

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

QUYẾT ĐỊNH

**Về việc ban hành tài liệu chuyên môn
“Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Di truyền – Sinh học phân tử”**

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật Khám bệnh, chữa bệnh năm 2023;

Căn cứ Nghị định số 42/2025/NĐ-CP ngày 27 tháng 02 năm 2025 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Căn cứ Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành Danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh;

Căn cứ Quyết định số 622/QĐ-BYT ngày 14 tháng 03 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệm thu “Hướng dẫn quy trình chuyên môn kỹ thuật về Di truyền – Sinh học phân tử”;

Căn cứ Biên bản họp ngày 08 tháng 08 năm 2025 của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu “Hướng dẫn quy trình chuyên môn kỹ thuật về Di truyền – Sinh học phân tử”; Công văn số 1130/HHTM ngày 20 tháng 08 năm 2025 của Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương về việc hoàn thiện Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Di truyền - Sinh học phân tử” - Tập 2, gồm 52 quy trình kỹ thuật (Tài liệu chuyên môn kèm theo).

Điều 2. Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Di truyền – Sinh học phân tử” được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày 01/7/2026.

Điều 4. Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ; Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh; Cục trưởng, Vụ trưởng các Cục, Vụ thuộc Bộ Y tế; Giám đốc các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương; Thủ trưởng Y tế các ngành và các cơ quan, đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 4;
- Bộ trưởng (để báo cáo);
- Các Thứ trưởng;
- BHXHVN - Bộ Tài chính;
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế;
- Website Cục QLKCB;
- Tổng hội Y học Việt Nam và các hội y khoa;
- Lưu: VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Trần Văn Thuấn



**HƯỚNG DẪN
QUY TRÌNH CHUYÊN MÔN KỸ THUẬT VỀ
DI TRUYỀN - SINH HỌC PHÂN TỬ
(TẬP 2)**

(Ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BYT ngày tháng năm 2025
của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Hà Nội, 2025

Chỉ đạo biên soạn, thẩm định

GS.TS. Trần Văn Thuấn	Thứ trưởng Bộ Y tế
-----------------------	--------------------

Chủ biên

PGS.TS. Nguyễn Hà Thanh	Viện trưởng Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
-------------------------	--

TS.BS. Hà Anh Đức	Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh (QLKCB)
-------------------	--

Tham gia biên soạn, thẩm định

PGS.TS. Trần Đức Phần	Chủ tịch Hội Di truyền Y học Việt Nam
-----------------------	---------------------------------------

TS.BS. Vương Ánh Dương	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
------------------------	--

TS.BS. Dương Huy Lương	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
------------------------	--

GS.TS. Phạm Quang Vinh	Nguyên Phó Viện trưởng Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
------------------------	---

PGS.TS. Phan Thị Xinh	Trưởng khoa Di truyền học phân tử, Bệnh viện Truyền máu - Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh
-----------------------	---

TS.BS. Trần Thanh Tùng	Trưởng khoa Huyết học, Bệnh viện Chợ Rẫy
------------------------	--

TS. Dương Quốc Chính	Trưởng khoa Di truyền - Sinh học phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
----------------------	--

TS.BS. Nghiêm Xuân Hoàn	Phó Chủ nhiệm khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
-------------------------	--

TS. Trần Thị Huyền Trang	Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng Tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
--------------------------	--

TS.BS. Lê Thị Hương Lan	Phó Giám đốc Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên
-------------------------	---

TS. Hoàng Quốc Trường	Phó trưởng Ban Quản lý chất lượng, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
-----------------------	--

TS.BS. Dương Hoàng Hào	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Ung bướu Hà Nội
------------------------	---

PGS.TS. Hoàng Thị Ngọc Lan	Nguyên Phó Giám đốc Trung tâm Chẩn đoán trước sinh, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương
----------------------------	--

TS.BS. Đinh Thúy Linh	Giám đốc Trung tâm Sàng lọc chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội
-----------------------	---

TS.BS. Hoàng Hải Yến	Nguyên Phó Giám đốc Trung tâm Sàng lọc chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội
----------------------	--

PGS.TS. Phạm Cẩm Phương	Giám đốc Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Vũ Chí Dũng	Giám đốc Trung tâm Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền và Liệu pháp phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương
PGS.TS. Lương Thị Lan Anh	Giám đốc Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Ngô Diễm Ngọc	Trưởng khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương
BSCKII. Trương Thị Hoàng Lan	Phó Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh và Sinh học phân tử, Bệnh viện K
PGS.TS. Trần Văn Khoa	Trưởng Bộ môn Sinh học & Di truyền Y học, Học viện Quân Y
PGS.TS. Hà Thị Minh Thi	Trưởng Bộ môn Di truyền Y học, Đại học Y Dược Huế
TS.BS. Nguyễn Thành Khiêm	Bộ môn Phụ sản, Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Nguyễn Khắc Hân Hoan	Khoa Xét nghiệm Di truyền Y học, Bệnh viện Từ Dũ
TS.BS. Đoàn Thị Kim Phượng	Phó trưởng Bộ môn Y Sinh học - Di truyền, Đại học Y Hà Nội, Phó trưởng khoa Tế bào - Di truyền, Bệnh viện Phụ sản Trung ương
TS.BS. Nguyễn Hữu Chiến	Trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS. Nguyễn Bá Khanh	Giám đốc Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Đào Nguyên Minh	Trưởng phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS. Lê Xuân Thịnh	Kỹ thuật viên trưởng Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS.BS. Vũ Thị Hà	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Vũ Thị Huyền	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
PGS.TS. Nguyễn Thị Trang	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS. Vũ Thị Bích Hương	Khoa Di truyền - Sinh học phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương

Thư ký	
TS.BS. Nguyễn Hữu Chiến	Trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Đào Nguyên Minh	Trưởng phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS.BS. Nguyễn Thị Minh Ngọc	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
ThS. Hoàng Thu Lan	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS. Nguyễn Thuận Lợi	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS.BS. Bùi Bích Mai	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Võ Thị Thúy Quỳnh	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Đoàn Văn Chính	Phó trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Lê Sinh Quân	Chuyên viên, Phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

LỜI NÓI ĐẦU

Bộ Y tế đã xây dựng và ban hành Tài liệu “Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về Di truyền - Sinh học phân tử” năm 2014, 2016. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật này là căn cứ để cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, người hành nghề khám bệnh, chữa bệnh, nhân viên y tế triển khai áp dụng và thực hiện kỹ thuật khám, chữa bệnh.

Trong những năm gần đây, với sự phát triển về khoa học kỹ thuật trên thế giới và năng lực người thực hiện kỹ thuật, nhằm cập nhật, bổ sung những tiến bộ mới và tiếp tục chuẩn hóa quy trình thực hiện kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh, Bộ Y tế đã giao một số bệnh viện làm đầu mối xây dựng, cập nhật Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật Di truyền - Sinh học phân tử như Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện K, Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Bạch Mai, các bệnh viện được giao đã huy động và phân công các giáo sư, phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ chuyên khoa... biên soạn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật; tổ chức họp hội đồng khoa học trong bệnh viện để nghiệm thu; biên tập, hoàn thiện theo ý kiến của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu do Bộ Y tế thành lập và chịu trách nhiệm về chuyên môn kỹ thuật quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật đều được các thành viên biên soạn rà soát với hướng dẫn hiện hành, tham khảo các tài liệu trong nước, nước ngoài để cập nhật phù hợp với thực tế hiện nay.

Bộ Y tế đã thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật với sự tham gia của một số Vụ, Cục chức năng của Bộ Y tế, các chuyên gia về Di truyền - Sinh học phân tử trong cả nước. Các thành viên Hội đồng đã làm việc với tinh thần trách nhiệm, đóng góp về thời gian, trí tuệ, kinh nghiệm để góp ý, nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật.

Để hoàn thành Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về Di truyền - Sinh học phân tử”, Cục Quản lý Khám chữa bệnh - Bộ Y tế xin trân trọng cảm ơn sự đóng góp công sức, trí tuệ, kinh nghiệm của các giáo sư, phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ chuyên khoa, chuyên ngành hàng đầu trong lĩnh vực Di truyền Y học và Sinh học phân tử đã tham gia với vai trò là thành viên Ban biên soạn, thành viên Hội đồng góp ý và nghiệm thu Tài liệu chuyên môn.

Trong quá trình biên soạn, biên tập, in ấn tài liệu, mặc dù Ban Biên soạn đã hết sức cố gắng nhưng khó tránh khỏi hoàn toàn những thiếu sót, chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến từ quý độc giả đồng nghiệp để Tài liệu chuyên môn ngày một hoàn thiện hơn. Mọi ý kiến góp ý xin gửi về Cục Quản lý Khám, chữa bệnh - Bộ Y tế, 138A, Giảng Võ, Hà Nội.

Trân trọng cảm ơn!

GS. TS. Trần Văn Thuấn
THỦ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

NGUYÊN TẮC XÂY DỰNG, BAN HÀNH VÀ ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT TRONG KHÁM BỆNH, CHỮA BỆNH

1. Nguyên tắc xây dựng và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh:

- a) Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chương, chuyên ngành bảo đảm đầy đủ các nội dung cơ bản về chỉ định, chống chỉ định, thận trọng, chuẩn bị đến các các bước thực hiện kỹ thuật theo trình tự thực hiện từ khi bắt đầu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật;
- b) Thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực, thuốc, thiết bị y tế... (danh mục và số lượng) được quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật căn cứ trên yêu cầu chuyên môn, tính phổ biến, thường quy thực hiện tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Trong thực tế triển khai, thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực, thuốc, thiết bị y tế... (danh mục và số lượng) có thể thay đổi dựa trên cá thể người bệnh, tình trạng bệnh, diễn biến lâm sàng... và điều kiện thực tế hạ tầng, thiết bị, nhân lực của mỗi cơ sở khám bệnh, chữa bệnh;
- c) Ngoài địa điểm thực hiện kỹ thuật như phòng phẫu thuật (phòng mổ), phòng thực hiện kỹ thuật (phòng thủ thuật), phòng bệnh... được quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, kỹ thuật có thể được thực hiện ở các địa điểm khác theo nguyên tắc:
 - Kỹ thuật được quy định thực hiện ở phòng bệnh thì kỹ thuật đó được phép thực hiện tại phòng thực hiện kỹ thuật, phòng phẫu thuật;
 - Kỹ thuật được quy định thực hiện ở phòng thực hiện kỹ thuật thì kỹ thuật đó được phép thực hiện tại phòng phẫu thuật;
 - Các kỹ thuật chỉ được phép thực hiện tại các địa điểm khác trong trường hợp cấp cứu theo quy định pháp luật về khám bệnh, chữa bệnh.

2. Nguyên tắc áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh:

- a) Cơ sở khám bệnh, chữa bệnh được phép áp dụng toàn bộ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành và phải có văn bản do người đứng đầu cơ sở khám bệnh, chữa bệnh phê duyệt việc triển khai áp dụng toàn bộ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành.
- b) Trường hợp cơ sở khám bệnh, chữa bệnh xây dựng và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật áp dụng tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh thì tuân thủ theo nguyên tắc xây dựng. Căn cứ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật tương ứng do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành, Thủ trưởng cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chỉ đạo xây dựng, ban hành, triển khai, áp dụng phù hợp với đơn vị và hoàn toàn trách nhiệm về việc xây dựng, ban hành, triển khai và áp dụng.
- c) Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật ban hành kèm theo Quyết định này được áp dụng cho các kỹ thuật quy định tại Phụ lục số 02 và không có trong Phụ lục số 01, Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh.
- d) Người thực hiện các kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh là người hành nghề có phạm

vi hành nghề phù hợp với kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh, theo quy định của Luật Khám bệnh, chữa bệnh, không bị giới hạn bởi các chức danh nghề nghiệp được liệt kê trong từng quy trình kỹ thuật.

- đ) Cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chỉ được thực hiện kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh sau khi được cấp có thẩm quyền phê duyệt, cho phép và sử dụng thuốc, thiết bị y tế được cấp phép theo quy định hiện hành.
- e) Trong quá trình triển khai áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, nếu có các bất cập hoặc nhu cầu cần sửa đổi, bổ sung, cập nhật..., các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chủ động cập nhật và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật áp dụng tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, đồng thời báo cáo, đề xuất Bộ Y tế (Cục Quản lý Khám, chữa bệnh) để xem xét ban hành áp dụng trong cả nước.

MỤC LỤC

1. XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC TRƯỚC SINH CÁC BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT NGS.....	18
2. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN BẰNG KỸ THUẬT NGS	27
3. XÉT NGHIỆM TẠP NHIỄM MÁU MẸ TRONG DỊCH ỎI BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN	33
4. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	36
5. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/TRƯỚC LÀM TỔ (PGT) BẰNG KỸ THUẬT NGS.....	41
6. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ (PGT-A) BẰNG KỸ THUẬT BOBS.....	49
7. KHÁM VÀ TƯ VẤN BỆNH DI TRUYỀN	60
8. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT DNA MICROARRAY	67
9. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX REAL-TIME PCR	83
10. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER.....	88
11. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI DNA.....	97
12. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR	102
13. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR	107
14. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT NGS	112
15. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN GÂY BỆNH ALPHA VÀ BETA THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT LAI DNA	119
16. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ CÒN BỆNH TỒN DƯ TỐI THIỂU (MRD) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT RQ-PCR.....	124
17. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT RQ-PCR HOẶC DIGITAL-PCR.....	129
18. XÉT NGHIỆM BIỂU HIỆN GEN BẰNG KỸ THUẬT MICROARRAY (GEP).....	134

19. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỌC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	139
20. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỌC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	144
21. XÉT NGHIỆM CHỈ THỊ STR CẶP GHÉP BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	149
22. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR HOẶC REAL-TIME PCR	154
23. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR	160
24. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR	164
25. XÉT NGHIỆM ĐỘ MẤT ỔN ĐỊNH VI VỆ TINH (MSI) BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR	169
26. XÉT NGHIỆM QUAN HỆ HUYẾT THỐNG BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	174
27. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI (Pre-PGT-M) (XÉT NGHIỆM TIỀN LÂM SÀNG DI TRUYỀN TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PRE-PGT-M)).....	180
28. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH DI TRUYỀN LIÊN KẾT.....	191
29. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ LỆCH BỘI NHIỄM SẮC THỂ (PGT-A) BẰNG KỸ THUẬT NGS	199
30. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BẤT THƯỜNG CẤU TRÚC NHIỄM SẮC THỂ (PGT-SR) BẰNG KỸ THUẬT NGS	208
31. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT NGS.....	218
32. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ PHÂN TỬ BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN ĐA MÀU MULTI-FISH	230
33. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR.....	235
34. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX RT-PCR	240

35. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT LR-PCR .	245
36. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH METHYL HÓA BẰNG KỸ THUẬT PCR	250
37. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH METHYL HÓA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR.....	257
38. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR.....	262
39. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR	266
40. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MS-MLPA.....	270
41. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MS-MLPA	282
42. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN MÃ HÓA (WES) BẰNG KỸ THUẬT NGS	294
43. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ HỆ GEN (WGS) BẰNG KỸ THUẬT NGS	300
44. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN BẰNG KỸ THUẬT PYROSEQUENCING.....	306
45. XÉT NGHIỆM SUY GIẢM CHỨC NĂNG TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ĐỒNG (HRD) BẰNG KỸ THUẬT NGS	312
46. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT NGS	320
47. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT NGS.....	325
48. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) BẰNG KỸ THUẬT NGS	329
49. XÉT NGHIỆM MARKER DI TRUYỀN CẶP GHÉP BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR.....	334
50. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN BỆNH LÝ (CES) BẰNG KỸ THUẬT NGS	339
51. NUÔI CẤY TẾ BÀO DỊCH ỒI.....	345
52. NUÔI CẤY TẾ BÀO GAI RAU	349

PHỤ LỤC

DANH MỤC KỸ THUẬT

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)
8379	1		Xét nghiệm sàng lọc trước sinh các bất thường nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật NGS
8380	2		Xét nghiệm gen trước sinh không xâm lấn bằng kỹ thuật NGS
8381	3		Xét nghiệm tập nhiễm máu mẹ trong dịch ối bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8384	6		Xét nghiệm biến thể gen bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8387	9		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi (PGT) bằng kỹ thuật NGS
8388	10		Xét nghiệm nhiễm sắc thể trước chuyển phôi (PGT-A) bằng kỹ thuật BoBs
8389	11		Khám và tư vấn bệnh di truyền
8391	13		Xét nghiệm nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật DNA microarray
8399	21		Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR
8401	23		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi bệnh đơn gen (PGT-M) bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger
8406	28		Xét nghiệm gen bằng phương pháp lai DNA
8407	29		Xét nghiệm gen với cfDNA bằng kỹ thuật digital-PCR
8408	30		Xét nghiệm gen với cfDNA bằng kỹ thuật Real-time PCR
8409	31		Xét nghiệm gen với cfDNA bằng kỹ thuật NGS
8410	32		Xét nghiệm các biến thể gen gây bệnh alpha và beta thalassemia bằng kỹ thuật lai DNA
8413	35		Xét nghiệm tỷ lệ còn bệnh tối thiểu (MRD) với máu toàn phần bằng kỹ thuật RQ-PCR hoặc digital-PCR
8414	36		Xét nghiệm tỷ lệ còn bệnh tối thiểu (MRD) theo dòng tế bào bằng kỹ thuật RQ-PCR hoặc digital-PCR
8418	40		Xét nghiệm biểu hiện gen bằng kỹ thuật microarray (GEP)

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)
8425	47		Xét nghiệm tỷ lệ mọc mảnh ghép (chimerism) với máu toàn phần bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8426	48		Xét nghiệm tỷ lệ mọc mảnh ghép (chimerism) theo dòng tế bào bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8427	49		Xét nghiệm marker di truyền cặp ghép bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8428	50		Xét nghiệm gen trước sinh không xâm lấn bằng kỹ thuật digital-PCR hoặc Real-time PCR
8429	51		Xét nghiệm gen với ctDNA bằng kỹ thuật digital-PCR
8430	52		Xét nghiệm gen với ctDNA bằng kỹ thuật Real-time PCR
8432	54		Xét nghiệm độ mất ổn định vi vệ tinh (MSI) bằng phương pháp Real-time PCR
8433	55		Xét nghiệm quan hệ huyết thống bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản
8434	56		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi (PGT)
8435	57		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi bệnh đơn gen (PGT-M) bằng kỹ thuật phân tích di truyền liên kết
8436	58		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi lệch bội nhiễm sắc thể (PGT-A) bằng kỹ thuật NGS
8437	59		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (PGT-SR) bằng kỹ thuật NGS
8438	60		Xét nghiệm di truyền trước chuyển phôi bệnh đơn gen (PGT-M) bằng kỹ thuật NGS
8441	63		Xét nghiệm nhiễm sắc thể phân tử bằng phương pháp lai tại chỗ gắn đa màu Multi-FISH
8442	64		Xét nghiệm biến thể gen bằng kỹ thuật RT-PCR
8443	65		Xét nghiệm các biến thể gen bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR
8444	66		Xét nghiệm các biến thể gen bằng kỹ thuật LR-PCR
8446	68		Xét nghiệm xác định methyl hóa bằng kỹ thuật PCR
8447	69		Xét nghiệm xác định methyl hóa bằng kỹ thuật Real-time PCR
8448	70		Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật digital-PCR
8449	71		Xét nghiệm các biến thể gen bằng kỹ thuật digital-PCR
8451	73		Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật MS-MLPA

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)
8452	74		Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật MS-MLPA
8454	76		Xét nghiệm giải trình tự hệ gen mã hóa (WES) bằng kỹ thuật NGS
8455	77		Xét nghiệm giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) bằng kỹ thuật NGS
8456	78		Xét nghiệm giải trình tự gen bằng kỹ thuật Pyrosequencing
8457	79		Xét nghiệm suy giảm chức năng tái tổ hợp tương đồng (HRD) bằng kỹ thuật NGS
8460	82		Xác định tỷ lệ còn bệnh tối thiểu (MRD) máu toàn phần bằng kỹ thuật NGS
8461	83		Xác định tỷ lệ còn bệnh tối thiểu (MRD) theo dòng tế bào bằng kỹ thuật NGS
8462	84		Xác định tỷ lệ còn bệnh tối thiểu (MRD) bằng kỹ thuật NGS
8464	86		Xét nghiệm marker di truyền cặp ghép bằng kỹ thuật Real-time PCR
8465	87		Xét nghiệm giải trình tự hệ gen bệnh lý (CES) bằng kỹ thuật NGS
Bổ sung mới			Nuôi cấy tế bào dịch ối
			Nuôi cấy tế bào gai rau

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CES	Clinical Exome Sequencing	Xét nghiệm giải trình tự hệ gen bệnh lý/ Xét nghiệm giải trình tự hệ gen lâm sàng
cfDNA	cell-free DNA	DNA tự do
cffDNA	cell free fetal DNA	DNA tự do của bào thai
CISH	chromogenic in situ hybridization	Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu
CNVs	Copy number variants-	Các biến thể số lượng bản sao
Ct	Cycle Threshhold	Chu kì ngưỡng
ctDNA	circulating tumor DNA	DNA ung thư lưu hành tự do trong máu
DNA	Deoxyribonucleic acid	DNA
FISH	Fluorescence In situ Hybridization	Lai tại chỗ huỳnh quang
Indel	insert/deletion polymorphism	Đa hình thêm/mất đoạn
ISH	In situ hybridization	Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ
LR-PCR	Longrange - Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi dài
mRNA	Messenger Ribonucleotid acid	RNA thông tin
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò dựa trên phản ứng ghép nối
MRD	Minimum Residual Disease	Tồn dư tối thiểu của bệnh
MS-MLPA	Methylation-Specific MLPA	Kỹ thuật MLPA đặc hiệu cho quá trình methyl hóa

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Multiplex PCR	Multiplex polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi đa mồi
NGS	Next Generation Sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NIPT	Noninvasive prenatal test	Xét nghiệm trước sinh không xâm lấn
NST		Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms	Phản ứng khuếch đại chuỗi dài-đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
PGT	Preimplantation genetic testing	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ
PGT	Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ
PGT- A	Preimplantation genetic testing for aneuploidy	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ lệch bội nhiễm sắc thể
PGT-M	Preimplantation Genetic Testing-monogenic	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen
PGT-M	Preimplantation genetic testing for monogenic gene diseases	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen
PGT-SR	Preimplantation Genetic Testing - Structure	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể
Pre-PGT-M	Pre- Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm tiền lâm sàng di truyền trước làm tổ
QF-PCR	Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction	PCR huỳnh quang định lượng
RNA	Axit ribonucleic	RNA

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
RQ-PCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại và định lượng đoạn DNA hoặc RNA mục tiêu trong thời gian thực
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
STR	Short tandem repeat	Các đoạn lặp ngẫu nhiên
VNTR	Variable number tandem repeat	Đa hình số lượng các đoạn lặp
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự hệ gen mã hoá hay giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa - giải trình tự toàn bộ exome
WGA	Whole genome amplification	Khuếch đại toàn bộ hệ gen
WGS	Whole genome sequencing	Giải trình tự bộ hệ gen

1. XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC TRƯỚC SINH CÁC BẤT THƯỜNG NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mục đích của kỹ thuật nhằm sàng lọc các bất thường nhiễm sắc thể hay gặp ở thai nhi, các bất thường đó là trisomy 21 gây hội chứng: Down, trisomy 18 gây hội chứng Edwards, trisomy 13 gây hội chứng Patau, hội chứng Turner, hội chứng Klinefelter... Một số mất đoạn nhỏ như hội chứng Digeorge...

1.2. Định nghĩa

Xét nghiệm sàng lọc trước sinh các bất thường nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới - NGS (NGS - Next Generation Sequencing) còn được gọi là Xét nghiệm trước sinh không xâm lấn (NIPT - Noninvasive prenatal test). Xét nghiệm này dựa trên việc phân tích DNA tự do của thai trong máu ngoại vi của mẹ. DNA tự do của bào thai (cffDNA - cell free fetal DNA) có nguồn gốc từ thai nhi trong huyết tương của mẹ. Phần lớn cffDNA có trong huyết tương của mẹ bắt nguồn từ các tế bào lá nuôi phôi trong nhau thai. Xét nghiệm NIPT có thể sàng lọc phát hiện một số bất thường lệch bội nhiễm sắc thể: Trisomy 21 gây hội chứng: Down, Trisomy 18 gây hội chứng Edwards, Trisomy 13 gây hội chứng Patau, Hội chứng Turner, Klinefelter... Mặc dù là xét nghiệm có độ chính xác cao nhưng xét nghiệm vẫn chỉ mang giá trị sàng lọc do vật chất di truyền của thai nhi vào trong máu mẹ có thể không đại diện cho thai nhi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư:

- Kit tách chiết DNA ngoại bào (cffDNA: Extract cell free DNA isolation kit (CE-IVD);
- Nước khử ion dùng cho Sinh học Phân tử;
- Ethanol dùng SHPT;
- Nước khử DNA;

- Hóa chất tạo thư viện (tạo thư viện, tinh sạch thư viện);
- Hóa chất định lượng thư viện;
- Hóa chất khuếch đại thư viện;
- Hóa chất chạy giải trình tự NIPT;
- Micropipette 2-10, 10-100, 100-1000 μL ;
- Đầu côn trắng, vàng, xanh;
- Ống thu mẫu các loại thể tích;
- Ống PCR;
- Bộ ống thu máu Streck bao gồm ống EDTA, Kim tiêm vô trùng (BD), Ống giữ ống thu máu (BD);
- Hộp bông cotton sát khuẩn;
- Găng tay vô khuẩn;
- Panh kẹp;
- Khẩu trang y tế;
- Dây garo, đệm kê tay.

2.3. Trang thiết bị

- Máy giải trình tự gen thế hệ mới (NextSeq, Miseq, Seq4000, ion proton, Ion S5...);
- Máy luân nhiệt PCR;
- Máy lắc ống falcon 15mL;
- Vortex;
- Máy ly tâm ống 10 mL tốc độ 16rcf;
- Máy lắc ổn nhiệt;
- Máy định lượng DNA;
- Rack từ;
- Máy ly tâm ống thu mẫu 1,5 mL.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: người bệnh được giải thích về việc lấy mẫu bệnh phẩm, hướng dẫn người bệnh phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu.
- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu máu.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Hộp lấy mẫu bao gồm kim lấy mẫu chân không, ống chân không chống đông EDTA.

- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 60h.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): máu được lấy vào ống chân không đủ từ 7 - 10 mL.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin thai phụ.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 120 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình an toàn sinh học.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

Nguyên lý:

- Tách huyết tương từ mẫu máu toàn phần.
- Tách chiết DNA ngoại bào.
- Chuẩn bị thư viện giải trình tự.
- Giải trình tự và xử lý dữ liệu.

Quy trình: tùy theo các loại hóa chất và khác nhau sẽ có các bước thực hiện thay đổi tương đương.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

4.1.1 Bước 1. Tách huyết tương từ mẫu máu toàn phần

- Ly tâm ống máu với tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng 25°C.

- Hút lớp huyết tương phía trên, chú ý thực hiện một cách nhẹ nhàng không lấy phần buffy coat.

- Ly tâm huyết tương vừa thu được.

- Hút thu dịch nổi (thực hiện một cách nhẹ nhàng).

- Giữ mẫu huyết tương trong tủ -80°C.

4.1.2 Bước 2. Tách chiết DNA ngoại bào

Xử lý mẫu trước khi tách chiết

- Thêm 15 µL proteinase K vào 1mL mẫu.

- Thêm tiếp 50 µL dịch SDS 20%, vortex mạnh.

- Ủ tại 60°C trong 60 phút.

- Ngay lập tức ủ trên đá lạnh trong 5 phút để hạ nhiệt độ mẫu về nhiệt độ phòng.

- Tách chiết DNA ngoại bào (cfDNA) từ huyết tương của mẹ.

- Chuyển toàn bộ mẫu plasma sau khi ủ vào ống falcon đã có sẵn 1,25 mL dung dịch Lysis và 15 µL dung dịch bead tách chiết, đảo ống 10 lần và đặt lên máy lắc mẫu trong 10 phút.

- Chuyển toàn bộ hỗn hợp trong ống falcon vào tube 2 mL, và đặt trên giá từ.

- Hút bỏ phần dịch nổi, thêm vào 500 µL Wash.

- Vortex tube 30s, ly tâm nhẹ, chuyển toàn bộ hỗn hợp sang tube 1,5 mL.

- Đặt tube 1,5 mL lên giá từ, hút bỏ dịch nổi, thêm vào 500 µL Wash.

- Vortex 30s, ly tâm nhẹ, đặt tube lên giá từ.
- Hút bỏ dịch nổi, thêm 1mL Ethanol 100%.
- Vortex 30s, ly tâm nhẹ, đặt tube lên giá từ.
- Hút bỏ dịch nổi, thêm 1mL Ethanol 100%.
- Vortex 30s, ly tâm nhẹ, đặt tube lên giá từ.
- Hút bỏ toàn bộ dịch nổi, ly tâm tube, hút sạch phần dịch còn lại.
- Chờ cho hạt bead vừa khô, thêm vào 30 μ L dung dịch Elution Buffer.

Định lượng cfDNA:

- Định lượng cfDNA bằng phương pháp đo huỳnh quang.
- Chuẩn bị dung dịch định lượng:
 - + Dung dịch TE (188,1 μ L H₂O + 9,9 μ L TE 20X), trộn đều ống.
 - + Hút bỏ đi 0,5 μ L dung dịch TE, thêm 0,5 μ L thuốc nhuộm, trộn đều ống.
- Cho 2 μ L mẫu sau khi tách chiết vào ống đã chứa sẵn 198 μ L dung dịch đó.
- Trộn đều ống.
- Để yên ống trên giá, tránh ánh sáng trong 5 phút.
- Cho ống vào máy định lượng, chọn chương trình đo gDNA với mức thể tích là 2 μ L.
- Tiêu chuẩn tối thiểu cần đạt: Nồng độ DNA sau khi tách chiết tối thiểu cần đạt là 0,1 ng/ μ L.
- Nếu không tiến hành bước tiếp theo, dịch DNA được trữ ở -20°C.

4.1.3 Bước 3. Chuẩn bị thư viện giải trình tự

Sửa sai đầu mút DNA:

- 17 μ L của cfDNA được li trích ở trên sẽ được trộn với 2,5 μ L End prep buffer và 1 μ L Endprep enzyme mix.
- Phản ứng được ủ ở 30 phút tại 20°C và 30 phút tại 65°C.
- Nối với adaptor:
 - 21 μ L từ phản ứng trên sẽ được tiếp tục trộn với 10 μ L Ligation master mix, 0,3 μ L Ligation enhancer và 0,8 μ L adaptor.
 - Phản ứng được ủ tại 20°C trong 15 phút.
 - Thêm 1 μ L USER enzyme.
 - Trộn mẫu và ủ tại 37°C trong 15 phút.

Tinh sạch DNA

- Trộn đều hạt beads bằng máy vortex.
- Thêm 48 μL beads, trộn đều.
- Để tại nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- Thêm 200 μL ethanol 80%.
- Ủ tại nhiệt độ phòng trong 30 giây.
- Đặt mẫu lên giá tách từ.
- Loại bỏ huyền phù.
- Thêm ethanol 80% để lập lại bước rửa lần thứ 2.
- Thêm 30 μL 10 mM Tris-HCl để dung giải DNA khỏi hạt bead.
- Đặt mẫu trên giá tách từ.
- Chuyển dịch dung giải DNA sang ống tube mới.

Khuếch đại DNA bằng PCR:

- Trộn 9 μL DNA được tinh sạch với 13 μL PCR master mix 2X và 3 μL của mỗi primer.

- Thực hiện phản ứng PCR với quy trình sau:
- Bảo quản sản phẩm PCR tại -20°C .
- Tinh sạch sản phẩm PCR.
- Trộn hạt beads.
- Thêm 48 μL bead vào mẫu, trộn đều.
- Để tại nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- Thêm 200 μL ethanol 80%.
- Ủ tại nhiệt độ phòng trong 30 giây.
- Đặt mẫu lên giá tách từ.
- Loại bỏ huyền phù.
- Thêm ethanol 80% để lập lại bước rửa lần thứ 2.
- Thêm 30 μL 10 mM Tris-HCl để dung giải DNA khỏi hạt bead.
- Đặt mẫu trên giá tách từ.
- Chuyển dịch dung giải DNA sang ống tube mới.
- Định lượng cfDNA.

Biến tính và pha loãng thư viện DNA:

- Sản phẩm PCR được tinh sạch sẽ được pha loãng bằng 10mM Tris-HCl đến 10 nM và sau đó là 1nM.

- Trộn 5 μL sản phẩm PCR tại nồng độ 1nM với 5 μL NaOH 0,1N.
- Ủ tại nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- Thêm 5 μL Tris-HCl 200 mM.
- Thêm 985 μL hybridization.
- Tiếp tục pha loãng sản phẩm PCR đến nồng độ 1,4 pM bằng cách trộn 140 μL sản phẩm PCR đã pha loãng từ bước trên với 360 μL hybridization buffer.

Trước khi giải trình tự gen, thư viện DNA sau khi tạo ra phải đảm bảo các yêu cầu chất lượng nhất định để phân tích kết quả được chính xác, bao gồm:

- Tỷ lệ DNA của thai nhi cần phải đủ cao để phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể đang tin cậy, > 4%.
- Các đoạn DNA thai nhi có phân bố kích thước đặc trưng, thường nằm trong phạm vi từ 150 - 200 bp.

4.1.4 Bước 4. Giải trình tự và xử lý dữ liệu.

- Giải trình tự thế hệ mới:
- 500 μL thư viện DNA sau khi đã được biến tính và pha loãng sẽ được bơm lên hộp hóa chất giải trình tự.
- Quá trình giải trình tự được tiến hành tự động trên hệ thống máy giải trình tự thế hệ mới.
- Phân tích kết quả giải trình tự:
- Chất lượng của tín hiệu giải trình tự được đánh giá dựa trên điểm chất lượng tương ứng.
- Kết quả giải trình tự sẽ được xuất dưới định dạng FASTQ và được so sánh với bộ gen người để định vị các phân mảnh DNA tự do được giải trình tự trên các NST. Sau đó, số lượng các phân mảnh DNA tự do trên mỗi NST mục tiêu sẽ được xác định. Nếu mẫu bị lệch bội, số lượng phân mảnh DNA tự do trên NST đó sẽ gia tăng so với tập hợp các mẫu bình thường. Đây là phương pháp đếm số lượng các DNA tự do được sử dụng phổ biến trong nhiều bộ kit thương mại.

4.2. Nhận định kết quả

Kết quả của người bệnh chỉ được báo cáo khi kết quả của người bệnh và kết quả của mẫu chứng trong xét nghiệm đạt các chỉ tiêu chấp nhận của phòng

thí nghiệm (giá trị chỉ số Z-score phù hợp với từng hãng sản xuất tương ứng), có chứng chỉ CE-IVD.

- z-score <2: mẫu bình thường.
- $2 < \text{z-score} < 3$: mẫu bị nghi ngờ.
- z-score >3: mẫu bệnh.
- Riêng trường hợp monosomy X thì zscore <-3.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Mẫu máu không đảm bảo cho việc xét nghiệm (tan huyết hoặc bị đông mẫu máu, hàm lượng cfDNA không đủ để phân tích).
 - + Mẫu để quá lâu gây thoái biến DNA, người bệnh có truyền máu, người bệnh có bị K, người bệnh có thai đôi tiêu biến, người bệnh sử dụng thuốc nội tiết.
- Xử trí: Lấy lại mẫu (nếu cần thiết khi các chỉ số phân tích không đạt).

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Những mẫu có nồng độ tách chiết không đạt.
 - + Những mẫu có nồng độ PCR không đạt.
 - + Những mẫu có nồng độ cffDNA thấp hơn theo tiêu chuẩn của kỹ thuật.
 - + Những mẫu có tín hiệu nhiễu và nghi ngờ (cần lấy lại mẫu sau 1 tuần dùng thuốc).
- Xử trí: Lấy lại mẫu (nếu cần thiết).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Kết quả thấy có nghi ngờ (nằm ở ranh giới giữa nguy cơ cao và nguy cơ thấp) hoặc có thể chưa phù hợp với kết quả siêu âm.
- Xử trí:
 - + Cần tiếp tục siêu âm theo dõi sự phát triển hình thái của thai nếu kết quả trả về là (âm tính, nguy cơ thấp).

+ Cần chọc ối để chẩn đoán chính xác bất thường của nhiễm sắc thể nếu kết quả trả về là dương tính, nguy cơ cao, nghi ngờ nguy cơ cao.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).
- Bảo dưỡng máy định kỳ hàng ngày, hàng tuần và hàng tháng theo quy định.
- Hóa chất, vật tư trước khi đưa vào sử dụng cần được kiểm tra/đánh giá theo quy định, đảm bảo chất lượng và đủ cơ số hóa chất, vật tư để thực hiện xét nghiệm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med*. 2014;370(9):799-808.
2. Genetic Disorders and the Fetus. Aubrey Milunsky and Jeff Milunsky. JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Seventh edition. 2002
3. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2016;18(10):1056-1065.
4. Lynn B. Jorde et al. Medical genetics, fifth edition, 2020, ISBN
5. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev AnalChem (Palo Alto Calif)*. 2013
6. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1589-1597.
7. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 4th ed. New York: Garland Science; 2010.

2. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen trước sinh không xâm lấn bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới - NGS (Next Generation Sequencing) nhằm phát hiện một số bất thường di truyền ở mức độ gen có thể có ở thai.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Trong quá trình mang thai, một lượng DNA của nhau thai được giải phóng và di chuyển tự do trong máu mẹ, được gọi là DNA tự do (cell-free DNA, cfDNA). Công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS - Next Generation Sequencing) giúp phân tích cfDNA để sàng lọc các bất thường di truyền ở mức độ gen của thai nhi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người.
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư:

- Hoá chất sinh phẩm: Bộ kit tách chiết cfDNA, bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự, bộ kit giải trình tự.
- Vật tư:
 - + Đầu côn 10 µL, 20 µL, 100 µL và 1000 µL;
 - + Ống thu mẫu 1,5 mL, ống thu mẫu 0,2 mL;
 - + Falcon;
 - + Khẩu trang;
 - + Găng tay vô trùng;
 - + Găng tay xử lý dụng cụ, quần áo bảo hộ, dung dịch nước rửa tay, cồn sát khuẩn tay nhanh, dung dịch khử trùng, khăn lau tay;
 - + Giấy thấm, giấy xét nghiệm, sổ lưu kết quả xét nghiệm, bút viết kính, bút bi.

2.3. Trang thiết bị:

- + Máy PCR;

- + Máy ly tâm;
- + Máy vortex;
- + Máy đo nồng độ DNA;
- + Micropipette;
- + Máy giải trình tự;
- + Server phân tích và lưu trữ dữ liệu.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: ống Streck.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: điều kiện nhiệt độ phòng, trong vòng 7 ngày.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...):
- + Ống máu không có tình trạng nứt, đổ bể.
- + Ống máu phải thu đúng bộ kit được cung cấp.
- + Ống máu được bảo quản theo tiêu chuẩn của bộ kit cung cấp.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): đối với 1 mẫu: 47-83 giờ

- Nhận và xử lý mẫu: 1 giờ.
- Tách chiết: 2 giờ.
- Thư viện: 8 giờ.
- Giải trình tự: 12 - 24 giờ (tùy vào kit sử dụng).
- Phân tích dữ liệu: 12 - 24 giờ (tùy vào công cụ phân tích và phần cứng máy tính).
- Đánh giá kết quả: 12 - 24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Các phòng xét nghiệm đủ điều kiện thực hiện kỹ thuật.

3. AN TOÀN

- Nhân viên thực hiện thao tác trên mẫu đều phải mặc áo lab, mang găng tay, đeo khẩu trang, và kính bảo hộ mắt.

- Các hoá chất, dung dịch sau xét nghiệm được thu hồi vào bình chứa chất thải lỏng có dán nhãn nguy hiểm sinh học, các chất thải rắn sau xét nghiệm được phân loại theo Quy trình xử lý và phân loại chất thải.

- Tuân thủ các nội quy, quy định và hướng dẫn thuộc An toàn Sinh học.

4.CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Bước 1. Nhận bệnh phẩm và xử lý mẫu: kiểm tra thông tin trên mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm).

- Xử lý mẫu: Quy trình trải qua hai bước ly tâm.

+ Ly tâm lần 1 (1600g, thu nhận huyết tương lần 1 trong tube 1,5 mL).

+ Ly tâm lần 2 (12000g, thu nhận huyết tương lần 2 trong tube 1,5 mL, bỏ cặn ly tâm).

4.1.2 Bước 2. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất (nếu có).

- Chuẩn bị đầu tip vô trùng (đã hấp khử trùng và sấy khô, hoặc dùng tip vô trùng đóng gói sẵn).

- Pha các hóa chất quy trình trong tủ an toàn sinh học cấp 2 hoặc phòng sạch dùng cho pha hóa chất.

4.1.3 Bước 3. Đánh giá QC.

Mẫu plasma sau khi ly tâm cần QC tình trạng tiêu máu, và có thể cần thu mẫu lại nếu cần thiết.

4.1.4 Bước 4. Tiến hành kỹ thuật (Các bước thực hiện kỹ thuật).

- Tách chiết cfDNA từ mẫu plasma theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo.
Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

- Chuẩn bị thư viện trên mẫu cfDNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

- Định lượng thư viện cfDNA bằng huỳnh quang (Qubit, Quantifluor) và chuẩn hóa (normalize) nồng độ thư viện tất cả các mẫu trước khi giải trình tự.

- Giải trình tự trên mẫu thư viện đã chuẩn bị.

+ Các mẫu thư viện được gộp chung (pooling) và được biến tính (denatured).

+ Thư viện sau đó được pha loãng về nồng độ trước khi nạp vào cartridge

+ Quá trình giải trình tự trải qua 2 bước chính: tạo cụm (clustering) và giải trình tự (sequencing).

+ Đánh giá các thông số chất lượng giải trình tự.

+ Phân tích dữ liệu giải trình tự.

4.2. Nhận định kết quả

- **Báo cáo kết quả giải trình tự và phân loại biến thể**

- Kết quả âm tính: Không phát hiện các biến thể gây bệnh/có khả năng gây bệnh trên các gen được khảo sát.

- Kết quả dương tính: Phát hiện các biến thể gây bệnh/có khả năng gây bệnh có tần suất thấp không có trong gDNA của mẹ.

- Đối với những mẫu có kết quả bất thường: nếu mẫu không đạt được các tiêu chuẩn của quy trình xét nghiệm sẽ được tiến hành lập lại để tìm ra nguyên nhân.

- Trị số bình thường: khi mẫu đạt được tất cả các tiêu chuẩn của bước thu mẫu, tách chiết cfDNA, tạo thư viện và giải trình tự.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Mẫu máu có đảm bảo cho việc xét nghiệm không (tan huyết hoặc bị đông mẫu máu, hàm lượng cfDNA không đủ để phân tích).
 - + Mẫu để quá lâu gây thoái biến DNA, người bệnh có truyền máu, người bệnh có bị K, người bệnh có thai đôi tiêu biến, người bệnh sử dụng thuốc nội tiết.
- Xử trí: Lấy lại mẫu (nếu cần thiết khi các chỉ số phân tích không đạt).

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Những mẫu có nồng độ tách chiết $<0,1$ ng/ μ L sẽ không được thực hiện.
 - + Những mẫu có nồng độ PCR <2 ng/ μ L sẽ không được giải trình tự.
 - + Những mẫu có nồng độ cffDNA nhỏ hơn 2%.
 - + Những mẫu có tín hiệu nhiễu và nghi ngờ (cần lấy lại mẫu sau 1 tuần dùng thuốc).
- Xử trí: Lấy lại mẫu (nếu cần thiết).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Kết quả thấy có nghi ngờ (nằm ở ranh giới giữa nguy cơ cao và nguy cơ thấp) hoặc có thể chưa phù hợp với kết quả siêu âm.
- Xử trí:
 - + Cần tiếp tục siêu âm theo dõi sự phát triển hình thái của thai nếu kết quả trả về là (âm tính, nguy cơ thấp)
 - + Cần chọc ối để chẩn đoán chính xác bất thường nhiễm sắc thể của thai nếu kết quả trả về là dương tính, nguy cơ cao, nghi ngờ nguy cơ cao.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chitty LS, Mason S, Barrett AN, McKay F. Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. Jul 2015;35(7):656-662.

2. Shaw J, Scotchman E, Chandler N, Chitty LS. PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: Non-invasive prenatal testing for aneuploidy, copy-number variants and single-gene disorders. *Reproduction* (Cambridge, England). Nov 2020;160(5):A1-a11.

3. Zhang J, Li J, Saucier J, et al. Non-invasive prenatal sequencing for multiple Mendelian monogenic disorders using circulating cell-free fetal DNA. *Nature Medicine*. 03/01 2019;25

4. Mohan P, Lemoine J, Trotter C, et al. Clinical experience with non-invasive prenatal screening for single-gene disorders (NIPT-SGD). Aug 6 2021.

3. XÉT NGHIỆM TẠP NHIỄM MÁU MẸ TRONG DỊCH ỒI BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tạp nhiễm máu mẹ trong dịch ối trong chẩn đoán trước sinh các bệnh lý di truyền.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Tạp nhiễm máu mẹ trong quá trình chọc hút dịch ối là nguy cơ dẫn đến sai lệch kết quả xét nghiệm chẩn đoán trước sinh. Do đó, xác định tạp nhiễm máu (tế bào) của mẹ trong dịch ối là cần thiết trước khi tiến hành chẩn đoán di truyền cho thai nhi với mẫu tế bào ối.

- Sử dụng kỹ thuật phân tích DNA với chỉ thị di truyền STR và kỹ thuật QF-PCR có thể để định danh nguồn gốc của tế bào trong mẫu. Trường hợp mẫu ối có lẫn tế bào máu của mẹ, kết quả phân tích STR sẽ cho thấy kết quả DNA đến từ 2 nguồn khác nhau. Ngược lại, kết quả phân tích STR sẽ cho kết quả DNA từ duy nhất 1 nguồn mẫu của thai nhi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người

2.2. Vật tư sinh phẩm

Vật tư, sinh phẩm thiết yếu	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit QF-PCR	
Kit điện di mao quản	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;

- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μL ;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy PCR;
- Máy giải trình tự gen Sanger hoặc tương đương và thiết bị đi kèm.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).
- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện $2-8^{\circ}\text{C}$.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Mẫu DNA có thể lưu ở $2-8^{\circ}\text{C}$ trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20°C .

4.1.2. Thực hiện phản ứng PCR

- Khuếch đại các vùng gen đích mã hóa các locus STR bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

- Chuẩn bị master mix và chạy PCR theo hướng dẫn quy trình của nhà sản xuất.

4.1.3. Điện di mao quản, phân tích đoạn DNA

- Sử dụng kit QF-PCR và điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Điện di trên máy Sanger sequencing.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số giải trình tự gen.
- Xuất kết quả từ máy và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. QIAGEN (2016) Protocol of QIAamp DNA Blood Mini Kit.
2. Prenatal Diagnosis, second edition, Humana Press 2019.

4. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA bằng điện di mao quản phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật này là kỹ thuật kết hợp PCR với điện di mao quản để phân tích đoạn DNA dựa trên độ dài của sản phẩm PCR.

Sử dụng các probe đặc hiệu dùng để phát hiện các biến đổi di truyền lớn (mất đoạn và lặp đoạn gen). Mỗi probe gồm hai oligonucleotide gắn trực tiếp trên trình tự đích, có chiều dài khuếch đại duy nhất, thường dao động trong khoảng 64-500 nucleotide. Sau khi biến tính sợi khuôn, hỗn hợp probe được thêm vào để phản ứng lai giữa probe và sợi khuôn được diễn ra. Tiếp đến, sản phẩm lai được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR. Tất cả các probe đã lai được khuếch đại đồng thời với cùng một cặp mồi PCR. Probe được đánh dấu huỳnh quang do đó cho phép các sản phẩm khuếch đại được phát hiện qua phân tích đoạn bằng thiết bị điện di mao quản, từ đó phát hiện được sự lặp lại hoặc xóa đoạn trình tự gen

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit phát hiện lặp đoạn/mất đoạn	
Cathode Buffer Container 3500 Series, Anode Buffer Container 3500 Series	
GeneScan - 600 LIZ® Size Standard v2.0, Hi-Di Formamide	

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
POP-4 (384) Performance Optimized Polymer 3500 Series	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Cathode Buffer Container 3500 Series, Anode Buffer Container 3500 Series	
GeneScan - 600 LIZ® Size Standard v2.0, Hi-Di Formamide	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Hệ thống máy giải trình tự ABI3500;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C-8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Máy hút ẩm;
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Biến tính DNA khuôn

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm;
- Thực hiện biến tính DNA khuôn theo hướng dẫn đi kèm bộ kit;
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR và chạy theo chương trình tương ứng.

