

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong xác định HLA

Nguyễn Đặng Dũng*; Nguyễn Ngọc Tuấn*

TÓM TẮT

Xác định HLA bằng kỹ thuật sinh học phân tử (còn gọi là định tít ADN) là kỹ thuật hiện đại, cho kết quả khách quan. Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật dựa trên khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên HLA có trong tế bào của mẫu xét nghiệm, sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với gen đã thiết kế sẵn, thông qua phản ứng PCR. Lần đầu tiên tại Học viện Quân y, áp dụng thành công kỹ thuật định tít ADN trong điều kiện ch- a thiết lập la bộ định tít ADN độc lập. Kỹ thuật đã đ- ợc ứng dụng để xác định HLA trên bệnh nhân (BN) nhận tim ghép và ng- ời cho tim chết não.

* Từ khóa: Định tít ADN; PCR.

Research on application of molecular biology technique in HLA typing

SUMMARY

Determination of HLAs based on molecular biology technique, known as DNA typing, is proved to be a state-of-the-art technology in tissue typing that gives more precise typing results compared to conventional serology technique. The principle of the technique is the PCR-based amplification of HLA-encoding target genes in the cell sample, with the use of readily designed specific primers.

In this paper, we reported our success, for the first time in Vietnam Military Medical University, the application of DNA typing technique in the context of a lack of an independent, fully-equipped DNA typing laboratory. The technique was then utilized in HLA typing for donor and recipient of the first case of heart transplantation in Vietnam.

* Key words: DNA typing; PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

HLA là tên viết tắt của kháng nguyên bạch cầu ng- ời (human leukocyte antigen). HLA đ- ợc mã hóa bởi một hệ thống gen nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 6, bao gồm 3 locus chính, có ký hiệu là A, B (mã hóa cho HLA lớp I) và DR (mã hóa cho

HLA lớp II). Các locus th- ờng liên kết chặt chẽ với nhau trong quá trình di truyền, d- ới dạng haplotít. HLA có mặt trên tế bào miễn dịch và nhiều tế bào khác của cơ thể, tham gia vào quá trình nhận diện kháng nguyên, dẫn đến hình thành đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chống kháng nguyên lạ xuất hiện trong cơ thể ng- ời. Bên cạnh đó, HLA còn đ- ợc

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

chứng minh là kháng nguyên gây phản ứng thải ghép mạnh nhất khi tiến hành ghép mô, cơ quan giữa ng- ời cho và ng- ời nhận. Do

đó, khi ghép mô hoặc tạng, cần lựa chọn ng- ời cho và ng- ời nhận phù hợp tốt nhất

về kháng nguyên HLA, nhằm giảm thiểu phản ứng thải ghép.

Định týp HLA là kỹ thuật xác định kháng nguyên HLA, làm cơ sở lựa chọn ng- ời cho và ng- ời nhận ghép hòa hợp tốt nhất về HLA. Hiện nay, có 2 ph- ơng pháp định týp HLA sử dụng phổ biến nhất là: 1) ph- ơng pháp huyết thanh học (kỹ thuật vi độc tế bào lympho, sử dụng kháng thể kháng HLA đã biết để xác định kháng nguyên HLA trên bề mặt tế bào lympho) và 2) định týp ADN (xác định gen mã hóa cho HLA) dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử, với nguyên lý cơ bản là: sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với gen mã hóa cho HLA, thực hiện phản ứng PCR với mẫu ADN đ- ợc tách chiết từ mẫu bệnh phẩm; gen mã hóa HLA chỉ đ- ợc khuếch đại khi có mặt cặp mồi đặc hiệu t- ơng ứng và phát hiện bằng cách điện di sản phẩm sau phản ứng PCR trên gel agose với sự có mặt của ethidium bromide, thông qua kỹ thuật chụp ảnh gel d- ới ánh sáng tử ngoại. Ph- ơng pháp định týp ADN có nhiều - u điểm so với kỹ thuật huyết thanh học (sử dụng một l- ợng nhỏ tế bào, không đòi hỏi phải là tế bào sống; phiên giải kết quả mang tính khách quan hơn, đồng thời có thể cho biết thông tin về HLA chi tiết hơn), song đòi hỏi phải có một số trang thiết bị hiện đại cho kỹ thuật sinh học phân tử.

