài mã số QG.16.23 để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Yu Z, Ding J, Huang J, Yao Y, Xiao H, Zhang J, et al. Mutations in NPHS2 in sporadic steroid resistant nephrotic syndrome in Chinese children. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:902-8.

2. Otukesh H, Otukesh S, Mojtahedzadeh M, Hoseini R, Fereshtehnejad SM, Riahi FA, et al. Management and outcome of steroid-resistant nephrotic syndrome in children. IJKD. 2009;3:210-7.

3. Cho YH, Lee HJ, Choi JH, Lee HB, Ha SH, Choi Y, et al. WT1 and NPHS2 mutations in Korean children with steroid resistant nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol. 2008;23:63-70.

4. Nora Franceschini, Kari E North, Jeffrey B Kopp, Louise Mckenzie, Cheryl Winkler. NPHS2 gene, nephritic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a huge review. Genetics in Medicine. 2006; 8:63-75.

5. Gianluca Caridi, Francesco Perfumo, Gian Marco Ghiggeri. NPHS2 (podocin) mutations in nephrotic syndrome, Clinical Spectrum and Fine Mechanism. Pediatric Research. 2005; 57:54R-61R.

6. Nicolas Boute, Olivier Gribouval, Severine Roselli, Frane Benessy, Hyunjoo Lee, Arno Fuchshuber, Karin Dahan, Marie-Claire Gubler, Patrick Niaudet, Corinne Antignac. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid resistant nephritic syndrome. Nature genetics. 2000; vol24:349-354.

Establishing the Genotyping Method of 6 exons of *NPHS2* gene in pediatric patients with nephrotic syndrome

Pham Thi Hong Nhung#, Tran Vu Quynh Giao#, Vu Van Nga, Pham Van Dem, Dinh Doan Long, Vu Thi Thom\*

*VNU School of Medicine and Pharmacy - Vietnam National University,
144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

*#: Equal contribution; \*: corresponding author*

Abstract: *NPHS2* is gene coding for podocin protein that plays an important role in nephrotic syndrome. Many studies showed *NPHS2* causing early onset and not responding to standard steroid treatment in pediatric patients with nephrotic syndrome. In this study, we established the genotyping method of 6 exons of *NPHS2* in pediatric patient blood samples collecting in National Pediatric Hospital. Blood samples was extracted DNA and amplified wanted gene by PCR. Different PCR conditions was tested, then optimal PCR product was sequenced. From sequencing results, 251 SNPs from 6 exons was detected including 7 SNPs with various polymorphism; 2 new SNPs in exon 2 and exon 3. In conclusion, we were successfully establishing the genotyping method of all 6 exons of NPHS2 in one PCR procedure and got some first results that would be useful for our next clinical study on Vietnamese pediatric patients with nephrotic syndrome.

*Keywords:* NPHS2, podocin, nephrotic syndrome

1. \* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1677968818

 Email: thomtbk5@gmail.com [↑](#footnote-ref-1)