4.1.4. Thực hiện phản ứng lai

- Chuẩn bị ống phản ứng;
- Thực hiện các bước lai theo hướng dẫn đi kèm.

4.1.5. Thực hiện phản ứng nối

- Chuẩn bị ống phản ứng;
- Thực hiện các bước lai theo hướng dẫn đi kèm.

4.1.6. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị ống phản ứng;
- Thực hiện các bước PCR theo hướng dẫn đi kèm.

4.1.7 Điện di trên hệ thống ABI3500

- Chuẩn bị máy ABI3500:
 - + Bật máy trước 1 giờ.
 - + Cài đặt sơ đồ mẫu.
- Biến tính mẫu: thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.
- Nhỏ mẫu vào plate theo đúng vị trí đã cài đặt trên máy.
- Đặt plate vào khay chạy mẫu và đặt khay vào đúng vị trí trên hệ thống

AB3500.

- Chọn chương trình phù hợp và bấm “Start Run” để bắt đầu chương trình chạy.

4.2. Nhận định kết quả

Nhận diện mẫu có kết quả bình thường, có đột biến mất đoạn hay lặp đoạn gen dựa theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Mẫu không lên tín hiệu hoặc tín hiệu chứng âm không đồng đều	▪ Cần sử dụng đúng nồng độ mẫu đầu vào theo yêu cầu của bộ sinh phẩm sử dụng

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Đánh giá chất lượng mẻ chạy theo các tiêu chí được quy định trong hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim, J. J., Lee, K. S., Lee, T. G., et al. (2022). A comparative study of next-generation sequencing and fragment analysis for the detection and allelic ratio determination of FLT3 internal tandem duplication. *Diagnostic Pathology*, 17, 14.
2. Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* 63:e3998.

5. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/TRƯỚC LÀM TỔ (PGT) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS - Next Generation Sequencing) nhằm phát hiện đồng thời biến thể gây bệnh di truyền đơn gen và các lệch bội nhiễm sắc thể của phôi.

1.2. Định nghĩa

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ (PGT - Preimplantation genetic testing) bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS - Next Generation Sequencing), còn gọi là kỹ thuật PGT-plus, bao gồm PGT-M kết hợp PGT-A. PGT plus là kỹ thuật phát hiện đồng thời biến thể gen gây bệnh và bất thường số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể trên phôi bào nhằm mục đích sàng lọc phôi bình thường để chuyển vào tử cung mẹ, tránh chuyển các phôi bất thường di truyền, tăng tỷ lệ thành công trong IVF-ICSI. Xét nghiệm sử dụng một số tế bào sinh thiết phôi để khuếch đại toàn bộ hệ gen (WGA), cung cấp đủ mẫu DNA để xây dựng và giải trình tự thư viện. Sử dụng sinh tin học so sánh tỷ lệ trình tự nhiễm sắc thể được tạo ra trong tế bào mẫu phôi với các chuỗi được tạo ra trong một bảng tham chiếu các tế bào, cho phép tính toán số bản sao nhiễm sắc thể (CNV) trong tế bào mẫu thử.

Xét nghiệm NGS dựa trên nguyên tắc giải trình tự song song (parallel sequencing), trong đó hàng triệu đoạn DNA được giải trình tự đồng thời, giải trình tự thế hệ mới cho phép giải được từ 8Gbases đến 600Gbases, cho phép giải trình tự trên cùng một mẫu tế bào phôi để phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể và các biến thể gây bệnh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit nhân bản toàn bộ hệ gen từ một vài tế bào (WGA) tùy hãng.
- PGS Kit for PGT-A.

- PGD-SEQ kits for PGT-M.
- Nước khử ion.
- Mastermix.
- Ống li tâm đáy nhọn dung tích 1,5 -2 mL.
- Đầu côn các loại: 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L.
- PCR tube.
- Plate PCR 96 giếng.
- Găng tay.
- Khẩu trang.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc.
- Máy Vortex.
- Máy ly tâm.
- Máy đo độ tinh sạch.
- Máy spin down.
- Máy Speedvac.
- Bộ dụng cụ pipette: micropipette, pipette 100 μ L và pipette 1000 μ L.
- Buồng thao tác PCR.
- Máy PCR.
- Hệ thống giải trình tự thế hệ mới tương thích với từng loại kit.
- Phần mềm phân tích kết quả tương thích cho từng hệ thống.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-M bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào lá nuôi của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi.

- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào (phôi 5 ngày) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 μ L.

- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24 giờ.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ L. Ống đựng tế bào phôi sinh

thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng. Mẫu được lấy theo Quy trình hướng dẫn lấy mẫu tại labo IVF.

2.5. Phiếu xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

4.1.1. Tiến hành nhân bản bộ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) [tham khảo phụ lục]

- Tiến hành nhân bản bộ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất.

- Các mẫu DNA thu được sau nhân bản bộ gen phôi được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

4.1.2. Tạo thư viện DNA

Tùy từng hãng mà bộ kit lập thư viện gen sẽ có từng quy trình tiến hành riêng, việc thực hiện cần đảm bảo các thao tác cẩn thận, tỉ mỉ với độ chính xác cao, quy trình chung sẽ bao gồm:

Bước 1: Cắt DNA hệ gen bằng enzyme giới hạn (DNA Fragmentation)

Thành phần	Thể tích
Purified single-cell amplified DNA (200 ng ~ 3 μ g, 400ng recommended)	16,0
DNA fragmentation buffer	2,0
DNA fragmentation enzyme	2,0
Tổng	20

Sau đó ủ 37°C trong 20 phút, duy trì 4 °C.

Bước 2: Tinh sạch sản phẩm cắt DNA bằng hạt từ.

Bước 3: Sửa đầu cuối (End repair).

Thành phần	Thể tích
DNA	39,5
End repair buffer	10
End repair enzyme	0,5
Tổng	50

Bước 4: tinh sạch sản phẩm End repair và thu sản phẩm trong 40 µL TE.

Bước 5: Ghép nối (Connector connection)

Thành phần	Thể tích
Blunt-end DNA	40
Ligation buffer	5
DNA ligase	1
P1 connector	2
Tag sequence X	2
Tổng	50

Trộn đều nhẹ và ly tâm nhẹ rồi chuyển sang máy PCR ủ ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút và duy trì ở 4°C.

- Bước 6: Tinh sạch sản phẩm Connector connection và thu sản phẩm trong 18,5µL TE.

- Bước 7: Nhân gen bằng PCR.

Thành phần	Thể tích
Ligated DNA linker	18,2
PCR amplification reagents	50
PCR primers	1,8
Tổng	70

Trộn đều nhẹ và ly tâm rồi chuyển sang máy PCR (72 °C trong 10 phút; 95 °C trong 5 min; 9 chu kỳ (95 °C trong 15 giây, 58 °C trong 15 giây, 70 °C trong 1 phút); 1 chu kỳ 70°C trong 5 phút, duy trì 4 °C).

Bước 8: Tinh sạch sản phẩm PCR bằng hạt từ và thu trong 50 µL TE, rồi tiến hành định lượng bằng máy realtime hoặc máy Quibit (theo kit Quibit của hãng sản xuất).

Bước 9: Chạy PCR thư viện trên máy chuẩn bị thư viện (nếu có theo quy trình của nhà sản xuất, mất khoảng 5 giờ) hoặc thủ công.

Bước 10: Giải trình tự các đoạn DNA đã gắn lên mỗi bead theo nguyên lý Ion Semiconductor hoặc nguyên lý khác tùy bộ kit.

DNA được biến tính và tiến hành giải trình tự đồng thời các gen mục tiêu trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới và hóa chất dành cho máy giải trình tự.

Bước 11: Phân tích kết quả: Ghép nối các đoạn DNA đã giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của genome.

Các bước tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của bộ kit và nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

- Từ phần mềm phân tích đưa ra dữ liệu và hình thái cấu trúc nhiễm sắc thể thể hiện qua hình ảnh và số liệu % khả năng xảy ra bất thường nhiễm sắc thể của phôi bào từ chạy PGS Kit for PGT-A.

- Từ phần mềm phân tích đưa ra dữ liệu kiểu gen qua di truyền liên kết của phôi bào từ chạy PGD-SEQ kits for PGT-M hoặc tương đương.

- Đánh giá tổng hợp hai kết quả và đưa ra kết luận.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Nhận nhầm mẫu.

- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm (Double check).

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.

- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.

- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn gen đột biến cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm. Sinh thiết lại phôi nếu không khắc phục được.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai, trả nhầm kết quả.
- Xử trí: Cần cẩn trọng phân tích trong các trường hợp, kiểm tra lại kỹ thông tin người bệnh và mã mẫu trên phiếu và trên phần mềm phân tích (Double check).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi 2 người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba.

- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh, so sánh kiểu gen của các thành viên trong gia đình, các mẫu phôi đã có kết quả. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Raza, Khalid, and Sabahuddin Ahmad. "Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: a review." arXiv preprint arXiv:1606.05254 (2016).
2. Single Cell Kit protocol. Qiagen.
3. Pre-implantation Chromosome Aneuploidy Detection Kit (user's guide). Capitalbio genomics.

Phụ lục 1

Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L)
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer:1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở -20°C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 65°C trong 5 phút); duy trì 4°C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

6. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ (PGT-A) BẰNG KỸ THUẬT BOBS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm nhiễm sắc thể trước làm tổ bằng kỹ thuật BoBs nhằm sàng lọc các phôi có bất thường lệch bội nhiễm sắc thể trong thụ tinh trong ống nghiệm.

1.2. Định nghĩa

Xét nghiệm nhiễm sắc thể trước làm tổ (PGT-A) là xét nghiệm sàng lọc các bất thường lệch bội nhiễm sắc thể được thực hiện ở giai đoạn đầu của phôi trong quá trình thụ tinh trong ống nghiệm, trước khi phôi bám vào nội mạc tử cung để làm tổ. Xét nghiệm được thực hiện trên một vài tế bào phôi ngày 3-5, nhân bản DNA phôi bào. Sử dụng công nghệ BACs - on - Beads, các hạt BoBs được gắn các đầu dò DNA bao phủ các vùng gen được quan tâm (Karyolite BoBs: toàn bộ 24 nhiễm sắc thể), lai với DNA của phôi bào và DNA mẫu chứng. Tỷ lệ cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu phôi so với mẫu chứng cho phép phát hiện được lệch bội tương ứng với mỗi loại nhiễm sắc thể.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư, hoá chất:

2.2.1. Vật tư

- Đầu tip (từ 10 - 1000 μ L), đầu tip có lọc (10-200 μ L).
- Đồng hồ bấm giờ.
- Đĩa tinh sạch sản phẩm PCR.
- Đĩa PCR 96 giếng.
- Đĩa lọc 0,45 μ m.
- Ống thu mẫu 250 μ L.
- Ống 1,5 L chống bám dính.
- Miếng nhựa dán phủ 96 giếng, khăn giấy, giấy bạc.
- Hệ thống điện di DNA.

- Giá PCR sạch.
- Khay đá lạnh cho ống 2 mL, 0,25 mL.
- Găng tay tiệt trùng.

2.2.2. Hoá chất

- Bộ kit KaryoLite BoBs (96 test) gồm 2 hộp: P1 và P2, P1 bảo quản nhiệt độ (-30°C đến -16°C) và P2 ở nhiệt độ (2- 8°C).
- Kít nhân bản tế bào đơn SurePlex DNA Amplification System: Cell Extraction Buffer, Extraction Enzyme Dilution Buffer, Cell Extraction Enzyme, Pre-Amp Buffer, Pre-Amp Enzyme, Amplification Buffer, Amplification Enzyme.
- Hóa chất máy Luminex: xMAP Sheath Fluid, xMAP Calibration, xMAP Verification.
- Nước khử ion.
- DNA chứng
- Dung môi Tris-HCl 5mM, pH 8.
- Ethanol 70%.
- Dung môi TE (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA).

2.3. Trang thiết bị

- Luminex 100/200.
- Máy lắc ủ TriNEST.
- Máy quang phổ NanoDrop 2000.
- Hệ thống bơm chân không Millipore MultiScreen cùng MultiScreen Vacuum.
- Manifold.
- Máy PCR.
- Máy vortex, máy spin.
- Máy ly tâm lạnh.
- Pipet đơn kênh đa kênh (dải 1-10 µL và 10 - 100 µL).

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Tế bào (phôi 3-5 ngày) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 µl.
- Mẫu được lấy theo Quy trình hướng dẫn lấy mẫu

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 120h

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình an toàn sinh học.

- Dùng trong sàng lọc *in vitro*.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

Gồm: Quy trình nhân bản tế bào đơn và Quy trình Karyolite BoBs.

4.1.1 Quy trình nhân bản tế bào đơn

- Bổ sung 2,5 μ L Cell Extraction Buffer vào các ống PCR đã chứa 2,5 μ L tế bào và các mẫu đối chứng.
- Chuẩn bị mix hỗn hợp Cell Extraction với số lượng phản ứng tương ứng và trộn đều:

HÓA CHẤT	V/ 5 PHẢN ỨNG
Extraction Enzyme Dilution Buffer	24 μ L
Cell Extraction Enzyme	1 μ L
Tổng thể tích	25 μ L

- Thêm 5 μ L hỗn hợp Extraction vào mỗi mẫu, bung đều, spin và đưa vào máy chạy chu trình PCR Extraction: Thể tích phản ứng: 10 μ L.

SỐ CHU TRÌNH	NHIỆT ĐỘ	THỜI GIAN
1	75°C	10 phút
	95°C	4 phút
	Nhiệt độ phòng	Ngưng

- Chuẩn bị mix hỗn hợp Pre-Amp với số lượng phản ứng tương ứng và trộn đều:

HÓA CHẤT	V/ 5 PHẢN ỨNG
Pre-Amp Buffer	24 μ L
Pre-Amp Enzyme	1 μ L
Tổng thể tích	25 μ L

- Thêm 5 μ L hỗn hợp Pre-Amp vào mỗi mẫu, búng đều, spin và đưa vào máy chạy chu trình PCR Pre-Amp. Thể tích phản ứng: 15 μ L.

SỐ CHU TRÌNH	NHIỆT ĐỘ	THỜI GIAN
1	95°C	2 phút
12	95°C	15 giây
	15°C	50 giây
	25°C	40 giây
	35°C	30 giây
	65°C	40 giây
	75°C	40 giây
1	4°C	Ngưng

- Ly tâm nhanh các mẫu và đưa các ống mẫu để trữ trên đá

- Chuẩn bị mix hỗn hợp Amplification:

HÓA CHẤT	V/ 5 PHẢN ỨNG
Amplification Buffer	125 μ L
Amplification Enzyme	4 μ L
Nuclease-Free Water	171 μ L
Tổng thể tích	300 μ L

- Thêm 60 μ L hỗn hợp Amplification vào mỗi mẫu, búng đều, spin và đưa vào máy chạy chu trình PCR Amplification như sau:

SỐ CHU TRÌNH	NHIỆT ĐỘ	THỜI GIAN
1	95°C	2 phút
14	95°C	15 giây
	65°C	1 phút
	75°C	1 phút
1	4°C	Ngưng

- Thể tích phản ứng: 75 μL
- Kiểm tra chất lượng DNA bằng Qubit: Tiến hành đo nồng độ DNA sau nhân bản trên máy Qubit: mẫu chứng âm $<2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, mẫu nhân bản có nồng độ $\geq 15 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

4.1.2. Quy trình Karyolite BoBs

Bước 1: Ghi nhãn DNA (Labeling of Genomic DNA)

- Chuẩn bị 2 phản ứng cho DNA chứng nam và nữ, và 1 phản ứng cho mẫu DNA đã nhân bản. Chuyển 50 ng (khoảng 2 μL) mỗi DNA mẫu vào ống tương đương. Thêm Sample Diluent để đưa thể tích từng ống tới 24 μL .

- Thêm 20 μL Random Primer Solution vào từng ống mẫu. Vortex các ống kỹ và spin down.

- Đóng chặt các nắp ống và đưa các ống vào máy PCR. Biến tính tại 98°C trong 5 phút, và hạ nhiệt tới 37°C. Thực hiện bước tiếp theo ngay khi máy PCR đạt 37°C.

- Chuẩn bị dung dịch ghi nhãn (Labeling Mix) trong ống 1,5 mL. Vortex Biotin - dNTP Mix (ngoại trừ polymerase - có thể dùng tay búng nhẹ vài lần vào ống) và spin down cả hai ống. Thể tích được tính toán thừa để bù trừ cho lỗi pipet. Hút lên xuống Labeling Mix 5-10 lần dùng pipet và spin down trước khi sử dụng:

Hóa chất	V/phản ứng (μL)	Số phản ứng	Thể tích cần (μL)
Biotin-dNTP Mix	5,5		
Polymerase	1,1		
Tổng thể tích của Labeling Mix(μL)			

- Hút 6 μL của Labeling Mix vào từng ống mẫu. Dùng pipet và trộn dung dịch trong ống ít nhất 5 lần và spin down.

- Đóng chặt các nắp ống và ủ các ống mẫu trong máy PCR tại 37°C trong vòng 60 - 90 phút. Đưa các hóa chất đã sử dụng xong trở về đúng điều kiện bảo quản sau bước này.

- Trong lúc chờ đợi phản ứng PCR kết thúc, chuẩn bị cho bước tiếp theo (tinh sạch sản phẩm DNA ghi nhãn). Khi chương trình PCR kết thúc, đưa các ống mẫu khỏi máy PCR.

Ghi chú: Nếu như bước tinh sạch chưa thể thực hiện ngay, bảo quản sản phẩm trong vial tiêng tại 4°C hoặc qua đêm tại -20°C

Bước 2: Tinh sạch sản phẩm DNA ghi nhãn (Purification of labeled DNA

Sử dụng đĩa tinh sạch NucleoFast 96 PCR.

Chuyển 50 µL từ mỗi ống mẫu sang giếng tương ứng trên đĩa tinh sạch NucleoFast 96 PCR sử dụng pipet thường hoặc đa kênh.

Ghi chú: Chuyển mẫu thật chậm rãi trực tiếp lên màng (không chọc màng); tránh nhỏ mẫu vào thành giếng.

- Đặt đĩa tinh sạch lên bộ hút chân không. Áp dụng mức chân không khoảng 190 mmHg cho tới khi chất lỏng được hút hết hoàn toàn (khoảng 10 phút). Tắt máy hút chân không.

- Thêm 50 µL dung môi TE (TE buffer) vào từng giếng. Áp dụng mức chân không khoảng 190 mmHg cho tới khi chất lỏng được hút hết hoàn toàn (khoảng 10 phút). Tắt máy hút chân không.

- Thấm khô đáy các giếng của đĩa tinh sạch sử dụng giấy thấm.

- Thêm 25 µL dung môi TE vào từng giếng trên đĩa.

- Đưa đĩa vào máy lắc ủ TriNEST và lắc tại nhiệt độ phòng, 1200 rpm trong 10 phút.

- Chuyển 20 µL của từng mẫu DNA vào ống PCR mới.

- Đo nồng độ DNA tinh sạch.

- DNA gắn nhãn sau khi tinh sạch có thể được bảo quản qua đêm tại 2 - 8 °C trước khi có biểu hiện ảnh hưởng xấu đến kết quả. Vortex và ly tâm mẫu trước khi sử dụng.

Bước 3: Lai DNA (DNA Hybridization)

- Đưa Hybridization Buffer ra khỏi tủ âm sâu và BACs-on-Beads Mix từ tủ lạnh.

- Cài máy lắc ủ TriNEST tới 52°C.

- Pha loãng các mẫu DNA gắn nhãn đã được tinh sạch có nồng độ >200 ng/µL về nồng độ 200 ng/µL. Các mẫu có nồng độ từ 150-200 ng/µL không cần tiến hành pha loãng. Dung dịch pha loãng sử dụng là dung môi TE 1X.

- Tạo sơ đồ mẫu cho đĩa thực hiện bước ủ để các mẫu được đánh dấu với từng giếng.

- Sử dụng bảng sau để chuẩn bị Hybridization Mix cho bước lai ủ. Thể tích thừa đã được tính toán:

Hóa chất	V/phản ứng (μL)	Số phản ứng	Thể tích cần (μL)
Hybridization Buffer	11		
BACs-on-Beads Mix	1,0		
Tổng thể tích của Hybridization Bead Mix (μL)			

- Đảm bảo Hybridization Buffer đã đạt nhiệt độ phòng. Vortex rất kỹ 3 lần, mỗi lần 10 giây và spin down.

- Hút lượng Hybridization Buffer cần thiết vào ống đủ cho tổng thể tích của Hybridization Bead Mix.

Ghi chú: Khi pipet Hybridization Buffer, lưu ý thao tác thật chậm vì độ nhớt của dung dịch này rất cao.

- Vortex Karyolite BoBs Mix rất kỹ 3 lần, mỗi lần 10 giây ngay trước khi dùng và pipet lượng thể tích cần thiết vào ống Hybridization Bead Mix

- Ly tâm rất nhanh Hybridization Bead Mix và vortex rất kỹ 3 lần, mỗi lần 10 giây.

- Chuyển 11 μL của Hybridization Bead Mix vào từng giếng đã được dựng trong sơ đồ.

Ghi chú: Thao tác pipet rất chậm vì dung dịch có độ nhớt cao.

- Chuyển 5 μL của DNA mẫu đã được tinh sạch vào đáy mỗi giếng có chứa Hybridization Bead Mix (sử dụng pipet thường hoặc đa kênh).

- Đậy nắp của đĩa PCR. Đảm bảo các nắp đã được đóng thật chặt.

- Chuyển đĩa mẫu ủ vào máy TriNEST tại 52°C và lắc tại 800 rpm trong 5 phút.

- Đặt đĩa vào máy PCR và biến tính ở 85°C trong 5 phút, và hạ nhiệt xuống tới 52°C.

- Khi máy PCR đã đạt 52 °C, đưa đĩa khỏi máy PCR và một lần nữa đảm bảo các nắp trên đĩa đã được đóng thật chặt.

- Để đĩa rất nhanh vào máy lắc ủ tại 52°C và lắc tại 800 rpm trong vòng 16 - 20 tiếng.

- Đặt tấm làm mát vào tủ lạnh +2 - +8°C chuẩn bị cho bước hạ nhiệt máy lắc ủ trong bước 4.

Bước 4: Rửa DNA và gắn phân tử báo cáo

- Bật máy Luminex 100/200 để laser và hệ thống được khởi động ít nhất trước 30 phút trước khi sử dụng.

- Lấy Wash Buffer 1 từ tủ lạnh, tính toán lượng Wash Buffer 1 cần sử dụng. 125 µL là cần cho mỗi giếng (thể tích thừa để bù trừ khi sử dụng pipet đa kênh đã được kết hợp).

- Lấy đĩa ủ lai từ máy lắc ủ (52°C) và ngay lập tức cài chế độ 50°C cho máy lắc ủ.

- Tháo các nắp giếng cẩn thận và nhẹ nhàng. Thêm 100µL của Wash Buffer 1 vào từng giếng (dùng pipet đơn hoặc đa kênh). Hút lên xuống 10 lần nhanh liên tục để trộn dung dịch.

- Ủ đĩa tại 50°C và 1200 rpm trong 20 phút.

- Chuẩn bị dụng cụ để hạ máy lắc ủ xuống 37°C.

- Trong lúc chờ đợi, lấy Reporter Concentrate, Reporter Diluent, và Wash Buffer 2 từ tủ lạnh và chuẩn bị Reporter Mix.

- Sử dụng bảng sau để tính toán lượng hóa chất cần thiết:

Hóa chất	V/phản ứng (µL)	Số phản ứng	Thể tích cần (µL)
Reporter Concentrate	0,45		
Reporter Diluent	112,5		
Tổng thể tích của Reporter Mix (µL)			

- Hút lượng thể tích cần thiết của Reporter Diluent vào ống thích hợp.

- Vortex Reporter Concentrate trong 5 giây, spin down và pipet lượng cần thiết vào ống Reporter Mix. Ngay lập tức, gói ống Reporter Mix vào giấy bạc để tránh ánh sáng.

-Vortex Reporter Mix 5 giây.

- Đĩa lọc 0,45 µm được sử dụng cho việc rửa và gắn phân tử Reporter. Tạo sơ đồ mẫu trên đĩa lọc.

- Đặt lại các giếng chưa sử dụng trên đĩa lọc với miếng dán đĩa bằng nhựa trong.

- Tính toán thể tích Wash Buffer 2 cần thiết. 0,47 mL cần cho mỗi giếng (thể tích thừa để bù trừ khi sử dụng pipet đa kênh đã được kết hợp).

- Thêm 30 μ L của Wash Buffer 2 vào các giếng sẽ sử dụng trên đĩa lọc để tạo ẩm cho các giếng này. Không chạm màng của đĩa lọc.

- Lấy đĩa ủ lại ra khỏi máy lắc ủ (50°C). Ngay lập tức, cài đặt máy vào chế độ lắc tại 37°C . Đưa tấm làm mát vào máy lắc ủ, tháo các giá đỡ đĩa để hạ nhiệt máy xuống 37°C . Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch trong các giếng của đĩa ủ lại sang đĩa lọc đã được tạo ẩm.

- Sử dụng hệ hút chân không tại áp suất 125 mmHg, Hút toàn bộ dung dịch trong giếng và dừng lại ngay khi hết dung dịch.

- Thêm 100 μ L của Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc và lặp lại bước loại dịch.

- Cho thêm 100 μ L của Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc và lặp lại bước loại dịch.

- Lau khô đáy đĩa lọc bằng giấy thấm.

- Thêm 100 μ L của Reporter Mix vào từng giếng của đĩa lọc. Không chạm màng lọc.

Ghi chú: Đảm bảo máy lắc ủ đã đạt 37°C tại thời điểm này. Không đợi quá 15 phút giữ đĩa lọc tại nhiệt độ phòng và bảo vệ khỏi ánh sáng.

- Ủ đĩa lọc trong máy lắc ủ tại 37°C , tốc độ lắc 1200 rpm trong 30 phút

- Sau bước ủ với Reporter Mix, sử dụng bộ hút chân không để loại bỏ dung dịch trên đĩa.

- Cho thêm 100 μ L của Wash Buffer 2 vào từng giếng.

- Lau khô đáy đĩa lọc bằng giấy thấm.

- Cho thêm 100 μ L của Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc.

Ghi chú: Không hút chân không sau bước này. Đĩa lọc được chuyển và đọc với hệ thống Luminex 100/200. Nếu như bước đo không được thực hiện ngay trong vòng 15 phút, gói đĩa trong giấy bạc để bảo vệ khỏi ánh sáng.

Bước 5: Đọc tín hiệu xét nghiệm

- Đảm bảo bước khởi động máy của Luminex đã được thực hiện. Hệ thống đã được thực hiện hiệu chuẩn và xác minh (calibration/verification) và đầu kim đã được điều chỉnh độ cao cho đĩa lọc.

- Mở protocol xét nghiệm.
- Đặt tên file xuất dữ liệu (.cvs - được đọc trên BoBsoft).
- Điền tên vào sơ đồ đĩa (F, M và mẫu ...).

Ghi chú: Mẫu DNA chứng nam phải luôn được đặt tên là M và F là của DNA chứng nữ theo đúng yêu cầu từ phần mềm phân tích BoBsoft.

- Đưa đĩa lọc vào máy, làm theo hướng dẫn và bắt đầu đọc tín hiệu.
- Sau khi đọc, các giếng chưa sử dụng vẫn có thể được sử dụng cho xét nghiệm tiếp theo.
- Đổ bỏ các dung môi Wash còn dư trong máng.

4.2. Nhận định kết quả

Kết quả thu được từ hệ thống máy Luminex 100/200 sẽ được phân tích bằng phần mềm BoBsoft. Cường độ tín hiệu huỳnh quang trung bình của mẫu DNA sau khi lai với đầu dò BAC đặc trưng được so sánh với cường độ tín hiệu huỳnh quang trung bình của mẫu DNA chứng liên kết với cùng đầu dò đặc trưng. Tỷ lệ của mẫu so với chứng nam và mẫu so với chứng nữ được tính toán với mỗi đầu dò BAC. Đối với thêm hoặc mất trong cánh nhiễm sắc thể, tất cả các đầu dò trong vùng phải có xu hướng dịch chuyển cùng 1 phía và lệch so với tỷ lệ bình thường 1.0.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Tế bào sinh thiết phôi nếu chưa sử dụng ngay, có thể được bảo quản -80°C từ 3-5 ngày để đảm bảo độ ổn định chất lượng mẫu.
- Xử trí: Lấy lại mẫu (nếu cần thiết khi các chỉ số phân tích không đạt).

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Mọi sai lệch khi thực hiện quy trình đều gây ảnh hưởng đến kết quả.
- Xử trí: Cần đảm bảo chính xác ở mỗi bước và toàn bộ quy trình.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dupont C, Grati FR, Choy KW, et al. Prenatal diagnosis of 24 cases of microduplication 22q11. 2: an investigation of phenotype-genotype correlations. *Prenatal Diagnosis*. 2015;35(1):35-43.

2. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(4):280-291.

3. Portnoi M-F. Microduplication 22q11. 2: a new chromosomal syndrome. *European journal of medical genetics*. 2009;52(2-3):88-93.

7. KHÁM VÀ TƯ VẤN BỆNH DI TRUYỀN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình khám và tư vấn bệnh di truyền nhằm quy định và hướng dẫn công tác khám bệnh, xét nghiệm và tư vấn cho người bệnh/khách hàng tại các chuyên khoa Di truyền lâm sàng; góp phần nâng cao chất lượng khám, chữa bệnh tại Bệnh viện.

1.2. Định nghĩa

Bệnh di truyền bao gồm các bệnh liên quan đến sự bất thường trong vật liệu di truyền từ cấp độ tế bào đến cấp độ phân tử, và các bệnh bẩm sinh bất thường có thể biểu hiện từ khi sinh ra hoặc sau này do nguyên nhân di truyền. Những bệnh này ảnh hưởng đến nhiều chuyên ngành lớn như Nhi khoa, Sản phụ khoa, Tim mạch, Huyết học, Tiêu hóa, Thần kinh, Nội tiết, Nam khoa và Ung thư.

Khám và tư vấn bệnh di truyền là một quá trình trong đó các bác sĩ thu thập bệnh sử, thăm khám lâm sàng, thực hiện các xét nghiệm cần thiết và đưa ra chẩn đoán, hướng dẫn hoặc điều trị đối với các bệnh lý di truyền. Tư vấn di truyền bao gồm giải pháp thích hợp và hướng dẫn về các vấn đề y tế, diễn biến bệnh, nguy cơ di truyền và các lựa chọn để giảm nguy cơ tái bệnh bệnh. Quá trình này tôn trọng quyền tự quyết định của người được tư vấn và hỗ trợ đưa ra các quyết định có hiểu biết về sức khỏe và sinh sản của mình, phù hợp với giá trị và tín hiệu cá nhân. Nhà tư vấn dịch vụ truyền thông không đưa ra quyết định cuối cùng về tôn trọng sự lựa chọn của người được tư vấn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Khám và tư vấn bệnh di truyền: Bác sĩ: 01.
- Tư vấn di truyền: Bác sĩ hoặc tương đương: 01.
- Điều dưỡng/kỹ thuật y: 01.

2.2. Vật tư:

- Dụng cụ khám bệnh: ống nghe, máy đo huyết áp, thước dây đo vòng đầu, búa phản xạ, tràng hạt, cân đo chiều cao cân nặng, đồng hồ bấm thời gian.
- Khẩu trang tiệt trùng.

- Găng tay tiệt trùng không bột.
- Cồn sát khuẩn.
- Nước muối sinh lý.
- Betadine.
- Phiếu chỉ định xét nghiệm.
- Phiếu khám và tư vấn bệnh di truyền.
- Phiếu đồng thuận thực hiện xét nghiệm.

2.3. Trang thiết bị

Bộ máy tính có phần mềm bệnh án di truyền điện tử / bệnh án di truyền giấy.

2.4. Chuẩn bị người bệnh

- Người bệnh có nhu cầu khám và tư vấn bệnh di truyền hoặc được chỉ định khám bệnh di truyền đăng ký khám và tư vấn bệnh di truyền tại quầy đón tiếp chung của bệnh viện hoặc quầy đón tiếp của Các chuyên khoa Di truyền lâm sàng. Sau khi đăng ký thành công, mỗi người bệnh sẽ có phiếu khám bệnh. Tư vấn di truyền.

- Người bệnh được hướng dẫn vào phòng khám bệnh và tư vấn di truyền.
- Người bệnh khám và tư vấn di truyền lần đầu sẽ được khám, tư vấn, xét nghiệm di truyền, xét nghiệm chuyên khoa liên quan đến bệnh, có kết quả xét nghiệm sẽ được tái khám và tư vấn di truyền.
- Người bệnh khám và tư vấn di truyền khi đã có kết quả xét nghiệm di truyền, cần chuẩn bị đủ hồ sơ khám chữa bệnh lần đầu hoặc từ các chuyên khoa (nếu có).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin thai phụ.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ):

Thời gian thực hiện tùy theo bệnh tật, có thể dao động từ 10 phút đến 30 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng khám và tư vấn di truyền

3. AN TOÀN

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi khám bệnh và thực hiện tư vấn di truyền. Phòng khám đảm bảo an toàn theo quy định về phòng chống cháy nổ chung, có đủ ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm phù hợp, đảm bảo về tiếng ồn không ảnh hưởng tới quá trình khám và tư vấn di truyền, phòng tư vấn cần độc lập với các phòng khác, mang tính chất riêng tư. Trong phòng có bảng chỉ dẫn và quy trình khám, tư vấn di truyền.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

Bước 1. Mở hồ sơ bệnh án di truyền điện tử/ bệnh án giấy

Bước 2. Hỏi bệnh sử

- Hỏi thời điểm phát hiện thấy bất thường, diễn biến, trình tự xuất hiện và biến đổi về mức độ các biểu hiện bất thường đó.

- Hỏi kỹ những lần khám trước. Các xét nghiệm, thăm dò lâm sàng và cận lâm sàng liên quan đến vấn đề bất thường di truyền cũng như các bệnh toàn thân khác.

Các bệnh tật di truyền là bẩm sinh hoặc mới phát sinh, đối tượng khám có thể trả lời, hoặc cần phải khai thác bệnh sử từ người giám hộ của người bệnh, bệnh có tính chất gia đình cần khai thác cả triệu chứng của những người có biểu hiện bệnh tương tự người bệnh.

Bước 3. Hỏi tiền sử

- Hỏi tiền sử bệnh tật của bản thân thai phụ: các bệnh nội khoa, ngoại khoa, sản phụ khoa.

- Hỏi tiền sử gia đình, dòng họ về các bệnh di truyền, các dị tật bẩm sinh.

Bước 4. Xây dựng phả hệ

Thực hiện xây dựng phả hệ ít nhất ba thế hệ, chú thích rõ đối tượng thăm khám và tư vấn di truyền.

Bước 5. Khám bệnh

- *Khám toàn thân/ bộ phận*

- + Đo chiều cao, cân nặng.

- + Khám da, niêm mạc xem có thiếu máu hay phù không.

- + Đo huyết áp: tư thế nằm hoặc ngồi.

- + Khám tim phổi.
- + Khám nam khoa, sản phụ khoa và các đặc tính sinh dục phụ (nếu cần gửi chuyên khoa khám).
- + Khám các bộ phận khác, nếu bất thường chuyển khám chuyên khoa.
- *Khám bệnh di truyền*
- + Đánh giá tâm lý, tâm thần người bệnh (thông qua hỏi bệnh và các test trí tuệ), có thể gửi khám chuyên khoa tâm thần nếu cần.
- + Quan sát hình thái khuôn mặt và các bộ phận trên khuôn mặt, các hội chứng bệnh tật di truyền thường có dị hình khuôn mặt (dysmorphic), có thể nhận hỗ trợ từ ứng dụng phần mềm trí tuệ nhân tạo để nhận diện (FACE2GENE).
- + Quan sát và khám từ toàn thân đến các bộ phận cơ thể, định hướng từ các bệnh/ hội chứng di truyền (gợi ý từ khuôn mặt dị hình, toàn thân, bộ phận bất thường).
- + Đối với các bệnh có tính gia đình, cần yêu cầu khám cho người có biểu hiện triệu chứng hoặc chưa rõ liên quan đến người bệnh (trong cùng phả hệ được xây dựng).
- *Chẩn đoán sơ bộ bệnh/ hội chứng di truyền.*

Bước 6. Tư vấn trước xét nghiệm (nếu người bệnh chưa có xét nghiệm di truyền hoặc các xét nghiệm chẩn đoán)

- Tư vấn các xét nghiệm di truyền.
- Tư vấn các xét nghiệm chuyên khoa.
- Tư vấn các xét nghiệm di truyền phù hợp với người bệnh, tư vấn trước xét nghiệm để người bệnh đồng thuận thực hiện xét nghiệm, phục vụ cho chẩn đoán và tiên lượng bệnh.
- Người bệnh kí phiếu đồng thuận xét nghiệm di truyền.

Bước 7. Chỉ định xét nghiệm (nếu có)

Bước 8. Chẩn đoán bệnh, tật, hội chứng di truyền

- Dựa vào các thăm khám lâm sàng và cận lâm sàng.
- Hội chẩn di truyền, Hội chẩn liên chuyên khoa (nếu cần).

Bước 9. Tư vấn di truyền sau xét nghiệm

- Xác định bệnh, tật, hội chứng của người bị mắc là gì?.

- Bệnh, tật có di truyền không? Nếu có di truyền thì theo cơ chế, quy luật nào?

- Tiên lượng bệnh, tật, các rủi ro của bệnh tật. Xác định khả năng điều trị và phòng bệnh, hướng nghiệp cho người bệnh nếu cần thiết.

- Xác định xác suất sinh con bình thường, con bị bệnh, con mang gen bệnh, giúp cho người được tư vấn hiểu về những rủi ro, nguy cơ tái mắc bệnh nếu sinh con, từ đó, đưa ra những quyết định phù hợp với bản thân họ, với gia đình và xã hội.

- Cần kết hợp tâm lý y học và luật pháp để bảo vệ hạnh phúc cho người bệnh. Tạo sự tin tưởng, yên tâm của người được tư vấn, hiểu rõ về bệnh tật và có sự ứng xử phù hợp với bệnh tật di truyền.

Bước 10. Chỉ định thuốc và các phương pháp điều trị phù hợp (nếu có)

Bước 11. Tổng kết quá trình tư vấn di truyền, hẹn khám lại

- Việc hẹn khám lại tùy tình trạng và mức độ bệnh.

- Tổng kết nội dung tư vấn di truyền cho người bệnh/ gia đình người bệnh- Theo dõi và đánh giá kết quả tư vấn di truyền để tầm soát bệnh tật, hội chứng di truyền.

Bước 12. Ghi và hoàn thiện hồ sơ bệnh án.

4.2. Nhận định kết quả

Tùy từng trường hợp với những kết quả xét nghiệm đã có và được chỉ định thêm mà đưa ra chẩn đoán xác định, tư vấn và phương hướng điều trị, dự phòng cho người bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện khám và tư vấn di truyền

- Sai sót: Không đúng người bệnh
- Xử trí: Đảm bảo đúng người bệnh, bác sĩ đúng chuyên ngành

5.2. Trong quá trình khám và tư vấn di truyền

- Sai sót: không đủ thông tin của người bệnh
- Xử trí:
 - + Khai thác đầy đủ tiền sử, bệnh sử, tránh bỏ sót.

+ Vẽ và xây dựng phả hệ đúng, đầy đủ dựa trên thông tin khai thác từ người bệnh và các xét nghiệm đã có.

+ Chỉ định đúng xét nghiệm để phục vụ cho chẩn đoán

5.3. Sau khi thực hiện khám và tư vấn di truyền

- Sai sót: không theo dõi và tầm soát bệnh

- Xử trí:

+ Cần đưa ra hướng xử lý kịp thời, biện pháp xử trí và điều trị thích hợp.

+ Tư vấn đưa ra những thông tin biện pháp để phòng và chữa bệnh một cách hiệu quả nhất cho tương lai người bệnh và người nhà của họ.

+ Theo dõi và đánh giá kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Dựa trên các kết quả xét nghiệm và hồ sơ bệnh án di truyền đưa ra chẩn đoán, điều trị và tư vấn cho người bệnh.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định số 573/QĐ-BYT ngày 11/02/2010 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành quy trình sàng lọc, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh.

2. Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ Y tế hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

3. Thông tư số 34/2017/TT-BYT ngày 18/8/2017 của Bộ Y tế hướng dẫn tư vấn, sàng lọc, chẩn đoán, điều trị trước sinh và sơ sinh.

4. Thông tư số 49/2018/TT-BYT ngày 28/12/2018 của Bộ Y tế hướng dẫn hoạt động xét nghiệm trong khám bệnh, chữa bệnh.

5. Quyết định số 941/QĐ-BVĐHYHN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội về việc ban hành Quy chế công tác các khoa, trung tâm, đơn vị thuộc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

6. Quyết định số 955/QĐ-BVĐHYHN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Bệnh viện Đại học Y Hà Nội về việc ban hành Quy chế công tác chuyên môn tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

7. Trần Đức Phấn, Lương Thị Lan Anh, Trường Đại học Y Hà Nội (2022), Di truyền Y học, Di truyền lâm sàng và Tư vấn Di truyền, NXB Y học.

8. Lương Thị Lan Anh, Phạm Cẩm Phương, Trường Đại học Y Hà Nội (2023), Nguyên lý di truyền ung thư, NXB Y học.

9. Lương Thị Lan Anh, Phạm Cẩm Phương, Trường Đại học Y Hà Nội (2024), Di truyền ung thư lâm sàng, NXB Y học.

10. Trương Thanh Hương, Đỗ Doãn Lợi, Trường Đại học Y Hà Nội (2020), Di truyền trong tim mạch lâm sàng, NXB Y học.

11. Bộ môn Y sinh học - Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội (2021), Thực hành Di truyền Y học, NXB Y học.
12. Vivian Y. Pan (Editor), Jane L.Schuette (Editor), Karen E. Wain (Editor), Beverly M. Yashar (Editor). A guide to genetic counseling, 3rd Edition, SBN: 978-1-119-89208-3, November 2024, Wiley- Blackwell
13. Thompson & Thompson (2024). Genetics and Genomics in Medicine. Ninth Edition. Elsevier.
14. Lynn B. (2020). Medical genetics. Sixth Edition. Elsevier.
15. Antonie D. (2024). Genomics in Clinic. A Practical Guide to Genetic Testing, Evaluation, and Counseling. Elsevier.

8. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT DNA MICROARRAY

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật microarray (SNParray, aCGH...) là một xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự mất cân bằng nhiễm sắc thể, các biến thể số lượng bản sao kích thước nhỏ (vi lặp đoạn/ vi mất đoạn) trong toàn bộ hệ gen.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật microarray sử dụng các đoạn dò DNA ngắn (probe) đặc hiệu cho các vùng gen (locus) cần khảo sát nằm trên 23 cặp nhiễm sắc thể (NST), được sắp xếp một cách chính xác trên lam kính thành một hệ thống lưới được gọi là con chip. Tiến hành lai DNA huỳnh quang rồi so sánh cường độ tín hiệu của mẫu xét nghiệm với mẫu chứng. Kỹ thuật này có thể phát hiện những thay đổi có kích thước từ 100 Kb (tùy thuộc độ phân giải của từng kit) - độ phân giải này cao hơn tới 1000 lần so với độ phân giải của nhiễm sắc thể đồ thông thường, do đó cho phép phát hiện các vùng nhỏ mà kỹ thuật karyotype không thể phát hiện được.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Hộp đựng slide tránh ozone.
- Ống thu mẫu 1,5 mL chống bám dính và không nhiễm RNase (bên tại 98°C).
- Pipet đơn kênh dải thể tích 0,1-2,5 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L.
- Pipet đa kênh dải thể tích 10 - 100 μ L; 30 -300 μ L.
- Đầu tip chống bám dính (thể tích từ 0,5 - 1000 μ L).
- Đồng hồ bấm giờ.
- Đĩa PCR 96 giếng.
- Đĩa PCR 96 giếng và các nắp dải 8 giếng.

- Miếng nhựa dán đĩa vi tấm, miếng film dán đĩa, tấm nhôm dán đĩa.
- Giấy thấm, giấy nhôm.
- Găng tay tiệt trùng không bột.
- Bình trữ tiệt trùng.
- Đĩa thuỷ tinh 1,5 L.
- Khay đựng đá lạnh.
- Nhíp sạch.
- Khay đựng lai rửa (x3 hoặc x5 vị trí slide) và đĩa rửa thể tích 250 mL.
- Bộ kit tách chiết DNA (tùy chọn).
- Bộ kit tinh sạch DNA tùy chọn.
- 1×TE (pH 8.0), dùng cho sinh học phân tử (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA•Na₂).
- Nước cất DNase/RNase-free.
- Nước siêu sạch Milli-Q.
- Human Genomic DNA.
- Bộ hóa chất lai và chip lai.

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống Microarray Scanner- - Hệ thống lai tương ứng với chip lai.
- Máy ủ slide thiết lập nhiệt độ tại 67°C - Lòng sắt quay cho máy ủ slide
- Khay rửa slide Microarray.
- Ống thành mỏng 200 µL.
- Ngăn lai hoá bằng thép không gỉ (Agilent p/n G2534A).
- Ngăn lai hoá bằng thép không gỉ.
- Đệm dùng cho lai hoá slide - loại đóng gói 8-.
- Máy đo nồng độ DNA.
- Máy khuấy từ gia nhiệt.
- Máy spindown.
- Máy ly tâm lạnh để bàn tốc độ 12000 x g.
- Ống PCR 0,5 mL thành mỏng loại trong.
- Máy luân nhiệt có chế độ làm nóng nắp.
- Máy vortex.
- Máy đo quang phổ UV-VIS.
- Máy cô chân không.

- Bể nước tuần hoàn hoặc block nhiệt. Cho tách chiết DNA, thiết lập tại 56°C, 37°C, 65°C và 98°C.

- Thanh khuấy từ, 7,9 × 38,1 mm (×2 hoặc ×4).

- Tủ hút ẩm hoặc hộp đựng N₂ sạch để trữ slide.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: Mẫu máu ngoại vi chống đông EDTA, mẫu tế bào như tế bào dịch ối, mẫu tế bào khác...

- Thể tích mẫu: mẫu máu ngoại vi 2 mL-3 mL, dịch ối 10-15 mL.

- Thời điểm tối ưu để lấy mẫu xét nghiệm: mẫu máu ngoại vi đối với sau sinh, mẫu dịch ối là từ tuần 16 của thai kỳ. Ghi nhận tuổi thai tại thời điểm chọc ối.

- Kiểm tra thông tin:

- + Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).

- + Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin thai phụ.

- + Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm: chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 96 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Nêu các vấn đề an toàn cần lưu ý khi thực hiện kỹ thuật (nếu cần thiết), có thể bao gồm:

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Bước 1. Chuẩn bị mẫu DNA

a. Tách chiết gDNA

- DNA cần được tách trong vòng 24 tiếng sau khi thu mẫu.
- Lượng DNA ≥ 500 ng được khuyến cáo sử dụng phương pháp trực tiếp (Direct Method, xem mục 3.1.4). Lượng DNA < 500 ng được khuyến cáo sử dụng phương pháp khuếch đại gDNA (xem mục 3.1.3).

- DNA sau khi được tách và tinh sạch có thể được bảo quản trong môi trường Tris-EDTA (pH 7.2) tại 2 - 8 °C trong 1 năm; tại -20 °C trong vòng 7 năm; và tại -70 °C cho ít nhất 7 năm.

b. Định lượng và kiểm tra chất lượng DNA

Tuỳ chọn các phương pháp đo quang phổ UV-VIS hay bằng máy đo Qubit.

c. Khuếch đại (Amplification of gDNA)

Chuyển 50 ng gDNA vào ống 200 μ L hoặc giếng, pha loãng với nước Dnase/Rnase-free thể tích 10 μ L.

- Thêm 1 μ L dung dịch 10x Fragmentation Buffer vào mỗi mẫu. Pipet lên xuống nhẹ để trộn đều.

- Đặt các ống hoặc giếng chứa mẫu vào máy luân nhiệt, cài đặt nhiệt độ nắp nhiệt ở 95 °C và ủ trong *chính xác* 4 phút.