Năm 1992, Học viện Quân y (HVQY) đã thực hiện thành công kỹ thuật định týp HLA bằng ph- ơng pháp huyết thanh học, góp phần đảm bảo an toàn về miễn dịch cho các ca ghép thận đầu tiên tại Việt Nam. Gần đây, HVQY đ- ợc trang bị một số thiết bị chuyên dụng trong kỹ thuật sinh học phân tử, lắp đặt tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - D- ợc học, trong đó có máy PCR,

máy điện di, thiết bị chụp ảnh gel; với những thiết bị này, hoàn toàn có đủ điều kiện để triển khai kỹ thuật định týp ADN, nhằm phục vụ tốt hơn ghép tạng trên ng- ời.

Trong đề tài này, chúng tôi nghiên cứu áp dụng ph- ơng pháp định týp HLA bằng kỹ thuật sinh học phân tử, với các mục tiêu:

- *Xây dựng quy trình thực hành la bô cho kỹ thuật định týp ADN tại HVQY.*

- *Ứng dụng quy trình thực hành cho xét nghiệm định týp HLA trên lâm sàng.*

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

- 4 mẫu máu tĩnh mạch ng- ời cho tình nguyện, chống đông bằng EDTA.

- 10 mẫu máu bệnh nhân (BN) đ- ợc lựa chọn để ghép tim (ng- ời nhận) và 2 mẫu máu BN chết não đ- ợc lựa chọn để hiến tim cho ghép (ng- ời cho), chỉ định theo các tiêu chí kỹ thuật của Bệnh viện 103, HVQY.

2. Vật liệu nghiên cứu.

- Kit định týp ADN (tên th- ơng mại SSP-ABDR, hãng One Lambda, Hoa Kỳ), bao gồm: các cặp mồi (primer) đặc hiệu với gen mã hóa HLA; nucleotide.

- Hóa chất, sinh phẩm th- ờng quy: hóa chất tách chiết ADN; enzym Taq polymerase; thạch agar và dung dịch đệm để tạo bản gel thạch dùng cho điện di ADN.

- Máy PCR; thiết bị điện di gel thạch 96 giếng chuyên dụng cho định týp ADN (hãng AB gene, Hoa Kỳ); thiết bị chụp ảnh gel.

3. Phương pháp nghiên cứu.

* *Thiết lập quy trình thực hành la bô cho kỹ thuật định týp ADN tại HVQY:*

- Tham khảo quy trình lý thuyết kỹ thuật định týp ADN.

- Tham khảo hướng dẫn sử dụng kit định typ ADN (tên thương mại SSP-ABDR, do hãng One Lambda, Hoa Kỳ cung cấp).

- Khảo sát thực trạng lắp đặt và sử dụng thiết bị cho kỹ thuật sinh học phân tử có khả năng ứng dụng cho định typ ADN tại HVQY.

- Xây dựng quy trình sử dụng thiết bị và thực hiện la bê cho kỹ thuật định typ ADN tại HVQY trong điều kiện ch- a thiết lập la bê định typ ADN chuyên biệt.

* Ứng dụng quy trình thực hành định typ ADN để xác định HLA trên BN đ- ợc lựa chọn để nhận tim ghép và trên ng- ời hiến tim tại Bệnh viện 103, HVQY:

- Thu nhận mẫu xét nghiệm.

- Thực hiện định typ ADN theo quy trình thực hiện la bê cho kỹ thuật định typ ADN .

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xây dựng quy trình thực hiện la bê cho kỹ thuật định typ ADN.

* Kết quả khảo sát thực trạng thiết bị cần thiết và đề xuất quy trình thực hành:

Bảng 1: Thiết bị chủ yếu có thể ứng dụng cho định typ ADN.

TÊN THIẾT BỊ	TÌNH TRẠNG LẮP ĐẶT/SỬ DỤNG	KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG ĐỊNH TYP ADN
Máy PCR system 9700 (GeneAmp)	- Lắp đặt tại la bê sinh học phân tử (SHPT), la bê vi sinh - Sử dụng không th- ờng xuyên cho thí nghiệm và xét nghiệm	Có thể sử dụng chung, khi đặt lịch tr- ớc 1 ngày
Hệ thống chụp ảnh gel Dolphin-DOC (Wealtec)	- Lắp đặt tại la bê vi sinh - Sử dụng cho thí nghiệm và xét nghiệm	Có thể sử dụng chung (thời gian chụp ảnh ngắn: vài phút)
Bộ nguồn điện di Power Station 300 (Labnet)	- Lắp đặt tại la bê vi sinh - Sử dụng không th- ờng xuyên cho thí nghiệm và xét nghiệm	Có thể sử dụng chung (thời gian điện di ngắn: < 15 phút)
Máy ly tâm	- Các la bê đều có - Hiện đang đ- ợc sử dụng chia sẻ	Có thể sử dụng bất kỳ lúc nào
Bể ổn nhiệt	Lắp đặt tại la bê sinh học phân tử	Có thể sử dụng chung, bất kỳ lúc nào
Box vô trùng	Lắp đặt tại la bê protein-độc chất-tế bào	Có thể sử dụng chung, bất kỳ lúc nào
Thiết bị điện di gel 96 giếng (AB gen)	Lắp đặt tại la bê protein-độc chất-tế bào	Sử dụng chuyên dụng cho định typ ADN