Lưu ý: Thời gian ủ phân mảnh gDNA sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả quy trình.

- Chuyển các mẫu sang khay đá lạnh ngay sau khi hết thời gian ủ, sau đó ly tâm nhanh để tập trung phần dung dịch báo trên thành ống xuống đáy. Lưu ý: Phải tiếp tục thực hiện bước 2 để không làm ảnh hưởng đến chất lượng library DNA.

d. Chuẩn bị DNA library

- Thêm 2 μ L dung dịch 1x Library Preparation Buffer vào mỗi mẫu.
- Thêm 1 μ L dung dịch Library Stabilization Solution vào mỗi mẫu.
- Trộn đều, ly tâm nhanh để tập trung phần dung dịch bám trên thành ống xuống đáy, đặt các ống hoặc giếng chứa mẫu vào máy luân nhiệt, cài đặt nhiệt độ nắp nhiệt ở 95°C trong 2 phút.

- Chuyển mẫu sang khay đá lạnh, ly tâm nhanh để tập trung dung dịch xuống đáy, chuyển lại về khay đá lạnh.
- Thêm 1 μL dung dịch Library Preparation Enzyme. Trộn đều, ly tâm nhanh để tập trung dung dịch xuống đáy.
- Đặt các ống hoặc giếng chứa mẫu vào máy luân nhiệt và ủ theo điều kiện trong bảng 1 (tổng thời gian ủ hơn 1 tiếng).

Bảng 1. Chu trình ủ nhiệt chuẩn bị DNA library bằng máy luân nhiệt

Nhiệt độ	Thời gian (phút)
16°C	20
24°C	20
37°C	20
75°C	5
4°C	∞

- Lấy mẫu ra khỏi máy luân nhiệt, ly tâm nhanh để tập trung dung dịch xuống đáy. Tổng thể tích mỗi mẫu lúc này là 15 μL . Có thể tiếp tục thực hiện bước khuếch đại hoặc trữ mẫu ở -20°C trong vòng 3 ngày.

e. PCR

- Chuẩn bị các thành phần cho phản ứng PCR trong
- Bảng 2 trên khay đá lạnh.

Bảng 2. Thành phần phản ứng khuếch đại gDNA

Thành phần	Thể tích (μL)	x16 phản ứng (μL)*	x48 phản ứng (μL)*	— phản ứng (μL)*
10x Amplification Master Mix	7,5	127,5	375	
Nuclease-Free Water	47,5	807,5	2375	
WGA DNA Polymerase	5	85	250	
Tổng thể tích của Amplification Master Mix	60	1020	3000	

- Thêm 60 μL Amplification Master Mix vào mỗi 15 μL mẫu thu được ở bước trước để đạt tổng thể tích phản ứng PCR là 75 μL .

- Trộn và ly tâm nhanh, đặt ống hoặc giếng chứa phản ứng vào máy luân nhiệt và vận hành chu trình nhiệt với điều kiện trong Bảng 3:

Bảng 3. Chu trình nhiệt phản ứng khuếch đại gDNA

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
Tách mạch ban đầu	95°C	3 phút
Lặp lại 14 chu kỳ:		
- Tách mạch	94°C	15 giây
- Kéo dài	65°C	5 phút
Kết thúc	4°C	∞

Kết thúc phản ứng PCR, giữ mẫu ở 4°C hoặc trữ lạnh ở -20°C trong vòng 3 ngày cho đến khi thực hiện bước tinh sạch.

4.1.2 Bước 2. Tinh sạch

- Sử dụng kit tùy chọn hoặc GenElute PCR Clean-Up.
- Định lượng sản phẩm DNA đã khuếch đại.
- Kiểm tra chất lượng sản phẩm DNA khuếch đại bằng phương pháp đo Nanodrop hoặc phương pháp tương khác tương ứng.

Chuẩn bị trước khi đánh dấu DNA

- Chuyển 2 μg mẫu DNA đã khuếch đại và tinh sạch vào ống 1,5 mL Rnase-free hoặc đĩa PCR, pha loãng với nước DNase/Rnase-free để đạt thể tích 26 μL . Đảm bảo lượng DNA trong mẫu DNA thực và mẫu DNA chứng là như nhau trước khi thực hiện bước phản ứng đánh dấu.

- Nếu thể tích mẫu DNA đã khuếch đại và tinh sạch (2 μg) vượt quá 26 μL , thực hiện bước cô đặc mẫu DNA bằng máy Vacuum concentrator (Speed Vac) và hòa tan mẫu với DNase/Rnase-free water.

4.1.3 Bước 3. Phương pháp trực tiếp (Direct Method)

a) Phản ứng phân đoạn DNA bằng enzyme (Restriction Digestion)

- Cài đặt nhiệt độ các block nhiệt hoặc bể điều nhiệt ở 37°C và 65°C, đảm bảo thiết bị đạt đến nhiệt độ yêu cầu trước khi ủ; hoặc sử dụng máy luân nhiệt để cài đặt các nhiệt độ trên.

- Rã đông 10x Restriction Enzyme Buffer và dung dịch BSA. Búng nhẹ ống để trộn đều và ly tâm nhanh (spindown). Bảo quản trên đá trong suốt quá trình sử dụng và trữ đông -20°C khi không sử dụng.

- Cho mỗi phản ứng, chuyển 500 ng gDNA vào ống DNase/RNase-free, pha loãng với nước DNase/RNase-free để mẫu đạt đến thể tích 20,2 μL .

- Chuẩn bị Digestion Master Mix theo thành phần trong.

- Pipet lên xuống để trộn đều. Giữ các hóa chất trên khay đá lạnh.

Bảng 4. Thành phần Digestion Master Mix

Thành phần	Mỗi phản ứng (μL)	x16 phản ứng (μL)	x48 phản ứng (μL)	___ phản ứng (μL)
Nuclease-Free Water	2,0	34	100	
10x Restriction Enzyme Buffer	2,6	44,2	130	
BSA	0,2	3,4	10	
Alu I	0,5	8,5	25	
Rsa I	0,5	8,5	25	
Tổng thể tích	5,8	98,6	290	

- Thêm 5,8 μL Digestion Master Mix vào mỗi mẫu DNA, pipet lên xuống để trộn đều.

- Ủ mẫu: Chuyển các mẫu vào ủ nhiệt độ 37°C trong 2 tiếng

- Chuyển sang 65°C và ủ trong 20 phút để bất hoạt enzyme.

- Chuyển mẫu sang khay đá lạnh.

- Trường hợp sử dụng máy luân nhiệt, có thể cài đặt chu trình nhiệt như Bảng 5 sau:

Bảng 5. Phản ứng phân đoạn mẫu bằng máy luân nhiệt

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
1	37°C	2 tiếng
2	65°C	20 phút
3	4°C	∞

Chuyển sang bước đánh dấu DNA (mục 3.2.1), hoặc trữ mẫu đã phân cắt bằng enzyme ở -20°C trong vòng 1 tháng.

4.1.4 Bước 4. Tiến hành

- Đưa các hóa chất ra khỏi tủ âm sâu và để các hóa chất tại nhiệt độ phòng từ 15 - 30 phút trước khi sử dụng. Đảm bảo các hóa chất đã được rã đông trước khi sử dụng:

- Đưa các hóa chất từ tủ lạnh (2 - 8°C) và để các hóa chất tại nhiệt độ phòng từ 15 - 30 phút trước khi sử dụng:

- + DNA thực;
- + DNA chứng (nữ);
- + DNA chứng (nam).

- Trước khi sử dụng, vortex đều và ly tâm nhanh các mẫu DNA thực, mẫu DNA chứng và các hóa chất sử dụng. Để các hóa chất tại nhiệt độ phòng để đảm bảo độ hòa tan và trộn tối đa.

4.1.4.1 Đánh dấu huỳnh quang lên DNA (*Fluorescent Labeling of gDNA*)

1. Các mẫu DNA thực sẽ được đánh dấu màu cyanine 5 và mẫu DNA chứng (Human Reference DNA, nam và nữ) sẽ gắn màu cyanine 3.

2. Cài đặt nhiệt độ các block nhiệt hoặc bể điều nhiệt ở 98°C, 37°C và 65°C, đảm bảo thiết bị đạt đến nhiệt độ yêu cầu trước khi ủ; hoặc sử dụng máy luân nhiệt để cài đặt các nhiệt độ trên.

3. Ly tâm nhanh các mẫu (1 phút, 6000 x g) để tập trung phân dung dịch xuống đáy.

4. Thêm 5 µL Random Primer vào mỗi ống hoặc giếng chứa 26 µL mẫu DNA. Pipet lên xuống nhẹ để trộn đều.

5. Chuyển các mẫu vào ủ nhiệt độ 98°C trong 10 phút, sau đó chuyển sang khay đá lạnh và ủ trong 5 phút. Trường hợp sử dụng máy luân nhiệt, có thể cài đặt chu trình nhiệt như sau (Bảng 6). Sau khi hoàn thành bước ủ, ly tâm nhanh các mẫu.

Bảng 6. Tách mạch và phân mảnh DNA bằng máy luân nhiệt

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
1	98°C	3 phút
2	4°C	∞

6. Chuẩn bị hóa chất đánh dấu Labeling Master Mix, chứa cyanine-3 hoặc cyanine-5 trên khay đá lạnh với các thành phần theo thứ tự trong Bảng 7:

Bảng 7. Chuẩn bị Label Master Mix

Thành phần	1 phản ứng (µL)	x 8 phản ứng (µL)*	x 24 phản ứng (µL)*	_____ phản ứng (µL)*
5x Reaction Buffer	10,0	85	250	
10x dNTPs	5,0	42,5	125	
Cyanine 3-dUTP <i>hoặc</i> Cyanine 5-dUTP	3,0	25,5	75	
Exo (-) Klenow	1,0	8,5	25	
Tổng thể tích	19,0	161,5	475	

7. Thêm 19 µL Labeling Master Mix vào mỗi mẫu DNA, tổng thể tích phản ứng lúc này là 50 µL. Pipet lên xuống nhẹ để trộn đều.

8. Ủ mẫu:

- Chuyển các mẫu vào ủ nhiệt độ 37°C trong 2 tiếng
- Chuyển sang 65°C và ủ trong 10 phút để bất hoạt enzyme.
- Chuyển mẫu sang khay đá lạnh.

9. Trường hợp sử dụng máy luân nhiệt, có thể cài đặt chu trình nhiệt như

Bảng 8 sau:

Bảng 8. Phản ứng đánh dấu DNA bằng máy luân nhiệt

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
1	37°C	2 tiếng
2	65°C	10 phút
3	4°C	∞

10. Sau khi hoàn thành bước ủ, ly tâm nhanh các mẫu. Mẫu DNA đã đánh dấu huỳnh quang có thể lưu trữ ở -20°C trong điều kiện tối.

4.1.4.2 Tinh sạch sản phẩm DNA đánh dấu (Purification of labeled DNA)

Mẫu DNA đã đánh dấu được tinh sạch bằng cột Purification Column.

Lưu ý: Tuyệt đối tách riêng các mẫu DNA được đánh dấu cyanine-3 và cyanine-5 khi thực hiện bước tinh sạch này.

- Ly tâm nhanh các mẫu DNA đã đánh dấu (1 phút, 6000 x g).
- Thêm 430 µL 1xTE (pH 8,0) vào mỗi mẫu.

- Với mỗi mẫu DNA cần tinh sạch, đặt 1 cột tinh sạch vào ống thu mẫu 2-mL và đánh dấu tên từng mẫu. Chuyển mẫu DNA vào cột.

- Đậy kỹ nắp cột, ly tâm trong 10 phút ở 14000 x g, nhiệt độ phòng. Đổ bỏ phần dung dịch và đặt cột vào lại ống thu mẫu.

- Thêm 480 μ L 1xTE (pH 8,0) vào mỗi cột. Ly tâm trong 10 phút 14000 x g trong nhiệt độ phòng. Đổ bỏ phần dung dịch.

- Chuyển cột sang ống thu mẫu 2-mL mới, đánh dấu tên mẫu tương ứng, lưu ý quay ngược cột lại khi đặt vào ống. Ly tâm trong 1 phút ở 1000 x g trong nhiệt độ phòng để thu mẫu tinh sạch. Thể tích của mỗi mẫu vào khoảng 20 - 32 μ L.

- Thêm 1xTE (pH 8,0) hoặc sử dụng Vacuum Concentrator để cô đặc mẫu đạt đến thể tích tương ứng trong Bảng 9.

- Trộn đều mẫu. Nếu mẫu khô hoặc rửa sau quá trình cô đặc, ủ mẫu trên khay đá trong 5 phút, sau đó pipet lên xuống 10 lần để tan mẫu.

- Lấy 1,5 μ L mỗi mẫu để thực hiện đánh giá lượng thu được (Yield) và hoạt tính cụ thể của các mẫu nhuộm huỳnh quang (Specific Activity).

- Trong ống 1,5 mL Rnase-free Microfuge Tube hoặc ống 200 μ L Thin-Wall, trộn mẫu DNA thực (đánh dấu cyanine-5) và mẫu DNA chứng (đánh dấu cyanine-3) theo tỷ lệ tương ứng trong Bảng 9.

Bảng 9. Thể tích mẫu và tổng thể tích hỗn hợp mẫu đánh dấu

Microarray	Thể tích mẫu đánh dấu với Cyanine 3 hoặc Cyanine 5 sau khi tinh sạch	Tổng thể tích hỗn hợp sau khi đo Nanodrop và trộn	Vật chứa
4-pack	21 μ L	39 μ L	1,5-mL RNase-free Microfuge Tube; 200- μ L Thin-Wall Tube hoặc đĩa PCR 96 giếng

Để xác định lượng thu được (Yield) và tỷ lệ đánh dấu (Degree of Labeling) và hoạt tính cụ thể của từng loại huỳnh quang (Specific Activity), sử dụng NanoDrop 8000 hoặc 2000 UV-Vis Spectrophotometer

4.1.4.3 Lai DNA (DNA Hybridization)

a) Chuẩn bị dung dịch khóa nền 10x Blocking Agent

- Thêm 1,35 mL nước Dnase/Rnase-free vào ống chứa 10x aCGH Blocking Agent đông khô.

- Giữ ở nhiệt độ phòng trong 60 phút và vortex đến khi tan đều trước khi sử dụng hoặc trữ lạnh.

Lưu ý: 10x Blocking Agent đã hòa tan có thể duy trì chất lượng trong 120 ngày khi trữ ở -20°C, chỉ rã đông tối đa 3 lần.

b) Chuẩn bị mẫu DNA đánh dấu để thực hiện lai (hybridization)

- Cài đặt nhiệt độ các block nhiệt hoặc bể điều nhiệt ở 98°C, 37°C, đảm bảo thiết bị đạt đến nhiệt độ yêu cầu; hoặc sử dụng máy luân nhiệt để cài đặt các nhiệt độ trên.

- Chuẩn bị hóa chất lai Hybridization Master Mix theo các thành phần tương ứng với bộ kit lai.

- Thêm 71 µL Hybridization Master Mix vào mẫu hỗn hợp DNA thực (Cyanine-5) và DNA chứng (Cyanine-3) (39 µL), tổng thể tích phản ứng là 110 µL.

- Pipet lên xuống để trộn đều, ly tâm nhanh để tập trung dung dịch xuống đáy ống.

- Chuyển mẫu vào ủ ở 98°C trong 3 phút, sau đó chuyển nhanh mẫu sang 37°C ủ trong 30 phút.

- Trường hợp sử dụng máy luân nhiệt, có thể cài đặt chu trình nhiệt như Bảng 11 sau:

Bảng 11. Nhiệt độ cho phản ứng lai bằng máy luân nhiệt

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
1	98°C	đúng 3 phút
2	37°C	30 phút

Lấy các ống mẫu, ly tâm nhanh 1 phút ở 6000 x g để thu mẫu sẵn sàng cho phản ứng lai ở đáy ống.

Lưu ý: Mẫu đã rã đông phải được thực hiện phản ứng lai ngay lập tức. Nếu không, duy trì hỗn hợp ở nhiệt độ 37°C cho đến khi lai.

c) Lắp slide vào buồng lai

- Đặt một slide đệm (gasket slide) sạch vào đáy buồng Agilent SureHyb, hướng mặt slide đệm có đánh dấu lên trên và thẳng hàng với phần hình chữ nhật trên đáy buồng. Đảm bảo slide nằm bằng phẳng và không bị chênh.

- Pipet lấy 100 μ L mẫu lai và nhả ra chậm, trải đều mẫu lên bề mặt slide đệm.

Lưu ý: Duy trì nhiệt độ gần 37°C nhất để đảm bảo hiệu suất phản ứng. Có thể thực hiện từng mẻ phản ứng nhỏ, và bố trí phản ứng trên khay nhiệt, lò nhiệt hoặc máy luân nhiệt.

- Đặt microarray slide lên trên slide đệm, sao cho mặt phản ứng (active side) tiếp xúc với slide đệm và mặt có mã vạch hướng lên trên, nhãn “Agilent” hướng xuống dưới. Chỉnh slide cho bằng phẳng và không bị chênh.

- Đóng nắp buồng SureHyb lại và trượt thanh kẹp vào để khóa chặt 2 slide với nhau.

- Xoay ngang buồng để mặt microarray slide ướt đều bằng cách quan sát các bóng khí giữa 2 slide di chuyển. Gõ nhẹ nếu cần để di chuyển các bóng khí, đảm bảo mặt slide tiếp xúc đều với dung dịch.

d) Phản ứng lai

Đặt buồng lai vào khay của lò, bắt đầu từ vị trí giữa khay. Đặt tốc độ xoay là 20 rpm, nhiệt độ 67°C trong 24 tiếng.

Lưu ý:

- + Sắp xếp các slide sao cho khay chứa được cân bằng trước khi vận hành lò xoay.

- + Lò phản ứng lai phải được hiệu chuẩn định kỳ để đảm bảo kết quả tốt.

4.1.4.4 Rửa (Microarray Wash)

Lưu ý: Bước rửa microarray phải được thực hiện trong điều kiện ozone ≤ 5 ppb. Xác định mức ozone trong phòng thí nghiệm để chọn quy trình rửa phù hợp.

a) Ủ ấm dung dịch Wash Buffer 2

- Nhiệt độ của dung dịch Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 phải được duy trì ở 37°C cho hiệu suất tối ưu.

- Lấy lượng buffer cần dùng sang chai chứa đã tiệt trùng, ủ ấm trong tủ ủ hoặc bể điều nhiệt ở 37°C qua đêm.

- Đặt đĩa nhuộm slide, đĩa 1,5 L, và bình chứa 1-2 L nước Milli-Q vào tủ ẩm hoặc bể điều nhiệt ở 37°C qua đêm.

b) Rửa với nước Milli-Q

Tráng kỹ đĩa nhuộm slide, khay đựng slide, đĩa khuấy bằng nước Milli-Q trước khi dùng. Tráng rửa 5 lần.

c) Rửa slide microarray

Bảng 12. Điều kiện rửa microarray

	Đĩa	Wash Buffer	Nhiệt độ	Thời gian
Tháo buồng lai	#1	Wash Buffer 1	Nhiệt độ phòng	
Rửa lần 1	#2	Wash Buffer 1	Nhiệt độ phòng	5 phút
Rửa lần 2	#3	Wash Buffer 2	37°C	1 phút

Luôn sử dụng Wash Buffer mới, thay mới sau mỗi quy trình rửa (tối đa 5 slide)

- Đổ đầy đĩa nhuộm slide #1 với Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 ở nhiệt độ phòng

- Chuẩn bị đĩa #2:

+ Đặt khay chứa slide vào đĩa nhuộm slide #2

+ Bỏ que khuấy từ vào, đổ đầy đĩa #2 với Wash Buffer 1 ở nhiệt độ phòng

+ Đặt đĩa #2 lên dụng cụ khuấy từ

- Chuẩn bị đĩa #3:

+ Đặt đĩa 1,5 L đã ủ ẩm lên dụng cụ khuấy từ có gia nhiệt.

+ Đặt đĩa nhuộm slide #3 vào đĩa 1,5 L

+ Đổ đầy đĩa 1,5 L bằng nước Milli-Q ở 37°C

+ Đổ đầy đĩa nhuộm slide #3 bằng Wash Buffer 2 ở 37°C.

+ Bỏ que khuấy từ vào, bật chế độ gia nhiệt ở 37°C. Theo dõi nhiệt độ bằng nhiệt kế.

- Thực hiện rửa với từng slide, lấy buồng lai từ tủ ủ và tiếp tục quay những buồng còn lại.

- Chuẩn bị tháo buồng lai:

+ Đặt buồng lai trên mặt phẳng, tháo lỏng ốc theo ngược chiều kim đồng hồ.

+ Trượt thanh kẹp ra, gỡ bỏ nắp buồng.

+ Lấy 2 slide (slide đệm - slide microarray) ra mà không để 2 slide tách rời nhau. Giữ mặt có mã vạch hướng lên trên, chuyển 2 slide vào đĩa #1

+ Thả nhẹ 2 slide vào đĩa #1 đã chuẩn bị trước.

- Trong đĩa #1, nhẹ nhàng tách 2 slide ra từ phía đầu có mã vạch bằng đầu nhíp, giữ slide ngấp dưới dung dịch. Lấy slide microarray ra. Lưu ý luôn giữ ở góc có mã vạch hoặc bên cạnh slide, tuyệt đối không chạm vào mặt slide. Chuyển sang nhanh và sang đĩa #2.

- Lặp lại từ bước 1 đến 6 cho 4 slide còn lại. Mỗi lần chỉ rửa đồng thời tối đa 5 slide.

- Khi đã đủ 5 slide trong đĩa #2, bật khuấy từ đến 350 rpm trong 5 phút. Điều chỉnh tốc độ vừa phải.

- Rửa slide trong đĩa #3:

- Chuyển khay chứa slide sang đĩa nhuộm slide #3 có chứa Wash Buffer 2 ở 37°C, bật khuấy từ, rửa ít nhất 1 phút, nhưng không quá 2 phút.

- Nhấc khay chứa slide chậm và nhẹ nhàng để hạn chế dung dịch bám lại trên slide.

- Đổ bỏ dung dịch Wash Buffer 1 và Wash Buffer 2 sau khi sử dụng cho một lần rửa.

- Đọc slide ngay sau khi rửa để hạn chế ảnh hưởng của các tác nhân oxy hóa trong môi trường đến tín hiệu. Có thể trữ slide trong hộp chứa slide màu cam trong hộp khí N₂, trong điều kiện tối.

d) Đặt slide vào khay giữ slide

Đối với hệ thống SureScan Microarray Scanner

- Nhẹ nhàng đặt phần slide không có mã vạch nằm lên phần mép của khay giữ.

- Hạ nhẹ slide xuống khay giữ, đảm bảo mặt phản ứng (active side) có chữ “Agilent” hướng lên trên và đối diện với nắp đậy

- Đậy nắp nhựa, nhấn nhẹ đến khi nghe tiếng khốp.

4.1.4.5 Đọc tín hiệu xét nghiệm (Microarray Scanning and Analysis)

- Đặt khay giữ slide vào khung quét của máy

- Kiểm tra tình trạng thiết bị.
- Bắt đầu quét, chọn Start Scan.

4.2. Nhận định kết quả

- Sau khi hoàn tất quét slide trên hệ thống Agilent SureScan, phần mềm CytoGenomics sẽ tự động xuất kết quả bao gồm cả báo cáo QC và sai số.

- Các biến thể số lượng bản sao được phân 5 loại: gây bệnh, có khả năng gây bệnh, lành tính, có khả năng lành tính, chưa rõ chức năng. Việc phân tích và phân loại CNV dựa vào phần mềm đi kèm, các nguồn dữ liệu như Decipher, Clinvar, OMIM.

- Xét nghiệm cha mẹ có thể cần thiết để đánh giá thêm khả năng gây bệnh của một sự thay đổi số lượng bản sao. Một số trường hợp các cơ sở dữ liệu sẵn có không thể phân loại biến thể thì có thể cân nhắc một số yếu tố bao gồm kích thước và thành phần gen trong vùng biến thể để giúp giải thích kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót:
 - + Giá trị OD260/230 thấp
 - + Nồng độ DNA đầu vào quá cao hoặc thấp
- Xử trí:
 - + Tinh sạch lại DNA
 - + Đảm bảo hiệu chuẩn máy đo quang phổ bằng dung dịch đệm thích hợp
 - + Đảm bảo gDNA hoàn toàn ở trong dung dịch bằng cách hút lên và xuống. Nếu cần, ủ ở 37°C trong 30 phút. Nếu nồng độ gDNA > 350 ng/μl, pha loãng 1:2 trong Buffer AE hoặc 1×TE (pH 8,0). Định lượng lại để đảm bảo định lượng là chính xác.
 - + Nếu cần, hãy tinh sạch lại DNA.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Khả năng đánh dấu huỳnh quang lên DNA thấp
- Xử trí:

+ Bảo quản Cyanine dUTP ở -20°C. Giữ enzyme trên đá và trở về -20°C như nhanh nhất có thể.

+ Kiểm tra kỹ thời gian ủ và nhiệt độ (sử dụng máy đã hiệu chuẩn nhiệt kế), và sử dụng máy luân nhiệt có nắp gia nhiệt.

+ Sự bay hơi có thể là vấn đề khi xử lý mẫu ở nhiệt độ cao nhiệt độ. Đảm bảo rằng các ống mẫu được đậy kín hoặc sử dụng đĩa Heat Sealer để tránh bay hơi.

+ Đảm bảo các pipet không bị hiệu chỉnh.

+ Đảm bảo gDNA, hoá chất và master mix được trộn đều.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Kết quả phân tích không phù hợp với biểu hiện lâm sàng và chẩn đoán bệnh.

- Xử trí: Cần phân tích kết quả và đôi chiếu lâm sàng.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù. (Nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues (with a High Throughput option) Protocol, Version 7.5, June 201.

2. Slater Howard R., Bailey Dione K., Ren Hua et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. American journal of human genetics. 2005;77(5):709-726

3. Bejjani Bassem A, Saleki Reza, Ballif Blake C et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? American Journal of Medical Genetics Part A. 2005;134(3):259-267.

4. Kirchhoff, Maria Rose, Hanne Lundsteen et al. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. Journal of Medical Genetics. 2001;38(11):740-744

9. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR nhằm phát hiện các đột biến đã biết, đồng thời ở nhiều gen phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Multiplex PCR là một phương pháp sinh học phân tử phổ biến nhằm khuếch đại nhiều trình tự DNA chỉ trong một phản ứng PCR. Trong quá trình phân tích PCR đa môi, nhiều trình tự sẽ được khuếch đại cùng lúc sử dụng nhiều cặp môi, tất cả các thành phần được bổ sung vào cùng một ống phản ứng. Như một phương pháp cải tiến của phản ứng PCR thông thường, phương pháp này giúp rút ngắn thời gian thực hiện mà lại không ảnh hưởng tới kết quả thí nghiệm. Vấn đề thường gặp trong phản ứng PCR đơn lẻ (Single PCR) là hiện tượng âm tính giả do sai về các thành phần hay chu trình nhiệt, cũng có khi lại là hiện tượng dương tính giả do bị nhiễm. Phương pháp multiplex PCR đã khắc phục được hiện tượng âm tính giả do mỗi sản phẩm khuếch đại sẽ cung cấp một giá trị giúp kiểm tra các phân đoạn được khuếch đại khác.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;

- Đầu cân 200 μ l có lọc;
- Đầu cân 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dụng đo Qubit 0,5mL;
- Kit đo nồng độ và chất lượng DNA/RNA;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Kit phát hiện đột biến gen bằng Multiplex Real-time PCR;
- Cồn chuyên dụng cho sinh học phân tử;
- Xylene;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 0,1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 200 - 1000 μ l;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu cân và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Tủ An toàn sinh học;
- Máy Real-time PCR.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô, mẫu mô đã được cố định và vùi nén (FFPE); mẫu máu; mẫu dịch cơ thể khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.

- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 12 đến 18 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm các gen từ bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc.
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA tinh sạch theo Kit tách DNA;
- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng bộ kit chuyên dụng.

- Lấy các mẫu DNA tách chuẩn bị cho xét nghiệm xét nghiệm các gen từ bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR.

4.3. Thực hiện kỹ thuật Multiplex Real-time PCR:

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để ổn định hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống 0,2 mL: Buffer, dNTPs, MgCl₂ (nếu trong Buffer chưa có), hỗn hợp mồi (gồm các cặp mồi phát hiện đột biến được trộn theo tỷ lệ nhất định), enzym Taq polymerase, nước khử ion vô trùng, DNA/RNA khuôn.

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn; Đặt vào máy PCR; Chọn chương trình; Bấm start để máy chạy.

- Phân tích kết quả:

- + Kết quả từ quá trình Multiplex Real-time PCR được phân tích tùy theo mục đích sử dụng và dựa theo hướng dẫn phân tích của từng bộ kit xét nghiệm.

- + Trong quá trình phân tích kết quả, trước hết cần kiểm tra mẫu chứng. Sau đó, tiến hành phân tích mẫu nếu mẫu chứng đạt yêu cầu.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:

- + Thực hiện lấy lại mẫu.

- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.

- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng:

- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.

- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:

- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.

- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng

- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:

- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.

- + Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.

- Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Markoulatos P., Siafakas N. and Moncany M. (2002), Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach, Journal of Clinical Laboratory Analysis, (16), 47-51.

10. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger nhằm xác định kiểu gen của phôi để sàng lọc các phôi không bệnh hoặc hoàn toàn không mang gen bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen (Preimplantation genetic testing for monogenic gene diseases - PGT-M) là một loại xét nghiệm di truyền phát hiện các đột biến di truyền đơn gen trên phôi, qua đó ngăn ngừa sự chuyển phôi mắc bệnh di truyền trên 1 vài gen cụ thể. Giải trình tự Sanger được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm và là kỹ thuật thường được ứng dụng trong PGT-M bởi tính chính xác và độ tin cậy cao. Phương pháp này thực hiện dựa trên kỹ thuật giải trình tự Sanger bằng việc dùng các máy giải trình tự động sử dụng các ddNTP có đánh dấu huỳnh quang giúp cho việc xác định trình tự gen được tiến hành một cách tự động và chính xác. Từ đó cho phép phát hiện được các đột biến gen khi so sánh với trình tự gen tham chiếu.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit khuếch đại toàn bộ hệ gen (tùy hãng).
- Bột agarose.
- Ethidium bromide hoặc tương đương.
- TBE 0,5X.

- Ladder DNA (100bp).
- Mastermix.
- Các môi khuếch đại đoạn gen cần giải trình tự.
- Nước khử ion.
- Dung dịch Hi-Di.
- Exo SAP- IT hoặc tương đương.
- Bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit hoặc tương đương.
- BigDye XTerminator™ Kit hoặc tương đương.
- Ống li tâm đáy nhọn 1,5 mL.
- Đầu côn các loại: 10 µL, 100 µL, 1000 µL.
- PCR tube.
- Plate PCR 96 giếng.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc.
- Máy Vortex.
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL.
- Máy đo độ tinh sạch.
- Máy spin down.
- Máy Speedvac.
- Bộ dụng cụ pipet: micropipet 2, 10, 100 và 1000 µL.
- Buồng thao tác PCR
- Máy PCR.
- Máy điện di.
- Máy soi và chụp ảnh gel.
- Máy điện di mao quản (SeqStudio Genetic Analyzer, ABI-3130 (XL), ABI-3500 (XL) hoặc tương đương.
- Phần mềm phân tích kết quả (Bioedit sequence alignment editor) hoặc tương đương.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-M bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào (phôi 5 ngày) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 μ l.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24h.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ l. Ống đựng tế bào phôi sinh thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng. Mẫu được lấy theo Quy trình hướng dẫn lấy mẫu tại labo IVF.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.
- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Các phòng xét nghiệm đủ điều kiện thực hiện kỹ thuật.

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.
- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.
- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước tiến hành

4.1.1. Bước 1

Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất. Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của quy trình này.

4.1.2. Bước 2

Khuếch đại đoạn trình tự gen chứa đột biến:

Dựa vào thông số của cặp mồi thiết kế nhằm khuếch đại đoạn gen chứa đột biến để xác định nhiệt độ gắn mồi. Nhiệt độ gắn mồi (T_a °C) có thể ước lượng thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của cặp mồi từ 3-5°C. Việc xác định nhiệt độ gắn mồi cũng có thể xác định chính xác bằng cách tiến hành phản ứng Gradient-PCR trong dải nhiệt độ nhất định.

Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng khuếch đại được minh họa ở bảng:

Thành phần	Thể tích (µL)
Mastermix 2X	6,25
Nước deion	2,75
Mồi F	0,5
Mồi R	0,5
Template DNA	2,5
Tổng	12,5

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95°C	5 phút	1 chu kỳ
95°C	30 giây	35 chu kỳ
T_a °C	30 giây	
72°C	45 giây	
72°C	10 phút	1 chu kỳ
4°C	∞	

Tiến hành điện di agarose, nhuộm và đánh giá

- Chạy điện di sản phẩm PCR trên agarose 2%, thời gian 30 phút với hiệu điện thế 200V và cường độ dòng điện là 100mA.

- Nhuộm bản gel sau khi chạy điện di trong dung dịch EtBr 10 $\mu\text{g/mL}$ trong 10 phút, rửa bản gel sau khi nhuộm bằng nước cất, chụp ảnh gel bằng máy chụp gel.

- Phản ứng khuếch đại thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp mồi đã thiết kế, không có băng phụ thì có thể tiến hành giải trình tự. Trường hợp có band phụ, cần cắt và tinh sạch từ gel.

4.1.3. Bước 3

- Giải trình tự Sanger bằng bộ kit Bộ kit thương mại.
- Trong phần này sẽ trình bày quy trình giải trình tự Sanger bằng bộ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Thermo fisher scientific [4].
- Tinh sạch sản phẩm khuếch đại.
- Tinh sạch sản phẩm bằng Exo SAP- IT nhằm loại bỏ các đoạn mồi dư thừa và các nucleotide chưa hợp nhất bằng enzym. Thành phần và chu trình tinh sạch được thực hiện như sau:

Thành phần	Thể tích (μL)
Sản phẩm DNA	5,0
Exo SAP- IT	2,0

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
37°C	4 phút	1 chu kỳ
80°C	1 phút	1 chu kỳ
4°C	∞	

- Phản ứng Sanger

Tùy vị trí đột biến trong đoạn gen khuếch đại để tiến hành giải trình tự Sanger mồi xuôi hay mồi ngược hay cả hai.

Thành phần và chu trình nhiệt chạy phản ứng Sanger được thực hiện như sau:

Thành phần	Thể tích (μL)	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Big Dye Buffer 1X	1,5	96°C	1 phút	1 chu kỳ
Big Dye Terminator v3.1 2.5X	1,0	96°C	10 giây	25 chu kỳ
Nước deion	6,25	50°C	5 phút	
Môi F hoặc R	0,5	60°C	4 phút	
Sản phẩm DNA	0,5	4°C	∞	
Tổng	10,0			

- Tinh sạch sản phẩm sau phản ứng PCR Sanger sequencing bằng một trong hai phương pháp sau:

Phương pháp 1: Tinh sạch bằng BigDye XTerminator™:

Lưu ý: Sử dụng ống chứa dung dịch dùng một lần và micro pipet P200 8 kênh nếu có, để tạo thuận lợi cho quá trình làm sạch. Sử dụng đầu tip pipet có lỗ rộng khi bơm dung dịch BigDye Xterminator™.

Lưu ý: Nếu sử dụng Máy phân tích DNA 3730, có thể sử dụng kỹ thuật hàn nhiệt tiêu chuẩn. Quy trình này mô tả việc niêm phong tấm bằng MicroAmp™ màng dính trong suốt. Các MicroAmp™ màng dính trong suốt phải được loại bỏ trước khi đặt đĩa 96 giếng lên thiết bị.

+ Lắc lọ BigDye XTerminator™ bead trong 8 đến 10 giây trước khi trộn với dung dịch SAM.

QUAN TRỌNG! Để làm sạch BigDye XTerminator™ hiệu quả, điều cần thiết là phải giữ các nguyên liệu được trộn đều. Giữ thuốc thử trên đá giữa các bước.

+ Chuẩn bị dung dịch xử lý SAM/BigDye XTerminator™ bead như sau:

Phản ứng tinh sạch sản phẩm PCR Sanger sequencing

Thành phần	Thể tích phản ứng 10μl
SAM	45
BigDye XTerminator™ bead	10
Tổng	55

+ Lấy màng dính trong suốt MicroAmp™ ra khỏi đĩa 96 giếng.

+ Chia đều thể tích hỗn hợp hạt (dung dịch hạt BigDye XTerminator™ và dung dịch SAM) cho từng mẫu.

QUAN TRỌNG! Trộn đều, bơm dung dịch lên xuống 3-4 lần trước mỗi lần chuyển. Trộn lại dung dịch sau mỗi bước phân phối

+ Dán đĩa 96 giếng bằng màng dính trong suốt MicroAmp™.

+ Lắc đĩa 96 giếng trong 20 phút ở tốc độ 1.800 vòng/phút (đối với Digital VortexGenie™ 2).

+ Trong máy ly tâm xô lắc, ly tâm đĩa 96 giếng ở tốc độ $1.000 \times g$ trong 2 phút.

Lưu ý: Để bảo quản tối đa 10 ngày, hãy dán kín đĩa bằng màng dính trong suốt MicroAmp™ và bảo quản ở 4°C để chuẩn bị điện di mao quản (CE) hoặc ở -20°C cho đến khi sử dụng. Đĩa BigDye XTerminator™ có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng lên đến 48 giờ bao gồm thời gian trên thiết bị giải trình tự.

Phương pháp 2: Tinh sạch bằng phương pháp rửa EtOH/EDTA:

+ Thêm vào toàn bộ sản phẩm 2 μL EDTA 0,125M và 30 μL ethanol 100°. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút.

+ Gạn bỏ dịch nổi phía trên, đem làm khô bằng speedvac ở 60°C trong 10 phút.

+ Sau khi khô hoàn toàn, thêm 10 μL nước khử ion và vortex đều.

- Điện di mao quản

+ Thêm vào mỗi ống 30 μL dung dịch Hi-Di Formamide và đem biến tính tại nhiệt độ 95°C trong 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C.

+ Sau biến tính, mẫu trên được sử dụng cho điện di mao quản bằng máy điện di mao quản.

+ Trình tự nucleotide của mỗi đoạn gen sau khi giải trình tự được xác định cả 2 chiều (xuôi và ngược) bằng phần mềm phân tích trình tự.

4.2. Nhận định kết quả

- Tùy vào từng loại đột biến, đối chiếu trình tự gen tham chiếu để xác định kết quả tại vị trí xảy ra đột biến đã biết:

- Tại vị trí đột biến chỉ xuất hiện một màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu phân ở trạng thái đồng hợp tử (Đồng hợp tử đột biến hoặc đồng hợp tử wildtype).

- Tại vị trí đột biến xuất hiện hai màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu phôi ở trạng thái dị hợp tử (Mang gen đột biến).

- Đối với các trường hợp kiểu gen đồng hợp tử gây bệnh, có thể kiểm soát được hiện tượng mất alen (Allelic drop out-ADO) gây âm tính giả. Các trường hợp dị hợp tử phức, cần được kiểm soát bằng phân tích di truyền liên kết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả kiểu gen của từng phôi theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Nhận nhầm mẫu.
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm cẩn thận.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.
- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.
- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn gen đột biến cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm. Sinh thiết lại phôi nếu không khắc phục được.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai.
- Xử trí: Cần cân trọng phân tích trong các trường hợp, đề phòng hiện tượng mất alen- ADO, hiện tượng mất cân bằng alen-AI (imbalance Allelic) dẫn đến kết luận sai giữa mẫu phôi mang gen bệnh và bình thường, không mang gen. Trường hợp không kiểm soát được ADO, AI, cần kết hợp phân tích di truyền liên kết bằng các trình tự lặp lại ngắn liên tiếp hoặc các đa hình nucleotide đơn liên kết với gen bệnh để phân biệt được kiểu gen.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi hai người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba.

- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh, so sánh kiểu gen của các thành viên trong gia đình, các mẫu phôi đã có kết quả. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xu C. M., Lu S. J., Chen S. C., Zhang J. L., Xu C. J., Gao Y., Huang H. F. (2023). Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. Reproductive and Developmental Medicine, 7(01), 3-11.

2. Dorado G., Gálvez S., Rosales T. E., Vásquez V. F., Hernández P. (2021). Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing-Review. Biomolecules, 11(8), 1111.

3. Single Cell Kit protocol. Qiagen.

4. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Thermo fisher scientific.

11. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI DNA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền bằng kỹ thuật lai DNA để phục vụ tư vấn, chẩn đoán và điều trị các bệnh lý huyết học, di truyền....

1.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật lai DNA ngược trong đó các đầu dò đặc hiệu với nhiều đột biến hay đa hình của một gen sẽ được gắn trên thanh lai và lai với gen đã được khuếch đại. Đầu dò được cố định trên thanh lai là một đoạn oligo có ái lực mạnh và đặc hiệu với trình tự gen mục tiêu. Chiều dài của chúng phù hợp cho phản ứng lai, giúp phân biệt DNA với những sai khác rất nhỏ trong trình tự. Sản phẩm sau PCR được lai với probe trên màng, các thể lai có thể được phát hiện bằng phản ứng với một cơ chất để tạo thành kết tủa có màu. Xét nghiệm sử dụng các thanh teststrip với các vị trí đã được gắn đầu dò phát hiện các đột biến gen.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Hóa chất cho phản ứng lai DNA	
Hóa chất cho phản ứng lai DNA	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	
Agarose	
Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bể ổn nhiệt;
- Bộ lưu điện;
- Máy điện di;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C-8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 72 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.

- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.1.5. Lai DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng hiển thị trên thanh teststrip. Nhận biết đột biến ở các vị trí vạch trên thanh theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Các vạch trên thanh strip không đặc hiệu	▪ Lưu ý thực hiện các bước rửa đầy đủ theo quy trình, kiểm soát số lượng mẫu đủ để các mẫu được thực hiện đồng thời

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest 2007; 67: 71-86
2. Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T et al. Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations. Arch Inn Med 2001; 4: 165-170.
3. Delague V, Kriegshauser G, Oberkanins C, Me'garbane' A. Reverse hybridization vs. DNA sequencing in the molecular diagnosis of Familial Mediterranean fever. Genet Test 2004; 8: 65-68.

12. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen thai nhi thông qua DNA lưu hành tự do trong máu mẹ (cfDNA) bằng kỹ thuật digital-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật tách chiết, phân lập DNA của thai nhi lưu hành trong máu của thai phụ (mẹ) và xét nghiệm biến thể gen bằng kỹ thuật digital-PCR.

- cfDNA (Cell free DNA) là những đoạn DNA ngắn được giải phóng và lưu hành trong máu mẹ. Những đoạn DNA này là nguồn vật liệu di truyền của thai nhi và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm các biến thể di truyền ở thai nhi.

- Kỹ thuật digital-PCR là một biến thể của kỹ thuật real-time PCR. Kỹ thuật này không chỉ tăng cường độ nhạy của xét nghiệm mà còn có thể định lượng (bằng phương pháp đếm tuyệt đối - absolute quantification).

- Kết hợp cfDNA với phương pháp digital-PCR được ứng dụng để sàng lọc, chẩn đoán trước sinh không xâm lấn nhằm phát hiện sớm các biến thể di truyền ở thai nhi, hạn chế các tai biến của phương pháp chẩn đoán xâm lấn như chọc ối hoặc sinh thiết gai nhau.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết cfDNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy digital-PCR và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm.
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là 10mL máu ngoại vi lấy vào ống chống đông (ống EDTA K2/K3, ống Streck, hoặc ống thu cfDNA). Yêu cầu mẫu không bị vỡ hồng cầu
- Mẫu máu đạt chất lượng ổn định khi lưu trữ 1-2 tuần ở điều kiện 6 - 35°C với ống Streck hoặc ống thu cfDNA.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý mẫu

- Chuẩn bị 2 ống 1,5 mL thường và 2 ống 1,5 mL cho mỗi mẫu, ghi mã mẫu lên thân và nắp ống.

- Ly tâm ống máu ở 1.600g, 8°C trong 10 phút nếu thu bằng ống EDTA hoặc trong 15 phút nếu thu bằng ống Streck, CwBio.

- Hút 1500 µL phần huyết tương vào các ống 1,5 mL thường có kí hiệu tương ứng.

- Ly tâm lần 2 các ống huyết tương ở 16.000 g, 8°C trong 10 phút.

- Hút 1000 µL huyết tương phía trên sang các ống 1,5 mL có ghi kí hiệu tương ứng.

- Lưu trữ mẫu huyết tương (-18°C đến -25°C) trong phòng tách chiết DNA cho đến khi sử dụng.

4.1.2. Tách chiết cfDNA

- Chuẩn bị đủ số ống 1,5 mL thường mới tương ứng với số mẫu cần tách chiết. Ghi mã mẫu lên nắp và thân của từng ống.

- Xử lý mẫu với Proteinase K (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)

- Hút 300 µL huyết tương mỗi mẫu vào ống đã chuẩn bị ở trên.

Thêm 550 µL dung dịch Lysis Buffer (có sẵn trong bộ kit) vào mỗi ống và vortex .

- Ủ các ống ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Trong quá trình ủ, trộn kỹ 3 lần bằng cách đảo chiều.

- Ly tâm nhanh và đặt ống lên giá từ trong 5 phút.

- Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 700 µL Wash Buffer 1 (có sẵn trong bộ kit) vào từng ống. Vortex và spin nhanh.

- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm vào 700 μ L Wash Buffer 2 đã chuẩn bị vào từng ống. Vortex và spin nhanh.

- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lặp lại bước rửa với Wash Buffer 2 thêm một lần nữa.

- Ly tâm nhanh và đặt các ống lên giá từ. Cần thận loại bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Mở nắp và giữ ống trên giá từ. Để khô ở nhiệt độ phòng trong 12 phút.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 45 μ L Elution Buffer và trộn đều.

- Ủ ống ở nhiệt độ phòng 10 phút.

Spin và đặt ống lên giá từ trong 3 phút.

Chuẩn bị ống 1,5 mL low binding, ghi kí hiệu cfDNA cũng mã mẫu và ngày tách lên nắp và thành ống.

- Hút dung dịch DNA phía trên vào ống 1,5mL có kí hiệu mã mẫu tương ứng.

- Ghi lại thông tin các mẫu vào hồ sơ tách chiết cfDNA.

- Mẫu cfDNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy Primers và Probes trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.

- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng ddPCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.

- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các giếng trong đĩa ddPCR.

- Trộn đều từng giếng bằng pipet, tránh tạo bọt.

- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhao, X.-L., et al. (2018). Highly sensitive and specific real-time PCR by employing serial invasive reaction as a sequence identifier for quantifying EGFR mutation abundance in cfDNA. *Analytical Biochemistry*.
2. Tạ, Y. et al. (2020). PROMER: Multiplex real-time PCR for point mutation detection in cfDNA. *Journal of Molecular Diagnostics*.
3. Smith, A. et al. (2023). Technical advances in circulating cell-free DNA detection and analysis for precision medicine. *Clinico-genomics Review*.
4. Lo, Y. M. D. et al. (2022). Current and future perspectives of cell-free DNA in liquid biopsy. *Translational Oncology*.

13. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen thai nhi thông qua DNA lưu hành tự do trong máu mẹ (cfDNA) bằng kỹ thuật realtime-PCR

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật tách chiết, phân lập DNA của thai nhi lưu hành trong máu của thai phụ (mẹ) và xét nghiệm biến thể gen bằng kỹ thuật realtime-PCR.

- cfDNA (Cell free DNA) là những đoạn DNA ngắn được giải phóng và lưu hành trong máu mẹ. Những đoạn DNA này là nguồn vật liệu di truyền của thai nhi và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm các biến thể di truyền ở thai nhi.

- Kỹ thuật realtime-PCR là một biến thể của kỹ thuật PCR, trong đó có sử dụng các đầu dò đánh dấu huỳnh quang (probe) để tăng độ nhạy phát hiện và quan sát phản ứng PCR theo thời gian thực.

- Kết hợp cfDNA với phương pháp realtime-PCR được ứng dụng để sàng lọc, chẩn đoán trước sinh không xâm lấn nhằm phát hiện sớm các biến thể di truyền ở thai nhi, hạn chế các tai biến của phương pháp chẩn đoán xâm lấn như chọc ối hoặc sinh thiết gai nhau.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết cfDNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000 μ L vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μ L;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy realtime-PCR và thiết bị đi kèm.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là 10mL máu ngoại vi lấy vào ống chống đông (ống EDTA K2/K3, ống Streck, hoặc ống thu cfDNA). Yêu cầu mẫu không bị vỡ hồng cầu.
- Mẫu máu đạt chất lượng ổn định khi lưu trữ 1-2 tuần ở điều kiện 6 - 35°C với ống Streck hoặc ống thu cfDNA.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Chuẩn bị đủ số ống 1,5 mL thường mới tương ứng với số mẫu cần tách chiết. Ghi mã mẫu lên nắp và thân của từng ống.

- Xử lý mẫu với Proteinase K (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)

- Hút 300 μ L huyết tương mỗi mẫu vào ống đã chuẩn bị ở trên.

- Thêm 550 μ L dung dịch Lysis Buffer (có sẵn trong bộ kit) vào mỗi ống và vortex .

- Ủ các ống ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Trong quá trình ủ, trộn kỹ 3 lần bằng cách đảo chiều.

- Ly tâm nhanh và đặt ống lên giá từ trong 5 phút.

- Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 700 μ L Wash Buffer 1 (có sẵn trong bộ kit) vào từng ống. Vortex và spin nhanh.

- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm vào 700 μ L Wash Buffer 2 đã chuẩn bị vào từng ống. Vortex và spin nhanh.

- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lặp lại bước rửa với Wash Buffer 2 thêm một lần nữa.

- Ly tâm nhanh và đặt các ống lên giá từ. Cần thận loại bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Mở nắp và giữ ống trên giá từ. Để khô ở nhiệt độ phòng trong 12 phút.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 45 μ L Elution Buffer và trộn đều.

- Ủ ống ở nhiệt độ phòng 10 phút.

- Spin và đặt ống lên giá từ trong 3 phút.

- Chuẩn bị ống 1,5 mL low binding, ghi kí hiệu cfDNA cũng mã mẫu và ngày tách lên nắp và thành ống.

- Hút dung dịch DNA phía trên vào ống 1,5mL có kí hiệu mã mẫu tương ứng.

- Ghi lại thông tin các mẫu vào hồ sơ tách chiết cfDNA.

- Mẫu cfDNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20°C.

4.1.2. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng realtime-PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng realtime-PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy realtime-PCR, chọn chương trình tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã

▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
--	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhao, X.-L., et al. (2018). Highly sensitive and specific real-time PCR by employing serial invasive reaction as a sequence identifier for quantifying EGFR mutation abundance in cfDNA. *Analytical Biochemistry*.
2. Tạ, Y. et al. (2020). PROMER: Multiplex real-time PCR for point mutation detection in cfDNA. *Journal of Molecular Diagnostics*.
3. Smith, A. et al. (2023). Technical advances in circulating cell-free DNA detection and analysis for precision medicine. *Clinico-genomics Review*.
4. Lo, Y. M. D. et al. (2022). Current and future perspectives of cell-free DNA in liquid biopsy. *Translational Oncology*.

14. XÉT NGHIỆM GEN VỚI cfDNA BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen với cfDNA bằng kỹ thuật NGS giúp phát hiện các biến thể dòng mầm (germline) gây bệnh đơn gen hoặc các biến thể di truyền dòng sinh dưỡng (soma) trong một số bệnh lý ung thư.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- DNA tự do (cell-free DNA) là những mảnh DNA nhỏ hiện diện trong máu, được ghi nhận lần đầu bởi Mandel và Metais vào năm 1948. Chúng thường được phát hiện dưới dạng DNA mạch đôi và có kích thước khoảng 150 - 200 cặp base, cũng tương ứng độ dài của 1 nucleosome. Người ta cho rằng cf-DNA được phóng thích vào máu thông qua quá trình chết theo chương trình (apoptosis) hoặc do hoại tử. Thời gian tồn tại của cf-DNA trong hệ tuần hoàn cũng không lâu, chu kỳ bán rã của chúng chỉ khoảng 1 giờ hoặc có thể ngắn hơn.

- Trong cơ thể người khỏe mạnh, cf-DNA hiện diện trong huyết tương ở mức thấp khoảng 10 - 15 ng/mL. Sử dụng phân tích cf-DNA có thể được ứng dụng trong việc phát hiện các biến thể gây bệnh di truyền dòng mầm (kết hợp trong xét nghiệm trước sinh không xâm lấn, NIPT) cho người thực hiện xét nghiệm.

- Ở người bệnh ung thư, tế bào khối u phóng thích ra một lượng cf-DNA và được đặt tên là "DNA khối u tuần hoàn" (ct-DNA), những ct-DNA làm cho hàm lượng cf-DNA ở người bệnh ung thư thường cao hơn người khỏe mạnh. Tuy nhiên tỷ lệ ct-DNA giữa các loại ung thư khác nhau, thậm chí là giữa các người bệnh mang cùng một loại ung thư cực kỳ biến động, tỷ lệ ct-DNA/cf-DNA đo được có người chỉ là $\leq 0,1\%$ nhưng cũng có người lại $\geq 90\%$, điều này gây thách thức đáng kể cho việc phân tích ct-DNA trên nền tảng cf-DNA. Phân tích DNA khối u bằng việc lấy máu định kỳ mà không cần phải làm sinh thiết khối u là một bước tiến lớn trong ứng dụng lâm sàng, đặc biệt là đối với những trường hợp khối u khó xác định vị trí, khối u khó thu mẫu. Hơn nữa, việc theo dõi điều trị cũng sẽ dễ dàng hơn và dĩ nhiên việc lấy một mẫu đại diện để phát hiện được nhiều dòng tế bào khối u khác nhau thì tiện hơn là dùng

kim chọc sinh thiết từng khối u. Ngoài ra, lấy máu còn có thể giúp phát hiện và theo dõi những người bệnh không có dấu hiệu bệnh lý lâm sàng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện.

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 03 người.

2.2. Vật tư

- Hoá chất sinh phẩm:
- + Bộ kit tách cfDNA;
- + Bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự;
- + Bộ kit lai bắt giữ;
- + Bộ kit giải trình tự.
- Vật tư:
- + Đầu côn 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L và 1000 μ L;
- + Ống thu mẫu 1,5 mL, ống thu mẫu 0,2mL, ống tube 2mL;
- + Falcon/Bình Duram;
- + Khẩu trang;
- + Găng tay vô trùng;
- + Găng tay xử lý dụng cụ, quần áo bảo hộ, dung dịch nước rửa tay, cồn sát khuẩn tay nhanh, dung dịch khử trùng, khăn lau tay.
- + Giấy thấm, giấy xét nghiệm, sổ lưu kết quả xét nghiệm, bút viết kính, bút bi.

2.3. Trang thiết bị:

- + Rack từ;
- + Máy PCR;
- + Máy ly tâm;
- + Máy ủ nhiệt;
- + Máy vortex;
- + Máy lắc ngang;
- + Máy đo nồng độ DNA;
- + Micropipette;
- + Máy giải trình tự;
- + Máy đông khô;

- + Server phân tích và lưu trữ dữ liệu.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi, 10 mL;
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: ống Streck;
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: điều kiện nhiệt độ phòng, trong vòng 7 ngày...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...):
- + Ống máu không có tình trạng nứt, đổ bể;
- + Ống máu phải thu đúng bộ kit được cung cấp;
- + Ống máu được bảo quản theo tiêu chuẩn của bộ kit cung cấp.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 50-100 giờ

- + Nhận và xử lý mẫu: 1 giờ;
- + Tách chiết: 2 giờ;
- + Thư viện: 8 giờ;
- + Lai bắt giữ: 16 giờ;
- + Giải trình tự: 12-24 giờ (tùy vào kit sử dụng);
- + Phân tích dữ liệu: 12-24 giờ (tùy vào pipeline và server);
- + Review kết quả: 12-24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên thực hiện thao tác trên mẫu đều phải mặc áo lab, mang găng tay, đeo khẩu trang, và kính bảo hộ mắt.
- Các hoá chất, dung dịch sau xét nghiệm được thu hồi vào bình chứa chất thải lỏng có dán nhãn nguy hiểm sinh học, các chất thải rắn sau xét nghiệm được phân loại theo Quy trình xử lý và phân loại chất thải.
- Tuân thủ các nội quy, quy định và hướng dẫn thuộc An toàn Sinh học.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Bước 1. Nhận bệnh phẩm và xử lý mẫu: kiểm tra thông tin trên mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm).

Xử lý mẫu: Quy trình trải qua hai bước ly tâm

+ Ly tâm lần 1 (1600g, thu nhận huyết tương lần 1 trong tube 1,5mL).

+ Ly tâm lần 2 (12000g, thu nhận huyết tương lần 2 trong tube 1,5mL, bỏ cặn ly tâm).

4.1.2 Bước 2. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất (nếu có).

Chuẩn bị đầu tip vô trùng (đã hấp khử trùng và sấy khô, hoặc dùng tip vô trùng đóng gói sẵn).

Pha các hóa chất quy trình trong tủ an toàn sinh học cấp 2 hoặc phòng sạch dùng cho pha hóa chất.

4.1.3 Bước 3. Đánh giá QC.

Mẫu plasma sau khi ly tâm cần QC tình trạng tiêu máu, và có thể cần thu mẫu lại nếu cần thiết.

4.1.4 Bước 4. Tiến hành kỹ thuật (Các bước thực hiện kỹ thuật).

- Tách chiết cfDNA từ mẫu plasma theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu cfDNA vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

- Chuẩn bị thư viện trên mẫu cfDNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.
- Phản ứng lai bắt giữ gen mục tiêu theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit
- Định lượng thư viện cfDNA bằng huỳnh quang (Qubit, Quantifluor) và chuẩn hóa (normalize) nồng độ thư viện tất cả các mẫu trước khi giải trình tự.
- Giải trình tự trên mẫu thư viện đã chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất:
 - + Các mẫu thư viện được gộp chung (pooling) và được biến tính (denatured).
 - + Thư viện sau đó được pha loãng về nồng độ trước khi nạp vào cartridge
 - + Quá trình giải trình tự trải qua 2 bước chính: tạo cụm (clustering) và giải trình tự (sequencing).
 - + Đánh giá các thông số chất lượng giải trình tự.
 - + Phân tích dữ liệu giải trình tự.

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả: kết quả được xuất tự động bằng phần mềm phân tích kết quả.
- Kết quả âm tính: Không phát hiện các biến thể gây bệnh/có khả năng gây bệnh trên các gen được khảo sát.
- Kết quả dương tính: Phát hiện các biến thể gây bệnh/có khả năng gây bệnh trên mẫu cfDNA/ctDNA.
- Đối với những mẫu có kết quả bất thường: nếu mẫu không đạt được các tiêu chuẩn của quy trình xét nghiệm sẽ được tiến hành lập lại để tìm ra nguyên nhân.
- Trị số bình thường: khi mẫu đạt được tất cả các tiêu chuẩn của bước thu mẫu, tách chiết cfDNA, tạo thư viện và giải trình tự.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót:

- Không đủ hoá chất sử dụng.
- Hoá chất hết hạn
- Máy móc thiết bị hư hỏng.

Xử trí:

- Theo dõi chặt chẽ chất lượng thuốc thử, HTKT (đóng gói, hạn dùng, pha chế, bảo quản, thời gian tối ưu cho việc sử dụng...).
- Giám sát kỹ công tác bảo dưỡng định kỳ máy móc, đặc biệt các thiết bị ảnh hưởng trực tiếp phương pháp đo quang như bóng đèn, kính lọc...

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót:

- Người làm thí nghiệm không nắm quy trình dẫn đến ảnh hưởng kết quả của lô mẫu.

Xử trí

- Đào tạo nhân sự liên tục.
- Kiểm tra chặt chẽ thao tác của người làm xét nghiệm trong từng bước thực hiện quy trình.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót:

- Kết quả không đạt QC;
- Mẫu có kết quả bất thường;
- Nhiễm chéo DNA giữa các mẫu.

Xử lý:

- Kiểm tra lại lô thuốc thử, máy móc;
- Kiểm tra lại quy trình thực hiện của lô mẫu;
- Kiểm tra lại tay nghề của nhân viên.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen X, Gole J, Gore A, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun.* Jul 21 2020;11(1):3475. doi:10.1038/s41467-020-17316-z
2. Clarke CA, Hubbell E, Ofman JJ. Multi-cancer early detection: A new paradigm for reducing cancer-specific and all-cause mortality. *Cancer Cell.* Apr 12 2021;39(4):447-448. doi:10.1016/j.ccell.2021.02.004
3. Cristiano S, Leal A, Phallen J, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* Jun 2019;570(7761):385-389. doi:10.1038/s41586-019-1272-6
4. Nguyen THH, Lu YT, Le VH,, Tran LS, et al. Clinical validation of a ctDNA-Based Assay for Multi-Cancer Detection: An Interim Report from a Vietnamese Longitudinal Prospective Cohort Study of 2795 Participants. *Cancer Invest.* 2023 Feb 6:1-17. doi: 10.1080/07357907.2023.2173773. Epub ahead of print. PMID: 36719061.
5. Doan PL, Nguyen DA, Le QT, Giang H, Phan MD, et al. Detection of maternal carriers of common α -thalassemia deletions from cell-free DNA. *Sci Rep.* 2022 Aug 9;12(1):13581. doi: 10.1038/s41598-022-17718-7. PMID: 35945425; PMCID: PMC9363435.

15. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN GÂY BỆNH ALPHA VÀ BETA THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT LAI DNA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể gen khác nhau của bệnh alpha và beta thalassemia bằng kỹ thuật lai DNA để phục vụ chẩn đoán và tư vấn cho người bệnh và thành viên gia đình người bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật lai DNA ngược trong đó các đầu dò đặc hiệu với nhiều đột biến hay đa hình của một gen sẽ được gắn trên thanh lai và lai với gen đã được khuếch đại. Đầu dò được cố định trên thanh lai là một đoạn oligo có ái lực mạnh và đặc hiệu với trình tự gen mục tiêu. Chiều dài của chúng phù hợp cho phản ứng lai, giúp phân biệt DNA với những sai khác rất nhỏ trong trình tự. Sản phẩm sau PCR được lai với probe trên màng, các thể lai có thể được phát hiện bằng phản ứng với một cơ chất để tạo thành kết tủa có màu. Xét nghiệm sử dụng các thanh teststrip với các vị trí đã được gắn đầu dò phát hiện các đột biến gen của cả bệnh alpha và beta thalassemia để xác định được kiểu gen đồng hợp hoặc dị hợp tử của các đột biến.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Hóa chất cho phản ứng PCR gen alpha và beta thalassemia	
Hóa chất cho phản ứng lai DNA	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	
Agarose	

Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bể ổn nhiệt;
- Bộ lưu điện;
- Máy điện di;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down.
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μL đến 1000 μL
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đánh giá nồng độ DNA với bước sóng 260nm và độ tinh sạch với bước sóng 260/280nm

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Khi trương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.
- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.1.5. Lai DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng hiển thị trên thanh teststrip. Nhận biết đột biến ở các vị trí vạch trên thanh theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

▪ Các vạch trên thanh strip không đặc hiệu	▪ Lưu ý thực hiện các bước rửa đầy đủ theo quy trình, kiểm soát số lượng mẫu đủ để các mẫu được thực hiện đồng thời
--	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Puehringer, Helene, et al. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common α -thalassemia point mutations and deletions. 2007: 605-610.
2. Winichagoon P, Kumpan P, Holmes P et al. Validation of the immunochromatographic strip for α -thalassemia screening: A multicenter study. Translational Research. 2015; 165(6):689-95.
3. Soliman OE, Yahia S, Shouma A et al. Reverse hybridization StripAssay detection of β -thalassemia mutations. Hematology. 2010;15(3):182-6.
4. Munkongdee T, Chen P, Winichagoon P et al. Update in laboratory diagnosis of thalassemia. Frontiers in molecular biosciences. 2020;7:74.
5. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T et al. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2018;57(2):165-74.

16. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ CÒN BỆNH TỒN DƯ TỐI THIỂU (MRD) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT RQ-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tỷ lệ phần trăm tế bào ung thư tồn dư trong mẫu máu ngoại vi của người bệnh để đánh giá nguy cơ tái phát và hỗ trợ điều trị ngăn ngừa tái phát bệnh.

1.2. Nguyên lý

Sử dụng phương pháp Real-time-PCR định lượng mRNA của gen ung thư nhằm mục đích dự đoán thời điểm bệnh tái phát để ngăn chặn trước khi tái phát. Dựa trên sự kiểm soát lượng huỳnh quang tiêu tốn trong phản ứng có thể xác định số lượng mRNA của gen ung thư tại thời điểm đó. Đồng thời trong phản ứng định lượng cùng lúc 2 gen: gen ung thư cần theo dõi và gen tham chiếu (housekeeping gen - là gen có tốc độ biểu hiện như nhau ở cả tế bào ung thư và tế bào lành) sẽ cho phép đánh giá mức độ hoạt động của gen ung thư so với gen tham chiếu ở cùng một thời điểm trong toàn bộ quá trình theo dõi thông qua tỷ lệ số lượng mRNA của gen ung thư/số lượng mRNA gen tham chiếu. Tỷ lệ mRNA của gen ung thư tăng dần là dấu hiệu gen ung thư bắt đầu hoạt động trở lại.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết RNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit định lượng gen	

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy realtime-PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;

- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản mẫu ở 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 72 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA từ máu toàn phần

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2 Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng real-time PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA/RNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA/RNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy real-time PCR, chọn chương trình tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả theo các dữ thu được bằng cách tính toán tỷ lệ mRNA gen ung thư/ RNA gen tham chiếu, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Thao tác pipet không chính xác.	Sử dụng pipet theo đúng thể tích qui định.
Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.	- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất - Thực hiện đúng, đủ các bước trong qui trình xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Tuân thủ theo hướng dẫn đi kèm bộ kit sử dụng. Về cơ bản xét nghiệm được đánh giá đạt chất lượng để đưa vào phân tích kết quả khi:

- Mẫu đối chứng nước (Negative control - NC): không có tín hiệu khuếch đại ở các kênh huỳnh quang sử dụng.

- Mẫu đối chứng dương (Positive control - PC): có tín hiệu khuếch đại của gen đích ở kênh huỳnh quang đặc hiệu gen đích.

- Tín hiệu nội kiểm của tất cả các mẫu lên đúng chu kỳ ngưỡng (Ct) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baccarani M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, Blood. 2013;122:872-884;

2. Marin D, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors, J Clin Oncol. 2012;30:232-238;

3. Hanfstein B, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML), Leukemia. 2012;26:2096-2102;

4. Hughes TP, et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib, Blood. 2014;123:1353-1360;

5. Hehlmann R, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV, J Clin Oncol. 2014;32(5):415-423;

6. Hughes TP, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS), Blood. 2010;116:3758-3765;

7. Cortes J, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate, Clin Cancer Res. 2005;11(9):3425-3432.

17. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) THEO ĐỒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT RQ-PCR HOẶC DIGITAL-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tỷ lệ % tế bào ung thư tồn dư của người bệnh trên mỗi dòng tế bào (dòng T và dòng tủy) để đánh giá nguy cơ tái phát và hỗ trợ điều trị ngăn ngừa tái phát bệnh.

1.2. Nguyên lý

Sử dụng các hạt từ gắn kháng nguyên đặc hiệu với mỗi dòng tế bào (tế bào lympho T có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu là CD3 do vậy dùng hạt từ có kháng thể CD3; tế bào tủy có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu là CD33 thì dùng hạt từ có kháng thể CD33) kết hợp với phương pháp tách tế bào bằng phương pháp từ tính để tách riêng được các tế bào tế bào T và tế bào tủy. Tiếp đến các tế bào T và tủy được sử dụng là các tế bào đích để thực hiện định lượng mRNA gen ung thư bằng phương pháp Real-time-PCR. Nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR là dựa trên sự kiểm soát lượng huỳnh quang tiêu tốn trong phản ứng để xác định số lượng mRNA của gen ung thư. Đồng thời trong phản ứng real-time PCR định lượng cùng lúc 2 gen: gen ung thư cần theo dõi và gen tham chiếu (housekeeping gen - là gen có tốc độ biểu hiện như nhau ở cả tế bào ung thư và tế bào lành) sẽ cho phép đánh giá mức độ hoạt động của gen ung thư so với gen tham chiếu ở cùng một thời điểm trong toàn bộ quá trình theo dõi thông qua tỷ lệ số lượng mRNA của gen ung thư/số lượng mRNA gen tham chiếu. Tỷ lệ mRNA của gen ung thư tăng dần là dấu hiệu gen ung thư bắt đầu hoạt động trở lại.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết RNA	
Kit đo nồng độ DNA	

Hóa chất tách dòng tế bào	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit định lượng gen	

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy realtime-PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Máy tách tế bào tự động;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách dòng tế bào

Từ mẫu bệnh phẩm, thực hiện tách dòng tế bào lympho hoặc tế bào tủy hoặc dòng tế bào khác bằng hạt từ gắn kháng thể kháng CD đặc hiệu cho từng dòng tế bào. Thực hiện trên máy tách tế bào tự động hoặc tách trên cột từ theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

4.1.2 Tách chiết DNA từ dòng tế bào

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.4. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng real-time PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bỏ sung DNA/RNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA/RNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy real-time PCR, chọn chương trình tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả theo các dữ thu được bằng cách tính toán tỷ lệ mRNA gen ung thư/ RNA gen tham chiếu, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Thao tác pipet không chính xác.	Sử dụng pipet theo đúng thể tích qui định.
Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.	- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất - Thực hiện đúng, đủ các bước trong qui trình xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Tuân thủ theo hướng dẫn đi kèm bộ kit sử dụng. Về cơ bản xét nghiệm được đánh giá đạt chất lượng để đưa vào phân tích kết quả khi:

- Mẫu đối chứng nước (Negative control - NC): không có tín hiệu khuếch đại ở các kênh huỳnh quang sử dụng.

- Mẫu đối chứng dương (Positive control - PC): có tín hiệu khuếch đại của gen đích ở kênh huỳnh quang đặc hiệu gen đích.

- Tín hiệu nội kiểm của tất cả các mẫu lên đúng chu kỳ ngưỡng (Ct) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baccarani M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, *Blood*. 2013;122:872-884;
2. Marin D, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors, *J Clin Oncol*. 2012;30:232-238;
3. Hanfstein B, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML), *Leukemia*. 2012;26:2096-2102;
4. Hughes TP, et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib, *Blood*. 2014;123:1353-1360;
5. Hehlmann R, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV, *J Clin Oncol*. 2014;32(5):415-423;
6. Hughes TP, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS), *Blood*. 2010;116:3758-3765;
7. Cortes J, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate, *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3425-3432.

18. XÉT NGHIỆM BIỂU HIỆN GEN BẰNG KỸ THUẬT MICROARRAY (GEP)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phân tích định lượng mRNA được phiên mã từ các gen đã biết và chưa biết để hiểu rõ hơn về chức năng phối hợp của các gen trong việc điều hòa chức năng của tế bào, từ đó làm căn cứ phân giải các biến thể gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm biểu hiện gen bằng kỹ thuật microarray là xét nghiệm định lượng mRNA cho mỗi gen có thể phát hiện dựa trên phản ứng lai của mRNA với một bề mặt chứa mật độ cao của các mẫu dò DNA cố định, mỗi mẫu dò tương ứng với một gen cụ thể. Một tập hợp hàng chục nghìn gen tương ứng với biểu hiện mRNA có thể phân tích cùng một lúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống microfuge 1,5 mL không có nuclease;
- Thanh khuấy từ (x2);
- Đĩa khuấy từ (x2);
- Micropipet;
- Đĩa nhuộm slide có giá đỡ (x3);
- Kẹp sạch;
- khay đựng đá lạnh;
- Găng tay không bột;
- Bình trữ tiệt trùng;
- Đồng hồ bấm giờ;
- Đầu tip có màng lọc;
- Hộp đựng slide tránh Nitơ;
- Bộ kit tách chiết RNA (tùy chọn);
- Bộ kit Low Input Quick Amp Labeling;

- Bộ kit RNA Spike-In;
- Bộ kit lai biểu hiện gen;
- Bộ kit Gene Expression Wash Buffer;
- Bộ kit RNeasy Mini Kit;
- Ethanol (95- 100% dùng cho sinh học phân tử);
- Isopropyl alcohol (dùng cho sinh học phân tử);
- Nước cất DNase/RNase-free;
- Nước siêu sạch Milli-Q.

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống tủ lai microarray;
- Buồng lai bằng thép không gỉ;
- Đệm dùng cho lai hoá slide - loại đóng gói 8-cái;
- Lồng sắt quay cho máy ủ slide;
- Máy ủ slide Microarray-Agilent thiết lập nhiệt độ tại 65°C;
- Máy vortex;
- Máy realtime- PCR;
- Máy quét microarray;
- Bể nước tuần hoàn hoặc block nhiệt. Cho tách chiết DNA, thiết lập tại 37°C, 40°C, 60°C, 65°C, 70°C và 80°C;
- Máy ly tâm;
- Máy đo quang phổ NanoDrop;
- Phần mềm phân tích dữ liệu;

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Mẫu có thể là bất kỳ tế bào/mô nào. Thông thường, 2 loại mẫu được thu thập, tức là các tế bào khỏe mạnh và bị bệnh, để so sánh và thu được kết quả.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 72 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Di truyền - Sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Quá trình tách chiết RNA từ mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng cột hoặc dung môi như phenol-chloroform.

- mRNA được tách từ RNA để lại rRNA và tRNA.

- Vì mRNA có đuôi poly-A nên các hạt cột có đuôi poly-T được sử dụng để giữ mRNA.

- Sau khi tách, dung dịch đậm được sử dụng để tráng cột nhằm tách mRNA khỏi các hạt.

- Kết quả chính xác phụ thuộc vào chất lượng và trọng lượng của mẫu yêu cầu từ 10 ng đến 200 ng.

Lưu ý: Việc tách chiết RNA yêu cầu thực hiện các biện pháp phòng ngừa để giảm thiểu nhiễm nuclease bằng cách luôn đeo găng tay, xử lý mặt bàn, pipet và sử dụng các sản phẩm thương mại không chứa RNase.

- Định lượng và kiểm tra chất lượng RNA sau tách bằng phương pháp đo quang phổ và máy phân tích sinh học.

Phiên mã ngược và đánh dấu cDNA

- Phiên mã ngược mRNA để tạo ra cDNA ổn định hơn.

- Khuếch đại cDNA bằng phản ứng PCR.

- Sau đó, cả hai mẫu được gắn với các thuốc nhuộm huỳnh quang khác nhau (dCTP hoặc dUTP được đánh dấu Cy3 và Cy5) bằng cách phiên mã ngược với mỗi oligo (dT) để tạo ra các chuỗi cDNA huỳnh quang cho phép phân biệt loại mẫu của các cDNA.

Lai

- Các cDNA đã đánh dấu từ cả hai mẫu được đặt trên phiên kính DNA microarray cho phép lai từng cDNA với chuỗi bổ sung của nó bằng cách ủ qua

đem, màu huỳnh quang trên mẫu bệnh phẩm thường có màu khác biệt với các mẫu dò.

Rửa sau lai

- Các mẫu sau lai huỳnh quang được rửa kỹ để loại bỏ các cDNA không ghép cặp đặc hiệu.

- Cường độ huỳnh quang tại mỗi điểm trên phiến kính phản ánh khả năng tương thích giữa đầu dò và các phân tử mục tiêu và là một phép đo định lượng tương ứng với mức độ biểu hiện của gen cụ thể.

- Việc sử dụng hai mẫu mRNA được đánh dấu khác nhau cho phép so sánh định lượng biểu hiện gen trong một cặp mẫu.

Thu dữ liệu và phân tích kết quả

- Máy quét microarray được sử dụng để ghi lại các tín hiệu huỳnh quang một cách định lượng.

- Máy quét chứa tia laser, máy tính và máy ảnh. Tia laser chịu trách nhiệm kích thích huỳnh quang của cDNA, tạo ra tín hiệu được phát hiện bởi máy quét. Máy ảnh ghi lại các hình ảnh được tạo ra tại thời điểm laser quét. Hình ảnh kỹ thuật số sau đó được xử lý thêm bằng phần mềm chuyên dụng để chuyển đổi hình ảnh của từng điểm thành giá trị số.

- Chỉ nên quét mỗi microarray một lần, vì mỗi lần quét tiếp theo làm giảm cường độ huỳnh quang đi 10-20%, do sự phân rã của fluorophore.

- Sau đó, máy tính lưu trữ dữ liệu và đưa ra kết quả ngay lập tức. Cường độ riêng biệt của màu sắc cho mỗi điểm xác định đặc tính của gen trong điểm cụ thể đó.

- Phân tích kết quả thực hiện bởi phần mềm Affymetrix

4.2. Nhận định kết quả

Sau khi hoàn tất quét slide trên hệ thống Agilent SureScan, phần mềm CytoGenomics sẽ tự động xuất kết quả bao gồm cả báo cáo QC và sai số.

Phần mềm sẽ đưa ra mức độ biểu hiện mRNA của các gen quan tâm được khảo sát. Việc phân tích và phân loại mức độ biểu hiện dựa vào phần mềm đi kèm, các nguồn dữ liệu như Decipher, Clinvar, OMIM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật: Sai sót thông tin mẫu và chỉ định xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Mẫu RNA đầu vào độ tinh sạch và nồng độ thấp.
- Xử trí:
 - + Tránh nhiễm hoá chất bởi nuclease, luôn đeo găng tay không có bột và sử dụng các dung dịch và pipet chuyên dụng không chứa nuclease.
 - + Duy trì khu vực làm việc sạch sẽ.
 - + Khi chuẩn bị dung dịch hoá chất gốc đông lạnh để sử dụng: (1) Rã đông phần dung dịch càng nhanh càng tốt mà không hạ nhiệt độ phòng; (2) Trộn nhanh trên máy vortex, sau đó quay trong máy ly tâm trong 5 đến 10 giây để đẩy các chất bên trong ra khỏi thành và nắp; (3) Bảo quản trên đá hoặc trong khô lạnh cho đến khi sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

Nhận định, phân tích kết quả chưa phù hợp với đặc điểm lâm sàng của người bệnh, cần đối chiếu, kiểm tra lại.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Types, Applications, and Their Future. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;101(1):22.1.1-22.1.11. doi:10.1002/0471142727.MB2201S101
2. Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska-Wolny J, Kimmel M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct*. 2015;10(1). doi:10.1186/S13062-015-0077-2
3. Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol, Version 6.9.1, December 2015

19. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỘC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định % tế bào người cho ở người bệnh sau ghép bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA để điều chỉnh thuốc ức chế miễn dịch, đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép và đánh giá nguy cơ thải ghép cho người bệnh sau điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản để xác định tỷ lệ mọc mảnh ghép là sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại và định lượng các đa hình hệ gen STR đặc trưng cho mỗi cá thể; kết hợp với kỹ thuật điện di mao quản để phân biệt và nhận diện các đa hình STR. Thông qua việc xác định và định lượng các STR đặc trưng của người cho sẽ cho biết được % tế bào người cho trong cơ thể người nhận. Các đa hình đặc trưng có ý nghĩa (informative) cho người hiến và người bệnh ghép được sử dụng để theo dõi dọc các ca ghép.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit định danh cá thể	
Các dung dịch đệm chạy máy	
Thang chuẩn	
Polymer	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu ;
- Hệ thống máy điện di mao quản;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL;
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt và tấm khăn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 72 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.2 Tách chiết DNA từ máu toàn phần

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên hệ thống điện di mao quản

- Chuẩn bị máy:
 - + Bật máy trước 1 giờ;
 - + Cài đặt sơ đồ mẫu.
- Biên tính mẫu: thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.
- Nhỏ mẫu vào plate theo đúng vị trí đã cài đặt trên máy.
- Đặt đĩa vào khay chạy mẫu và đặt khay vào đúng vị trí trên hệ thống điện di.

- Chọn chương trình phù hợp và bấm “Start Run” để bắt đầu chương trình chạy

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả xác định chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận trước ghép tế bào gốc tạo máu và kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép tế bào gốc tạo máu được tính toán trên phần mềm chuyên dụng. - Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%) của tế bào người cho trên tổng số tế bào phân tích.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Nhập và khai báo thông tin trong phần mềm sai, lựa chọn sai phương pháp phân tích	▪ Nhập đúng thông tin người cho và người nhận khi khai báo trên phần mềm ▪ Lựa chọn phương pháp phân tích theo đúng đặc điểm cặp ghép (1 người cho hoặc 2 người cho).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Khi sử dụng marker STRs: Kết quả xét nghiệm chỉ được chấp nhận khi chỉ số Size quality $\geq 0,75$ và chỉ số Genotype quality $\geq 0,75$.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T Lion (2003).Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. Leukemia, 2003 Jan;17(1):252-4

2. E SchramL, H Daxberger, F Watzinger, T Lion. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. Leukemia, 2003 Jan;17(1):254-7

3. Y Chalandon 1, S Vischer, C Helg, B Chapuis, E Roosnek. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. 2003 Jan;17(1):228-31.

4. C Acquaviva , M Duval, D Mirebeau, R Bertin, H Cavé. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris-Robert Debré experience. Leukemia, 2003 Jan;17(1):241-6

20. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỘC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định % tế bào người cho ở người bệnh sau ghép tế bào gốc tạo máu trên mỗi dòng tế bào (T và tủy) bằng kỹ thuật phân tích đoạn DNA để theo dõi hiệu quả điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc, từ đó điều chỉnh thuốc ức chế miễn dịch, đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép và đánh giá nguy cơ thải ghép cho người bệnh sau điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc tạo máu.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản để xác định tỷ lệ mọc mảnh ghép là sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại và định lượng các đa hình hệ gen STR đặc trưng cho mỗi cá thể; kết hợp với kỹ thuật điện di mao quản để phân biệt và nhận diện các đa hình STR. Thông qua việc xác định và định lượng các STR đặc trưng của người cho sẽ cho biết được % tế bào người cho trong cơ thể người nhận. Các đa hình đặc trưng có ý nghĩa (informative) cho người hiến và người bệnh ghép được sử dụng để theo dõi dọc các ca ghép.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit định danh theo chỉ thị di truyền DNA	
Hóa chất tách dòng tế bào	
Dung dịch đệm chạy máy	
Thang chuẩn	
Polymer	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Hệ thống máy điện di mao quản;
- Máy tách tế bào tự động;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm.
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách dòng tế bào

Tách tế bào dòng T hoặc dòng tủy, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm sử dụng.

4.1.2 Tách chiết DNA từ dòng tế bào

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.4. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp môi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%

- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng khỏi máy luân nhiệt.

Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.5. Điện di trên hệ thống mao quản

- Chuẩn bị máy điện di:
 - + Bật máy trước 1 giờ.
 - + Cài đặt sơ đồ mẫu.
- Biến tính mẫu: thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.
- Nhỏ mẫu vào plate theo đúng vị trí đã cài đặt trên máy.
- Đặt plate vào khay chạy mẫu và đặt khay vào đúng vị trí trên hệ thống điện di mao quản.
- Chọn chương trình phù hợp và bấm “Start Run” để bắt đầu chương trình chạy.

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả xác định chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận trước ghép tế bào gốc tạo máu và kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép tế bào gốc tạo máu được tính toán trên phần mềm chuyên dụng.
- Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%) của tế bào người cho trên tổng số tế bào phân tích.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Nhập và khai báo thông tin trong phần mềm sai, lựa chọn sai phương pháp phân tích	▪ Nhập đúng thông tin người cho và người nhận khi khai báo trên phần mềm ▪ Lựa chọn phương pháp phân tích theo đúng đặc điểm cặp ghép (1 người cho hoặc 2 người cho).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T Lion (2003).Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. Leukemia, 2003 Jan;17(1):252-4.

2. E SchramL, H Daxberger, F Watzinger, T Lion. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. Leukemia, 2003 Jan;17(1):254-7.

3. Y Chalandon 1, S Vischer, C Helg, B Chapuis, E Roosnek. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. 2003 Jan;17(1):228-31.

4. C Acquaviva , M Duval, D Mirebeau, R Bertin, H Cavé. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris-Robert Debré experience. Leukemia, 2003 Jan;17(1):241-6.

21. XÉT NGHIỆM CHỈ THỊ STR CẶP GHÉP BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự khác biệt về chỉ thị STR giữa người cho tế bào gốc và người nhận để lựa chọn các STR có giá trị thông tin (là các STR chỉ có ở người cho mà không có ở người bệnh). Các STR khác biệt ở người cho so với người nhận được sử dụng để theo dõi tình trạng mọc mảnh ghép.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật phân tích đoạn DNA trên điện di mao quản để xác định chỉ thị STR của cặp ghép là sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại các đa hình hệ gen STR đặc trưng cho mỗi cá thể; sau đó sản phẩm PCR được điện di mao quản để phân biệt và nhận diện các đa hình STR, từ đó xác định các STR khác nhau giữa người cho và người nhận. Các STR khác biệt được sử dụng để theo dõi cho người bệnh sau ghép.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit định danh theo chỉ thị di truyền DNA	
Hóa chất tách dòng tế bào	
Dung dịch đệm chạy máy	
Thang chuẩn	
Polymer	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Hệ thống máy điện di mao quản;

- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn ;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1µL đến 1000µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm.
- Bồn rửa mắt và tấm khăn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách chiết DNA

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên hệ thống điện di mao quản

- Chuẩn bị máy điện di:

- + Bật máy trước 1 giờ.

- + Cài đặt sơ đồ mẫu.

- Biến tính mẫu: thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

- Nhỏ mẫu vào plate theo đúng vị trí đã cài đặt trên máy.
- Đặt đĩa vào khay chạy mẫu và đặt khay vào đúng vị trí trên hệ thống điện di.
- Chọn chương trình phù hợp và bấm “Start Run” để bắt đầu chương trình chạy.

4.2. Nhận định kết quả

Sau khi phân tích với phần mềm chuyên dụng, các chỉ thị phân tử khác biệt (informative) giữa người cho và người nhận trước ghép được sử dụng để theo dõi ca ghép.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Nhập và khai báo thông tin trong phần mềm sai, lựa chọn sai phương pháp phân tích	▪ Nhập đúng thông tin người cho và người nhận khi khai báo trên phần mềm

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Khi sử dụng marker STRs: Kết quả xét nghiệm chỉ được chấp nhận khi chỉ số Size quality $\geq 0,75$ và chỉ số Genotype quality $\geq 0,75$.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T Lion (2003).Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. Leukemia, 2003 Jan;17(1):252-4.

2. E SchramL, H Daxberger, F Watzinger, T Lion. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification

of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. *Leukemia*, 2003 Jan;17(1):254-7.

3. Y Chalandon 1, S Vischer, C Helg, B Chapuis, E Roosnek. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. 2003 Jan;17(1):228-31.

22. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR HOẶC REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen thai nhi bằng phương pháp không xâm lấn, thông qua DNA lưu hành tự do trong máu mẹ (cfDNA), sử dụng kỹ thuật digital-PCR hoặc realtime-PCR

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- cfDNA (Cell free DNA) là những đoạn DNA ngắn được giải phóng và lưu hành trong máu mẹ. Những đoạn DNA này là nguồn vật liệu di truyền của thai nhi và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm các biến thể di truyền ở thai nhi.

- Kỹ thuật digital-PCR là một biến thể của kỹ thuật realtime-PCR. Kỹ thuật này không chỉ tăng cường độ nhạy của xét nghiệm mà còn có thể định lượng (bằng phương pháp đếm tuyệt đối - absolute quantification).

- Kỹ thuật realtime-PCR là biến thể của kỹ thuật PCR, trong đó ngoài cặp mồi đặc hiệu, đầu dò huỳnh quang gắn với sản phẩm tạo ra từ quá trình PCR sẽ tăng độ nhạy phát hiện và kết quả được theo dõi ở thời gian thực.

- Kết hợp cfDNA với phương pháp digital-PCR và realtime-PCR được ứng dụng để sàng lọc, chẩn đoán trước sinh không xâm lấn nhằm phát hiện sớm các biến thể di truyền ở thai nhi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết cfDNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy digital-PCR và thiết bị đi kèm;
- Máy realtime-PCR và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là 10mL máu ngoại vi lấy vào ống chống đông (ống EDTA K2/K3, ống Streck, hoặc ống thu cfDNA). Yêu cầu mẫu không bị vỡ hồng cầu
- Mẫu máu đạt chất lượng ổn định khi lưu trữ 1-2 tuần ở điều kiện 6 - 35°C với ống Streck hoặc ống thu cfDNA.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý mẫu

- Chuẩn bị 2 ống 1,5 mL thường và 2 ống 1,5 mL cho mỗi mẫu, ghi mã mẫu lên thân và nắp ống.
- Ly tâm ống máu ở 1.600g, 8 °C trong 10 phút nếu thu bằng ống EDTA hoặc trong 15 phút nếu thu bằng ống Streck, CwBio.
- Hút 1500 µL phần huyết tương vào các ống 1,5 mL thường có kí hiệu tương ứng.
- Ly tâm lần 2 các ống huyết tương ở 16.000 g, 8 °C trong 10 phút.
- Hút 1000 µL huyết tương phía trên sang các ống 1,5 mL có ghi kí hiệu tương ứng.
- Lưu trữ mẫu huyết tương (-18°C – -25 °C) trong phòng tách chiết DNA cho đến khi sử dụng.

4.1.2. Tách chiết cfDNA

- Chuẩn bị đủ số ống 1,5mL thường mới tương ứng với số mẫu cần tách chiết. Ghi mã mẫu lên nắp và thân của từng ống.
- Xử lý mẫu với Proteinase K (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
- Hút 300 µL huyết tương mỗi mẫu vào ống đã chuẩn bị ở trên.
- Thêm 550 µL dung dịch Lysis Buffer (có sẵn trong bộ kit) vào mỗi ống và vortex .
- Ủ các ống ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Trong quá trình ủ, trộn kỹ 3 lần bằng cách đảo chiều.
- Ly tâm nhanh và đặt ống lên giá từ trong 5 phút.
- Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.

- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 700 μ L Wash Buffer 1 (có sẵn trong bộ kit) vào từng ống. Vortex và spin nhanh.
- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.
- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm vào 700 μ L Wash Buffer 2 đã chuẩn bị vào từng ống. Vortex và spin nhanh.
- Đặt lên giá từ trong 1 phút. Hút bỏ phần dịch nổi phía trên.
- Lặp lại bước rửa với Wash Buffer 2 thêm một lần nữa.
- Ly tâm nhanh và đặt các ống lên giá từ. Cẩn thận loại bỏ phần dịch nổi phía trên.
- Mở nắp và giữ ống trên giá từ. Để khô ở nhiệt độ phòng trong 12 phút.
- Lấy ống ra khỏi giá từ, thêm 45 μ L Elution Buffer và trộn đều.
- Ủ ống ở nhiệt độ phòng 10 phút.
- Spin và đặt ống lên giá từ trong 3 phút.
- Chuẩn bị ống 1,5 mL low binding, ghi kí hiệu cfDNA cũng mã mẫu và ngày tách lên nắp và thành ống.
- Hút dung dịch DNA phía trên vào ống 1,5mL có kí hiệu mã mẫu tương ứng.
- Ghi lại thông tin các mẫu vào hồ sơ tách chiết cfDNA.
- Mẫu cfDNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.3. Thực hiện phản ứng digital PCR

- Lấy môi và đầu dò trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.
- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng ddPCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.
- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các giếng trong đĩa ddPCR. Trộn đều từng giếng bằng pipet, tránh tạo bọt.
- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.1.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy mỗi và đầu dò trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.
- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng realtime-PCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.
- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các ống PCR.
- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Guo, Y., Charoenkwan, P., Traisrisilp, K., Piyamongkol, W., & Tongprasert, F. (2025). Application of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT). *Biomolecules*, 15(3), 360.
2. Sillence, K. A., et al. (2015). Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping: Comparison with real-time PCR. *Clinical Chemistry*, 61(11), 1399-1407.
3. Kim, S.Y., Lee, S.M., Kim, S.M. et al. Novel method of real-time PCR-based screening for common fetal trisomies. *BMC Med Genomics* 14, 195 (2021).
4. Li YQ, Tan GJ, Zhou YQ. Digital PCR and its applications in noninvasive prenatal testing. *Brief Funct Genomics*. 2022 Sep 16;21(5):376-386.

23. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen thông qua DNA ung thư lưu hành tự do trong máu bằng kỹ thuật digital-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật tách chiết, phân lập DNA ung thư lưu hành tự do trong máu (ctDNA- circulating tumor DNA) và kỹ thuật digital-PCR.

- ctDNA là những đoạn DNA ngắn được giải phóng từ tế bào u và lưu hành trong máu. Những đoạn DNA này là nguồn vật liệu di truyền của tế bào ung thư và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm sự xuất hiện của tế bào ung thư hoặc biến thể của DNA ung thư.

- Kỹ thuật digital-PCR là một biến thể của kỹ thuật realtime-PCR. Kỹ thuật này không chỉ tăng cường độ nhạy của xét nghiệm mà còn có thể định lượng (bằng phương pháp đếm tuyệt đối - absolute quantification).

- Kết hợp kỹ thuật tách chiết ctDNA với phương pháp digital-PCR được ứng dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm các biến thể di truyền gen ung thư ở tần suất thấp.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết ctDNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000 μ L vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μ L;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy digital-PCR và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi lấy vào ống chống đông (ống EDTA K2/K3, ống Streck, hoặc ống thu cfDNA). Yêu cầu mẫu không bị vỡ hồng cầu
- Mẫu máu đạt chất lượng ổn định khi lưu trữ 1-2 tuần ở điều kiện 6 - 35°C với ống Streck hoặc ống thu cfDNA.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý mẫu

- Chuẩn bị 2 ống 1,5 mL thường và 2 ống 1,5 mL cho mỗi mẫu, ghi mã mẫu lên thân và nắp ống.

- Ly tâm ống máu ở 1600g, 8°C trong 10 phút nếu thu bằng ống EDTA hoặc trong 15 phút nếu thu bằng ống Streck.

- Hút 1500 µL phần huyết tương vào các ống 1,5 mL thường có kí hiệu tương ứng.

- Ly tâm lần 2 các ống huyết tương ở 1600g, 8°C trong 10 phút.

- Hút 1000 µL huyết tương phía trên sang các ống 1,5 mL có ghi kí hiệu tương ứng.

- Lưu trữ mẫu huyết tương (-18°C đến -25°C) trong phòng tách chiết DNA cho đến khi sử dụng.

4.1.2. Tách chiết ctDNA

- Chuẩn bị đủ số ống 1,5 mL thường mới tương ứng với số mẫu cần tách chiết. Ghi mã mẫu lên nắp và thân của từng ống.

- Thực hiện quy trình tách theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Ghi lại thông tin các mẫu vào hồ sơ tách chiết ctDNA.

- Mẫu ctDNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24 giờ và lưu trữ lâu hơn ở -20°C.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy môi và đầu dò trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.

- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng ddPCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.

- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các giếng trong đĩa ddPCR.
- Trộn đều từng giếng bằng pipet, tránh tạo bọt.
- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li, X., et al. (2018). Evaluation of digital PCR for detecting low-level EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma patients: a cross-platform comparison study. *Oncotarget*.
2. Sánchez-Martín V, et al. Comparative study of droplet-digital PCR and absolute Q digital PCR for ctDNA detection in early-stage breast cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2024 Jan 1;552:117673.

24. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen thông qua DNA khối u lưu hành tự do trong máu hoặc huyết tương bằng kỹ thuật real-time PCR

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật tách chiết, phân lập DNA ung thư lưu hành tự do trong máu (ctDNA - circulating tumor DNA) và kỹ thuật real-time PCR.

- ctDNA là những đoạn DNA ngắn được giải phóng từ tế bào u và lưu hành trong máu. Những đoạn DNA này là nguồn vật liệu di truyền của tế bào ung thư và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm sự xuất hiện của tế bào ung thư hoặc biến thể của DNA ung thư.

- Kỹ thuật realtime-PCR là một biến thể của kỹ thuật PCR. Kỹ thuật này không chỉ tăng cường độ nhạy của xét nghiệm bằng việc gắn đầu dò phát hiện bằng tín hiệu huỳnh quang mà còn quan sát được quá trình PCR theo thời gian thực.