Với những thiết bị hiện có tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - D- ợc học quân sự, đã có đủ điều kiện về thiết bị kỹ thuật để thực hiện định typ ADN. Tuy nhiên, những thiết

bị này đ- ợc lắp đặt tại nhiều la bê khác nhau và hiện tại ch- a thiết lập 1 la bê định typ ADN độc lập. Với thực trạng trên, cần xây dựng quy trình thực hiện la bê cho kỹ

thuật định tít ADN, trong đó đặc biệt quan trọng là quy trình sử dụng chung (chia sẻ) thiết bị dùng cho định tít ADN. Ngoài máy PCR, các thiết bị còn lại có thể sử dụng một cách chủ động, theo yêu cầu định tít ADN.

Trên cơ sở khảo sát tình trạng sử dụng thiết bị, chúng tôi đề xuất "Quy trình thực hành la bô cho kỹ thuật định tít ADN tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - D- ợc học quân sự, HVQY", với các nội dung chính sau:

* Quy trình sử dụng chung thiết bị giữa các la bô cho định tít ADN:

+ Khi có yêu cầu định tít ADN, nhóm định tít ADN sẽ thông báo với ng- ời phụ trách về kế hoạch định tít ADN, đăng ký tr- ớc lịch sử dụng máy PCR (trừ tr- ờng hợp - u tiên là ng- ời cho chết não).

+ Ng- ời phụ trách la bô và ng- ời đ- ợc giao trực tiếp phụ trách máy PCR của la bô có trách nhiệm phối hợp cùng nhóm định tít ADN vận hành máy PCR.

+ Nhóm định tít ADN chịu trách nhiệm thực hiện quy trình kỹ thuật chạy PCR, thực hiện các quy định về sử dụng máy PCR của la bô.

* Quy trình kỹ thuật định tít ADN:

- Chuẩn bị sinh phẩm, hóa chất, thiết bị:

+ Đăng ký lịch định tít ADN tr- ớc 1 ngày tại các la bô có liên quan; trong tr- ờng hợp cần định tít ADN với ng- ời cho chết não, thông báo trực tiếp với tr- ờng la bô để đ- ợc phép sử dụng - u tiên thiết bị cho định tít ADN.

+ Chuẩn bị sinh phẩm: theo h- ớng dẫn định tít ADN của nhà sản xuất (đ- ợc cung cấp kèm theo bộ kit định tít ADN).

- Chuẩn bị mẫu: 10 ml máu tĩnh mạch, chia đều vào 2 ống chống đông EDTA, quá trình lấy mẫu đảm bảo vô trùng.

- Thực hành định tít ADN: theo h- ớng dẫn của nhà sản xuất, với các b- ớc chính sau:

- Tách chiết ADN theo ph- ơng pháp th- ờng quy.

- Thực hiện phản ứng PCR: thành phần phản ứng gồm hỗn hợp nucleotide (Buffer D-mix); enzym Taq polymerase; ADN tổng số.

Bảng 2: Chu trình phản ứng PCR (theo h- ớng dẫn của nhà sản xuất).

CHU TRÌNH	B ỚC	NHIỆT ĐỘ (°C)	THỜI GIAN (S)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Kết thúc	1	4	...

* Điện di sản phẩm PCR:

- Tạo bản gel điện di 96 giếng.

- Chuyển sản phẩm của phản ứng PCR sang bản gel điện di.

- Bổ sung dung dịch đệm TBE 1X vào bể điện di, đảm bảo mức dung dịch v- ọt trên bề dày bản gel khoảng 2 mm.

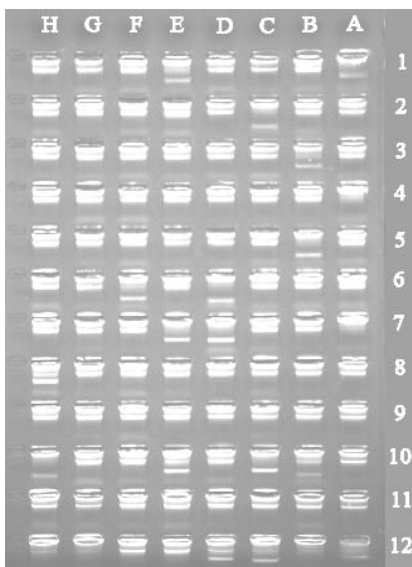
- Điện di ở hiệu điện thế 100 V, c- ờng độ dòng điện 50 mA, trong 9 phút.

- Đọc và phiên giải kết quả định tƣp ADN: sử dụng phần mềm ADN/LMT405 (do hãng One Lambda cung cấp kèm theo bộ kit) để phân tích kết quả.

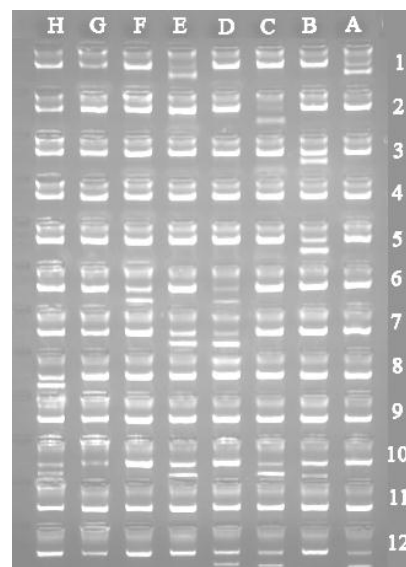
Với quy trình thực hành la bô cho kỹ thuật định tƣp ADN nêu trên, chúng tôi nhận thấy thực hiện theo quy trình cho phép sử dụng chung thiết bị để định tƣp ADN mà vẫn đảm bảo thực hiện ứng dụng khác của thiết bị. Trong tr- ờng hợp ng- ời cho tặng đ- ợc xác định chết não, việc xét nghiệm định tƣp ADN cần thực hiện càng sớm càng tốt; do đó, cần - u tiên sử dụng thiết bị cho định tƣp ADN, đặc biệt là máy PCR. Với số máy hiện có tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - D- ợc học quân sự, HVQY, có thể tiến hành định

tƣp ADN cho tối đa 2 mẫu tại cùng một thời điểm trong 1 ngày. Tuy nhiên, để đảm bảo tốt hơn yêu cầu về thời gian định tƣp ADN và giảm thiểu sai sót kỹ thuật trong quá trình định tƣp, nên thiết lập một la bô định tƣp ADN độc lập, đ- ợc trang bị đầy đủ các thiết bị cần thiết, đồng thời phân chia thành từng khu vực t- ơng đối độc lập, trong đó có một khu vực để thực hiện tách chiết ADN (tránh nhiễm chéo mẫu) và một khu vực chuẩn bị bản gel điện di và tiến hành điện di (vì có sử dụng hóa chất độc hại là ethidium bromide).

* Kết quả định tƣp ADN thử nghiệm theo quy trình đã xây dựng:



Lần 1 (thời gian điện di 8 phút)



Lần 2 (thời gian điện di 10 phút)

Hình 1: Hình ảnh điện di sản phẩm phản ứng PCR trên cùng 1 mẫu xét nghiệm.

Chúng tôi đã thực hiện quy trình thực hành đ- ợc xây dựng để tiến hành định tít ADN thử nghiệm trên mẫu tế bào ng- ời tình nguyện. Kết quả giữa 2 lần xét nghiệm trên cùng một mẫu cho thấy không có sự khác biệt ở các giếng có băng d- ợng tính; ở lần 2 (thời gian điện di 10 phút), thấy khoảng cách di chuyển của các băng xa hơn so với lần 1 (thời gian điện di 8 phút), trong khi đó ở lần 1, các băng d- ợng tính hơi gần sát các

băng nội kiểm, gây khó khăn khi đọc kết quả. Chúng tôi lựa chọn thời gian điện di 9 phút, ở khoảng giữa thời gian điện di lần 1 và lần 2, điều này giúp khắc phục đ- ợc những hạn chế nêu trên.