- Kết hợp kỹ thuật tách chiết ctDNA với phương pháp realtime-PCR được ứng dụng để sàng lọc, chẩn đoán sớm các biến thể di truyền gen ung thư ở tần suất thấp.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube)
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);

- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μ L
- Đồng hồ hẹn giờ
- Máy realtime-PCR và thiết bị đi kèm

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết ctDNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi lấy vào ống chống đông (ống EDTA K2/K3, ống Streck, hoặc ống thu ctDNA). Yêu cầu mẫu không bị vỡ hồng cầu
- Mẫu máu đạt chất lượng ổn định khi lưu trữ 1-2 tuần ở điều kiện 6 - 35oC với ống Streck hoặc ống thu ctDNA.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý mẫu

- Chuẩn bị 2 ống 1,5 mL thường và 2 ống 1,5 mL cho mỗi mẫu, ghi mã mẫu lên thân và nắp ống.

- Ly tâm ống máu ở 1.600g, 8 °C trong 10 phút nếu thu bằng ống EDTA hoặc trong 15 phút nếu thu bằng ống Streck.

- Hút 1500 µL phần huyết tương vào các ống 1,5 mL thường có kí hiệu tương ứng.

- Ly tâm lần 2 các ống huyết tương ở 16.000 g, 8 °C trong 10 phút.

- Hút 1000 µL huyết tương phía trên sang các ống 1,5 mL có ghi kí hiệu tương ứng.

- Lưu trữ mẫu huyết tương (-18°C – -25oC) trong phòng tách chiết DNA cho đến khi sử dụng.

4.1.2. Tách chiết ctDNA

- Chuẩn bị đủ số ống 1,5 mL thường mới tương ứng với số mẫu cần tách chiết. Ghi mã mẫu lên nắp và thân của từng ống.

- Thực hiện quy trình tách theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Ghi lại thông tin các mẫu vào hồ sơ tách chiết ctDNA.

- Mẫu ctDNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.2. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng realtime-PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng realtime-PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy realtime-PCR, chọn chương trình tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC), chứng dương, chứng âm trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/ so sánh liên phòng (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xiang, J., Wan, Q., & Xie, L. (2022). Detection of ctDNA SNPs by nested real-time Taqman qPCR: a simulation study. Human Cell, 35, 2022-2025.

2. Elazezy & Joosse (2020). “Real-time molecular monitoring in acute myeloid leukemia with circulating tumor DNA” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

Wiley review (2023): “Emerging ctDNA detection strategies in clinical theranostics”.

25. XÉT NGHIỆM ĐỘ MẤT ỔN ĐỊNH VI VỆ TINH (MSI) BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm có mục đích nhằm để đánh giá độ mất ổn định vi vệ tinh (MSI), đó là hậu quả của sự thiếu hụt hệ thống sửa chữa bắt cặp sai DNA (MMR). Sự thiếu hụt hệ thống sửa chữa bắt cặp sai có thể phát triển từ đột biến dòng mầm di truyền ở một gen MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*). Xét nghiệm có ý nghĩa trong chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật PCR/ Real-time PCR là dựa vào sự khuếch đại đặc hiệu của enzyme Taq Polymerase trên cơ sở sự bắt cặp chính xác của primer vào DNA trong mẫu và các dNTP tự do và sự phát quang của các probe huỳnh quang và tự đó bộ phận ghi nhận tín hiệu sẽ ghi nhận được tín hiệu phát ra từ các probe này. Việc khuếch đại này dựa trên sự khác nhau của nhiệt độ phản ứng và những biến đổi của các thành phần. Kỹ thuật Real time PCR sẽ được đọc bằng máy Real-time PCR. Máy real time PCR là một thiết bị gồm 2 phần cơ bản đó là phần nhiệt và phần quang và được điều khiển bằng một phần mềm chuyên biệt cho máy. Mất ổn định vi vệ tinh (MSI), biểu hiện bởi tăng chiều dài đoạn vi vệ tinh, hậu quả của sự suy giảm chức năng hệ thống sửa lỗi ghép cặp DNA (DNA MMR). Khi những sai sót trong quá trình tái bản không được phát hiện và sửa chữa, các sai sót này dần tích lũy, bên cạnh nguy cơ hình thành nên các đột biến, các sai sót không được sửa chữa ở chuỗi lặp vùng vi vệ tinh cũng dần tích lũy, dẫn đến kéo dài đoạn vi vệ tinh (MSI).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;

- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Tip có lọc 1-200 μ L;
- Tip có lọc 100-1000 μ L;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Cồn chuyên dụng cho sinh học phân tử;
- Xylene;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Kit phát hiện độ mất ổn định vi vệ tinh (MSI);
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 0,1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 200 - 1000 μ l;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Tủ an toàn sinh học;
- Máy Real-time PCR;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Máy nhuộm HE;

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE), mẫu mô, mẫu máu, dịch cơ thể...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ các thông tin như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán....

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng 12 đến 18 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm độ mất ổn định vi vệ tinh (MSI) bằng kỹ thuật Real-time PCR.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc.
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA:

- Quy trình tách chiết để thu được DNA tinh sạch theo Kit tách DNA.
- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng bộ kit chuyên dụng.
- Lấy các mẫu DNA tách chuẩn bị cho xét nghiệm độ mất ổn định vi vệ tinh (MSI) bằng kỹ thuật Real-time PCR.

4.4. Thực hiện kỹ thuật Real-time PCR

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.
- Trộn lẫn các thành phần sau vào ống PCR 0,2 mL: Buffer, dNTPs, MgCl₂ (nếu trong Buffer chưa có), hỗn hợp mồi (gồm các cặp mồi phát hiện đột biến được trộn theo tỷ lệ nhất định), enzym Taq polymerase, nước khử ion vô trùng, DNA khuôn.
- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn; Đặt vào máy PCR; Chọn chương trình; Bấm start để máy chạy.
- Phân tích kết quả:
 - + Kết quả từ quá trình Real-time PCR được phân tích tùy theo mục đích sử dụng và dựa theo hướng dẫn phân tích của từng bộ kit xét nghiệm.
 - + Trong quá trình phân tích kết quả, trước hết cần kiểm tra chứng dương, chứng âm, IC. Sau đó, tiến hành phân tích mẫu nếu chứng dương, chứng âm và IC đạt yêu cầu.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
 - + Thực hiện lấy lại mẫu.
 - + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng.
 - + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
 - + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
 - + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
 - + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.

- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Thibodeau S, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science. 1993; 260 (5109):816-819.
4. Dietmaier W, Hofstädter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. Lab Invest 2001;81(10):1453-6.

26. XÉT NGHIỆM QUAN HỆ HUYẾT THỐNG BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐOẠN DNA TRÊN ĐIỆN DI MAO QUẢN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xác định các mối quan hệ huyết thống trực hệ: cha - con, mẹ - con (đối với các trường hợp khác như xác định quan hệ huyết thống theo dòng cha trên nhiễm sắc thể Y, xác định quan hệ trên nhiễm sắc thể X, xin tham khảo hướng dẫn).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm quan hệ huyết thống bằng kỹ thuật phân đoạn DNA trên điện di mao quản là xét nghiệm so sánh các chỉ thị DNA đặc biệt là các đoạn lặp lại ngắn (STR- short tandem repeat) trong các cá thể được xét nghiệm để xác định các cá thể người tham gia xét nghiệm có quan hệ huyết thống hay không. Xét nghiệm dựa trên cơ sở con cái được thừa hưởng các đặc tính di truyền từ bố mẹ thông qua 23 NST từ tinh trùng của bố và 23 NST từ tế bào trứng của mẹ. Khi các STR xuất hiện ở con mà không xuất hiện ở bố và/ hoặc mẹ chứng tỏ nguồn gốc STR của con không có từ bố và/ hoặc mẹ.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Hóa chất sinh phẩm: Nước deion, Cồn tinh khiết 100 độ (Ethanol 100%), Chelex®100, Bộ hoá chất tách chiết DNA, Bộ hoá chất chạy PCR (nhân bội 24 locus STR trở lên), Các hoá chất sử dụng cho máy điện di mao quản, Các hoá chất phụ trợ khác.

- Các loại đầu pipet;
- Các loại ống ly tâm;
- Pipet các loại;
- Hộp đựng ống ly tâm;
- Hộp đựng đầu pipet;
- Giá chuyên dụng cho các loại ống ly tâm;

- Khẩu trang;
- Găng tay;
- Giấy lau;
- Các vật tư tiêu hao khác.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ly tâm;
- Máy spin down;
- Máy ủ mẫu;
- Máy PCR; Real-time PCR;
- Hệ thống điện di mao quản;
- Tủ an toàn sinh học;
- Hệ thống điện di mao quản;
- Tủ an toàn sinh học;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy điện di;
- Tủ lạnh âm sâu;
- Tủ lạnh thường;
- Máy hấp dụng cụ;
- Máy sấy dụng cụ;
- Các thiết bị phụ trợ khác.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Tiêu chuẩn mẫu xét nghiệm:

- Mẫu phẩm là mẫu có nguồn gốc sinh học.
- Loại mẫu phẩm đảm bảo không được nhiễm mẫu phẩm của người không được lấy mẫu.
- Mẫu phẩm không chứa các loại hoá chất, phụ gia ảnh hưởng tới chất lượng DNA.

Dụng cụ thu mẫu:

- Tăm bông thu mẫu chuyên dụng.
- Thẻ thu mẫu chuyên dụng.
- Ống chứa mẫu.
- Ống chứa máu chống đông.

(Có thể sử dụng một trong các dụng cụ thu mẫu nêu trên phù hợp với từng loại mẫu phẩm)

Bảo quản mẫu xét nghiệm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm;

- Mẫu khô: Mẫu được làm khô hoàn toàn, bảo quản trong túi đựng mẫu, có bổ sung chất hút ẩm và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm từ 1-10 ngày sau khi lấy mẫu.

- Mẫu tươi (mẫu máu lấy trong ống chống đông, mẫu mô tươi...): Bảo quản ở 2 - 8°C. Thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm 1-2 ngày sau khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Đơn yêu cầu xét nghiệm.
- Bản kết quả xét nghiệm.
- Hồ sơ số liệu gen.
- Các giấy tờ liên quan khác (nếu có)

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Bảo đảm phòng thí nghiệm phải an toàn cho mẫu xét nghiệm tránh nhiễm DNA ngoại lai vào mẫu cần:

Chia các khu vực riêng biệt cho từng khâu xét nghiệm cụ thể như sau:

- Khu nhận mẫu và trả kết quả xét nghiệm.
- Khu xử lý, tách chiết DNA.
- Khu thao tác PCR.
- Khu điện di.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Bước 1. Nhận mẫu bệnh phẩm

Kiểm tra thông tin trên mẫu xét nghiệm, đối chiếu với phiếu xét nghiệm.

4.1.2. Bước 2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất (nếu có)

4.1.3. Bước 3. Đánh giá QC

- Máy móc trang thiết bị được hiệu chuẩn/ kiểm chuẩn 1 lần/năm.

- Hoá chất được bảo quản theo đúng quy định của nhà sản xuất, còn hạn sử dụng và kiểm tra chất lượng định kỳ.

4.1.4. Bước 4. Tiến hành kỹ thuật

- Xử lý mẫu.
- Tách chiết.
- Định lượng DNA (nếu cần).
- Khuếch đại DNA (PCR).
- Điện di mao quản.
- Đọc và nhận định kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Lập hồ sơ DNA của người có mẫu xét nghiệm.
 - So sánh hồ sơ DNA giữa những người được yêu cầu xét nghiệm tìm mối quan hệ huyết thống theo nguyên tắc:

1. Có quan hệ huyết thống bố/ mẹ - con: phải có sự cho - nhận alen ở tất cả những locus được phân tích.

2. Không có quan hệ huyết thống bố/ mẹ - con: không cho nhận alen từ 3 locus STR trở lên.

3. Ngoài ra còn trường hợp không có sự cho nhận alen tại 1 hoặc 2 locus STR thì có khả năng đột biến hoặc nguyên nhân khác cần phải làm thêm phương pháp bổ trợ:

+ Thực hiện lại quy trình xét nghiệm (để loại trừ sai khác trên không phải lỗi do kỹ thuật xét nghiệm).

+ Phân tích bổ sung một số STR trên NST giới tính Y (nếu là bố - con trai), X (bố - con gái hoặc mẹ - con).

+ Dựa vào kết quả xét nghiệm bổ trợ, người giám định viên có thể đưa ra kết luận cuối cùng.

- Tính độ tin cậy của kết quả xét nghiệm

+ Sử dụng bảng phân bố tần suất alen các STR trong quần thể người Việt Nam.

+ Tính tỷ suất tương đồng (Likelihood ratio - LR) của từng locus gen tuân theo Định luật Bayes.

- Tính tỷ suất tương đồng kết hợp (Combined Paternity Index - CPI) bằng tích LR của các locus và xác suất có quan hệ huyết. Dựa vào giá trị PI để xác định độ tin cậy của kết luận có quan hệ huyết thống giữa hai hồ sơ DNA.

+ Nếu $CPI > 1000$, có sự cho và nhận alen ở tất cả các locus STR: xác suất có quan hệ huyết thống cha - con/mẹ - con giữa 2 hồ sơ DNA là trên 99,99%.

+ $CPI = 0$ nghĩa là không có sự cho nhận alen giữa 2 hồ sơ DNA, kết luận là loại trừ (không có quan hệ huyết thống).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Xác định mẫu của đúng người cần xét nghiệm.
- Kiểm tra chất lượng và quy cách bảo quản mẫu (Nếu nhận mẫu từ người yêu cầu xét nghiệm).
- Ký hiệu mẫu trùng khớp hoàn toàn với thông tin người được lấy mẫu.
- Xác định đúng mối quan hệ của từng đối tượng cần xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Ký hiệu đúng mẫu cần xét nghiệm.
- Sử dụng đúng loại hoá chất, nồng độ và quy trình phù hợp với từng loại mẫu xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tuân thủ đúng nguyên tắc an toàn trong phòng xét nghiệm để tránh tình trạng nhiễm DNA ngoại lai vào mẫu được xét nghiệm.
- Hóa chất, vật tư sử dụng trong xét nghiệm phải đảm bảo không nhiễm DNA.

- DNA đầu vào cho phản ứng khuếch đại DNA (PCR) cần đảm bảo nồng độ phù hợp yêu cầu của từng bộ hoá chất theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Phân tích và đọc dữ liệu DNA: Dữ liệu DNA sau khi phân tích mỗi alen cần có tín hiệu (peak) trên 100 RFU (Các trường hợp dưới 100 RFU thì do nghiên cứu viên/giám định viên trực tiếp nhận định kết quả kết luận).

- So sánh các dữ liệu DNA: Cần so sánh dữ liệu của người có đúng ký hiệu cần tìm mối quan hệ huyết thống

- Kết luận: Dựa vào nhận định và so sánh kết quả kết luận đúng mối quan hệ và cần tính độ tin cậy.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm chất lượng: mẫu nội kiểm bao gồm

- + Chứng dương: Nguồn DNA đầu vào là DNA control theo bộ kit hoá chất PCR, kết quả sau điện di mao quản thể hiện có tín hiệu peak phù hợp theo hướng dẫn nhà sản xuất hoặc theo quy định của phòng xét nghiệm.

- + Chứng âm: không có tín hiệu peak.

- Yêu cầu ngoại kiểm/ so sánh liên phòng: để đảm bảo chất lượng các phòng thí nghiệm nên tham gia chương trình ngoại kiểm thường xuyên của các tổ chức uy tín. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc) (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med*. 2014;370(9):799-808.

2. Genetic Disorders and the Fetus. Aubrey Milunsky and Jeff Milunsky. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Seventh edition. 2002

3. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2016;18(10):1056-1065.

4. Lynn B. Jorde et al. Medical genetics, fifth edition, 2020, ISBN

5. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev AnalChem (Palo Alto Calif)*. 2013

6. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1589-1597.

7. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 4th ed. New York: Garland Science; 2010

27. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI (Pre-PGT-M) (XÉT NGHIỆM TIỀN LÂM SÀNG DI TRUYỀN TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PRE-PGT-M))

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm này nhằm mục đích chuẩn bị cho xét nghiệm các rối loạn di truyền đơn gen trên phôi, tức là trước khi thực hiện kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen (PGT-M).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm tiền lâm sàng di truyền trước làm tổ, Pre- Preimplantation Genetic Testing (Pre-PGT-M) hay còn gọi là PCR - Set up là tập hợp các kỹ thuật di truyền phân tử chuyên sâu được thực hiện nhằm thiết lập quy trình trên mẫu máu hoặc mẫu mô của các thành viên gia đình có nguyện vọng PGT-M với các điều kiện gần giống như tiến hành trên mẫu phôi trước khi xác định những bất thường về gen của phôi được tạo ra trong quá trình làm thụ tinh ống nghiệm.

Tiền lâm sàng xét nghiệm di truyền trước làm tổ dựa trên hai nhóm phương pháp là phương pháp phát hiện trực tiếp đột biến và phương pháp gián tiếp phát hiện đột biến. Phương pháp phát hiện trực tiếp cho các đột biến điểm thường dùng là giải trình tự Sanger. Phương pháp di truyền liên kết dựa trên sự di truyền cùng nhau giữa gen gây bệnh và các marker di truyền liên kết với chúng trong các gia đình có người bị bệnh. Từ đó, thay vì phát hiện trực tiếp gen gây bệnh, hoàn toàn có thể chẩn đoán đối tượng mang gen bệnh thông qua sự có mặt hay vắng mặt của các marker di truyền liên kết gen gây bệnh. Các marker di truyền thường được sử dụng cho phương pháp này thường dùng là các trình tự lặp lại ngắn, bởi chúng xuất hiện rải rác trên toàn bộ gen và chứa vùng trình tự DNA giống nhau nhưng được lặp với số lần khác nhau giữa những cá thể khác nhau.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo. Pre-PGT-M cũng được thực hiện theo cách thức tương tự.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit tách DNA tổng số (tùy hãng).
- Bộ kit khuếch đại toàn bộ hệ gen phù hợp cho PGT-M (tùy hãng).
- Bột agarose.
- Thuốc nhuộm DNA: Ethidium bromide hoặc tương đương.
- TBE 0,5X.
- Thang DNA (100bp).
- PCR- MasterMix.
- Các môi khuếch đại đoạn gen chứa biến thể cần giải trình tự để xác định.
- Các môi huỳnh quang khuếch đại STR (tùy từng gen, trung bình 4- 6 cặp).
- Nước khử ion.
- Dung dịch Hi-Di.
- Exo SAP- IT hoặc tương đương.
- Bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit hoặc tương đương.
- Standard Genescan LIZ500 hoặc tương đương.
- Ống li tâm đáy nhọn thể tích 1,5 - 2mL.
- Đầu côn các loại: 10µL, 100µL, 1000µL.
- PCR tube.
- Plate PCR 96 giếng.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc.
- Máy Vortex.
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL.
- Máy đo độ tinh sạch.
- Máy spin down.
- Máy Speedvac.

- Bộ dụng cụ pipette: micropipette 2, 10, 100 và 1000 μL .
- Buồng thao tác PCR.
- Máy PCR.
- Máy điện di DNA.
- Máy soi và chụp ảnh gel.
- Máy điện di mao quản (ABI-3130(xL), ABI-3500 (xL), SeqStudio Genetic Analyzer) hoặc tương đương.
- Phần mềm phân tích kết quả (Genemapper ID, Bioedit sequence alignment editor hoặc tương đương có tính năng phân tích trình tự gen và phân tích kích thước đoạn).

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu máu của các thành viên trong gia đình (có thể lấy mẫu cuống rốn còn lưu với mẫu bệnh), hướng dẫn gia đình phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu.
- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu máu hoặc cuống rốn, mô khác còn lưu.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Hộp lấy mẫu bao gồm kim lấy mẫu chân không, ống chân không có chất chống đông EDTA.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 72 giờ.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): máu được lấy vào ống chân không đủ từ 2-3 mL. Có thể tách DNA ngay hoặc bảo quản bảo quản ở -20°C để dùng lâu dài.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về các thành viên trong gia đình: họ tên, tuổi, mối quan hệ họ hàng, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm.
- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

4.4.1. Bước 1

Các mẫu máu sau khi được rửa bằng dung dịch đệm PBS 1-2 lần, DNA được giải phóng khỏi tế bào. Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen với mẫu tế bào bạch cầu.

Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất. (Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của Quy trình này).

4.4.2. Bước 2

-Khuếch đại các đoạn STR và đoạn trình tự gen chứa đột biến.

Dựa vào thông số của cặp mồi thiết kế nhằm khuếch đại đoạn STR và đoạn gen chứa đột biến để xác định nhiệt độ gắn mồi. Nhiệt độ gắn mồi (Ta °C) có thể ước lượng thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của cặp mồi từ 3-5°C. Việc xác định nhiệt độ gắn mồi cũng có thể xác định chính xác bằng cách tiến hành phản ứng Gradient-PCR trong dải nhiệt độ nhất định.

Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng khuếch đại được minh họa ở bảng sau:

Tỷ lệ, thành phần		Chu trình nhiệt		
Thành phần	Thể tích (μL)	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Mastermix 2X	6,25	95°C	5 phút	1 chu kỳ
Nước deion	2,75	95°C	30 giây	30 chu kỳ
Mồi F	0,5	Ta°C	30 giây	
Mồi R	0,5	72°C	45 giây	
DNA mẫu	2,5	72°C	10 phút	1 chu kỳ
Tổng	12,5	4°C	∞	

Ghi chú: Tỷ lệ thành phần và chu trình nhiệt được thay đổi tùy theo từng gen và từng vị trí đột biến.

-Tiến hành điện di agarose, nhuộm và đánh giá.

+ Chạy điện di sản phẩm PCR trên agarose 2%, thời gian 30 phút với hiệu điện thế 200V và cường độ dòng điện là 100mA.

+ Nhuộm bản gel sau khi chạy điện di trong dung dịch EtBr 10 μg/mL hoặc RedSafe trong 10 phút, rửa bản gel sau khi nhuộm bằng nước cất, chụp ảnh gel bằng máy chụp gel.

+ Phản ứng khuếch đại đoạn gen chứa đột biến thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp mồi đã thiết kế, không có băng phụ thì có thể tiến hành giải trình tự.

+ Phản ứng khuếch đại STR thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp mồi đã thiết kế.

4.4.3. Bước 3

- Giải trình tự Sanger bằng bộ kit Bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

- Trong phần này sẽ trình bày quy trình giải trình tự Sanger bằng bộ kit Bộ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Thermo fisher scientific.

- Tinh sạch sản phẩm khuếch đại.

- Tinh sạch sản phẩm bằng Exo SAP- IT nhằm loại bỏ các đoạn môi dư thừa và các nucleotide chưa hợp nhất bằng enzym. Thành phần và chu trình tinh sạch được thực hiện như sau:

Tỷ lệ, thành phần		Chu trình nhiệt		
Thành phần	Thể tích (μL)	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Sản phẩm DNA	5,0	37°C	4 phút	1 chu kỳ
Exo SAP- IT	2,0	80°C	1 phút	1 chu kỳ
		4°C	∞	

- Phản ứng PCR Sanger sequencing:

+ Tùy vị trí đột biến trong đoạn gen khuếch đại để tiến hành giải trình tự Sanger môi xuôi hay môi ngược hay cả hai.

+ Thành phần và chu trình nhiệt chạy phản ứng PCR Sanger sequencing như sau:

Tỷ lệ, thành phần	
Thành phần	Thể tích (μL)
Big Dye Buffer 1X	1,5
Big Dye Terminator v3.1 2,5X	1,0
Nước deion	6,25
Môi F hoặc R	0,5
Sản phẩm DNA	0,5
Tổng	10,0

Chu trình nhiệt		
Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
96°C	1 phút	1 chu kỳ
96°C	10 giây	25 chu kỳ
50°C	5 phút	
60°C	4 phút	
4°C	∞	

-Tinh sạch sản phẩm sau phản ứng PCR Sanger sequencing bằng một trong hai phương pháp sau:

Phương pháp 1: Tinh sạch bằng BigDye XTerminator™.

Lưu ý: Sử dụng ống chứa dung dịch dùng một lần và micro pipet P200 8 kênh nếu có, để tạo thuận lợi cho quá trình làm sạch. Sử dụng đầu tip pipet có lỗ rộng khi bơm dung dịch BigDye Xterminator™. Nếu sử dụng Máy phân tích DNA 3730, có thể sử dụng kỹ thuật hàn nhiệt tiêu chuẩn. Để làm sạch BigDye XTerminator™ hiệu quả, cần giữ các nguyên liệu được trộn đều, giữ thuốc thử trên đá giữa các bước.

Quy trình này mô tả việc thực hiện tinh sạch trên đĩa 96 giếng với màng dính trong suốt MicroAmp™.

+ Lắc lọ BigDye XTerminator™ bead trong 8 đến 10 giây trước khi trộn với dung dịch SAM.

+ Chuẩn bị dung dịch xử lý SAM/BigDye XTerminator™ bead theo tỷ lệ pha như sau:

Phản ứng tinh sạch sản phẩm PCR Sanger sequencing

Thành phần	Thể tích phản ứng 10µl
SAM	45
BigDye XTerminator™ bead	10
Tổng	55

+ Chia đều thể tích hỗn hợp (dung dịch hạt BigDye XTerminator™ và dung dịch SAM) cho từng mẫu. Trộn đều, bơm dung dịch lên xuống 3-4 lần trước mỗi lần chuyển. Trộn lại dung dịch sau mỗi bước phân phối.

+ Dán đĩa 96 giếng bằng màng dính trong suốt MicroAmp™.

+ Lắc đĩa 96 giếng trong 20 phút ở tốc độ 1.800 vòng/phút (đối với Digital VortexGenie™ 2).

+ Trong máy ly tâm xô lắc, ly tâm đĩa 96 giếng ở tốc độ 1.000xg trong 2 phút.

Dán kín đĩa bằng màng dính trong suốt MicroAmp™ và bảo quản ở 4°C trước khi điện di mao quản hoặc ở -20°C cho đến khi sử dụng (tối đa 10 ngày).

Đĩa BigDye XTerminator™ có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng lên đến 48 giờ bao gồm thời gian trên thiết bị giải trình tự.

Phương pháp 2: Tinh sạch bằng phương pháp rửa EtOH/EDTA:

+ Thêm vào toàn bộ sản phẩm 2 μL EDTA 0,125M và 30 μL ethanol 100°. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút.

+ Gạn bỏ dịch nổi phía trên, đem làm khô bằng speedvac ở 60°C trong 10 phút.

+ Sau khi khô hoàn toàn, thêm 10 μL nước khử ion và vortex đều.

- Điện di mao quản

- Thêm vào mỗi ống 30 μL dung dịch Hi-di và đem đi biến tính tại nhiệt độ 95°C trong 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C.

- Sau biến tính, mẫu trên được sử dụng cho điện di mao quản bằng máy điện di mao quản.

- Trình tự nucleotide của mỗi đoạn gen sau khi giải trình tự được xác định cả 2 chiều (xuôi và ngược) bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor.

4.4.4. Phân tích di truyền liên kết

- Biến tính sản phẩm DNA và điện di mao quản

Sản phẩm PCR được trộn cùng dung dịch chứa Hi-Di và Standard GeneScan (tuỳ hãng khuyến cáo), sau đó đem biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C. Có thể tiến hành điện di mao quản cùng lúc nhiều STR của cùng một mẫu trong cùng một ống phản ứng với điều kiện kích thước các STR phải khác nhau (nếu cùng được gắn nhãn một màu huỳnh quang) hoặc các STR được gắn nhãn các màu huỳnh quang khác nhau.

Thành phần phản ứng biến tính DNA trước khi điện di mao quản:

Thành phần	Thể tích
Hi-Di	Biến đổi
Standard GeneScan	0,25-0,5 μL
DNA Mẫu	1,0 μL
Tổng	12,0 μL

Sau biến tính, sản phẩm được tra lần lượt trên các giếng của plate 96 wells và cài đặt chương trình Fragment Analysis và chạy điện di mao quản.

- Phân tích kết quả trên phần mềm GeneMapper

Sau khi điện di mao quản, kết quả được phân tích bằng phần mềm GeneMapper. Mỗi peak sản phẩm đại diện cho mỗi alen được khuếch đại, có kích thước được xác định nhờ so sánh với thang chuẩn Standard GeneScan.

Lập bảng dữ liệu thống kê kích thước sản phẩm khuếch đại (các alen) trên các locus STR của các cá nhân thuộc cùng một gia đình từ đó so sánh và đánh giá sự di truyền liên kết của các STR với gen gây bệnh.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Kết quả giải trình tự Sanger

Tùy vào từng loại đột biến, đối chiếu trình tự gen tham chiếu để xác định kết quả tại vị trí xảy ra đột biến đã biết:

- Tại vị trí đột biến chỉ xuất hiện một màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu ở trạng thái đồng hợp tử đột biến hoặc đồng hợp tử wildtype.
- Tại vị trí đột biến xuất hiện hai màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu ở trạng thái dị hợp tử (Mang gen đột biến).
- Trường hợp kiểu gen bệnh là dị hợp tử phức, phải phân tích tại từng vị trí đột biến.

4.2.2. Kết quả phân tích di truyền liên kết

Dựa trên phả hệ đã lập và kết quả chẩn đoán xác định bệnh bằng phương pháp khác trên các thành viên gia đình để tìm ra các alen liên kết với gen gây bệnh của từng STR, từ đó xác định kiểu gen đơn bội (haplotype) hoặc kiểu gen lưỡng bội (diplotype). Tùy thuộc vào kiểu cách di truyền của từng loại gen bệnh để xác định kiểu gen bị bệnh, kiểu gen người lành mang gen bệnh hay kiểu gen không mang đột biến để kết luận.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Kết luận kết quả đủ điều kiện tiến hành bước tiếp theo PGT-M hay không.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Giao nhận nhầm mẫu.
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm cẩn thận.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác:

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.

- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai:

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.
- Xử trí: Đảm bảo nghiêm ngặt, khử nhiễm. Phản ứng khuếch đại gen cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Không đủ dữ liệu phân tích kết quả.
- Xử trí: Cần cân trọng phân tích trong các trường hợp, trường hợp không kết luận được, phải chạy lại hoặc bổ sung các trình tự lặp lại gắn liền tiếp hoặc hoặc các đa hình nucleotide đơn liên kết với gen bệnh đến khi phân biệt được kiểu gen.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi 2 người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba.

- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc) (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dorado G., Gálvez S., Rosales T. E., Vásquez V. F., Hernández P. (2021). Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing-Review. *Biomolecules*, 11(8), 1111.

2. Xu C. M., Lu S. J., Chen S. C., Zhang J. L., Xu C. J., Gao Y., Huang H. F. (2023). Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. *Reproductive and Developmental Medicine*, 7(01), 3-11.

3. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Thermo fisher scientific.

Phụ lục 1

Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L).
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer: 1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở - 20 °C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94 °C trong 30 giây; 65 °C trong 5 phút); duy trì 4 °C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

28. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH DI TRUYỀN LIÊN KẾT

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen bằng kỹ thuật phân tích liên kết nhằm xác định kiểu gen của phôi thông qua mối liên kết với gen bệnh, mục đích để chọn các phôi không bị bệnh di truyền đơn gen.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Xét nghiệm di truyền trước làm tổ - Preimplantation Genetic Testing (PGT) là tập hợp các kỹ thuật di truyền phân tử chuyên sâu thực hiện nhằm xác định những bất thường về di truyền của phôi được tạo ra trong quá trình làm thụ tinh ống nghiệm.

- Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen (PGT-M) là một loại xét nghiệm di truyền nhằm phát hiện các đột biến di truyền đơn gen trên phôi, qua đó ngăn ngừa sự di truyền các bệnh đơn gen này từ cha mẹ sang con cái. Do đó, xét nghiệm này sẽ giúp kiểm tra bộ gen của phôi từ giai đoạn rất sớm, từ đó xác định các bất thường trên một gen cụ thể. Phân tích di truyền liên kết sử dụng STR (Short Tandem Repeats) là phân tích trình tự lặp lại ngắn liên kết với biến thể gen.

- Phương pháp di truyền liên kết dựa trên sự di truyền cùng nhau giữa gen gây bệnh và các marker di truyền liên kết với chúng trong các gia đình có người bị bệnh. Từ đó, thay vì phát hiện trực tiếp gen gây bệnh, hoàn toàn có thể xác định đối tượng mang gen bệnh thông qua sự có mặt hay vắng mặt của các marker di truyền liên kết gen gây bệnh. Các marker di truyền thường được sử dụng cho phương pháp này là các trình tự lặp lại ngắn, bởi chúng xuất hiện rải rác trên toàn bộ gen kèm theo tính đa hình di truyền cao do chứa vùng trình tự DNA giống nhau nhưng được lặp với số lần khác nhau giữa những cá thể khác nhau.

- Theo khuyến cáo của Hiệp hội di truyền sinh sản quốc tế (The International Society of Reproductive Genetics - ISRG) năm 2023, các STR cần được chọn sao cho khoảng cách từ chúng đến vị trí của gen cần khảo sát

càng gần càng tốt (tốt nhất là dưới 1 Mb). Ngoài ra cũng nên lựa chọn được càng nhiều STR càng tốt. Ít nhất là 3 STR, trong đó, ít nhất 1 STR trước gen đích, 1 STR sau gen đích.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit tách DNA tổng số (tùy hãng);
- Bộ kit nhân bản toàn bộ hệ gen phù hợp cho PGT-M (tùy hãng);
- Bột agarose;
- Ethidium bromide hoặc tương đương;
- TBE 0.5X;
- Thang DNA (100bp);
- Mastermix, bảo quản -20°C;
- Các môi huỳnh quang khuếch đại STR;
- Nước khử ion;
- Dung dịch Hi-Di;
- Standard Genescane;
- Ống li tâm đáy nhọn dung tích 1,5 -2 mL;
- Đầu côn các loại: 10 µL, 100 µL, 1000 µL;
- PCR tube;
- Plate PCR 96 wells.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL;
- Máy đo độ tinh sạch;
- Máy spin down;
- Máy Speedvac;

- Bộ dụng cụ pipette: micropipette 2, 10, 100 và 1000 μ L, pipet 8 kênh nếu có;

- Buồng thao tác PCR;
- Máy PCR;
- Máy điện di;
- Máy soi và chụp ảnh gel;
- Máy điện di mao quản (ABI-3130(XL), ABI-3500 (XL), SeqStudio

Genetic Analyzer, hoặc tương đương;

- Phần mềm phân tích kết quả (Genemapper ID).

5.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-M bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi. Chú ý, trước khi tiến hành trên mẫu phôi sinh thiết, một quy trình tiền lâm sàng PGT-M đã được chuẩn bị trước.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi sinh thiết từ lá nuôi.

- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào lá nuôi (phôi ngày 5) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi thu vào ống chỉ là 2,5 μ L.

- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24giờ.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ L. Ống đựng tế bào phôi sinh thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng, đáy ở dưới, nắp ở trên. Mẫu được lấy theo Quy trình hướng dẫn lấy mẫu tại labo IVF.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước tiến hành

4.4.1. Bước 1

Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất. (Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của Quy trình này).

4.4.2. Bước 2

- Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu ngoại vi các thành viên trong gia đình theo quy trình của bộ kit tách chiết DNA hoặc mẫu DNA đã được tách chiết từ trước khi tiến hành Pre-PGT-M.

- Các mẫu DNA thu được được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

4.4.3. Bước 3

- Khuếch đại các đoạn STR.
- Các trình tự chứa STR được khuếch đại dựa trên Quy trình xét nghiệm tiền lâm sàng di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen đã được thiết lập.
- Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng khuếch đại được minh họa ở bảng sau:

Tỷ lệ, thành phần		Chu trình nhiệt		
Thành phần	Thể tích (μL)	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Mastermix 2X	6,25	95°C	5 phút	1 chu kỳ
Nước deion	2,75	95°C	30 giây	30 chu kỳ
Môi F	0,5	Ta°C	30 giây	
Môi R	0,5	72°C	45 giây	
DNA mẫu	2,5	72°C	10 phút	1 chu kỳ
Tổng	12,5	4°C	∞	

Tiến hành điện di agarose, nhuộm và đánh giá

- Chạy điện di sản phẩm PCR trên agarose 2%, thời gian 30 phút với hiệu điện thế 200V và cường độ dòng điện là 100mA.
- Nhuộm bản gel sau khi chạy điện di trong dung dịch EtBr 10 μg/mL trong 10 phút, rửa bản gel sau khi nhuộm bằng nước cất, chụp ảnh gel bằng máy chụp gel.
- Phản ứng khuếch đại thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp môi đã thiết kế.

4.4.4. Bước 4

- Phân tích di truyền liên kết.
- Biến tính sản phẩm DNA và điện di mao quản.
- Sản phẩm PCR được trộn cùng dung dịch chứa Hi-Di và Standard GeneScan (tuỳ hãng máy khuyến cáo), sau đó đem biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C. Có thể tiến hành điện di mao quản cùng lúc nhiều STR của cùng một mẫu trong cùng một ống phản ứng với điều kiện kích thước các STR phải khác nhau (nếu cùng được gắn nhãn một màu huỳnh quang) hoặc các STR được gắn nhãn các màu huỳnh quang khác nhau.
- Thành phần phản ứng biến tính DNA trước khi điện di mao quản:

Thành phần	Thể tích
Hi-Di	Biến đổi
Standard GeneScan	0,25-0,5 μ L
DNA Mẫu	1,0 μ L
Tổng	12,0 μ L

- Sau biến tính, sản phẩm được tra lần lượt trên các giếng của plate 96 wells và cài đặt chương trình Fragment Analysis và chạy điện di mao quản.

- Phân tích kết quả trên phần mềm GeneMapper

+ Sau khi điện di mao quản, kết quả được phân tích bằng phần mềm GeneMapper. Mỗi peak sản phẩm đại diện cho mỗi alen được khuếch đại, có kích thước được xác định nhờ so sánh với thang chuẩn Standard GeneScan.

+ Lập bảng dữ liệu thống kê kích thước sản phẩm khuếch đại (các alen) trên các locus STR của các cá nhân thuộc cùng một gia đình và phôi từ đó so sánh và đánh giá sự di truyền liên kết của các STR với gen gây bệnh.

4.2. Nhận định kết quả

Dựa trên phả hệ đã lập, dựa trên kết quả tìm ra các alen liên kết với gen gây bệnh của từng STR (trong quy trình tiền lâm sàng PGT-M đã được chuẩn bị trước) và kết quả phân tích trên các phôi xác định kiểu gen đơn bội (haplotype) hoặc kiểu gen lưỡng bội (diplotype). Tùy thuộc vào kiểu cách di truyền của từng loại gen bệnh để xác định kiểu gen của phôi: bị bệnh, lành mang gen bệnh hay kiểu gen không mang đột biến để kết luận và đưa ra thứ tự ưu tiên chuyển phôi dựa trên xét nghiệm gen hoặc kết hợp với kết quả sàng lọc nhiễm sắc thể phôi (PGT-A) nếu có chỉ định và gia đình có nguyện vọng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả về di truyền liên kết của các STR với gen bệnh, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Giao nhận nhầm mẫu.
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm cẩn thận.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.

- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận; thực hiện lại kỹ thuật nếu không đạt chất lượng

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.
- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn STR cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm. Sinh thiết lại phôi nếu không khắc phục được.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai.
- Xử trí: Cần cẩn trọng phân tích trong các trường hợp, đề phòng hiện tượng ADO (Allelic drop out) dẫn đến kết luận sai giữa mẫu phôi mang gen bệnh và bình thường, không mang gen. Các mẫu phôi đồng hợp tử trên tất cả các STR cần nghi ngờ hiện tượng ADO và kiểm tra thêm các STR khác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi 2 người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba.

- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh, so sánh kiểu gen của các thành viên trong gia đình, các mẫu phôi đã có kết quả. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc) (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xu C. M., Lu S. J., Chen S. C., Zhang J. L., Xu C. J., Gao Y., Huang H. F. (2023). Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. Reproductive and Developmental Medicine, 7(01), 3-11.

2. Deans Z. C., Biricik A., De Rycke M., Harton G. L., Hornak M., Khawaja F., Renwick P. (2023). Twelve years of assessing the quality of preimplantation genetic testing for monogenic disorders. Prenatal Diagnosis, 43(4), 506-515.

3. Single Cell Kit protocol. Qiagen

Phụ lục 1

Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L)
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer: 1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở -20°C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 65°C trong 5 phút); duy trì 4°C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

29. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ LỆCH BỘI NHIỄM SẮC THỂ (PGT-A) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ lệch bội nhiễm sắc thể (PGT-A - Preimplantation genetic testing for aneuploidy) bằng kỹ thuật NGS (Next Generation Sequencing) nhằm phát hiện các lệch bội nhiễm sắc thể của phôi, sàng lọc phôi bình thường sau khi thu được bằng cách tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (IVF-ICSI).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bất thường nhiễm sắc thể (PGT-A) là kỹ thuật phát hiện bất thường số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể trên đối tượng phôi bào nhằm mục đích chẩn đoán di truyền, sàng lọc phôi bình thường để chuyển vào tử cung mẹ, tăng tỷ lệ thành công trong IVF-ICSI. Hiện nay giải trình tự NGS xác định các bất thường nhiễm sắc thể được ứng dụng trong sàng lọc trước làm tổ bởi tính chính xác và độ tin cậy cao.

NGS dựa trên nguyên tắc giải trình tự song song (parallel sequencing), trong đó, hàng triệu đoạn DNA được giải trình tự đồng thời, giải trình tự thế hệ mới cho phép giải được từ 8Gbases đến 600Gbases, có nghĩa là cho phép giải trình tự cả một bộ gen. Có nhiều công nghệ NGS khác nhau. Trong đó có hai công nghệ được sử dụng nhiều nhất hiện nay là Công nghệ bán dẫn (ion semiconductor) đo tín hiệu ion H^+ giải phóng ra trong các phản ứng tổng hợp chuỗi DNA và Công nghệ Illumina thay vì khuếch đại dựa trên các hạt từ, hệ thống Illumina sử dụng kỹ thuật gọi là cầu khuếch đại nhằm nhân bản các chuỗi DNA đơn được cố định trên bản flow cell.

Nguyên lý chung của các công nghệ: là giải trình tự tế bào đơn sau khi khuếch đại toàn bộ hệ gen (WGA) là rất quan trọng để cung cấp đủ mẫu DNA cho xây dựng và giải trình tự thư viện. Sử dụng sinh tin học so sánh tỷ lệ trình tự gen trên nhiễm sắc thể được tạo ra trong tế bào mẫu thử với các chuỗi được tạo ra trong một bảng tham chiếu các tế bào, cho phép tính toán số bản sao nhiễm sắc thể (CN) trong tế bào mẫu thử.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit nhân bản toàn bộ hệ gen (WGA) tùy hãng phù hợp cho PGT-A;
- Mastermix;
- Bộ kit tạo thư viện gen (Ion Torrent, Illumina hoặc tương đương);
- Bộ kit giải trình tự gen thế hệ mới (Ion Torrent, Illumina hoặc tương đương);
- Nước khử ion;
- Ống li tâm đáy nhọn, dung tích 1,5 - 2 mL;
- Đầu côn các loại: 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L;
- PCR tube;
- Plate PCR 96 wells.

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL;
- Máy đo độ tinh sạch;
- Máy spin down;
- Máy Speedvac;
- Bộ dụng cụ pipet: micropipet, pipet 100 μ L và pipet 1000 μ L, pipet 8 kênh nếu có;
- Buồng thao tác PCR;
- Máy PCR;
- Hệ thống giải trình tự thế hệ mới phù hợp PGT-A;
- Phần mềm phân tích kết quả PGT-A.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-A bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào lá nuôi của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi.

- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào lá nuôi (phôi ngày 5) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 μ l.

- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24 giờ.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ l. Ống đựng tế bào phôi sinh thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng đáy ống xuống dưới, miệng ống lên trên. Mẫu được lấy theo Quy trình sinh thiết phôi tại labo IVF được cấp phép hoạt động.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định

- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có)

- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng

- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử..

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

4.4.1. Tiến hành nhân bản bộ gen của phôi (WGA - whole genome amplification)

- Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất. (Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của Quy trình này).

- Các mẫu DNA thu được sau nhân bản bộ gen phôi được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng bằng nước deion hoặc dung dịch pha loãng DNA về nồng độ từ 10-20ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR/WGA...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

4.4.2. Tạo thư viện DNA

Tùy từng hãng mà bộ kit lập thư viện gen sẽ có từng quy trình tiến hành riêng, việc thực hiện cần đảm bảo các thao tác cẩn thận, tỉ mỉ với độ chính xác cao, quy trình chung sẽ bao gồm:

Bước 1: Cắt DNA hệ gen bằng enzyme giới hạn (DNA Fragmentation)

Thành phần	Thể tích (μl)
Purified single-cell amplified DNA (200ng ~ 3μg, 400ng recommended)	16,0
DNA fragmentation buffer	2,0
DNA fragmentation enzyme	2,0
Tổng	20

Sau đó ủ 37 °C trong 20 phút, duy trì 4 °C

Bước 2: Tinh sạch sản phẩm cắt DNA bằng hạt từ

Bước 3: Sửa chữa đầu cuối (End repair)

Thành phần	Thể tích (μl)
DNA	39,5
End repair buffer	10
End repair enzyme	0,5
Tổng	50

Bước 4: tinh sạch sản phẩm End repair và thu sản phẩm trong 40μL TE

Bước 5: Kết nối (Connector connection)

Thành phần	Thể tích ((μl)
Blunt-end DNA	40
Ligation buffer	5
DNA ligase	1
P1 connector	2
Tag sequence X	2
Tổng	50

Trộn đều nhẹ và ly tâm nhẹ rồi chuyển sang máy PCR ủ ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút và duy trì ở 4°C đến bước tiếp theo.

Bước 6: Tinh sạch sản phẩm Connector connection và thu sản phẩm trong 18,5 TE.

Bước 7: nhân gen bằng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
Ligated DNA linker	18,2
PCR amplification reagents	50
PCR primers	1,8
Tổng	70

Trộn đều nhẹ và ly tâm rồi chuyển sang máy PCR (72°C trong 10 phút; 95°C trong 5 min; 9 chu kỳ (95°C trong 15 giây, 58°C trong 15 giây, 70°C trong 1 phút); 1 chu kỳ 70°C trong 5 phút, duy trì 4°C đến bước tiếp theo.)

Bước 8: tinh sạch sản phẩm PCR bằng hạt từ và thu trong 50 μL TE. Rồi tiến hành định lượng bằng máy realtime hoặc đo bằng máy Quibit (theo kit Quibit của hãng sản xuất).

Bước 9: Chạy PCR thư viện trên máy Ion oneTouch 2 hoặc hệ thống tương đương (theo chương trình chạy của nhà sản xuất, mất khoảng 5 giờ).

Bước 10: Giải trình tự các đoạn DNA đã gắn lên mỗi bead theo nguyên lý Ion Semiconductor hoặc theo nguyên lý của từng bộ kit thuộc các hãng sản xuất khác nhau.

+ Các bước tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của bộ kit và nhà sản xuất.

+ DNA được biến tính và tiến hành giải trình tự đồng thời các gen mục tiêu trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới và hóa chất giành cho máy giải trình tự.

Bước 11: Phân tích kết quả: Ghép nối các đoạn DNA đã giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của bộ gen.

4.2. Nhận định kết quả

Từ phần mềm phân tích đưa ra dữ liệu và hình thái cấu trúc nhiễm sắc thể thể hiện qua hình ảnh và số liệu % khả năng xảy ra bất thường nhiễm sắc thể của phôi. Đánh giá và đưa ra kết luận.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Nhận nhầm mẫu, mất mẫu (không thu được tế bào)
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm (Double check).
- Trường hợp mất mẫu phải sinh thiết lại.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.
- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.
- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn gen đột biến cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm. Trường hợp cần thiết phải sinh thiết lại.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai, trả nhầm kết quả.
- Xử trí: Cần cẩn trọng phân tích trong các trường hợp, kiểm tra lại kỹ thông tin người bệnh và mã mẫu trên phiếu và trên phần mềm phân tích (Double check).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi 2 người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba có kinh nghiệm.
- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh, so sánh kiểu gen của các thành viên trong gia đình, các mẫu phôi đã có kết quả. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Raza, Khalid, and Sabahuddin Ahmad. "Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: a review." arXiv preprint arXiv:1606.05254 (2016).
2. Single Cell Kit protocol. Qiagen.
3. Pre-implantation Chromosome Aneuploidy Detection Kit (user's guide). Capitalbio genomics.