Do hạn chế về nguồn kinh phí, không thực hiện định tít HLA bằng kỹ thuật huyết thanh để so sánh kết quả trên cùng 1 mẫu xét nghiệm.

2. Kết quả xác định HLA bằng kỹ thuật định tít ADN trên lâm sàng.

Bảng 3: Kết quả định tít ADN.

HỌ VÀ TÊN	HLA LỚP I	HLA LỚP II	GHI CHÚ
Bùi Văn N.			BN nhận tim ghép
Nguyễn Văn Th.	[A*,A*11] [B*39,B*46]	[DRB1*04,DRB1*09SY]; [DRB4*01,DRB4*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
(Khuyết danh)	[A*11,A*33] [B*58,B*46]	[DRB1*03,DRB1*09SY] [DRB3*01,DRB4*01]	Ng- ời hiến tim (chết não)
Nguyễn B.	[A*01,A*33] [B*44,B*18]	[DRB1*15,DRB1*07] [DRB5*,DRB4*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Triệu Phúc B.	[A*,A*24] [B*0756,B*46]	[DRB1*12,DRB1*09SY] [DRB3*,DRB4*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Võ Thanh H.	[A*,A*] [B*46,B*46]	[DRB1*09SY,DRB1*09SY] [DRB4*01,DRB4*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Trần Văn T.	[A*9235,A*26] [B*39,B*5607]	[DRB1*15,DRB1*10A] [DRB5*01,DRB5*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Nguyễn Văn H.	[A*11,A*11] [B*38,B*15]	[DRB1*15,DRB1*15] [DRB5*,DRB5*]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Phạm Th.	[A*01,A*33] [B*44,B*57]	[DRB1*07,DRB1*07] [DRB4*01,DRB4*01]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim

(1)	(2)	(3)	(4)
Cao Thị Hoài L.	[A*11,A*30] [B*07,B*15]	[DRB1*12,DRB1*14] [DRB3*,DRB3*]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Quách Công H.	[A*,A*11] [B*13,B*46]	[DRB1*16,DRB1*13] [DRB5*,DRB3*]	BN đ- ợc lựa chọn để chờ ghép tim
Nguyễn Văn Hải	[A*,A*] [B*15,B*46]	[DRB1*12,DRB1*09SY] [DRB3*,DRB4*01]	Ng- ời hiến tim (chết não)

Qua áp dụng quy trình thực hành la bê ðịnh tít ADN, chúng tôi ðã xác ðịnh ð- ợc HLA của 12 mẩu tế bào, trong ðó, 2 mẩu từ BN chết não (dự kiến hiến tim cho ghép) và 10 mẩu từ BN ð- ợc lựa chọn về lâm sàng ðể ghép tim. ðây là lần ðầu tiên áp dụng thành công kỹ thuật ðịnh tít ADN tại HVQY, trong ðiều kiện không có la bê ðịnh tít ADN ðộc lập.

Thực hành ðịnh tít ADN theo quy trình ðã ð- ợc thiết lập cho phép sử dụng chia sẻ thiết bị hiện có mà không ðòi hỏi thiết lập la bê ðịnh tít ADN ðộc lập; ðồng thời, yêu cầu về kỹ thuật (tách chiết ADN; chạy phản ứng PCR; chụp hình gel ðiện di ADN) vẫn ðảm bảo chặt chẽ. ðây là cơ sở khoa học ðể chủ ðộng thực hiện ðịnh tít HLA phục vụ cho ghép tạng tại Bệnh viện 103.

KẾT LUẬN

1. ðã xây dựng ð- ợc quy trình thực hành la bê cho kỹ thuật ðịnh tít ADN trong ðiều kiện không thiết lập la bê ðịnh tít ADN ðộc lập; quy trình có tính khả thi, ðảm bảo yêu cầu kỹ thuật cho ðịnh tít ADN.
2. ðã ứng dụng thành công quy trình thực hành la bê cho kỹ thuật ðịnh tít ADN ðể xác ðịnh HLA trên BN ghép tim tại Bệnh viện 103, HVQY.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Miễn dịch học. NXB Y học. 2006, tr.277-290.
2. *Derek Middleton*. HLA typing from serology to sequencing era. IAARI. 2005, Vol 4, No 2, pp.53-66.
3. *Glenn E. Rodey*. HLAs - beyond tears. De Novo Inc. 2000, pp.99-150.
4. *Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Richard A. Kuby* Immunology. 5th Ed., W.H. Freeman. 2002, pp.481-500.