Phụ lục 1**Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)**

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L)
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer:1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở -20°C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 65°C trong 5 phút); duy trì 4°C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

30. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BẤT THƯỜNG CẤU TRÚC NHIỄM SẮC THỂ (PGT-SR) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (PGT-SR: Preimplantation Genetic Testing - Structure) bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS - Next Generation Sequencing) là đánh giá hình thái bất thường liên quan đến cấu trúc nhiễm sắc thể trên đối tượng phôi bào nhằm mục đích chẩn đoán di truyền, sàng lọc phôi khỏe mạnh tham gia vào thụ tinh nhân tạo.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (PGT-SR) là đánh giá hình thái bất thường liên quan đến cấu trúc nhiễm sắc thể trên đối tượng phôi bào nhằm mục đích chẩn đoán di truyền, sàng lọc phôi khỏe mạnh tham gia vào thụ tinh nhân tạo. Kỹ thuật NGS hiện là công cụ hiện đại nhất và được sử dụng rộng rãi nhất cho PGT-SR. PGT-SR sử dụng NGS có khả năng phát hiện sự mất cân bằng phân đoạn nhỏ nhất với kích thước khoảng 5-6Mb. Do vậy, NGS chỉ xác định được các bất thường cấu trúc mất cân bằng (thừa đoạn, lặp đoạn của nhiễm sắc thể), không xác định được các trường hợp chuyển đoạn và đảo đoạn và các bất thường cấu trúc nhỏ dưới 1Mb.

Đối với trường hợp chuyển đoạn hoặc đảo đoạn sẽ phải thực hiện kỹ thuật PCR bắc cầu qua vị trí chuyển đoạn:

Giải trình tự NGS được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định các bất thường nhiễm sắc thể và là kỹ thuật thường được ứng dụng trong PGS bởi tính chính xác và độ tin cậy cao. NGS dựa trên nguyên tắc giải trình tự song song (parallel sequencing), trong đó hàng triệu đoạn DNA được giải trình tự đồng thời, giải trình tự thế hệ mới cho phép giải được từ 8Gbases đến 600Gbases, có nghĩa cho phép giải trình tự cả một bộ gen. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới theo nguyên lý Ion Torrent Sequencing/ Ion semiconductor sequencing là kỹ thuật xác định trình tự các nucleotide trong DNA thông qua việc phát hiện tín hiệu do ion H^+ được giải phóng ra trong quá trình tổng hợp DNA bằng các máy đo

pH siêu nhỏ gắn vào chip cảm ứng bán dẫn. Đầu tiên, một loại dNTP được bơm vào các giếng trên đĩa. DNA polymerase xúc tác cho phản ứng kéo dài chuỗi DNA, tại đó từng dNTP được thêm vào chuỗi DNA sẽ được giải phóng ra Ppi và H^+ . Số lượng H^+ giải phóng sẽ tỷ lệ với số lượng phân tử của 1 loại dNTP được gắn vào chuỗi. H^+ giải phóng sẽ làm giảm pH và tăng điện tích ở khay cảm ứng bán dẫn, dẫn tới chênh lệch điện thế của bộ phận truyền cảm ứng và xuất hiện dòng điện. Tín hiệu điện hóa được ghi nhận bởi phần mềm máy tính. Từng loại dNTP được bơm vào trong giếng phản ứng luân phiên nối tiếp nhau. Hiện nay người ta sử dụng các máy giải trình tự động phân tích trình tự gen ứng dụng rất nhiều trong sàng lọc di truyền trước làm tổ nhằm đánh giá hình thái, bản chất di truyền cấu trúc nhiễm sắc thể trên các phôi bào.

Kỹ thuật PCR bắc cầu qua vị trí chuyển đoạn (Breakpoint-PCR): nguyên tắc đoạn chuyển tương hỗ cho nhau giữa 2 nhiễm sắc thể sẽ có trình tự đặc trưng cho từng NST đó. Cần thiết kế tối thiểu 4 cặp mồi để nhân gen PCR bắc qua vị trí mà đoạn nhiễm sắc thể được chuyển. Muốn biết được vị trí đoạn NST được chuyển nằm chính xác vị trí nào cần phải thực hiện kỹ thuật giải trình tự đoạn đọc dài (Long read sequencing) rồi mới tiến hành thiết kế 4 cặp mồi cần thiết tại vị trí chuyển đoạn đó.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Bộ kit khuếch đại toàn bộ hệ gen (tùy hãng) phù hợp cho PGT-SR;
- Mastermix, Primer;
- Bộ kit tạo thư viện gen (Ion Torrent, Capitalbio genomic, Illumina...);
- Bộ kit giải trình tự gen thế hệ mới (Ion Torrent, Capitalbio genomic, Illumina...);
- Nước khử ion;
- Redsafe;

- Ống li tâm đáy nhọn dung tích 1,5 -2 mL;
- Đầu côn các loại: 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L;
- PCR tube;
- Plate PCR 96 giếng;

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL;
- Máy đo độ tinh sạch;
- Máy spin down;
- Máy Speedvac;
- Bộ dụng cụ pipet: micropipet 2 μ L, 10 μ L, pipet 100 μ L và pipet 1000 μ L;
- Buồng thao tác PCR;
- Máy PCR;
- Hệ thống giải trình tự thế hệ mới;
- Phần mềm phân tích kết quả;
- Máy soi chụp gel;
- Máy điện di agarose.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-SR bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi.

- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào (phôi 3-5 ngày) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 μ L.

- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24h.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ L. Ống đựng tế bào phôi sinh thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng đáy ống ở dưới, miệng ống ở trên. Mẫu được lấy theo Quy trình sinh thiết phôi tại labo IVF.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Khoảng 24 đến 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Bước 1. Nhận mẫu bệnh phẩm

Kiểm tra thông tin trên mẫu xét nghiệm, đối chiếu với phiếu xét nghiệm.

4.1.2. Bước 2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất (nếu có)

4.1.3. Bước 3. Đánh giá QC

- Máy móc trang thiết bị được hiệu chuẩn/ kiểm chuẩn 1 lần/năm.

- Hoá chất được bảo quản theo đúng quy định của nhà sản xuất, còn hạn sử dụng và kiểm tra chất lượng định kỳ.

4.1.4. Bước 4. Tiến hành kỹ thuật

a) Bước 4.1. Tiến hành nhân bản bộ gen của phôi (WGA - whole genome amplification)

- Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình của nhà sản xuất. (Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của Quy trình này).

- Các mẫu DNA thu được sau nhân bản bộ gen phôi được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện bước tiếp theo.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR/WGA...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

b) Bước 4.2. Tạo thư viện DNA và giải trình tự

- Tùy từng hãng mà bộ kit lập thư viện gen và giải trình tự gen sẽ có từng quy trình tiến hành riêng, việc thực hiện cần đảm bảo các thao tác cẩn thận, tỉ mỉ với độ chính xác cao, quy trình chung sẽ bao gồm:

- Cắt DNA hệ gen bằng enzyme giới hạn (DNA Fragmentation)

Bảng 1. Thành phần các chất trong cắt DNA hệ gen bằng enzyme giới hạn

Thành phần	Thể tích (μL)
Purified single-cell amplified DNA (200 ng ~ 3μg, 400ng recommended)	16,0
DNA fragmentation buffer	2,0
DNA fragmentation enzyme	2,0
Tổng	20

Sau đó ủ 37°C trong 20 phút, duy trì 4°C

- Tinh sạch sản phẩm cắt DNA bằng hạt từ.
- End repair.

Bảng 2. Thành phần các chất trong End repair

Thành phần	Thể tích
DNA	39,5
End repair buffer	10
End repair enzyme	0,5
Tổng	50

- Tinh sạch sản phẩm End repair và thu sản phẩm trong 40 μL TE.
- Connector connection

Bảng 3. Thành phần các chất trong Connector connection

Thành phần	Thể tích
Blunt-end DNA	40
Ligation buffer	5
DNA ligase	1
P1 connector	2
Tag sequence X	2
Tổng	50

Trộn đều nhẹ và ly tâm nhẹ rồi chuyển sang máy PCR ủ ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút và duy trì ở 4°C.

- Tinh sạch sản phẩm Connector connection và thu sản phẩm trong 18,5 TE.
- Nhân gen bằng PCR

Bảng 4. Thành phần các chất trong PCR amplification

Thành phần	Thể tích
Ligated DNA linker	18,2
PCR amplification reagents	50
PCR primers	1,8
Tổng	70

Trộn đều nhẹ và ly tâm rồi chuyển sang máy PCR (72°C trong 10 phút; 95°C trong 5 min; 9 chu kỳ (95°C trong 15 giây, 58°C trong 15 giây, 70°C trong 1 phút); 1 chu kỳ 70°C trong 5 phút, duy trì 4°C).

- Tinh sạch sản phẩm PCR bằng hạt từ và thu trong 50 μ L TE. Rồi tiến hành định lượng bằng máy realtime hoặc đo bằng máy Qubit (theo kit Qubit của hãng sản xuất).

- Chạy PCR thư viện trên máy One Touch hoặc tương đương (theo quy trình của nhà sản xuất, mất khoảng 5 giờ).

- Giải trình tự các đoạn DNA đã gắn lên mỗi bead theo nguyên lý Ion Semiconductor hoặc nguyên lý khác theo hãng sản xuất.

Các bước tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của bộ kit và nhà sản xuất.

DNA được biến tính và tiến hành giải trình tự đồng thời các gen mục tiêu trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới và hóa chất dành cho máy giải trình tự.

- Phân tích kết quả: Ghép nối các đoạn DNA đã giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của genome.

c) Bước 4.3. Thực hiện phản ứng Breakpoint PCR

- Dựa trên kết quả vị trí bất thường NST sau khi tiến hành giải trình tự NGS, tiến hành thiết kế các cặp mồi bắc cầu qua vị trí ngắt nối. Sản phẩm PCR phụ thuộc vào cặp mồi được thiết kế và vị trí của đoạn NST được chuyển đoạn (4 phản ứng cho chuyển đoạn tương hỗ xảy ra giữa 2 NST).

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%.

- Chụp ảnh sản phẩm điện di trên máy chụp gel.

4.2. Nhận định kết quả

Dựa trên kết quả phản ứng Break point PCR

4.2.1. Chuyển đoạn tương hỗ xảy ra giữa 2 nhiễm sắc thể

- Phôi bào mang bộ nhiễm sắc thể chuyển đoạn tương hỗ khi có mặt tất cả các sản phẩm của 4 phản ứng PCR.

- Phôi bào mang bộ nhiễm sắc thể lệch bội đoạn - segmental aneuploidy (trisomy một phần và monosomy một phần) khi xuất hiện sản phẩm của 1 trong 2 phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mang điểm ngắt nối và sản phẩm của 2 phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen bình thường.

- Phôi bào mang bộ NST bình thường khi chỉ có mặt sản phẩm của 2 phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen bình thường, không chứa điểm ngắt nối.

4.2.2. Chuyển đoạn nhiễm sắc thể

Kỹ thuật Breakpoint PCR chỉ xác định được phôi bào có mang chuyển đoạn hay không. Phôi bào mang bộ NST lệch bội (được xác định bằng PGT-A, tiến hành đồng thời trên cùng một mẫu) không thể phát hiện bằng kỹ thuật này:

- Phôi bào mang NST chuyển đoạn khi có mặt sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mang điểm ngắt nối.

- Phôi bào không mang NST chuyển đoạn khi chỉ có mặt sản phẩm của 2 phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen bình thường, không chứa điểm ngắt nối.

Kết hợp kết quả phân tích breakpoint PCR với kết quả phân tích PGT-A để đánh giá và đưa ra kết luận cuối cùng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Nhận nhầm mẫu.
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm cẩn thận (Double check).

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.
- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.

- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn gen đột biến cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai, trả nhầm kết quả.
- Xử trí: Cần cẩn trọng phân tích trong các trường hợp, kiểm tra lại kỹ thông tin người bệnh và mã mẫu trên phiếu và trên phần mềm phân tích (Double check).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù. (Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm không bắt buộc) (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xu C. M., Lu S. J., Chen S. C., Zhang J. L., Xu C. J., Gao Y., Huang H. F. (2023). Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. *Reproductive and Developmental Medicine*, 7(01), 3-11.
2. Griffin D. K., Ogur C. (2023). PGT-SR: A Comprehensive Overview and a Requiem for the Interchromosomal Effect. *DNA*, 3(1), 41-64.
3. Gupta A. K., Gupta U. D. (2020). Next generation sequencing and its applications. In *Animal biotechnology* (pp. 395-421). Academic Press.
4. Single Cell Kit protocol. Qiagen.

Phụ lục 1**Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)**

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L).
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer: 1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở - 20 °C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94 °C trong 30 giây; 65 °C trong 5 phút); duy trì 4 °C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

31. XÉT NGHIỆM DI TRUYỀN TRƯỚC CHUYỂN PHÔI/ TRƯỚC LÀM TỔ BỆNH ĐƠN GEN (PGT-M) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen (PGT-M: Preimplantation Genetic Testing-monogenic) bằng kỹ thuật giải trình tự gen sanger và phân tích STR nhằm xác định kiểu gen của phôi để chọn các phôi hoàn toàn không mang gen bệnh hoặc phôi mang gen nhưng không bị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Xét nghiệm di truyền trước làm tổ (PGT - Preimplantation Genetic Testing) là tập hợp các kỹ thuật di truyền phân tử chuyên sâu thực hiện nhằm xác định những bất thường di truyền đơn gen đã biết của phôi được tạo ra trong quá trình làm thụ tinh ống nghiệm.

- Phương pháp giải trình tự Sanger thực hiện dựa trên kỹ thuật “chain termination- kết thúc chuỗi” bằng việc sử dụng các deoxy nucleotide đã bị chỉnh sửa làm mất nhóm hydroxyl ở đầu 3’ của phân tử đường. Nhóm 3’-OH cho phép gắn thêm một nucleotide mới vào chuỗi. Khi một ddNTP được thêm vào chuỗi, vì không có nhóm 3’-OH nên một nucleotide không được thêm vào, phản ứng tổng hợp sẽ dừng lại. Enzyme polymerase xúc tác phản ứng gắn các dNTP vào mạch đơn của DNA để kéo dài mạch ở vị trí 3’- OH và dừng lại nếu gắn các ddNTP vào chuỗi. Sau đó, tiến hành điện di mao quản để xác định trình tự kết hợp so sánh đối chiếu với bộ gen tham chiếu tìm ra đột biến.

- Phương pháp di truyền liên kết dựa trên sự di truyền cùng nhau giữa gen gây bệnh và các marker di truyền liên kết với chúng trong các gia đình có người bị bệnh. Từ đó, thay vì phát hiện trực tiếp gen gây bệnh, hoàn toàn có thể chẩn đoán đối tượng mang gen bệnh thông qua sự có mặt hay vắng mặt của các marker di truyền liên kết gen gây bệnh. Các marker di truyền thường được sử dụng cho phương pháp này là các đoạn STR do chúng có kích thước ngắn và số lượng lớn. Các STR được lựa chọn sao cho khoảng cách từ chúng đến vị trí của gen cần khảo sát càng gần càng tốt (tốt nhất là dưới 1 Mbps). Ngoài ra cũng nên lựa chọn được càng nhiều STR càng tốt. Ít nhất là 3 STR, trong đó, ít nhất 1 STR trước gen đích, 1 STR sau gen đích.

Giải trình tự Sanger được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm. Phân tích di truyền liên kết sử dụng STR (Short Tandem Repeats) được khuyến cáo trong chẩn đoán di truyền trước làm tổ các bệnh đơn gen bởi khả năng kiểm soát ngoại nhiễm, giảm thiểu nguy cơ chẩn đoán sai do hiện tượng mất alen (Allelic Dropout - ADO), hiện tượng tái tổ hợp của cặp nhiễm sắc thể tương đồng. Sự kết hợp giữa giải trình tự Sanger và phân tích di truyền liên kết sử dụng STR giúp PGT-M được tiến hành chính xác, hạn chế sai sót trong chẩn đoán.

Do mẫu phôi sinh thiết được chỉ chứa vài tế bào, vì vậy trước khi thực hiện PGT-M, thường phải qua bước khuếch đại toàn bộ hệ gen-WGA (Whole genome amplification) để đủ lượng DNA cho các phân tích tiếp theo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư hóa chất

- Bộ kit tách DNA tổng số (tùy hãng);
- Bộ kit nhân bản toàn bộ hệ gen (tùy hãng) phù hợp PGT-M;
- Bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit hoặc tương đương;
- BigDye XTerminator™ Kit hoặc tương đương;
- Bột agarose;
- Ethidium bromide hoặc tương đương;
- TBE 0,5X;
- Thang DNA (100bp);
- Mastermix;
- Các môi huỳnh quang khuếch đại STR (tối thiểu 3 cặp) và môi giải trình tự (1 hoặc 2 cặp);
- Nước khử ion;
- Dung dịch Hi-Di;
- Exo SAP- IT hoặc tương đương;
- Genescan LIZ500 hoặc tương đương;
- Ống li tâm đáy nhọn, dung tích 1,5 -2mL;

- Đầu côn các loại: 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L;
- PCR tube;
- Plate PCR 96 wells;

2.3. Trang thiết bị

- Máy ủ nhiệt có lắc;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm dành cho ống li tâm đáy nhọn 1,5mL;
- Máy đo độ tinh sạch;
- Máy spin down;
- Máy Speedvac;
- Bộ dụng cụ pipette: micropipette 2, 10, 100 và 1000 μ L;
- Buồng thao tác PCR;
- Máy PCR;
- Máy điện di;
- Máy soi và chụp ảnh gel;
- Máy điện di mao quản (ABI-3130(XL), ABI-3500(XL), SeqStudio Genetic Analyzer...) hoặc tương đương;
- Phần mềm phân tích kết quả (Genemapper ID, Bioedit sequence alignment editor...).

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: Gia đình được giải thích cặn kẽ về việc lấy mẫu sinh thiết phôi ngày 5 làm xét nghiệm PGT-SR bằng cách lấy từ 5 đến 7 tế bào lá nuôi của phôi. Việc sinh thiết này không làm ảnh hưởng đến chất lượng phôi. Chú ý, trước khi tiến hành trên mẫu phôi sinh thiết, một quy trình tiền lâm sàng PGT-M đã được chuẩn bị trước.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phôi.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Tế bào (phôi ngày 5) được thu vào ống PCR cùng với một lượng tối thiểu dung dịch PBS 1X sao cho thể tích sau khi chuyển chỉ là 2,5 μ L.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) không quá 24h.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tế bào phôi được lấy vào ống PCR sạch 0,2 mL, đủ 2,5 μ L. Ống đựng tế bào phôi sinh

thiết luôn phải đặt ở trạng thái đứng đáy ở dưới, miệng ở trên. Mẫu được lấy theo Quy trình hướng dẫn lấy mẫu tại labo IVF.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về phôi: cặp vợ chồng: mã số phôi, họ tên vợ và chồng, tuổi, chẩn đoán lâm sàng, chỉ định xét nghiệm, ngày sinh thiết.

- Kiểm tra lại các thủ tục hành chính theo quy định.
- Kiểm tra lại chỉ định/chống chỉ định (nếu có).
- Kiểm tra họ tên, tuổi, thông tin vợ chồng.
- Kiểm tra lại các xét nghiệm cần thiết.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 48 đến 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Quản lý các nguồn điện, áp dụng phòng ngừa biện pháp an toàn điện chung cho các thiết bị trong phòng xét nghiệm.

- Các hóa chất thực hiện có thể là các chất nguy hại sinh học hoặc dễ gây cháy nổ, tham khảo dữ liệu an toàn của từng hoá chất để kiểm soát rủi ro có thể có.

- Các mẫu sinh học có thể có chứa nhân tố lây nhiễm sinh học, cần được coi là nguy cơ sinh học tiềm ẩn. Đảm bảo thực hiện an toàn cá nhân bằng các trang thiết bị như trang phục phòng xét nghiệm, khẩu trang, găng tay, kính mắt...

- Chú ý thao tác với các thiết bị có nhiệt độ cao như máy ủ nhiệt có lắc, máy Speedvac, máy PCR.

- Khi có sự cố cần báo cáo kịp thời để có biện pháp ngăn ngừa rủi ro và khắc phục hậu quả.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện kỹ thuật

4.1.1. Tiến hành nhân bản bộ gen của phôi (WGA - whole genome amplification)

Tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen của phôi (WGA - whole genome amplification) bằng kit WGA dùng cho tế bào đơn (Single cell) theo quy trình

của nhà sản xuất. (Tham khảo quy trình khuếch đại hệ gen của bộ kit REPLI-g Single Cell trong phụ lục 1 của Quy trình này).

Các mẫu DNA thu được sau khuếch đại toàn bộ hệ gen phôi được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

4.1.2. Khuếch đại các đoạn STR và đoạn trình tự gen chứa đột biến

Dựa vào thông số của cặp môi thiết kế nhằm khuếch đại đoạn STR và đoạn gen chứa đột biến để xác định nhiệt độ gắn môi. Nhiệt độ gắn môi ($T_a^{\circ}\text{C}$) có thể ước lượng thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của cặp môi từ 3-5 $^{\circ}\text{C}$. Việc xác định nhiệt độ gắn môi cũng có thể xác định chính xác bằng cách tiến hành phản ứng Gradient-PCR trong dải nhiệt độ nhất định.

Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng khuếch đại được minh họa ở bảng:

Bảng 1. Thành phần các chất trong phản ứng khuếch đại

Thành phần	Thể tích (μL)
Mastermix 2X	6,25
Nước deion	2,75
Môi F	0,5
Môi R	0,5
Template DNA	2,5
Tổng	12,5

Bảng 2. Chu trình nhiệt trong phản ứng khuếch đại

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 $^{\circ}\text{C}$	5 phút	1 chu kỳ
95 $^{\circ}\text{C}$	30 giây	30 chu kỳ
$T_a^{\circ}\text{C}$	30 giây	
72 $^{\circ}\text{C}$	45 giây	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 phút	1 chu kỳ
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	

Tiến hành điện di agarose, nhuộm và đánh giá

- Chạy điện di sản phẩm PCR trên agarose 2%, thời gian 30 phút với hiệu điện thế 200V và cường độ dòng điện là 100mA.

- Nhuộm bản gel sau khi chạy điện di trong dung dịch EtBr 10 µg/mL trong 10 phút, rửa bản gel sau khi nhuộm bằng nước cất, chụp ảnh gel bằng máy chụp gel.

- Phản ứng khuếch đại đoạn gen chứa đột biến thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp mồi đã thiết kế, không có băng phụ thì có thể tiến hành giải trình tự.

- Phản ứng khuếch đại STR thành công khi các băng điện di sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ, đúng với kích thước của các cặp mồi đã thiết kế.

4.1.3. Giải trình tự Sanger bằng bộ kit Bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [4].

a) Tinh sạch sản phẩm khuếch đại

Tinh sạch sản phẩm bằng Exo SAP- IT nhằm loại bỏ các đoạn mồi dư thừa và các nucleotide chưa hợp nhất bằng enzym. Thành phần và chu trình tinh sạch được thực hiện như sau:

Bảng 3. Thành phần các chất trong tinh sạch

Thành phần	Thể tích (µL)
Sản phẩm DNA	5,0
Exo SAP- IT	2,0

Bảng 4. Nhiệt độ trong chu trình tinh sạch

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
37°C	4 phút	1 chu kỳ
80°C	1 phút	1 chu kỳ
4°C	∞	

b) Phản ứng Sanger

Tùy vị trí đột biến trong đoạn gen khuếch đại để tiến hành giải trình tự Sanger mồi xuôi hay mồi ngược hay cả hai.

Thành phần và chu trình nhiệt chạy phản ứng Sanger được thực hiện như sau:

Bảng 5. Thành phần các chất trong PCR Sanger sequencing

Thành phần	Thể tích (μL)
Big Dye Buffer 1X	1,5
Big Dye Terminator v3.1 2.5X	1,0
Nước deion	6,25
Môi F hoặc R	0,5
Sản phẩm DNA	0,5
Tổng	10,0

Bảng 6. Chu trình nhiệt trong PCR Sanger sequencing

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
96°C	1 phút	1 chu kỳ
96°C	10 giây	25 chu kỳ
50°C	5 phút	
60°C	4 phút	
4°C	∞	

c) Tinh sạch sản phẩm sau PCR Sanger sequencing

- Tinh sạch sản phẩm sau phản ứng PCR Sanger sequencing bằng một trong hai phương pháp sau:

Phương pháp 1: Tinh sạch bằng BigDye XTerminator™:

Lưu ý: Sử dụng ống chứa dung dịch dùng một lần và micro pipet P200 8 kênh nếu có, để tạo thuận lợi cho quá trình làm sạch. Sử dụng đầu tip pipet có lỗ rộng khi bơm dung dịch BigDye Xterminator™.

Lưu ý: Nếu sử dụng Máy phân tích DNA 3730, có thể sử dụng kỹ thuật hàn nhiệt tiêu chuẩn. Quy trình này mô tả việc niêm phong tấm bằng MicroAmp™ màng dính trong suốt. Các MicroAmp™ màng dính trong suốt phải được loại bỏ trước khi đặt đĩa 96 giếng lên thiết bị.

+ Lắc lọ BigDye XTerminator™ bead trong 8 đến 10 giây trước khi trộn với dung dịch SAM.

QUAN TRỌNG! Để làm sạch BigDye XTerminator™ hiệu quả, điều cần thiết là phải giữ các nguyên liệu được trộn đều. Giữ thuốc thử trên đá giữa các bước.

+ Chuẩn bị dung dịch xử lý SAM/BigDye XTerminator™ bead như sau:

Bảng 7. Phản ứng tinh sạch sản phẩm PCR Sanger sequencing

Thành phần	Thể tích phản ứng 10µl
SAM	45
BigDye XTerminator™ bead	10
Tổng	55

+ Lấy màng dính trong suốt MicroAmp™ ra khỏi đĩa 96 giếng.

+ Chia đều thể tích hỗn hợp hạt (dung dịch hạt BigDye XTerminator™ và dung dịch SAM) cho từng mẫu.

QUAN TRỌNG! Trộn đều, bơm dung dịch lên xuống 3-4 lần trước mỗi lần chuyển. Trộn lại dung dịch sau mỗi bước phân phối

+ Dán đĩa 96 giếng bằng màng dính trong suốt MicroAmp™.

+ Lắc đĩa 96 giếng trong 20 phút ở tốc độ 1.800 vòng/phút (đối với Digital VortexGenie™ 2).

+ Trong máy ly tâm xô lắc, ly tâm đĩa 96 giếng ở tốc độ $1.000 \times g$ trong 2 phút.

Lưu ý: Để bảo quản tối đa 10 ngày, hãy dán kín đĩa bằng màng dính trong suốt MicroAmp™ và bảo quản ở 4°C để chuẩn bị điện di mao quản (CE) hoặc ở -20°C cho đến khi sử dụng. Đĩa BigDye XTerminator™ có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng lên đến 48 giờ bao gồm thời gian trên thiết bị giải trình tự.

Phương pháp 2: Tinh sạch bằng phương pháp rửa EtOH/EDTA:

+ Thêm vào toàn bộ sản phẩm 2 µL EDTA 0,125M và 30 µL ethanol 100%. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút.

+ Gạn bỏ dịch nổi phía trên, đem làm khô bằng speedvac ở 60°C trong 10 phút.

+ Sau khi khô hoàn toàn, thêm 10 µL nước khử ion và vortex đều.

- Điện di mao quản

+ Thêm vào mỗi ống 30 µL dung dịch Hi-Di Formamide và đem biến tính tại nhiệt độ 95°C trong 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C.

+ Sau biến tính, mẫu trên được sử dụng cho điện di mao quản bằng máy điện di mao quản.

+ Trình tự nucleotide của mỗi đoạn gen sau khi giải trình tự được xác định cả 2 chiều (xuôi và ngược) bằng phần mềm phân tích trình tự.

4.1.4. Phân tích di truyền liên kết

a) Biến tính sản phẩm DNA và điện di mao quản

- Sản phẩm PCR được trộn cùng dung dịch chứa Hi-Di và Standard GeneScan (tuỳ hãng máy khuyến cáo), sau đó đem biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút. Hạ nhiệt nhanh về 4°C. Có thể tiến hành điện di mao quản cùng lúc nhiều STR của cùng một mẫu trong cùng một ống phản ứng với điều kiện kích thước các STR phải khác nhau (nếu cùng được gắn nhãn một màu huỳnh quang) hoặc các STR được gắn nhãn các màu huỳnh quang khác nhau.

- Thành phần phản ứng biến tính DNA trước khi điện di mao quản:

Bảng 8. Thành phần các chất trong phản ứng biến tính DNA

Thành phần	Thể tích (µL)
Hi-Di	Biến đổi
Standard GeneScan	0,25-0,5
DNA Mẫu	1,0
Tổng	12,0 µL

- Sau biến tính, sản phẩm được tra lần lượt trên các giếng của plate 96 wells và cài đặt chương trình Fragment Analysis và chạy điện di mao quản.

b) Phân tích kết quả trên phần mềm GenMapper

- Sau khi điện di mao quản, kết quả được phân tích bằng phần mềm GeneMapper. Mỗi peak sản phẩm đại diện cho mỗi alen được khuếch đại, có kích thước được xác định nhờ so sánh với thang chuẩn Standard GeneScan.

- Lập bảng dữ liệu thống kê kích thước sản phẩm khuếch đại (các alen) trên các locus STR của các cá nhân thuộc cùng một gia đình và phôi từ đó so sánh và đánh giá sự di truyền liên kết của các STR với gen gây bệnh.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Kết quả giải trình tự Sanger

Tuỳ vào từng loại đột biến, đối chiếu trình tự gen tham chiếu để xác định kết quả tại vị trí xảy ra đột biến đã biết:

- Tại vị trí đột biến chỉ xuất hiện một màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu phôi ở trạng thái đồng hợp tử (Đồng hợp tử đột biến hoặc đồng hợp tử wildtype).

- Tại vị trí đột biến xuất hiện hai màu tín hiệu huỳnh quang có nghĩa mẫu phôi ở trạng thái dị hợp tử (Mang gen đột biến).

4.2.2. Kết quả phân tích di truyền liên kết

Dựa trên phả hệ đã lập và kết quả chẩn đoán xác định bệnh bằng phương pháp khác trên các thành viên gia đình để tìm ra các alen liên kết với gen gây bệnh của từng STR:

- Các phôi mang cả hai alen liên kết với gen gây bệnh ở tất cả các STR là phôi bị bệnh (đồng hợp tử đột biến).

- Các phôi mang cả một trong hai loại alen liên kết với gen gây bệnh ở tất cả các STR là phôi mang gen bệnh.

- Các phôi không mang cả hai loại alen liên kết với gen gây bệnh ở tất cả các STR là phôi bình thường, không mang gen bệnh.

4.2.3. Kết luận kết quả chẩn đoán bệnh di truyền đơn gen trên các mẫu phôi

Dựa trên sự phù hợp giữa kết quả chẩn đoán của cả hai phương pháp giải trình tự Sanger và phân tích di truyền liên kết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Giao nhận nhầm mẫu.
- Xử trí: Kiểm tra thông tin mẫu, đối chiếu phiếu xét nghiệm cẩn thận.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Thao tác pipet không chính xác

- Sai sót: Thao tác pipet không chính xác ảnh hưởng đến chất lượng của xét nghiệm.

- Xử trí: Định kỳ kiểm tra chất lượng pipet, tiến hành thao tác với pipet cẩn thận.

5.2.2. Mẫu nhiễm DNA ngoại lai

- Sai sót: Nhiễm DNA ngoại lai dẫn đến kết quả xét nghiệm sai.
- Xử trí: Tiến hành nhân bản toàn bộ hệ gen mẫu phôi trong phòng áp lực dương, thao tác tiến hành cẩn thận. Phản ứng khuếch đại đoạn STR cần chạy kèm cả mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Phân tích kết quả sai.
- Xử trí: Cần cẩn trọng phân tích trong các trường hợp, đề phòng hiện tượng mất alen- ADO (Allelic drop out), hiện tượng mất cân bằng alen-AI (imbalance Allelic) dẫn đến kết luận sai giữa mẫu phôi mang gen bệnh và bình thường, không mang gen. Trường hợp không kiểm soát được ADO, AI, cần kết hợp phân tích di truyền liên kết bằng các trình tự lặp lại ngắn liên tiếp hoặc các đa hình nucleotide đơn liên kết với gen bệnh để phân biệt được kiểu gen.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm: mỗi kết quả được phân tích và kết luận bởi 2 người có trình độ chuyên môn độc lập. Khi kết quả trùng khớp mới đưa ra kết luận. Nếu kết quả không trùng khớp, kết quả cần được phân tích độc lập bởi một người thứ ba.

- Yêu cầu ngoại kiểm: đối chiếu với kết quả xét nghiệm gen trước đó phát hiện đột biến gây bệnh, so sánh kiểu gen của các thành viên trong gia đình, các mẫu phôi đã có kết quả. (Yêu cầu ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Xu C. M., Lu S. J., Chen S. C., Zhang J. L., Xu C. J., Gao Y., Huang H. F. (2023). Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. Reproductive and Developmental Medicine, 7(01), 3-11.
2. Deans Z. C., Biricik A., De Rycke M., Harton G. L., Hornak M., Khawaja F., Renwick P. (2023). Twelve years of assessing the quality of preimplantation genetic testing for monogenic disorders. Prenatal Diagnosis, 43(4), 506-515.
3. Single Cell Kit protocol. Qiagen.
4. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. Thermo fisher scientific.

Phụ lục 1

Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 µL) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 µL).
2. Lấy 1 µL hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 µL dung dịch đã chứa tế bào phôi.

3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.

4. Thêm 3 µL hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer: 1 Library stabilization buffer).

5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.

6. Thêm 1 µL Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở - 20 °C.

7. Thêm 61 µL (7,5 µL Amplification premix + nước 48,5 µL + 5 µL WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94 °C trong 30 giây; 65 °C trong 5 phút); duy trì 4 °C).

8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.

9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/µL để thực hiện phản ứng tiếp theo.

32. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ PHÂN TỬ BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN ĐA MÀU MULTI-FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm nhằm đánh giá, phát hiện các biến đổi về cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể (NST) phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh bằng phương pháp lai tại chỗ sử dụng đầu dò huỳnh quang (FISH), chẳng hạn như sàng lọc trước sinh các bất thường số lượng NST ở thai nhi, phát hiện một số mất đoạn gen nhỏ ở các hội chứng di truyền, xác định nguồn gốc của các đoạn nhiễm sắc thể chưa rõ, phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể đặc hiệu trong ung thư và các bệnh lý khác...

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật lai tại chỗ phát huỳnh quang (Fluorescence in situ hybridization - FISH) dựa trên nguyên tắc bắt cặp các trình tự gen quan tâm với đầu dò huỳnh quang theo nguyên tắc bổ sung. Các đầu dò huỳnh quang có kích thước từ 20 bp đến 1000 bp, đầu dò huỳnh quang được đánh dấu ở vùng tận cùng của nhiễm sắc thể, tâm động nhiễm sắc thể. Kết quả của quá trình lai được đánh giá bằng các tín hiệu màu xác được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang với các filter phù hợp. Ưu điểm của xét nghiệm này là cho kết quả nhanh, đặc hiệu và chính xác. Ngoài ra, FISH rất hiệu quả trong ghi nhận những mất đoạn gen nhỏ (microdeletion) hoặc xác định nguồn gốc của một số loại chuyển đoạn gen đặc biệt.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính chuyên dụng cho KT FISH;
- Lưỡi dao mổ;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;

- Đầu côn 200 μ l có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Bộ kit chứa đầu dò huỳnh quang;
- Cồn sinh học phân tử;
- Xylene;
- Rubber cement;
- Kit xử lý mẫu phục vụ cho lai tại chỗ huỳnh quang;
- Nước chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Kính hiển vi huỳnh quang;
- Kính hiển vi;
- Máy lai;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy nhuộm HE;
- Máy cắt + Bàn tải bệnh phẩm;
- Ống chuyên dụng cho kỹ thuật FISH;
- Tủ ấm;
- Tủ lạnh;
- Tủ hút hoá chất;
- Máy tính, máy in;
- Pippett các thể tích;

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu mô tươi, mẫu máu; mẫu dịch cơ thể và các loại mẫu khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu, mẫu dịch cơ thể ...).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: ví dụ họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 24 đến 30 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị.
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Quy định về an toàn hóa chất.
- Quy định về an toàn sinh học.
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Cắt tiêu bản với độ dày thích hợp lên lam chuyên dụng cho kỹ thuật FISH

4.1.2. Xử lý, bọc lộ tiêu bản

- Chuẩn bị dung dịch bọc lộ: Cho dung dịch xử lý tiêu bản vào ống chuyên dụng. Ủ dung dịch xử lý ở nhiệt độ và thời gian thích hợp tùy theo kit chuyên dụng trước khi bắt đầu xét nghiệm.

- Chuẩn bị lam kính với bệnh phẩm dày 4-5 μm , ủ lam kính ở 56 - 60°C trong 30 phút trước khi bắt đầu xét nghiệm.

- Loại paraffin bằng cách ngâm lam trong Xylene 5 phút (lặp lại 3 lần).
- Chuyển lam lần lượt sang cồn 100, 90, 70% trong 3 phút.
- Chuyển lam sang nước tinh khiết trong 3 phút.
- Ngâm lam trong dung dịch rửa trong 3 phút.
- Ngâm lam trong dung dịch xử lý theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.
- Chuyển lam sang nước tinh khiết trong 3 phút.

- Ngâm lam trong dung dịch rửa trong 3 phút.
- Loại bỏ dung dịch thừa.
- Nhỏ lên lam dung dịch chứa Protease (Protease Solution) theo dõi sự thoái biến của protein trên kính hiển vi quang học (thời gian bộc lộ tùy theo hướng dẫn của kit chuyên dụng). Khi trên màng nhân tế bào xuất hiện các lỗ nhỏ và màng nhân nở ra thì quá trình xử lý có thể dừng lại.
- Ngâm lam lần lượt trong cồn 75%, 85%, 100% trong 1 phút.
- Để khô trong 2-5 phút.

4.1.3. Lai tiêu bản với đầu dò đặc hiệu

- Nhỏ đầu dò lên lam kính và gắn lamen theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.
- Phủ mép lamen bằng nhựa cao su (rubber cement).
- Chuyển lamen vào máy lai và chọn chương trình lai phù hợp với từng loại đầu dò.
- Sau khi quá trình lai kết thúc, chuẩn bị ống chuyên dụng cho kỹ thuật FISH chứa dung dịch rửa, ủ dung dịch rửa theo hướng dẫn của kit chuyên dụng trước khi làm bước tiếp theo. Cần thận loại bỏ rubber cement, tránh làm ảnh hưởng đến mẫu.
- Ngâm lam trong dung dịch rửa sau lai ở nhiệt độ thích hợp cho đến khi lamen bong ra.
- Để khô lam tự nhiên.
- Nhỏ lên lam DAPI và đậy lamen.
- Kiểm tra tín hiệu đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu đối chứng: kiểm tra chất lượng tín hiệu huỳnh quang các mẫu đối chứng được nhuộm kèm. Kết quả đối chứng đạt sẽ tiếp tục phân tích kết quả mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Đọc và nhận định kết quả
 - + Đánh giá tín hiệu huỳnh quang các tế bào nội chứng.
 - + Đánh giá tín hiệu huỳnh quang trên các tế bào u theo tiêu chí đưa ra của bộ kit.
 - + Kết luận những thay đổi về mặt nhiễm sắc thể của mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.

- + Bàn luận một số trường hợp đặc biệt.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết và lưu trữ hồ sơ theo “quy trình trả kết quả” và “quy trình lưu trữ hồ sơ”.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Cắt lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Fluorescence *in situ* hybridization. *Nat Methods* **2**, 237-238 (2005).
<https://doi.org/10.1038/nmeth0305-237>

33. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền (nếu có) bằng phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) với khuôn ban đầu là RNA, phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật RT-PCR là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm kết hợp giữa sao chép ngược (phiên mã ngược) RNA thành DNA bổ sung (cDNA) và khuếch đại các mục tiêu DNA cụ thể bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Kỹ thuật này gồm 2 bước cơ bản. Đầu tiên, mẫu bệnh phẩm (máu, dịch tủy) được tiến hành tách chiết RNA, các mẫu RNA đạt chất lượng được thực hiện phản ứng phiên mã ngược nhằm tổng hợp sợi cDNA. Sau đó, sản phẩm cDNA tiếp tục được làm khuôn cho bước PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại các gen mong muốn. Sự có mặt hay không có mặt của gen mong muốn được phân tích thông qua kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết RNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ RNA	
Kit tổng hợp cDNA	
Hóa chất cho phản ứng PCR	
Các cặp mồi đặc hiệu	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	
Agarose	

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μL đến 1000 μL ;
- Tủ lạnh 2°C-8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông EDTA. Bảo quản mẫu ở 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử..

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết RNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ RNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp môi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%

- Khi trương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên gel agarose

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng sản phẩm PCR trên bản điện di và kích thước theo lý thuyết của các cặp mồi sử dụng và thang DNA chuẩn:
 - + Nếu sản phẩm PCR có băng duy nhất (đặc hiệu), đúng kích thước lý thuyết: mẫu dương tính.
 - + Nếu sản phẩm PCR không có băng ở vị trí kích thước theo lý thuyết: mẫu âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Quá trình điện di có thể bị thủng giếng, trôi mẫu, tràn mẫu sang giếng khác	▪ Khi nhỏ mẫu để đầu côn ở phía trên bề mặt giếng tách, không cắm đầu côn sâu vào giếng tách.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Các mẫu đối chứng đạt yêu cầu khi:

- Đối chứng dương: phải có băng sản phẩm đặc hiệu đúng kích thước.
- Đối chứng âm: không được lên băng có kích thước trùng với loại đột biến tương ứng.
- Chứng H₂O: phải không có băng sản phẩm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bachman J. Reverse-transcription PCR (rt-PCR). In Methods in enzymology 2013; 530: 67-74
2. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science. 2005;109(4):365-79.
3. Rio DC. Reverse transcription-polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Protocols. 2014;2014(11):pdb-rot080887.
4. Frech B, Peterhans E. RT-PCR: 'background priming' during reverse transcription. Nucleic acids research. 1994; 22(20):4342.
5. Haddad F, Baldwin KM. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. RT-PCR Protocols: Second Edition. 2010:261-70.

34. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX RT-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền (nếu có) bằng phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) với khuôn ban đầu là RNA, phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật RT-PCR là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm kết hợp giữa sao chép ngược (phiên mã ngược) RNA thành DNA bổ sung (cDNA) và khuếch đại các mục tiêu DNA cụ thể bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Kỹ thuật này gồm 2 bước cơ bản. Đầu tiên, mẫu bệnh phẩm (máu, dịch tủy) được tiến hành tách chiết RNA, các mẫu RNA đạt chất lượng được thực hiện phản ứng phiên mã ngược nhằm tổng hợp sợi cDNA. Sau đó, sản phẩm cDNA tiếp tục được làm khuôn cho bước PCR sử dụng ≥ 2 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đồng thời nhiều gen mong muốn. Sự có mặt hay không có mặt của gen mong muốn được phân tích thông qua kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết RNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ RNA	
Kit tổng hợp cDNA	
Hóa chất cho phản ứng PCR	
Các cặp mồi đặc hiệu	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Agarose	
Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết RNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ RNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.
- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên gel agarose

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng sản phẩm PCR trên bản điện di và kích thước theo lý thuyết của các cặp mồi sử dụng và thang DNChuẩn:
 - + Nếu sản phẩm PCR có băng/các băng DNA đặc hiệu, đúng kích thước lý thuyết: mẫu dương tính.
 - + Nếu sản phẩm PCR không có băng ở vị trí kích thước theo lý thuyết: mẫu âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Quá trình điện di có thể bị thủng giếng, trôi mẫu, tràn mẫu sang giếng khác	▪ Khi nhỏ mẫu để đầu côn ở phía trên bề mặt giếng tách, không cắm đầu côn sâu vào giếng tách.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Các mẫu đối chứng đạt yêu cầu khi:

- Đối chứng dương: phải có băng sản phẩm đặc hiệu đúng kích thước.
- Đối chứng âm: không được lên băng có kích thước trùng với loại đột biến tương ứng.
- Chứng H₂O: phải không có băng sản phẩm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bachman J. Reverse-transcription PCR (rt-PCR). In Methods in enzymology 2013; 530: 67-74
2. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science. 2005;109(4):365-79.
3. Rio DC. Reverse transcription-polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Protocols. 2014;2014(11):pdb-rot080887.
4. Frech B, Peterhans E. RT-PCR: 'background priming' during reverse transcription. Nucleic acids research. 1994; 22(20):4342.
5. Haddad F, Baldwin KM. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. RT-PCR Protocols: Second Edition. 2010:261-70.

35. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT LR-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền (nếu có) bằng phản ứng khuếch đại chuỗi dài LR-PCR (Longrange - Polymerase Chain Reaction), phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

LR-PCR là kỹ thuật khuếch đại các DNA có kích thước lớn. Nguyên lý của kỹ thuật là dựa trên phản ứng PCR hiệu suất cao, sử dụng nhiều loại enzym để tổng hợp đoạn DNA chuỗi dài, kích thước lên đến trên 10kb. Sản phẩm PCR này được phát hiện trên hệ thống điện di agarose.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Hóa chất cho phản ứng PCR	
Các cặp mồi đặc hiệu	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	
Agarose	
Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bộ lưu điện;
- Máy điện di;

- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L ;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp môi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bảo quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên gel agarose

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.

- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.

- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.

- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.

- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng sản phẩm PCR trên bản điện di và kích thước theo lý thuyết của các cặp môi sử dụng và thang DNA chuẩn:

+ Nếu sản phẩm PCR có băng/các băng DNA đặc hiệu, đúng kích thước lý thuyết: mẫu dương tính

+ Nếu sản phẩm PCR không có băng ở vị trí kích thước theo lý thuyết: mẫu âm tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Quá trình điện di có thể bị thủng giếng, trôi mẫu, tràn mẫu sang giếng khác	▪ Khi nhỏ mẫu để đầu côn ở phía trên bề mặt giếng tách, không cắm đầu côn sâu vào giếng thạch.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Các mẫu đối chứng đạt yêu cầu khi:

- Đối chứng dương: phải có băng sản phẩm đặc hiệu đúng kích thước.
- Đối chứng âm: không được lên băng có kích thước trùng với loại đột biến tương ứng.
- Chứng H₂O: phải không có băng sản phẩm

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Benkel BF, Fong Y. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 1996;13(5):123-7.
2. Davies PA, Gray G. Long-range PCR. *PCR Mutation Detection Protocols*. 2002:51-5.
3. Hogrefe HH, Borns MC. Long-range PCR with a DNA polymerase fusion. *PCR Protocols*. 2011:17-23.
4. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*. 2022 Jun 1;197:130-43.
5. Waggott W. Long range PCR. *Clinical Applications of PCR*. 1998:81-91.

36. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH METHYL HÓA BẰNG KỸ THUẬT PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm xác định tình trạng methyl hóa bằng phương pháp PCR để kiểm tra tình trạng methyl hóa các gen ức chế ung thư, có ý nghĩa trong lâm sàng.

1.2. Định nghĩa/ nguyên lý

- Nguyên lý của kỹ thuật PCR là nhân lên hàng triệu lần một đoạn DNA chọn lọc trong thời gian ngắn trong môi trường in vitro giống như quá trình phân bào. Đây là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu và tính chính xác cao, có ý nghĩa to lớn trong y học và sinh học phân tử, giúp hiểu hơn về gen và các bệnh lý liên quan tới gen.

- Quá trình methyl hóa DNA xảy ra trên các gốc cytosine, đặc biệt là trên các dinucleotide CpG được làm giàu ở các vùng DNA nhỏ (<500 bp). Những vùng này có hàm lượng GC lớn hơn 55% được gọi là đảo CpG.

- Trạng thái methyl hóa của trình tự DNA có thể được xác định tốt nhất bằng cách sử dụng natri bisulfit. Việc ủ DNA mục tiêu bằng natri bisulfit dẫn đến chuyển đổi các gốc cytosine không được methyl hóa thành uracil, khiến các cytosine bị methyl hóa không thay đổi. Do đó, việc xử lý bằng bisulfite sẽ tạo ra các trình tự DNA khác nhau đối với DNA bị methyl hóa và không được methyl hóa.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Đầu tip 10 µL có lọc;
- Đầu tip 20 µL có lọc;
- Đầu tip 100 µL có lọc;
- Đầu tip 1000 µL có lọc;
- Ống falcon 50 mL;

- Ống đựng mẫu 1,7mL, chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dùng cho định lượng DNA bằng phương pháp huỳnh quang;
- Găng tay không bột chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Khẩu trang y tế;
- Mũ giấy;
- Pipet nhựa 10 mL;
- Hộp lưu mẫu 81 vị trí;
- Dao mổ lưỡi bầu;
- Bộ hóa chất tách DNA;
- Hóa chất loại paraffin;
- Hóa chất định lượng DNA theo phương pháp huỳnh quang;
- Bộ hóa chất xử lý bisulfite;
- Hóa chất chạy phản ứng PCR;
- Cồn tuyệt đối chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Nước chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Agarose;
- Đệm TBE 10X;
- Chất nhuộm DNA dùng cho điện di;
- Hóa chất gắn sản phẩm PCR;
- Thang chuẩn DNA;
- Cồn 70°.

2.3. Trang thiết bị

- Giá giữ lạnh ống PCR;
- Bộ pipet kèm giá đỡ;
- Thiết bị trợ hút pipet thủy tinh tự động;
- Máy ly tâm lắng mẫu nhanh;
- Máy ly tâm lạnh tách mẫu để bàn;
- Máy lắc rung trộn mẫu;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy định lượng DNA bằng phương pháp huỳnh quang;
- Máy nhân gen tốc độ cao;

- Tủ mát bảo quản mẫu;
- Tủ lạnh sâu -30°C;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Bộ nguồn và bể điện di;
- Máy chụp ảnh gel điện di;
- Cân phân tích;

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu mô cố định formalin vùi paraffin, mô tươi, mẫu máu toàn phần.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Khoảng 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.

- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm xác định tình trạng methyl hóa bằng phương pháp PCR.

4.1.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc.
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết

4.1.3. Chuẩn bị mẫu DNA

Bước 1: Thu mẫu (với mẫu cố định formalin vùi paraffin).

Dùng dao cắt phần mô chứa nhiều tế bào u, chuyển vào ống ly tâm 1,7 mL.

Bước 2: Loại paraffin (với mẫu cố định formalin vùi paraffin).

Sử dụng xylene: Thêm xylene, trộn đều trong 10 giây. Ly tâm $20.000 \times g$ trong 2 phút và loại dịch nổi. Rửa lại bằng ethanol 96-100% với thao tác tương tự.

Sử dụng hoá chất loại paraffin: Thêm hoá chất loại paraffin, trộn đều trong 10 giây và ủ 56°C trong 10 phút.

Bước 3: Ly giải tế bào

Thêm dung dịch đệm phân tách mô, trộn đều trong 10 giây. Bổ sung enzym phân hủy protein (proteinase K). Ủ 56°C trong 1-3 giờ hoặc đến khi tế bào bị ly giải hoàn toàn, ủ tiếp 90°C trong 1 giờ.

Bước 4: Cố định DNA lên cột và loại tạp chất

Thêm dung dịch đệm phá màng tế bào, bổ sung ethanol 96-100% hoặc isopropanol và trộn đều bằng vortex. Chuyển toàn bộ dịch ly giải tế bào lên cột thu acid nucleic, ly tâm $10.000 \times g$ trong 1 phút, chuyển cột lên ống 1,7 mL sạch khác.

Bước 5: Rửa cột.

Thêm đệm rửa, đẩy nắp và ly tâm $10.000 \times g$ trong 1 phút, loại dịch. Lặp lại bước rửa. Ly tâm $20.000 \times g$ trong 3 phút để làm khô màng của cột.

Bước 6: Rửa giải cột và thu DNA.

Chuyển cột lên ống ly tâm 1,7 mL sạch (đã cắt bỏ nắp), thêm đệm thu DNA vào chính giữa màng, ủ 1-5 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm $20.000 \times g$ trong 1 phút.

Bước 7: Xác định hàm lượng DNA bằng phương pháp huỳnh quang.

4.1.4. Thực hiện bisulfite

Bước 1: Bổ sung 800 μL nước vào hóa chất methyl hoá, vortex trong 5 phút để hòa tan hoàn toàn.

Bước 2: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Bước 3: Thực hiện phản ứng trên máy PCR theo chương trình được cài đặt.

Sau khi kết thúc, ly tâm nhẹ để lắng mẫu dưới đáy ống. Chuyển sang ống ly tâm 1,7 mL.

Bước 4: Bổ sung chất mang RNA vào đệm ly giải, đảm bảo nồng độ 10 µg/mL, trộn đều.

Bước 5: Bổ sung 310 µl đệm ly giải đã có chất mang RNA vào từng ống, trộn đều và ly tâm nhẹ để lắng mẫu.

Bước 6: Bổ sung 250 µl vào mỗi mẫu, vortex 15 giây, ly tâm nhẹ để lắng mẫu.

Bước 7: Chuyển toàn bộ dung dịch sang cột methyl hoá, ly tâm cột với tốc độ tối đa trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới.

Bước 8: Bổ sung 500 µl đệm rửa vào từng cột, ly tâm cột với tốc độ tối đa trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới.

Bước 9: Bổ sung 500 µl đệm khử sulfat vào từng cột, ủ cột tại nhiệt độ phòng trong 15 phút ly tâm cột với tốc độ tối đa trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới.

Bước 10: Bổ sung 500 µl đệm rửa vào từng cột, ly tâm cột với tốc độ tối đa trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới. Lặp thêm 1 lần nữa.

Bước 11: Chuyển cột sang ống mới, ly tâm với tốc độ tối đa trong 1 phút để làm khô cột. Có thể làm khô bằng cách ủ tại nhiệt độ 56°C trong vòng 5 phút.

Bước 12: Chuyển cột sang ống mới, bổ sung 20 µl dung dịch thu DNA, ly tâm với tốc độ 15000 x g trong 1 phút để thu DNA.

4.1.5. Thực hiện phản ứng PCR

Bước 1: Ghi tên các ống theo thứ tự.

Bước 2: Chuẩn bị phản ứng PCR: Mẫu DNA + master mix theo nồng độ khuyến cáo và hướng dẫn sử dụng của kit.

Bước 3: Chuyển ống vào máy PCR và chạy chương trình theo hướng dẫn nhà sản xuất.

4.1.6. Điện di sản phẩm PCR và chụp gel

Bước 1: Đổ bản gel agarose 3%.

Bước 2: Gắn bể điện di với bộ nguồn.

Bước 3: Đặt bản gel agarose vào trong máy theo đúng chiều âm (-) đến dương (+), đổ dung dịch đệm ngập bản gel.

Bước 4: Tra thang chuẩn (kích thước thang chuẩn phụ thuộc vào kích thước cần phát hiện của mẫu, theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

Bước 5: Trộn mẫu với một thuốc nhuộm phù hợp và tra mẫu vào giếng. Lưu ý tra nhẹ nhàng, tránh làm vỡ giếng gel.

Bước 6: Đặt nắp máy điện di, cắm điện. Bật công tắc máy điện di. Thời gian và hiệu điện thế được cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả từ quá trình PCR được phân tích tùy theo mục đích sử dụng và dựa theo hướng dẫn phân tích của từng bộ kit xét nghiệm.

- Trong quá trình phân tích kết quả, trước hết cần kiểm tra chứng dương, chứng âm. Sau đó, tiến hành phân tích mẫu nếu chứng dương, chứng âm đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn	Thực hiện lấy lại mẫu. Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng	Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình. Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Mẫu đối chứng không đạt	Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm. Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.

Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích	Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm. Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết.
---	---

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả	Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận Thực hiện lại quy trình trả kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).
- Bảo dưỡng máy định kỳ hàng ngày, hàng tuần và hàng tháng theo quy định.
- Hóa chất, vật tư trước khi đưa vào sử dụng cần được kiểm tra/đánh giá theo quy định, đảm bảo chất lượng và đủ cơ số hóa chất, vật tư để thực hiện xét nghiệm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành huyết học - Truyền máu miễn dịch - Di truyền - Sinh học phân tử, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 2014.
2. Phạm Hùng Vân, Real-time PCR và PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp, Nhà xuất bản y học, 2009.
3. Trường đại học y Hà Nội, Bài giảng y sinh học phân tử, Nhà xuất bản Y học, 2023.
4. Nguyễn Thị Hồng Gấm và cộng sự, Ứng dụng PCR đặc hiệu methyl hóa phát hiện methyl hóa gen DAPK và RASSF1A trong mẫu máu người bệnh ung thư vòm mũi họng, Journal of Science technology, 2018.
5. Hernán G. Hernández, et al, Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis, future science, 2013.
6. Šárka Šestáková, et al, DNA Methylation Validation Methods: a Coherent Review with Practical Comparison, Biomed central, 2019.

37. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH METHYL HÓA BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm nhằm đánh giá, xác định tình trạng methyl hóa của gen bằng phương pháp Real-time, hỗ trợ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Methyl hóa DNA là hiện tượng gắn thêm gốc methyl (CH₃) vào vị trí 5' C của nucleotide. Methyl hóa DNA được chia thành 2 loại: Methyl hóa dưới mức và methyl hóa quá mức. Methyl hóa DNA dưới mức trong ung thư thường xảy ra tại các trình tự lặp lại, yếu tố vận động Alu hay LINE1, vùng DNA vệ tinh α gần tâm động. Kết quả là thúc đẩy sự vận động của các yếu tố di truyền, tăng khả năng sắp xếp lại hệ gen và phát sinh khối u. Methyl hóa quá mức vùng promoter là cơ chế phổ biến gây bất hoạt các gen ức chế khối u, xuất hiện ở nhiều loại ung thư thể rắn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người

2.2. Vật tư

- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Ống nghiệm lấy mẫu máu K2 EDTA;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Đầu côn 10 μ l có lọc;
- Đầu côn 20 μ l có lọc;
- Đầu côn 200 μ l có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 0,2 mL tiệt trùng;
- Dải ống PCR 0,2mL;
- Bộ kit xác định methly hóa DNA bằng RT-PCR;

- Kit xử lý Bisulfite;
- Ống chuyên dụng 0,5 mL đo nồng độ DNA;
- Kit xác định nồng độ DNA;
- Xylene;
- Cồn chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Nước chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Kính hiển vi;
- Máy nhuộm HE;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy cắt + Bàn tải bệnh phẩm;
- Tủ ẩm;
- Tủ lạnh;
- Tủ hút hoá chất;
- Bàn sấy tiêu bản;
- Máy Vortex;
- Máy Spin down;
- Tủ An toàn sinh học;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Máy li tâm;
- Máy real-time PCR;
- Pippett các thể tích.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE), mẫu mô, mẫu máu, dịch cơ thể hay các loại mẫu khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: Đảm bảo đủ số lượng tế bào u đã được đánh giá trước đó trên tiêu bản đã nhuộm H&E.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu, mẫu dịch cơ thể...).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: ví dụ họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 24 đến 30 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị.
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Quy định về an toàn hóa chất.
- Quy định về an toàn sinh học.
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách chiết DNA tổng số và xác định nồng độ DNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA tinh sạch theo Kit tách chuyên dụng
- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng kit chuyên dụng;
- Lấy các mẫu đã tách chuẩn bị cho xử lý bisulfite.

4.1.2. Xử lý bisulfite với DNA tổng số

- Quá trình xử lý bisulfite là một chuỗi phản ứng hóa học của sodium bisulfite (HSO_3^-) xảy ra trên sợi đơn của DNA ở nhiệt độ cao và pH thấp bao gồm 3 bước chính:

- (1) Phản ứng Sulfo hóa tại vị trí C số 5 của Cytosine;
- (2) Loại bỏ nhóm amin.
- (3) Loại sulfo của nhóm alkali.

4.1.3. Thực hiện phản ứng Realtime-PCR

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng với các thành phần dựa trên hướng dẫn của bộ kit.

- Cài đặt chu trình nhiệt của máy PCR.
- Nạp hỗn hợp phản ứng vào máy PCR.
- Chạy máy và phân tích kết quả dựa trên phần mềm phân tích.

4.2. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu đối chứng.
- Đọc và nhận định kết quả.
- + Đánh giá kết quả các DNA nội chứng.
- + Đánh giá mức độ methyl hóa trình tự đích.
- + Kết luận và bàn luận một số trường hợp đặc biệt.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết và lưu trữ hồ sơ theo “quy trình trả kết quả” và “quy trình lưu trữ hồ sơ”.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng.
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích.
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Hernandez H.G, et al., Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis, future science, 2013.
4. Phạm Hùng Vân, Real-time PCR và PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp, Nhà xuất bản y học, 2009.

38. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen bằng kỹ thuật digital-PCR

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật digital-PCR là một biến thể của kỹ thuật realtime-PCR. Trong đó, ngoài việc sử dụng cặp mồi để khuếch đại vùng DNA đích cần phân tích thì kỹ thuật còn sử dụng đầu dò đánh dấu huỳnh quang để phát hiện sản phẩm nhân lên theo thời gian thực. Kỹ thuật digital-PCR cho phép thực hiện các phản ứng PCR với từng đoạn DNA đích riêng rẽ với độ phân giải cao. Do đó, các biến thể di truyền có thể được phát hiện ở tần suất thấp. Kỹ thuật này phù hợp với việc phát hiện sớm các biến thể gen ung thư.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000 μ L vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);

- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μ L;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy digital-PCR và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm đủ điều kiện để thực hiện kỹ thuật di truyền và sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Mẫu DNA có thể bảo quản ở -20°C trong thời gian dài, trước khi thực hiện xét nghiệm.

4.1.3. Thực hiện phản ứng digital PCR

- Lấy Primers và Probes trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.

- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng ddPCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.
- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các giếng trong đĩa ddPCR.
- Trộn đều từng giếng bằng pipet, tránh tạo bọt.
- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alcaide, M. et al. (2020). Evaluating quantity, quality and size distribution of cfDNA by multiplex ddPCR. *Scientific Reports*, 10:12564.
2. Wainman LM, Sathyanarayana SH, Lefferts JA. Applications of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Molecular and Clinical Testing. *J Appl Lab Med*. 2024 Jan 3;9(1):124-137.
3. Guo, Y., Charoenkwan, P., Traisrisilp, K., et al. (2025). Application of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT). *Biomolecules*, 15(3):360.

39. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN BẰNG KỸ THUẬT DIGITAL-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể của gen hoặc của nhiều gen bằng kỹ thuật digital-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Kỹ thuật digital-PCR là một biến thể của kỹ thuật realtime-PCR. Trong đó, ngoài việc sử dụng cặp mồi để khuếch đại vùng DNA đích cần phân tích thì kỹ thuật còn sử dụng đầu dò đánh dấu huỳnh quang để phát hiện sản phẩm nhân lên theo thời gian thực. Kỹ thuật digital-PCR cho phép thực hiện các phản ứng PCR với từng đoạn DNA đích riêng rẽ với độ phân giải cao. Do đó, các biến thể di truyền có thể được phát hiện ở tần suất thấp. Kỹ thuật này phù hợp với việc phát hiện sớm các biến thể gen ung thư.

- Với việc phối hợp nhiều cặp mồi đặc hiệu cho các gen (hoặc đoạn DNA) đích và đánh dấu đầu dò bằng các màu huỳnh quang khác nhau. Kỹ thuật này cho phép phân tích cùng lúc nhiều biến thể của một gen hoặc nhiều gen trong cùng một phản ứng PCR.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Master mix cho phản ứng PCR	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000 μ L vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy digital-PCR và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-16 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Mẫu DNA có thể bảo quản ở -20°C trong thời gian dài, trước khi thực hiện xét nghiệm.

4.1.3. Thực hiện phản ứng digital PCR

- Lấy các cặp mồi và đầu dò huỳnh quang trong tủ đông, làm tan bằng cách để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Trộn đều các hóa chất cần dùng bằng máy vortex rồi ly tâm 1000 rcf trong 30 giây, đặt trên khay lạnh.

- Điền thông tin mẫu cần PCR kỹ thuật số vào phiếu PCR.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng ddPCR Master Mix trong ống nghiệm 1,5 mL với thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn bằng máy vortex, rồi ly tâm nhẹ bằng máy spindown.
- Dùng pipet chia đều cho mỗi phản ứng vào các giếng trong đĩa ddPCR.
- Trộn đều từng giếng bằng pipet, tránh tạo bọt.
- Cài đặt chương trình chạy theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị PCR.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Xuất kết quả từ máy chạy và nhập vào công thức tính.
- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các đối chứng (IC) trong phản ứng đạt yêu cầu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã

▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
--	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alcaide, M. et al. (2020). Evaluating quantity, quality and size distribution of cfDNA by multiplex ddPCR. Scientific Reports, 10:12564.
2. Wainman LM, Sathyanarayana SH, Lefferts JA. Applications of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Molecular and Clinical Testing. J Appl Lab Med. 2024 Jan 3;9(1):124-137.

40. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MS-MLPA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng bản sao tương đối và trạng thái methyl hóa của các biến thể số lượng bản sao (Copy number variations - CNV) có kích thước dưới 60 Nucleotid trong một phản ứng multiplex PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Biến thể số lượng bản sao (Copy number variations - CNV) và biến đổi methyl hóa trong DNA ở hệ gen người được coi là nguyên nhân của một số lượng lớn các bệnh lý.

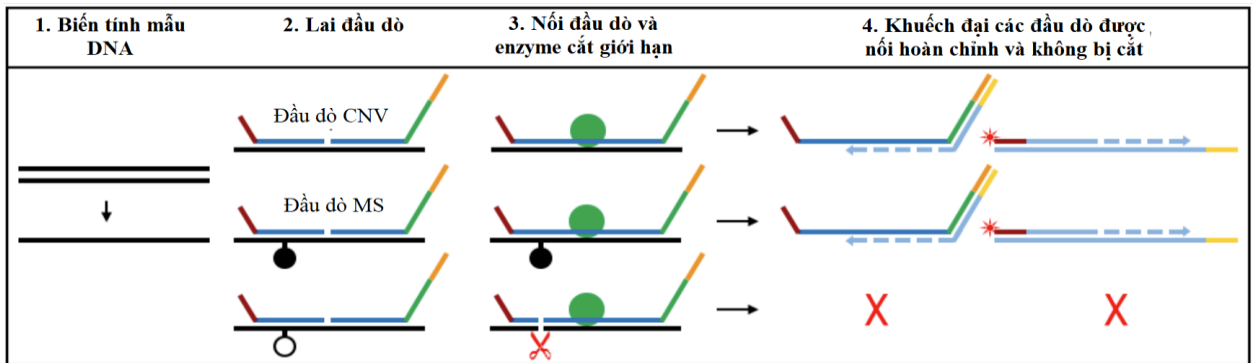
Kỹ thuật MS-MLPA được thực hiện dựa trên sự khuếch đại của các đầu dò (tối đa 60 đầu dò) đặc hiệu với một trình tự DNA có độ dài khoảng 60 Nucleotid (Hình 1). Kết quả của MS-MLPA là một tập hợp các amplicons PCR đặc hiệu có chiều dài từ 64 - 500 nt được phân tách bằng điện di mao quản.

Sau bước biến tính lần đầu tiên của DNA mẫu bệnh phẩm, một hỗn hợp các đầu dò MS-MLPA được thêm vào trong mẫu bệnh phẩm. Nhìn chung, mỗi đầu dò MS-MLPA bao gồm hai phân tử oligonucleotide có khả năng lai trực tiếp vào hai trình tự DNA mục tiêu liền kề nhau để được nối thành một đầu dò duy nhất. Trong các phản ứng PCR tiếp theo, tất cả các đầu dò đã được nối với nhau sẽ được khuếch đại đồng thời sử dụng cùng một cặp mồi PCR, tạo ra một tập hợp các trình tự PCR duy nhất. Một đoạn mồi PCR được dán nhãn huỳnh quang, cho phép các sản phẩm khuếch đại được hiển thị trong quá trình phân tách trên thiết bị điện di mao quản. Sự phân tách của các đoạn sẽ tạo ra đồ thị tín hiệu đặc hiệu cho mẫu: đỉnh tín hiệu của mẫu (Hình 2, ở trên cùng).

Để xác định được cả số lượng bản sao và tình trạng methyl hóa của DNA đích, hỗn hợp đầu dò MS-MLPA chứa một vài đầu dò đặc hiệu với quá trình methyl hóa. Chúng được thiết kế để nhắm mục tiêu vào trình tự DNA có chứa vị trí được nhận diện bởi enzyme HhaI - một enzyme giới hạn nhạy cảm với sự methyl hóa. Sau khi lai mẫu dò, phản ứng MS-MLPA được chia thành 2 phần. Một phần phản ứng MS-MLPA được tiến hành như phản ứng MLPA bình thường như trình bày ở trên, đưa ra thông tin về số lượng bản sao của DNA

đích, phần còn lại được xử lý bằng enzyme HhaI, sẽ cho biết về trạng thái methyl hóa của DNA đích (Hình 1).

Khi lai với DNA đích không bị methyl hóa, các đầu dò đặc hiệu methyl được nối và đồng thời sẽ ngay lập tức bị cắt bởi enzyme HhaI (Hình 1, dưới cùng). Đầu dò methyl hóa bị cắt sẽ không tạo ra được đỉnh tín hiệu bởi nó không được khuếch đại. Ngược lại, khi một trình tự đích của đầu dò MS-MLPA bị methyl hóa, nhóm methyl sẽ ngăn chặn enzyme cắt HhaI (Hình 1, giữa). Đầu dò được nối và không bị cắt sẽ được khuếch đại trong phản ứng PCR, kết quả là tạo ra đỉnh tín hiệu bình thường.



Hình 1. Phản ứng MS-MLPA

Hình 1: Phản ứng MS-MLPA

MS-MLPA là một kỹ thuật định lượng tương đối: khác biệt khi so sánh giữa các đỉnh tín hiệu MS-MLPA giữa các mẫu DNA chỉ là tương đối. Chiều cao tương đối của mỗi đỉnh tín hiệu đầu dò được so sánh với chiều cao tương đối của đỉnh tín hiệu các mẫu DNA tham chiếu, phản ánh một cách tương đối số lượng bản sao của trình tự DNA đích tương ứng. Vì vậy, việc chạy các mẫu tham chiếu cùng với mẫu bệnh phẩm trong mỗi quá trình thực hiện là điều cần thiết.

So sánh đỉnh tín hiệu của các phản ứng MS-MLPA không bị enzyme cắt tác động cho phép phát hiện sự thay đổi số lượng bản sao (Hình 2 A và B - trên cùng). So sánh đỉnh tín hiệu của các phản ứng bị tác động bởi enzyme cắt cho biết tình trạng methyl hóa bất thường của trình tự DNA đích (Hình 2A và B - hàng dưới cùng).

Tính toán số lượng bản sao:

Đồ thị tín hiệu của mẫu bệnh phẩm A - không bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía trên bên phải) được so sánh với đồ thị tín hiệu của mẫu tham chiếu 1 - không bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía trên bên trái). Mẫu bệnh phẩm A

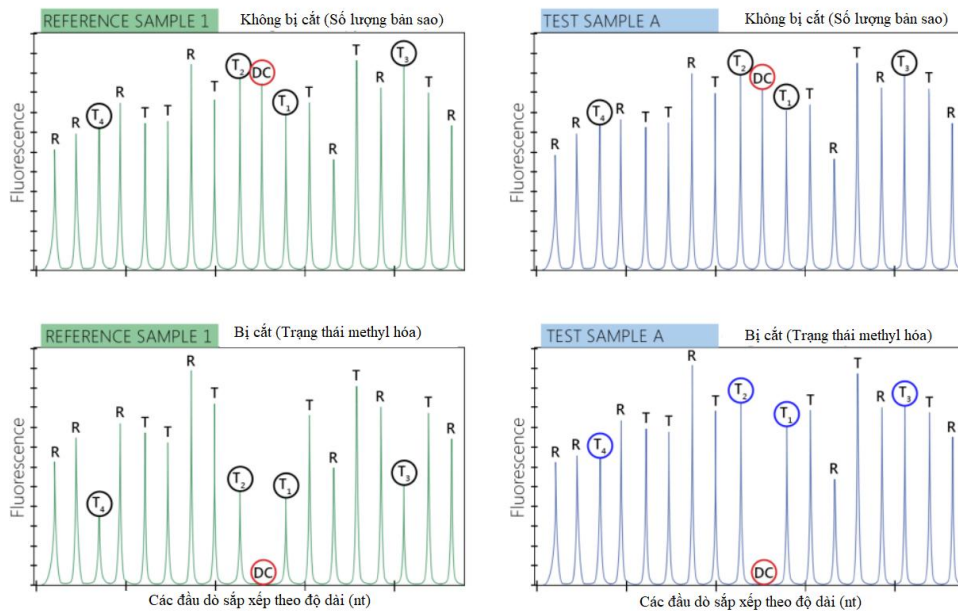
hiển thị đỉnh tín hiệu giống với mẫu tham chiếu, chỉ ra rằng không có sự thay đổi về số lượng bản sao. Điều này có thể thấy rõ hơn ở biểu đồ tỉ số đầu dò, hiển thị trên phần mềm Coffalyser.Net, các đầu dò được sắp xếp theo thứ tự trên nhiễm sắc thể (Hình 2.B, phía trên).

Tính toán tình trạng methyl hóa:

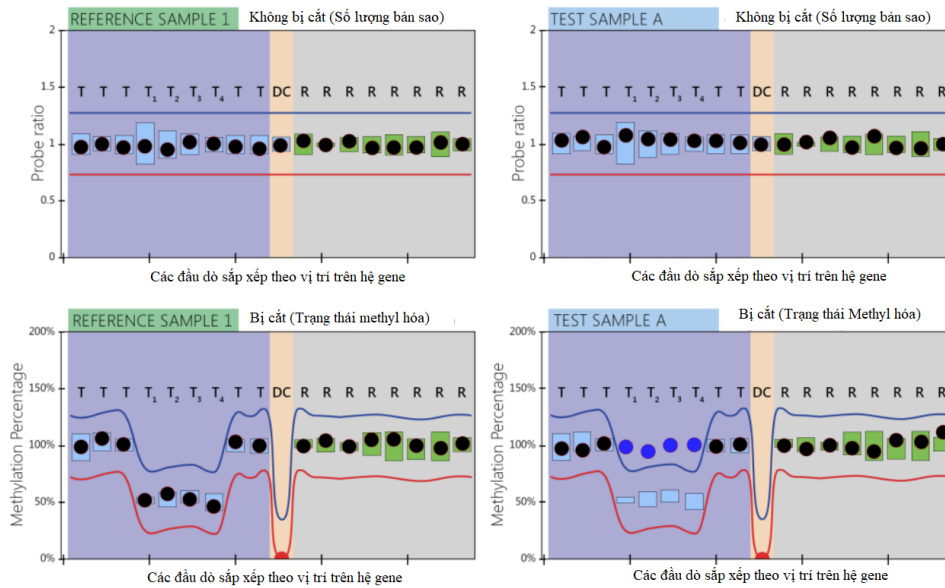
Đồ thị tín hiệu của mẫu bệnh phẩm A - bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía dưới bên phải) được so sánh với mẫu bệnh phẩm A - không bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía trên phải). Tương tự, đồ thị tín hiệu của mẫu tham chiếu 1 - bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía dưới trái) được so sánh với tín hiệu của mẫu tham chiếu - không bị cắt bởi enzyme (Hình 2.A, phía trên trái).

Mẫu bệnh phẩm A - bị cắt bởi enzyme cho thấy 4 đầu dò ở vị trí nhận biết của enzyme HhaI (đánh số 1-4 và khoanh tròn màu xanh) có đỉnh tín hiệu giống với mẫu bệnh phẩm A - không bị cắt bởi enzyme giới hạn. Mẫu tham chiếu - bị cắt bởi enzyme giới hạn cho thấy 4 đầu dò này giảm tín hiệu so với mẫu tham chiếu - không bị cắt bởi enzyme giới hạn. Khi được hiển thị trên phần mềm Coffalyser.Net, kết quả cho thấy 4 đầu dò này bị methyl hóa 100% ở mẫu bệnh phẩm và 50% ở mẫu tham chiếu (Hình B, bên dưới).

A. Tín hiệu điện di mao quản



B. Kết quả hiển thị trên phần mềm Coffalyser.Net



Hình 2: Kết quả hiển thị MS-MLPA

Tình trạng methyl hóa của vùng dấu ấn gen được xác định bởi 4 đầu dò nhạy cảm methyl hóa có tín hiệu khác biệt ở mẫu bệnh phẩm A so với mẫu tham chiếu từ những người khỏe mạnh. Đầu dò chúng (bị enzyme cắt) - DC phát hiện một trình tự thường không methyl hóa trên mẫu DNA tách chiết từ máu, đầu dò này được sử dụng để kiểm tra sự hoạt động của enzyme HhaI. Đồ thị tín hiệu và kết quả trên Coffalyser.Net của mẫu bệnh phẩm và mẫu tham chiếu đều cho thấy sự mất tín hiệu của đầu dò DC.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống, dải hoặc đĩa PCR 0,2 mL.
- Ống thu mẫu 1,5mL chống bám dính và không nhiễm RNase (bền tại 98°C).
- Pipet đơn kênh dải thể tích 0,1-2,5 μ L; 2-20 μ L; 20-20 μ L; 100-1000 μ L.
- Pipet đa kênh dải thể tích 10 - 100 μ L; 30 -300 μ L.
- Đầu tip chống bám dính (thể tích từ 0,5 - 1000 μ L).
- Đồng hồ bấm giờ.
- Găng tay tiệt trùng không bột.

Hoá chất, sinh phẩm (Bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm).

- Nước siêu tinh khiết.
- TE0.1 (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA).
- Formamide chất lượng cao.
- Polymers:
 - + SCIEX: Gel biến tính GenomeLab™ Linear Polyacrylamide (LPA).
 - + Promega Spectrum Compact: Spectrum Compact Polymer.
- Bộ kit tách chiết DNA (tùy chọn).
- Bộ kit tinh sạch DNA tùy chọn hoặc Kit GenElute PCR Clean-Up.
- Human DNA.

2.3. Trang thiết bị

- Máy luân nhiệt hiệu chuẩn có nắp gia nhiệt (99-105°C) và thiết bị phòng thí nghiệm tiêu chuẩn.
- Thiết bị điện di mao quản với phần mềm phân tích mảnh.
 - + Applied Biosystems: Phần mềm thu thập dữ liệu nền tảng tiêu chuẩn
 - + SCIEX: GeXP Software Package
- Hệ thống dán nhãn tiêu chuẩn:
 - + Applied Biosystems: GeneScan™ 500 LIZ®/ROXTM
 - + SCIEX: CEQ™ DNA Size Standard Kit - 600
- Phần mềm phân tích Coffalyser.Net.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: Mẫu máu ngoại vi
- + Sử dụng 2 mL máu ngoại vi chống đông EDTA.
- Loại mẫu: Tiêu bản mô bệnh học đúc paraffin
- + Soi tiêu bản mô bệnh học xác định vùng lấy mô: Khoanh vùng lấy mô tương ứng với vùng soi trên tiêu bản có hình ảnh tế bào u rõ, ít tổ chức hoại tử nhất.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm: chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:

- Luôn lắc đều dung dịch đệm và hỗn hợp đầu dò đã làm tan băng, sau đó ly tâm nhanh. Tất cả các ống chứa enzym phải được ly tâm trong thời gian ngắn. Bộ đệm MLPA thường được đông lạnh ở -20°C nhưng có thể vẫn ở dạng lỏng do chứa nhiều muối.

- Trước khi sử dụng, làm ấm lọ enzym (Ligase-65, polymerase và HhaI) trong tay trong 10 giây để giảm độ nhớt.

- Dung dịch enzyme chứa 50% glycerol và ở dạng lỏng ở -20°C. Hỗn hợp mastermix có chứa enzym nên được trộn kỹ bằng cách hút lên và xuống nhẹ nhàng. Trộn không đủ có thể dẫn đến kết quả không đáng tin cậy. Khi chuẩn bị hỗn hợp chính, luôn luôn thêm enzym sau cùng. Không bao giờ xoay dung dịch chứa enzym bởi sự bất hoạt có thể xảy ra.

- Để giảm thiểu sự biến thiên của mẫu, hãy chuẩn bị lượng dung dịch hỗn hợp chính đủ lớn (5-10% thể tích số dư).

- Chuẩn bị hỗn hợp mastermix (Ligase-65 và polymerase) ở nhiệt độ phòng ngay trước khi sử dụng. Nếu chuẩn bị trước, bảo quản hỗn hợp chính trên đá hoặc ở 4°C và làm ấm chúng ở nhiệt độ phòng trước khi thêm vào các phản ứng MS-MLPA. Các đỉnh tín hiệu không đặc hiệu có thể hình thành trong phản ứng không có DNA khi hỗn hợp tổng thể ligase rất lạnh được thêm vào.

- Sử dụng pipet đa kênh để tránh bay hơi quá nhiều.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ) :72 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

4.CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Bién tính DNA (Ngày 1):

- + Dán nhãn ống, dải hoặc đĩa 0,2 mL.

+ Thêm 5 μL mẫu DNA (50-250 ng; 50-100ng là tối ưu) hoặc TE (kiểm soát không DNA) vào mỗi ống.

+ Đặt ống vào máy luân nhiệt; khởi động chương trình máy điều nhiệt MS-MLPA (Bảng 1).

+ Đảm bảo mẫu ở nhiệt độ 25°C trước khi lấy ống ra khỏi máy luân nhiệt.

- Lai đầu dò (Ngày 1):

+ Chuẩn bị master mix. Đối với mỗi phản ứng, trộn: 1,5 μL đệm MLPA (nắp màu vàng) + 1,5 μL mix đầu dò (nắp màu đen). Trộn đều bằng pipet hoặc vortex.

+ Sau khi biến tính DNA, thêm 3 μL hỗn hợp mastermix vào mỗi phản ứng. Thao tác pipet chính xác là rất quan trọng. Pha trộn bằng cách hút nhẹ nhàng lên và xuống.

+ Tiếp tục chương trình luân nhiệt với các bước 3-4.

- Phản ứng nối đầu dò và cắt:

+ Chuẩn bị một bộ đệm ligase master mix A. Đối với mỗi phản ứng, trộn: 3 μL ligase đệm A (nắp trong suốt) + 10 μL nước siêu tinh khiết. Trộn đều bằng pipet lên xuống nhẹ nhàng.

+ Chuẩn bị mastermix Ligase-65. Đối với mỗi phản ứng, trộn: 8,25 μL nước siêu tinh khiết + 1,5 μL ligase đệm B (nắp màu trắng), sau đó thêm 0,25 μL enzyme Ligase-65 (nắp màu xanh lá cây). Trộn đều bằng pipet lên xuống nhẹ nhàng.

+ Chuẩn bị mastermix ligase-digestion. Đối với mỗi phản ứng, trộn: 7,75 μL nước siêu tinh khiết + 1,5 μL ligase đệm B (nắp trắng), sau đó thêm 0,25 μL enzyme Ligase-65 (nắp xanh) + 0,5 μL enzyme SALSA HhaI (nắp xanh nhạt). Pha trộn bằng cách hút nhẹ nhàng lên và xuống.

+ Tiếp tục chương trình máy luân nhiệt với bước 5. Tháo các ống ra khỏi máy luân nhiệt.

+ Thêm 13 μL ligase buffer A master mix vào mỗi ống. Trộn đều bằng pipet lên xuống nhẹ nhàng. Tách các hỗn hợp bằng cách chuyển 10 μL toàn bộ hỗn hợp sang ống thứ hai.

+ Đặt các ống vào máy luân nhiệt. Tiếp tục chương trình tuần hoàn nhiệt bước 6.

+ Khi máy điều nhiệt ở 48°C và trong khi mẫu đang ở trong máy điều nhiệt, thêm vào 10 µL mastermix Ligase-65 trộn với phản ứng MLPA đầu tiên (kiểm tra số bản sao). Trộn đều bằng pipet lên xuống nhẹ nhàng.

+ Thêm 10 µL mastermix ligase-digestion vào phản ứng MLPA thứ hai (thử nghiệm methyl hóa). Trộn đều bằng pipet nhẹ nhàng lên và xuống.

+ Tiếp tục chương trình luân nhiệt với các bước 7-9.

Bảng 1. Chu trình nhiệt cho phản ứng MS-MLPA

Biến tính DNA		
98°C	5 phút	
25°C	Dừng	
Lai đầu dò		
95 °C	1 phút	
60 °C	16-20 giờ	
20 °C	Dừng	
Phản ứng nối đầu dò và cắt		
48 °C	Dừng	
48 °C	30 phút	
98 °C	5 phút	
20 °C	Dừng	
Phản ứng PCR		
35 chu kỳ	95 °C	30 giây
	60 °C	30 giây
	72 °C	60 giây
72 °C	20 phút	
15 °C	Dừng	

- Phản ứng PCR (Ngày 2)

+ Chuẩn bị hỗn hợp master mix polymerase. Đối với mỗi phản ứng, trộn: 3,75 µL nước siêu tinh khiết + 1 µL hỗn hợp mồi PCR SALSA (nắp màu nâu), sau đó thêm 0,25 µL SALSA polymerase (nắp màu cam). Trộn đều bằng pipet lên xuống nhẹ nhàng.

+ Ở nhiệt độ phòng, thêm 5 µL hỗn hợp chính polymerase vào mỗi phản ứng. Trộn đều bằng pipet nhẹ nhàng lên và xuống. Ngay lập tức đặt các ống

vào máy điều nhiệt và tiếp tục chương trình máy điều nhiệt theo các bước 9-11.

+ Sau phản ứng PCR, không mở ống trong cùng phòng với máy luân nhiệt. Để tránh ô nhiễm, sử dụng các micropipette khác nhau để thực hiện các phản ứng MS-MLPA và xử lý các sản phẩm PCR MS-MLPA.

+ Sản phẩm PCR có thể được bảo quản tránh ánh sáng ở 4°C trong 1 tuần. Trong thời gian dài hơn, bảo quản trong khoảng -25 °C và -15°C.

Phân tách bằng điện di mao quản

- Kích thước tiêu chuẩn, điều kiện chạy, polyme, thuốc nhuộm huỳnh quang và thể tích phản ứng PCR MS-MLPA phụ thuộc vào loại thiết bị điện di mao quản.

- Thay ống mao dẫn và polyme thường xuyên theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Polymer nhanh chóng xấu đi sau khi tiếp xúc kéo dài ở >25°C. Nếu các đỉnh tiêu chuẩn kích thước liên tục thấp và rộng, thì mao mạch hoặc polymer có thể đã bị hư hỏng.

- Sử dụng formamide chất lượng cao và bảo quản ở -20°C. Formamide có thể gây ra tình trạng acid hóa, khử purin và phân mảnh DNA khi đun nóng.

4.2. Nhận định kết quả

- Nên sử dụng phần mềm Coffalyser.Net, kết hợp với bảng Coffalyser cụ thể cho từng lô thích hợp để phân tích dữ liệu MS-MLPA. Đối với cả hai, nên sử dụng phiên bản mới nhất. Cẩm nang tham khảo Coffalyser.Net cung cấp hướng dẫn từng bước về phân tích dữ liệu MS-MLPA.

- Độ huỳnh quang tuyệt đối được đo bằng điện di mao quản cho mỗi đầu dò bị ảnh hưởng bởi nhiều biến số và không thể sử dụng trực tiếp. Sự phát huỳnh quang của mỗi đầu dò trước tiên phải được chuẩn hóa trong mỗi phản ứng (cả phản ứng không bị enzyme cắt và bị cắt). Để tính toán số lượng bản sao, các tín hiệu thăm dò tương đối từ phản ứng chưa bị cắt của mẫu tham chiếu được so sánh với phản ứng không bị cắt của các mẫu tham chiếu. Sau đó, sự so sánh này cho phép xác định số lượng bản sao tương đối của các trình tự đích trong một mẫu.

- Để tính toán trạng thái methyl hóa, tín hiệu của mỗi đầu dò trong phản ứng phân cắt sau đó được so sánh với tỷ lệ thu được trong phản ứng không phân cắt tương ứng. Tỷ lệ này có thể được nhân với 100 để đưa ra phần trăm

methyly hóa. Cuối cùng, tỷ lệ phần trăm methyly hóa trong mẫu bệnh phẩm được so sánh với tỷ lệ phần trăm trong các mẫu tham chiếu. Coffalyser.Net chọn phương pháp phân tích tốt nhất cho từng hỗn hợp đầu dò MS-MLPA và cung cấp khả năng kiểm soát chất lượng chuyên sâu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Giá trị OD_{260/230} thấp.
- + Tinh sạch lại DNA.
- + Đảm bảo hiệu chuẩn máy đo quang phổ bằng dung dịch đệm thích hợp.
- Nồng độ DNA đầu vào quá cao hoặc thấp.
- + Đảm bảo gDNA hoàn toàn ở trong dung dịch bằng cách hút lên và xuống. Nếu cần, ủ ở 37°C trong 30 phút. Nếu nồng độ gDNA > 350 ng/μL, pha loãng 1 : 2 trong Buffer AE hoặc 1×TE (pH 8,0). Định lượng lại để đảm bảo định lượng là chính xác.
- + Nếu cần, hãy tinh sạch lại DNA.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đảm bảo tất cả các mẫu DNA chứa 5-10 mM Tris-HCl pH 8-8,5.
- Phải có ít nhất ba mẫu tham chiếu, lấy từ cùng một loại mô và được xử lý theo cách tương tự như các mẫu thử nghiệm, trong mọi thử nghiệm MS-MLPA.
- Hút thuốc thử chính xác là cần thiết để thu được kết quả đáng tin cậy. Điều này đặc biệt quan trọng đối với 3 μL của master mix lai.
- Kiểm tra chất lượng mảnh vỡ. Biến tính DNA mẫu bệnh phẩm hoàn toàn và phân hủy HhaI là điều cần thiết.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Những bất thường do MS-MLPA phát hiện phải được xác nhận bằng một kỹ thuật độc lập bất cứ khi nào có thể. Các thay đổi về số lượng bản sao và quá trình methyl hóa được phát hiện bởi một đầu dò duy nhất luôn yêu cầu phải được xác nhận lại. Giải trình tự của các trình tự mục tiêu có thể cho thấy tín hiệu ở các đầu dò thấp hơn là do đột biến/đa hình gây ra. Việc tìm thấy hai trình tự dị hợp tử thường chỉ ra rằng DNA mẫu chứa hai alen khác nhau.

Lưu ý rằng việc phát hiện một alen hiếm bằng cách giải trình tự không có nghĩa là một alen bị xóa, vì hai dạng alen hiếm có thể có mặt. Đa hình đơn dạng đồng hợp tử có thể dẫn đến giảm tín hiệu một phần giống như dị hợp tử mất đoạn.

- Không phải tất cả các thay đổi về số lượng bản sao và quá trình methyl hóa được phát hiện bởi MS-MLPA đều gây bệnh.

- Một số bất thường số lượng bản sao nhất định có thể là do thay đổi soma, bao gồm mất và lặp lại toàn bộ nhiễm sắc thể.

- Trong trường hợp có sự mất đoạn đồng hợp tử rõ ràng, nên kiểm tra đồ thị tín hiệu bằng mắt thường để xác định liệu tín hiệu có thực sự mất hay không.

- Các giá trị ngưỡng tối ưu để phát hiện sự thay đổi đáng kể trong quá trình methyl hóa của trình tự phụ thuộc vào đầu dò, phụ thuộc vào loại mẫu và ứng dụng. Trong một số trường hợp nhất định, có thể có một sự thay đổi đáng kể ở trạng thái methyl hóa các trình tự cụ thể giữa các cá thể bình thường khác nhau. Kiểm tra mô tả sản phẩm của MS-MLPA probemix để có bất kỳ lời khuyên bổ sung nào về việc xác định trạng thái methyl hóa.

- Các đầu dò MS-MLPA phát hiện các trình tự trong các đảo CpG bên ngoài các vùng in dấu, ví dụ: trong các vùng promoter của gen, thường mang lại tín hiệu thấp trong các mẫu tham chiếu được phân cắt. Điều này có thể là do methyl hóa trình tự trong một tỷ lệ nhỏ các tế bào được thử nghiệm. Tín hiệu nền này thường cao hơn trong các đầu dò phát hiện trình tự gần rìa đảo CpG. Tương tự, các chuỗi nằm gần cạnh của đảo CpG dễ dàng mất đi sự bảo vệ chống lại quá trình methyl hóa và thường cho thấy tần suất methyl hóa cao hơn trong các khối u.

- Đối với nhiều đảo CpG nằm trong các vùng nhiễm sắc thể được in dấu, một bản sao ở đảo CpG đến từ bố hoặc mẹ bị methyl hóa trong khi bản sao

được thừa hưởng từ người còn lại không bị methyl hóa. Tỷ lệ methyl hóa trung bình khi đó là 50%. Khi kiểm tra các mẫu bệnh phẩm in dấu, giá trị ngưỡng cho bất thường quá trình methyl hóa có thể được xác định bằng cách kiểm tra đủ mẫu DNA từ những người khỏe mạnh.

- Đầu dò chứng phân cắt: Trình tự mục tiêu của đầu dò chứng phân cắt không bị methyl hóa ở hầu hết mẫu DNA có nguồn gốc từ máu. Tỷ lệ phần trăm methyl hóa của các mẫu dò này nên được kiểm tra để đảm bảo quá trình tiêu hóa đã hoàn tất, đặc biệt là trong DNA có nguồn gốc từ mô FFPE

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù. (Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1.Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57. doi:10.1093/nar/gnf056.

2.Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences - PubMed. Accessed July 25, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16106041/>.

41. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MS-MLPA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) được sử dụng để phân tích đồng thời bất thường số lượng bản sao (CNV) và tình trạng methyl hóa DNA tại các vị trí CpG đặc hiệu, nhằm: phát hiện đột biến mất/thêm/lặp đoạn.... hoặc đột biến điểm đã biết trên nhiều gen/vùng gen hoặc xác định tình trạng methyl hóa bất thường (tăng hoặc giảm methyl hóa) đã xác định trong cùng 1 lần thực hiện xét nghiệm, nhằm phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh, hỗ trợ tư vấn di truyền.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò dựa trên phản ứng ghép nối (MS-MLPA) và phản ứng methyl hóa là một kỹ thuật bán định lượng được sử dụng để xác định số lượng bản sao của số lượng trình tự DNA xác định (ví dụ tối đa 60 trình tự DNA...) và đặc hiệu trong cùng một phản ứng và trình tự bị methyl hóa.

1.2.2. Nguyên lý

- Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

- Kỹ thuật MS-MLPA dựa trên phản ứng PCR khuếch đại nhiều đoạn gen khác nhau chỉ với 1 cặp mồi duy nhất và sử dụng enzyme cắt DNA sợi đôi. Phản ứng MS-MLPA tạo ra một tập hợp các sản phẩm PCR có chiều dài từ 64-500 nt và được phân tách bằng điện di mao quản.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L); ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL).

- Bộ mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí), Khay chứa mẫu 96 giếng.

- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và giấy lau tay; Tấm cao su đập đĩa chạy mẫu và đập khay đệm cho máy điện di mao quản.

- Ống đựng bệnh phẩm (ống chống đông EDTA, vô trùng...); trang bị bảo hộ: găng tay; khẩu trang; mũ giấy; băng dính; sát khuẩn tay nhanh.

- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease ; ethanol 100%.

- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến (Human Female Genomic DNA, Human male Genomic DNA), mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).

- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.

- Hóa chất PCR: hỗn hợp hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (PCR Master mix...) hoặc enzym Taq DNA Polymerase; hỗn hợp 4 loại nucleotid (dNTPs Mix...); môi xuôi và môi ngược (50 nmol/ống...).

- Hóa chất MS-MLPA (Salsa MS-MLPA Probemix...); Hóa chất đệm điện di mao quản (Hidi formamide...); Thang DNA chuẩn dùng cho điện di mao quản (Genscan 500 Liz...); nước không chứa Nuclease.

- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản (Anode Buffer Container (ABC), Cathode Buffer Container (CBC); POP-7 Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers...); hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản (DS-33 Matrix Standard (Dye set G5)...).

- Bảo quản hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL.

- Tủ sạch/Tủ ATSH cấp 1/Tủ ATSH cấp 2, Tủ hút hóa chất.

- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh gel điện di kèm phần mềm.

- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa; tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác bao gồm mẫu nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, mẫu u, máu cuống rốn; DNA tổng số, sản phẩm PCR.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.

- + Các bệnh phẩm khác: đựng trong ống đựng bệnh phẩm vô trùng.

- + DNA tổng số, sản phẩm PCR: lượng DNA tối thiểu 10 ng/μL.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: Kiểm tra thông tin theo qui định.

- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: Kiểm tra thông tin theo qui định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

6,2 giờ.

2.7. Đại điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử..

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:

- + khay giữ lạnh; khay đựng **ống ly tâm đáy nhọn 1,5 mL** và ống PCR

- + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70 °C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng máy.

- + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống PCR/ống ly tâm.

+ Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.

- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

- Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật MS-MLPA

- Rã đông các hóa chất.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Thực hiện phản ứng MS-MLPA theo các bước sau:

Bước 1: Biến tính DNA

- Lấy lượng DNA cần thiết (5 µL hoặc tương đương 50- 200 ng DNA) cho vào ống PCR 0,2 mL đã ghi tên (ống PCR số 1) và đặt ống vào máy PCR, chạy chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 2: Lai các đầu dò

- Pha hỗn hợp hóa chất lai đầu dò theo các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (µL)/ mẫu
Hỗn hợp đầu dò	

Dung dịch đệm	
Tổng thể tích	

- Chia lượng dung dịch phù hợp (3 μL ..) hóa chất lai chứa đầu dò đã pha vào các ống PCR số 1 chứa DNA đã biến tính và trộn đều bằng Pippet.

- Ủ mẫu theo chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 3: Phản ứng ghép nối

- Pha dung dịch số 1, pha trước hỗn hợp trước 1 tiếng sử dụng và bảo quản trong khay lạnh. Thể tích từng loại hóa chất được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Enzyme nối ghép	
Tổng thể tích	

- Pha dung dịch số 2, pha trước hỗn hợp trước 1 tiếng sử dụng và bảo quản trong khay lạnh. Thể tích từng loại hóa chất được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch đệm 1	
Dung dịch đệm 2	
Tổng thể tích	

- Pha dung dịch số 3 (Ghép Nối-Cắt), pha trước hỗn hợp trước 1 tiếng sử dụng và bảo quản trong khay lạnh. Thể tích từng loại hóa chất được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch đệm 1	
Dung dịch đệm 2	
Enzyme	
Tổng thể tích	

- Chuẩn bị Ống PCR số 2 (Bằng số lượng Ống PCR số 1) cho phản ứng Cắt-Ghép nối.

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 20°C hoặc chuyển các ống ra nhiệt độ phòng.

- Thêm thể tích cần thiết (ví dụ 13 μL ...) dung dịch số 1 vào Ống PCR số 1, trộn đều hỗn hợp bằng pipet. Chuyển thể tích cần thiết (ví dụ 10 μL ...) hỗn hợp dung dịch đã trộn sang Ống PCR số 2.

- Đặt các ống vào máy PCR, tiếp tục giữ ở nhiệt độ 48°C

- Khi chu trình ở nhiệt độ 48°C

+ Thêm thể tích cần thiết (ví dụ 10 μL ...) dung dịch số 2 (Ghép nối) vào Ống PCR số 1, trộn đều hỗn hợp (Phản ứng số lượng bản sao)

+ Thêm thể tích cần thiết (ví dụ 10 μL ...) dung dịch số 3 (Ghép nối-cắt) vào Ống PCR số 2, trộn đều hỗn hợp (phản ứng methyl hóa)

- Thực hiện chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 4: Phản ứng PCR (Ngày 2)

- Pha hỗn hợp dung dịch PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch chứa trình tự môi	
Enzyme tổng hợp DNA sợi đôi	
Tổng thể tích	

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 20°C, chia thể tích hỗn hợp dung dịch PCR phù hợp (ví dụ 5 μL ...) vào mỗi mẫu, sau đó trộn đều và thực hiện PCR theo chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Lưu ý: Sản phẩm PCR có thể được bảo quản tránh ánh sáng ở 4°C trong 1 tuần. Trong thời gian dài hơn có thể bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C.

4.1.3. Điện di sản phẩm MS-MLPA bằng máy điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Pha hỗn hợp dung dịch điện di mao quản theo các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất, bao gồm:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Hóa chất điện di mao quản	
Thang DNA chuẩn	
Sản phẩm PCR	
Tổng thể tích	

- Hút thể tích dung dịch sản phẩm MS-MLPA cần điện di mao quản phù hợp (10-20 μL) vừa pha và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu.

- Đậy nắp và đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản và tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.4. Thu thập dữ liệu và phân tích

- Kết quả phản ứng MS-MLPA được thu thập từ máy điện di mao quản và lưu trữ theo qui định.

- Phân tích kết quả MS-MLPA bằng phần mềm chuyên dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

- Lượng DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ tinh sạch DNA trong khoảng 1,8-2,0.

b. Điện di sản phẩm MS-MLPA

- Tín hiệu rõ ràng, không nhiễu, kích thước dải tín hiệu tối ưu, tối thiểu và tối đa cho các thiết bị điện di mao quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Tỷ lệ tín hiệu (Final Ratio - FR) được phân tích bằng việc so sánh các tín hiệu các đoạn của mẫu bệnh phẩm với đoạn tương ứng của mẫu đối chứng.

- Độ lệch chuẩn của từng đoạn so với các đoạn tham chiếu phải $\leq 0,10$.

- Phân tích tỷ lệ tín hiệu tại vị trí các đầu dò để xác định mối tương quan giữa kiểu gen và số bản sao gen.

- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.
- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo hướng dẫn của các quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo qui định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai qui định - Bảo quản sai qui định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu

Nguyên nhân	Nguy cơ	Xử trí
		- Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguyên nhân	Nguy cơ	Xử trí
- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	Sai quy trình kỹ thuật	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại qui trình kỹ thuật
- Bảo quản sai/hết hạn	Hóa chất không đạt	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	Thiết bị dừng đột ngột	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	Nhiễm mẫu	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Ít mẫu - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị của người bệnh	Lượng DNA không đạt	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Lấy lại mẫu
- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	Độ DNA	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
- Nhân viên không tuân thủ quy trình	Nhầm mẫu	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Sản phẩm MLPA không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng qui định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu/ hóa chất - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại MLPA; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại phản ứng - Lấy lại mẫu/tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Tín hiệu các đầu dò trên mức tín hiệu tối ưu	- Quá nhiều sản phẩm PCR	- Giảm thời gian điện di/ hiệu điện thế - Sử dụng ít sản phẩm PCR hơn (Tối đa 10% tổng thể tích mẫu điện di) - Pha loãng sản phẩm PCR
Các đỉnh của đầu dò MLPA dốc xuống	- Bay hơi trong gia đoạn lai qua đêm - Bay hơi trong bước phản ứng nối - Tạp chất từ mẫu DNA	- Kiểm tra nắp gia nhiệt - Sử dụng đầu ngăn bay hơi, đảm bảo ống PCR đóng chặt. - Giảm thời gian thao tác mở nắp (sử dụng pipet đa kênh) - Pha loãng hoặc tinh sạch DNA
Không có sản phẩm MLPA	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai qui định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ qui trình - Mất điện - Máy hỏng	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Thực hiện lại phản ứng MLPA trên máy khác

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Phân tích kết quả không chính xác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Kiểm tra chéo kết quả - Báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.
Trả nhầm kết quả xét nghiệm của người bệnh khác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm: Lượng DNA tổng số < 1ng/μL, độ tinh sạch (OD_{260/280nm}) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.

- Cách xử lý khi DNA tổng số không đạt chất lượng: tiến hành tách lại mẫu bệnh phẩm.

- Kết quả điện di mao quản đạt yêu cầu của nhà sản xuất.

- Điện di luôn thực hiện kèm theo thang chuẩn, đủ số lượng tín hiệu của đầu dò trên mẫu nội kiểm.

- Mẫu nội kiểm đạt chất lượng.

- Kiểm soát chất lượng kỹ thuật MS-MLPA: phụ lục.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences.
2. Moelans CB, Atanesyan L, Savola SP, van Diest PJ. (2018) Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA). *Methods Mol Biol*.
3. Trần Đức Phần và cs. 2021. “Di truyền Y học”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
4. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
5. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
6. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

42. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN MÃ HÓA (WES) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể di truyền ở vùng mã hóa của các gen trong toàn bộ hệ gen, nhằm hỗ trợ chẩn đoán nguyên nhân của các bệnh tật di truyền.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vùng mã hóa (coding region): Là phần của DNA chứa trình tự exon của gen, mang thông tin để tổng hợp protein. Trình tự này sẽ được phiên mã thành mRNA và dịch mã thành chuỗi axit amin.

Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa của gen (Whole Exome Sequencing - WES/ Exome sequencing - ES) là kỹ thuật giải trình tự DNA nhằm phân tích toàn bộ các exon (vùng mã hóa protein) trong bộ gen người (của khoảng 22.000 gen)..

- Nguyên lý dựa trên công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS), các đoạn DNA được cắt thành các mảnh nhỏ, giải trình tự song song, sau đó được lắp ráp và so sánh với bộ gen tham chiếu để nhận diện biến thể.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư:

- Hoá chất sinh phẩm: Bộ kit tách chiết DNA, bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự, bộ kit lai bắt giữ, bộ kit giải trình tự.

- Vật tư:
 - + Đầu côn 10 µL, 20 µL, 100 µL và 1000 µL;
 - + Ống thu mẫu 1,5 mL, ống thu mẫu 0,2 mL;
 - + Falcon;
 - + Khẩu trang;
 - + Găng tay vô trùng;

- + Găng tay xử lý dụng cụ, quần áo bảo hộ, dung dịch nước rửa tay, cồn sát khuẩn tay nhanh, dung dịch khử trùng, khăn lau tay;
- + Giấy thấm, giấy xét nghiệm, sổ lưu kết quả xét nghiệm, bút viết kính, bút bi.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy PCR;
- Máy giải trình tự;
- Máy ly tâm;
- Máy votex;
- Máy đo nồng độ và độ tinh sạch DNA;
- Micropipet;
- Máy đông khô (Speedvac);
- Server phân tích và lưu trữ dữ liệu;
- Tủ lạnh thường;
- Tủ âm sâu -20°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: có thể là mẫu máu ngoại vi, dịch ối, gai nhau, mẫu mô sinh thiết...
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: ống máu chống đông EDTA, falcon nhựa vô khuẩn, lam kính, khối nền... tùy theo loại bệnh phẩm cho phù hợp.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: điều kiện nhiệt độ phòng, nếu chưa thực hiện ngay trong vòng 2 giờ, mẫu cần được bảo quản tủ lạnh -4 °C trong vòng 24 giờ hoặc -20 °C nếu lưu trữ lâu hơn.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): đủ để tách chiết DNA theo yêu cầu của bộ kit tách chiết.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 60 - 90 giờ

- Nhận và xử lý mẫu: 1 giờ.
- Tách chiết: 2 giờ.

- Thư viện: 8 giờ.
- Lai bắt giữ: 8 giờ.
- Giải trình tự: 12-24 giờ (tuỳ vào kit sử dụng).
- Phân tích dữ liệu: 12-24 giờ (tuỳ vào công cụ phân tích dữ liệu và phần cứng máy tính).
- Phân tích và báo cáo kết quả: 12-24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

- Nhân viên thực hiện thao tác trên mẫu đều phải mặc áo lab coat, mang găng tay, đeo khẩu trang, và kính bảo hộ mắt.

- Các hoá chất, dung dịch sau xét nghiệm được thu hồi vào bình chứa chất thải lỏng có dán nhãn nguy hiểm sinh học, các chất thải rắn sau xét nghiệm được phân loại theo Quy trình xử lý và phân loại chất thải.

- Tuân thủ các nội quy, quy định và hướng dẫn thuộc an toàn sinh học.

4.CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc cfDNA/ctDNA hoặc RNA...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo.
Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

Bước 1: Tách chiết gDNA từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của bộ kit tách chiết.

Bước 2: Chuẩn bị thư viện từ mẫu gDNA theo hướng dẫn của bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự. Tùy từng hãng mà bộ kit lập thư viện gen và giải trình tự gen sẽ có từng quy trình tiến hành riêng.

Bước 3: Phản ứng lai bắt giữ gen mục tiêu theo hướng dẫn của bộ kit lai bắt giữ.

Bước 4: Định lượng thư viện gDNA bằng huỳnh quang (Qubit, Quantiflour) và chuẩn hóa (normalize) nồng độ thư viện tất cả các mẫu trước khi giải trình tự.

Bước 5: Giải trình tự trên mẫu thư viện đã chuẩn bị.

Các bước tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của bộ kit và nhà sản xuất (Tùy từng hãng Thermofisher, Illumina, Capitalbio genomics...).

DNA được biến tính và tiến hành giải trình tự đồng thời các gen mục tiêu trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới và hóa chất dành cho máy giải trình tự.

Bước 6: Phân tích dữ liệu: Ghép nối các đoạn DNA đã giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của genome.

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả: kết quả được xuất tự động bằng phần mềm phân tích kết quả.

- Phân loại biến thể, phiên giải kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ, tài liệu liên quan đến xét nghiệm theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Sai sót:

- Không đủ hoá chất sử dụng.
- Hoá chất hết hạn.
- Máy móc thiết bị hư hỏng.

Xử trí:

- Theo dõi chặt chẽ chất lượng thuốc thử: đóng gói, hạn dùng, pha chế, bảo quản, thời gian tối ưu cho việc sử dụng...
- Giám sát kỹ công tác bảo dưỡng định kỳ máy móc, đặc biệt các thiết bị ảnh hưởng trực tiếp phương pháp đo quang như bóng đèn, kính lọc...

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Sai sót:

- Người làm thí nghiệm không nắm quy trình dẫn đến ảnh hưởng kết quả của lô mẫu.
- Mẫu không đạt điều kiện phân tích.

Xử trí

- Đào tạo nhân sự liên tục.
- Kiểm tra chặt chẽ thao tác của người làm xét nghiệm trong từng bước thực hiện quy trình.
- Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết. Kiểm tra lại điều kiện bảo quản hoá chất xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

Sai sót:

- Kết quả không đạt QC.
- Mẫu có kết quả bất thường.
- Nhiễm chéo DNA giữa các mẫu.

Xử lý:

- Nếu mẫu không đạt được các tiêu chuẩn của quy trình xét nghiệm sẽ được tiến hành lập lại để tìm ra nguyên nhân.
- Kiểm tra lại lô thuốc thử, máy móc.
- Kiểm tra lại quy trình thực hiện của lô mẫu.
- Kiểm tra lại tay nghề của nhân viên.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù. (Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gupta A. K., Gupta U. D. (2020). Next generation sequencing and its applications. *Animal biotechnology* (pp. 395-421). Academic Press.
2. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev AnalChem* (Palo Alto Calif). 2013
3. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 4th ed. New York: Garland Science; 2010.
4. Eleanor G. Seaby et al (2016), Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Briefings in Functional Genomics*, Vol 15, Issue 5.

43. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ HỆ GEN (WGS) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể di truyền ở cả vùng mã hóa và vùng không mã hóa của các gen trong toàn bộ hệ gen, nhằm hỗ trợ chẩn đoán nguyên nhân của các bệnh tật di truyền một cách toàn diện.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vùng mã hóa (coding region): Là phần của DNA chứa trình tự exon của gen, mang thông tin để tổng hợp protein. Trình tự này sẽ được phiên mã thành mRNA và dịch mã thành chuỗi axit amin.

Vùng không mã hóa (non-coding region): Là phần của DNA không trực tiếp mã hóa protein, bao gồm intron, vùng điều hòa (promoter, enhancer, silencer), trình tự lặp, và các vùng xen kẽ khác. Dù không tạo ra protein, các vùng này vẫn có vai trò quan trọng trong điều hòa biểu hiện gen, cấu trúc nhiễm sắc thể, và chức năng của tế bào

- Giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole genome sequencing - WGS/ Genome sequencing - GS): phân tích tất cả 3 tỉ nucleotid bộ gen người, bao gồm vùng mã hóa - exon (của khoảng 22.000 gen) và vùng không mã hóa. WGS có thể giúp phát hiện các biến thể di truyền trên phạm vi toàn bộ hệ gen.

- Nguyên lý dựa trên công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS), các đoạn DNA được cắt thành các mảnh nhỏ, giải trình tự song song, sau đó được lắp ráp và so sánh với bộ gen tham chiếu để nhận diện biến thể.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 02 người.
- Kỹ thuật y (hoặc tương đương): 02 người.

2.2. Vật tư:

- Hoá chất sinh phẩm: Bộ kit tách chiết DNA, bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự, bộ kit lai bắt giữ, bộ kit giải trình tự.
- Vật tư:

- + Đầu côn 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L và 1000 μ L.
- + Ống thu mẫu 1,5 mL, ống thu mẫu 0,2 mL.
- + Falcon.
- + Khẩu trang.
- + Găng tay vô trùng.
- + Găng tay xử lý dụng cụ, quần áo bảo hộ, dung dịch nước rửa tay, cồn sát khuẩn tay nhanh, dung dịch khử trùng, khăn lau tay.
- + Giấy thấm, giấy xét nghiệm, sổ lưu kết quả xét nghiệm, bút viết kính, bút bi.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy PCR;
- Máy giải trình tự;
- Máy ly tâm;
- Máy votex;
- Máy đo nồng độ và độ tinh sạch DNA;
- Micropipet;
- Máy đông khô (Speedvac);
- Server phân tích và lưu trữ dữ liệu;
- Tủ lạnh thường;
- Tủ âm sâu -20°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: có thể là mẫu máu ngoại vi, dịch ối, gai nhau, mẫu mô sinh thiết...
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: ống máu chống đông EDTA, falcon nhựa vô khuẩn, lam kính, khối nền... tùy theo loại bệnh phẩm cho phù hợp.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: điều kiện nhiệt độ phòng, nếu chưa thực hiện ngay trong vòng 2 giờ, mẫu cần được bảo quản tủ lạnh -4°C trong vòng 24 giờ hoặc -20°C nếu lưu trữ lâu hơn.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): đủ để tách chiết DNA theo yêu cầu của bộ kit tách chiết.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ): 60 - 90 giờ

- Nhận và xử lý mẫu: 1 giờ.
- Tách chiết: 2 giờ.
- Tạo thư viện: 8 giờ.
- Lai bắt giữ: 8 giờ.
- Giải trình tự: 12 - 24 giờ (tùy vào kit sử dụng).
- Phân tích dữ liệu: 12 - 24 giờ (tùy vào công cụ phân tích dữ liệu và phần cứng máy tính).
- Phân tích và báo cáo kết quả: 12 - 24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

- Nhân viên thực hiện thao tác trên mẫu đều phải mặc áo lab coat, mang găng tay, đeo khẩu trang, và kính bảo hộ mắt.

- Các hoá chất, dung dịch sau xét nghiệm được thu hồi vào bình chứa chất thải lỏng có dán nhãn nguy hiểm sinh học, các chất thải rắn sau xét nghiệm được phân loại theo Quy trình xử lý và phân loại chất thải.

- Tuân thủ các nội quy, quy định và hướng dẫn thuộc an toàn sinh học.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc cfDNA/ctDNA hoặc RNA...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

Bước 1: Tách chiết gDNA từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của bộ kit tách chiết.

Bước 2: Chuẩn bị thư viện từ mẫu gDNA theo hướng dẫn của bộ kit chuẩn bị thư viện cho giải trình tự. Tùy từng hãng mà bộ kit lập thư viện gen và giải trình tự gen sẽ có từng quy trình tiến hành riêng.

Bước 3: Phản ứng lai bắt giữ gen mục tiêu theo hướng dẫn của bộ kit lai bắt giữ.

Bước 4: Định lượng thư viện gDNA bằng huỳnh quang (Qubit, Quantiflour...) và chuẩn hóa (normalize) nồng độ thư viện tất cả các mẫu trước khi giải trình tự.

Bước 5: Giải trình tự trên mẫu thư viện đã chuẩn bị. Các bước tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của bộ kit và nhà sản xuất (Tùy từng hãng Thermofisher, Illumina, Capitalbio genomics...).

DNA được biến tính và tiến hành giải trình tự đồng thời các gen mục tiêu trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới và hóa chất dành cho máy giải trình tự.

Bước 6: Phân tích dữ liệu: Ghép nối các đoạn DNA đã giải trình tự bằng phần mềm tin sinh để tạo ra một trình tự đầy đủ của genome.

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả: kết quả được xuất tự động bằng phần mềm phân tích kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ, tài liệu liên quan đến xét nghiệm theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Sai sót:

- Không đủ hoá chất sử dụng.
- Hoá chất hết hạn.
- Máy móc thiết bị hư hỏng.

Xử trí:

- Theo dõi chặt chẽ chất lượng thuốc thử: đóng gói, hạn dùng, pha chế, bảo quản, thời gian tối ưu cho việc sử dụng...

- Giám sát kỹ công tác bảo dưỡng định kỳ máy móc, đặc biệt các thiết bị ảnh hưởng trực tiếp phương pháp đo quang như bóng đèn, kính lọc...

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Sai sót:

- Người làm thí nghiệm không nắm quy trình dẫn đến ảnh hưởng kết quả của lô mẫu.

- Mẫu không đạt điều kiện phân tích.

Xử trí

- Đào tạo nhân sự liên tục
- Kiểm tra chặt chẽ thao tác của người làm xét nghiệm trong từng bước thực hiện quy trình.

- Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết. Kiểm tra lại điều kiện bảo quản hoá chất xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Sai sót:

- + Kết quả không đạt QC
- + Mẫu có kết quả bất thường
- + Nhiễm chéo DNA giữa các mẫu
- Xử lý:

+ Nếu mẫu không đạt được các tiêu chuẩn của quy trình xét nghiệm sẽ được tiến hành lập lại để tìm ra nguyên nhân.

+ Kiểm tra lại lô thuốc thử, máy móc.

+ Kiểm tra lại quy trình thực hiện của lô mẫu.

+ Kiểm tra lại tay nghề của nhân viên.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù. (Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gupta A. K., Gupta U. D. (2020). Next generation sequencing and its applications. In Animal biotechnology (pp. 395-421). Academic Press.

2. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. Annu Rev AnalChem (Palo Alto Calif). 2013

3. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 4th ed. New York: Garland Science; 2010.

4. Bagger, F.O., Borgwardt, L., Jespersen, A.S. et al. Whole genome sequencing in clinical practice. BMC Med Genomics 17, 39 (2024).

44. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN BẰNG KỸ THUẬT PYROSEQUENCING

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm nhằm phát hiện các biến thể gen liên quan đến chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự Pyrosequencing.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Công nghệ pyrosequencing dựa trên cơ sở pyrophosphate (PPi) được giải phóng khi nucleotide tự do mới được gắn vào chuỗi trong quá trình tổng hợp sợi DNA. Sau mỗi nucleotide tự do được gắn vào sợi khuôn trong quá trình tổng hợp. Trình tự nucleotid được đọc thành các đỉnh thông qua việc chuyển đổi năng lượng pyrophosphate giải phóng trong quá trình tổng hợp chuỗi DNA được tiếp nhận tín hiệu ánh sáng bởi một Sensors. Hệ thống được chứng nhận CE-IVD đồng bộ cả thiết bị và các bộ kit xét nghiệm đi kèm, với độ nhạy 1%. Nguyên lý cơ bản của phương pháp này bao gồm các bước: (1) Một đoạn DNA được khuếch đại và sợi làm bản mẫu cho pyrosequencing được biotin hoá. Sau khi biến tính, sợi đơn PCR amplicon được phân lập và được lại với một primer giải trình tự; (2) Phức hợp lai của primer và sợi đơn khuôn được ủ với phức hợp men (enzyme) DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, and apyrase và các cơ chất adenosine 5 'phosphosulfate (APS) và luciferin; (3) Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) đầu tiên được thêm vào phản ứng. DNA polymerase xúc tác gắn thêm dNTP vào primer giải trình tự, nếu nó bổ sung với trình tự sợi khuôn. Mỗi một sự kiện gắn vào đó đi kèm với việc giải phóng pyrophosphate (PPi). Số phân tử PPi giải phóng bằng với số nucleotide được gắn vào; (4) ATP sulfurylase biến đổi PPi thành ATP với sự hiện diện của APS. Phân tử ATP này điều khiển việc chuyển hoá luciferin thành oxyluciferin dưới sự xúc tác của luciferase tạo ra ánh sáng khả kiến tỷ lệ thuận với số phân tử ATP. Ánh sáng được tạo ra trong phản ứng luciferase xúc tác được phát hiện bởi các cảm biến và được nhìn thấy thành các đỉnh trong dữ liệu đầu ra thô. Độ cao của mỗi đỉnh tỷ lệ thuận với nu được gắn vào; (5) Apyrase liên tục phân giải nucleotide (dNTP) không được gắn vào (không bổ sung với mạch khuôn) và các ATP sinh ra. Khi quá trình phân giải hoàn thành, một nucleotide khác được thêm vào; (6) Quá trình thêm các dNTP được tiến hành

tuần tự. Lưu ý deoxyadenosine alfa-thio triphosphate (dATP α S) được sử dụng thay thế cho deoxyadenosine triphosphate (dATP) có hoạt tính với DNA polymerase, nhưng không phải được nhận biết bởi luciferase. Khi quá trình này tiếp tục, các sợi DNA bổ sung được kéo dài và trình tự nucleotide được xác định từ các đỉnh tín hiệu trong phổ dữ liệu đầu ra.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Ống nghiệm lấy mẫu máu K2 EDTA;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Đầu côn 10 μ l có lọc;
- Đầu côn 20 μ l có lọc;
- Đầu côn 200 μ l có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 0,2 mL tiệt trùng;
- Dải ống PCR 0,2mL;
- Đĩa chuyên dụng cho Pyrosequencing;
- Khay nhựa Cartridge cho giải trình tự Pyrosequencing;
- Bộ kit giải trình tự Pyrosequencing;
- Bộ kit chạy máy chuyên dụng trong giải trình tự Pyrosequencing;
- Hạt bead Sepharose High Performance;
- Xylene;
- Cồn chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Nước chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Kính hiển vi;

- Máy nhuộm HE;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy cắt + Bàn tải bệnh phẩm;
- Tủ ấm;
- Tủ lạnh;
- Tủ hút hoá chất;
- Pippett;
- Bàn sấy tiêu bản;
- Máy Vortex;
- Máy Spin down;
- Tủ An toàn sinh học;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Máy li tâm;
- Hệ thống giải trình tự gen Pyrosequencing.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE), mẫu mô tươi, mẫu máu, dịch cơ thể và các loại mẫu khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: Đảm bảo đủ số lượng tế bào u đã được đánh giá trước đó trên tiêu bản đã nhuộm H&E.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu, mẫu dịch cơ thể ...).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 18 đến 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị.
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Quy định về an toàn hóa chất.
- Quy định về an toàn sinh học.
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Chuẩn bị

- Quy trình tách chiết để thu được DNA tinh sạch theo kit chuyên dụng, xác định nồng độ DNA sau tách chiết bằng Nanodrop.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng: chuẩn bị đủ số ống PCR cho số lượng mẫu cần xét nghiệm đột biến.

- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải để tan hóa chất ở nhiệt độ phòng, ly tâm các ống hóa chất để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng cho từng mẻ PCR dựa theo hướng dẫn của bộ kit.

- Tiến hành phản ứng PCR theo chương trình tương ứng với hướng dẫn của bộ kit chuyên dụng cho giải trình tự Pyrosequencing.

- Cố định sản phẩm PCR với hạt bead Sepharose High Performance: Vortex Sepharose High Performance đến khi tạo hỗn hợp đồng nhất; Chuẩn bị dung dịch cố định DNA theo hướng dẫn của bộ kit; Chia dung dịch cố định DNA vào ống PCR 0,2 mL; Thêm sản phẩm PCR đã gắn biotin vào các ống tương ứng; ống PCR chứa sản phẩm PCR và dung dịch cố định DNA được ủ ở nhiệt độ và thời gian theo hướng dẫn của bộ kit.

- Chuẩn bị mẫu trước khi phân tích PyroSequencing trên hệ thống máy giải trình tự: Chuẩn bị hỗn hợp mẻ giải trình tự PyroSequencing theo hướng dẫn của bộ kit; Thêm hỗn hợp mẻ giải trình tự vào giếng của đĩa chuyên dụng cho giải trình tự Pyrosequencing theo sơ đồ tương ứng với vị trí các mẫu; Chuẩn bị các dung dịch cho máy giải trình tự: EtOH 70%, dung dịch biến tính, đệm rửa, nước tinh sạch dùng trong sinh học phân tử; Đặt đĩa chuyên dụng, sản phẩm PCR lên máy giải trình tự.

4.2. Các bước tiến hành

- Khởi động hệ thống giải trình tự: Khởi động bơm chân không; Chuyển “filter probes” vào ống chứa sản phẩm PCR. Bật “On” để giữ các hạt bead chứa sản phẩm PCR, giữ “filter probes” theo hướng dẫn của bộ kit; Chuyển “filter probes” qua dung dịch EtOH 70% theo hướng dẫn của bộ kit; Chuyển “filter probes” qua dung dịch biến tính theo hướng dẫn của bộ kit; Chuyển “filter probes” qua dung dịch đệm rửa theo hướng dẫn của bộ kit; Để “filter probes” thẳng đứng, góc 900 để khô “filter probes”, chuyển “filter probes” sang chế độ “OFF”; Đặt “filter probes” vào máy giải trình tự theo vị trí tương ứng, lắc đều để các hạt bead giữ trong “filter probes” giải phóng vào đĩa chứa hỗn hợp môi giải trình tự Pyrosequencing; Chuyển “filter probes” qua nước tinh sạch theo hướng dẫn của bộ kit, bật “ON”; Chuyển “filter probes” qua nước tinh sạch theo hướng dẫn của bộ kit; Để “filter probes” thẳng đứng, góc 900 để khô “filter probes”, chuyển “filter probes” sang chế độ “OFF”; Tắt bơm chân không; Đặt đĩa máy giải trình tự chứa mẫu vào block nhiệt ở thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của bộ kit; Làm mát đĩa máy giải trình tự ở nhiệt độ phòng theo hướng dẫn của bộ kit.

- Chạy giải trình tự trên máy giải trình tự: Chuẩn bị hỗn hợp enzyme và cơ chất theo hướng dẫn của bộ kit, chia nhỏ thành các phần, bảo quản ở -20 0C; Thêm enzyme, cơ chất, nucleotide vào Cartridge theo hướng dẫn của bộ kit; Đặt Cartridge vào máy giải trình tự; Chuẩn bị file chạy theo phần mềm giải trình tự trên hệ thống máy tính, có kết nối cổng USB; Kết nối USB chứa file chạy với máy giải trình tự, chọn “RUN”, ấn “OK”; Khi máy chạy xong, ấn “CLOSE”, lấy USB khỏi máy giải trình tự và phân tích kết quả trên hệ thống máy tính với phần mềm chuyên dụng.

4.3. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu đối chứng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Đọc và nhận định kết quả: sử dụng phần mềm chuyên dụng đánh giá kết quả giải trình tự dựa trên trình tự DNA chuẩn.

4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết và lưu trữ hồ sơ theo “quy trình trả kết quả” và “quy trình lưu trữ hồ sơ”.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả
- Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
 - Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm;
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù. (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

45. XÉT NGHIỆM SUY GIẢM CHỨC NĂNG TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ĐỒNG (HRD) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm suy giảm chức năng tái tổ hợp tương đồng (HRD) bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới giúp tiên lượng và lựa chọn phác đồ điều trị trong một số bệnh lý ung thư.

1.2. Định nghĩa/ nguyên lý

Xét nghiệm HRD sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới đánh giá tình trạng gen và đánh giá tính bất ổn định hệ gen và được thực hiện đồng thời nhằm đưa ra kết quả HRD - đánh giá thiếu hụt chức năng tái tổ hợp tương đồng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống rửa máy giải trình tự;
- Ống đựng mẫu 1,7mL, chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Ống phản ứng dùng cho máy định lượng bằng phương pháp huỳnh quang;
- Lưỡi dao mổ;
- Dải 8 ống PCR kèm nắp;
- Ống đựng mẫu 1,5mL, chuyên dùng cho sinh học phân tử và chống bám dính;
- Ống 15 mL, chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Ống 50 mL, chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L ;
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L ;
- Đầu côn (típ) có lọc, 100 μ L ;
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L ;
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L ;
- Pipet nhựa 10 mL;

- Giấy lau không bụi;
- Khẩu trang y tế;
- Mũ giấy;
- Găng tay không bột các cỡ dùng cho sinh học phân tử;
- Bộ tách chiết DNA từ mẫu mô cố định formalin vùi paraffin;
- Hóa chất khử paraffin;
- Hóa chất định lượng DNA bằng phương pháp huỳnh quang;
- Agarose;
- Đệm điện di TBE 10X;
- Hóa chất nhuộm DNA từ gel;
- Hóa chất gắn sản phẩm PCR (Loading Dye);
- Thang DNA 100bp;
- Hóa chất chuẩn bị thư viện giải trình tự;
- Hóa chất phân mảnh DNA tổng số;
- Hóa chất tinh sạch thư viện;
- Cồn tuyệt đối dùng trong sinh học phân tử;
- Nước tinh sạch dùng trong xét nghiệm sinh học phân tử;
- Đệm bảo quản DNA/RNA;
- Dung dịch hạt từ tính gắn Streptavidin;
- Dung dịch biến tính thư viện;
- Hóa chất giải trình tự gen tổng hợp;
- Thư viện đối chứng;
- Hóa chất rửa máy giải trình tự;
- Dung dịch làm sạch đường ống trong máy giải trình tự;
- Cồn 70°.

2.3. Trang thiết bị

- Bộ pipet;
- Giá giữ lạnh ống PCR;
- Giá từ tinh sạch ống 0,2 mL;
- Tủ mát 2-8°C bảo quản mẫu;
- Tủ lạnh sâu -30°C;
- Tủ lạnh âm sâu -80°C;
- Tủ an toàn sinh học;

- Tủ thao tác PCR;
- Máy ly tâm lạnh tách mẫu để bàn;
- Máy ly tâm lắng mẫu nhanh;
- Máy lắc rung trộn mẫu chuyên dụng cho sinh học phân tử;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy định lượng DNA bằng phương pháp huỳnh quang;
- Máy nhân gen tốc độ cao PCR;
- Máy real-time PCR;
- Hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới;
- Bộ nguồn và bề điện di;
- Máy chụp ảnh gel điện di;
- Thiết bị trợ hút pipet (pipet aid) thuỷ tinh tự động;
- Cân phân tích.

2.4. Người bệnh - mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: người bệnh được giải thích về việc lấy mẫu xét nghiệm, phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu. Lấy mẫu theo quy trình kèm theo.

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu khối nén vùi paraffin. Mẫu cắt từ mô FFPE cần đem tách chiết DNA ngay. Thời gian bảo quản cho các mô FFPE không nên quá 3 năm.

- Các mẫu DNA đạt tiêu chuẩn có thể dung để chuẩn bị thư viện hoặc bảo quản ở nhiệt độ $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, tránh giã đông và làm đông quá nhiều lần.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo tỷ lệ tế bào u ít nhất $\geq 30\%$.

- Mẫu mô lưu trữ không quá 3 năm.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện: khoảng 40 giờ.

2.7. Địa điểm, thời gian thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Quy trình kiểm soát môi trường và an toàn phòng thí nghiệm kèm theo.

- Quy trình hiệu chuẩn vật tư thiết bị đi kèm.
- Quy định an toàn khi thực hiện kỹ thuật.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Nhận bệnh phẩm (Kiểm tra thông tin trên mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm, đánh giá mẫu có đủ tiêu chuẩn, xử lý mẫu).

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất

Đề hóa chất ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (với các hóa chất được yêu cầu).

4.1.3. Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm

4.1.4. Thực hiện QC.

4.1.5. Tiến hành kỹ thuật (Các bước thực hiện kỹ thuật).

Bước 1: Tiền biến tính

- Lấy các mẫu DNA, chứng dương và dung dịch Low TE ra ngoài và làm tan hoá chất ở nhiệt độ phòng. Khi hoá chất rã đông hoàn toàn, trộn đều và ly tâm nhẹ 5-10 giây, để các ống trên đá.

- Chuẩn bị phản ứng tiền biến tính trên đá trong ống PCR 0,2 mL bằng cách thêm các thành phần theo hướng dẫn bộ kit.

- Trộn kỹ dung dịch và ly tâm ngắn, sau đó đặt mẫu vào máy luân nhiệt. Đặt phản ứng thể tích và thực hiện chương trình sau: 98°C trong 5 phút, sau đó đặt các ống lên đá ngay lập tức.

Bước 2: Lai

- Rã đông ở nhiệt độ phòng các hoá chất sau đó trộn đều và ly tâm nhẹ, để các tuýp trên đá.

- Lấy sản phẩm tiền biến tính trên ra khỏi máy luân nhiệt và giữ ống trên đá. Chuẩn bị phản ứng lai trên đá theo hướng dẫn của bộ kit.

- Trộn đều dung dịch, ly tâm nhẹ và đặt mẫu lên máy PCR đã cài đặt sẵn chương trình.

Bước 3: Kéo dài-Gắn

- Giã đông hoá chất cần cho bước này tại nhiệt độ phòng. Đợi hoá chất rã đông hoàn toàn, trộn đều và ly tâm nhẹ, giữ lạnh ống hoá chất trên đá.

- Lấy sản phẩm lai từ máy PCR ra và cũng giữ lạnh trên đá. Thêm hỗn hợp phản ứng vào ống PCR, trộn đều dung dịch, ly tâm nhẹ, đặt mẫu lên máy PCR đã cài đặt sẵn chương trình.

Bước 4: Phân cắt bằng exonuclease

- Lấy các hoá chất trong bộ kit cần cho bước này, trộn đều và ly tâm nhẹ, giữ các ống trên đá.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng exonuclease digestion ngay trên đá bằng cách thêm các thành phần theo bảng sau.

- Trộn đều dung dịch, ly tâm nhẹ, đặt mẫu vào máy PCR. Cài đặt thể tích phản ứng và chương trình theo hướng dẫn của bộ xét nghiệm.

Bước 5: Khuếch đại PCR

- Rã đông các hoá chất trong bộ kit cho bước này sau đó rã đông hoàn toàn, trộn đều và ly tâm nhẹ, giữ các ống trên đá.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng khuếch đại PCR ngay trên đá theo thành phần của bộ kit.

- Trộn đều dung dịch trong các ống PCR, ly tâm nhẹ, cho vào máy PCR.

Bước 6: Tinh sạch

- Để ống hạt từ ở nhiệt độ phòng 30 phút, trộn đều ống trước khi sử dụng để tránh hạt từ bị lắng.

- Thêm hạt từ và sản phẩm PCR vào ống 1,5mL, trộn đều, ủ 5 phút tại nhiệt độ phòng.

- Đặt ống lên giá từ khoảng 3-5 phút đến khi dung dịch trong. Nhẹ nhàng loại bỏ phần nước nổi (vẫn giữ ống trên giá từ). Tránh để đầu tip chạm vào phần hạt từ.

- Vẫn giữ ống trên giá từ, thêm cồn 80%. Ủ tại nhiệt độ phòng trong 30 giây, sau đó nhẹ nhàng loại bỏ phần nước nổi.

- Lặp lại bước rửa thêm một lần.

- Ly tâm nhẹ ống, đặt các ống trở lại giá từ. Mở nắp các ống, loại bỏ hoàn toàn cồn còn sót lại trong ống, làm khô hạt từ trong khoảng 2-3 phút

Lưu ý: Không làm khô quá lâu vì có thể làm giảm chất lượng DNA

- Bỏ ống mẫu ra khỏi giá từ. Thêm đệm TE (pH8,0). Trộn đều, ủ 3 phút tại nhiệt độ phòng.

- Đặt ống mẫu vào giá từ khoảng 3-5 phút đến khi dung dịch chuyển trong. Nhẹ nhàng chuyển phần nước nổi sang ống 1,5mL mà không chạm vào phần hạt từ.

Lưu ý: Thư viện đã tinh sạch có thể lưu ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ không quá hai tuần.

Bước 7: Đánh giá chất lượng thư viện

- Đánh giá nồng độ thư viện và kích thước đoạn DNA.

Bước 8: Giải trình tự

4.2. Nhận định kết quả

- Xuất dữ liệu giải trình tự và tải lên phần mềm phân tích chuyên dụng.
 - Xem xét kết quả QC: Nêu giới hạn ngưỡng kết quả nội kiểm và hành động khắc phục khi QC không đạt. QC đạt yêu cầu sẽ đọc kết quả xét nghiệm.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Đọc kết quả: Kết quả sau khi được phân tích qua phần mềm sẽ kiểm tra tình trạng đột biến gen và tính bất ổn hệ gen.

- Báo cáo kết quả: Trả kết quả trên phần mềm quản lý thông tin của bệnh viện.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: nồng độ DNA sau tách chiết quá thấp, QC sau giải trình tự không đạt thì tiến hành lại quy trình xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn	Thực hiện lấy lại mẫu. Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.

Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng	Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình. Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.
---	---

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Mẫu đối chứng không đạt	Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm. Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích	Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm. Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả	Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận Thực hiện lại quy trình trả kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).
- Bảo dưỡng máy định kỳ hàng ngày, hàng tuần và hàng tháng theo quy định.
- Hóa chất, vật tư trước khi đưa vào sử dụng cần được kiểm tra/đánh giá theo quy định, đảm bảo chất lượng và đủ cơ số hóa chất, vật tư để thực hiện xét nghiệm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pellegrino B, et al. ESMO Open. 2019;4(2):e000480;
2. Sandra van Wilpe et al, 2021, Homologous Recombination Repair Deficiency and Implications for Tumor Immunogenicity, Pubmed center

3. Paula Stancl et al, 2022, The Great Majority of Homologous Recombination Repair-Deficient Tumors Are Accounted for by Established Causes, Frontier
4. Zhiwen Shi et al, 2023, Genomic and molecular landscape of homologous recombination deficiency across multiple cancer types, Scientific reports
5. Trường Đại học Y Hà Nội, Bài giảng y sinh học phân tử, Nhà xuất bản Y học, 2023.

46. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tỷ lệ tồn dư tối thiểu của gen bệnh sau điều trị với mẫu máu toàn phần (whole blood) bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next-Generation Sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Số lượng tế bào mang gen đột biến trong bệnh lý ác tính suy giảm sau quá trình điều trị, đặc biệt là điều trị nhắm đích. Tỷ lệ tồn dư các tế bào mang đột biến này có thể được đánh giá thông qua giải trình tự gen đích và so sánh alen đột biến với alen tham chiếu. Kỹ thuật NGS có độ phân giải cao, do đó, tỷ lệ tồn dư tối thiểu của bệnh có thể được đánh giá chính xác ở tỷ lệ thấp.

- Kỹ thuật này phân tích tồn dư tối thiểu của bệnh dựa trên máu toàn phần, không phân tách theo dòng tế bào.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách tế bào	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit tách chiết DNA	
Kit đo nồng độ DNA	
Kit giải trình tự gen	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;

- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Cột tách tế bào;
- Máy tách tế bào bằng hạt từ;
- Máy giải trình tự gen và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).
- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện 2-8°C.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Thực hiện kỹ thuật bằng hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Bước 1. Chuẩn bị mẫu:

- Tiếp nhận và kiểm tra thông tin mẫu bệnh phẩm (máu ngoại vi, tủy xương, dịch sinh học....).

- Tách chiết DNA hoặc RNA/ctDNA/cfDNA từ mẫu theo hướng dẫn của bộ kit tương thích với hệ thống.

- Đánh giá nồng độ và độ tinh sạch acid nucleic bằng thiết bị tương đương (ví dụ Qubit, NanoDrop....)

Bước 2. Chuẩn bị hệ thống và hóa chất

- Chuẩn bị cartridge/ hộp hóa chất và vật tư tiêu hao theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đảm bảo hóa chất và vật tư còn hạn dùng, bảo quản đúng điều kiện.

- Lắp đặt hóa chất, tip, khay chứa vào vị trí quy định trên hệ thống.

Bước 3. Nạp mẫu và khai báo thông tin

- Nạp DNA/ctDNA hoặc RNA đã tách chiết vào cartridge hoặc vị trí mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu trên phần mềm điều khiển (mã số, loại mẫu, bảng gen/panel, thông số phân tích....)

Bước 4. Vận hành hệ thống

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, hệ thống tự động hoàn toàn các bước sau: chuẩn bị thư viện giải trình tự, gắn index/adapter, tinh sạch thư viện, định lượng thư viện và pha loãng, nạp thư viện vào flow cell hoặc buồng giải trình tự. Thực hiện giải trình tự tự động.

Bước 5. Phân tích dữ liệu , kiểm tra và báo cáo kết quả.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật bằng phương pháp NGS bán tự động/ thủ công

Tùy theo từng hãng và từng hệ thống máy, từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tuy nhiên, có một số bước chung như sau:

4.1.2.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20°C.

4.1.2.2. Giải trình tự gen

- Khuếch đại DNA đích bằng chương trình PCR;
- Phân mảnh DNA;
- Gắn index bằng phản ứng PCR theo quy trình của nhà sản xuất;
- Tinh sạch thư viện DNA sử dụng hạt từ;
- Khuếch đại thư viện DNA bằng chương trình PCR;
- Tinh sạch lần 2;
- Đánh giá chất lượng và đo nồng độ thư viện sử dụng thiết bị thích hợp

ví dụ: Qubit, NanoDrop.....

- Biến tính, pha loãng thư viện DNA;
- Chuẩn bị cartridge hóa chất;
- Nạp mẫu thư viện;
- Giải trình tự trên máy NGS.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số chạy NGS, như mật độ cluster, độ phủ (coverage),...

- Xuất kết quả từ máy NGS và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học (MiSeq reporter, CLC Genomic Workbench, IGV,...).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã

▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
--	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Deng, X., Zhang, M., Zhou, J. et al. Next-generation sequencing for MRD monitoring in B-lineage malignancies: from bench to bedside. *Exp Hematol Oncol* 11, 50 (2022).
2. Cheng, S., et al. (2022). Next generation sequencing as the new gold standard for MRD detection in B-ALL. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*
3. Qiumei Yao et al. Upgraded Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 22, No. 5, May 2020

47. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tỷ lệ tồn dư tối thiểu của gen bệnh sau điều trị với mẫu máu, đã được tách dòng tế bào, bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next-Generation Sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Số lượng tế bào mang gen đột biến trong bệnh lý ác tính suy giảm sau quá trình điều trị, đặc biệt là điều trị nhắm đích. Tỷ lệ tồn dư các tế bào mang đột biến này có thể được đánh giá thông qua giải trình tự gen đích và so sánh alen đột biến với alen tham chiếu. Kỹ thuật NGS có độ phân giải cao, do đó, tỷ lệ tồn dư tối thiểu của bệnh có thể được đánh giá chính xác ở tỷ lệ thấp.

- Kỹ thuật này phân tích tồn dư tối thiểu của bệnh với mẫu đã được phân tách theo dòng tế bào (dòng tủy hoặc lympho) bằng hạt từ gắn kháng thể đặc hiệu cho mỗi dòng tế bào.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách tế bào	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit tách chiết DNA	
Kit đo nồng độ DNA	
Kit giải trình tự gen	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);

- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Cột tách tế bào;
- Máy tách tế bào bằng hạt từ;
- Máy giải trình tự gen và thiết bị đi kèm.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).
- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện 2-8°C.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách tế bào bằng hạt từ

- Ủ bạch cầu với hạt từ gắn kháng thể đặc hiệu trong 15 phút.

- Gắn cột tách vào giá từ, chuẩn bị ống 15 mL để đựng chất thải.
- Cho 1 mL Buffer vào cột để rửa cột. Đợi dung dịch qua cột hoàn toàn.
- Cho tiếp dung dịch tế bào thu được ở bước 2 lên cột. Đợi dung dịch qua cột hoàn toàn.
- Rửa cột 3 lần, mỗi lần 500 μ L Buffer. Đợi dung dịch qua cột hoàn toàn.
- Lấy cột ra khỏi giá từ, chuyển sang ống 15 mL sạch.
- Cho 1 mL Buffer lên cột. Dùng bơm đẩy toàn bộ dung dịch vào ống 15mL. Lặp lại bước này. Tổng thể tích thu được là 2 mL.
- Ly tâm 300g trong 10 phút.
- Thu tế bào, bảo quản 2-8 °C để xử lý ở bước tiếp theo

4.1.2. Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Mẫu DNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.3. Giải trình tự gen

- Khuếch đại DNA đích bằng phản ứng PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất;
- Phân mảnh DNA;
- Gắn index bằng phản ứng PCR theo quy trình của nhà sản xuất;
- Tinh sạch thư viện DNA sử dụng hạt từ;
- Khuếch đại thư viện DNA bằng phản ứng PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất;
- Tinh sạch lần 2;
- Đánh giá chất lượng và đo nồng độ thư viện bằng hệ thống định lượng huỳnh quang Qubit hoặc phương pháp, thiết bị tương đương.
- Biến tính, pha loãng thư viện DNA;
- Chuẩn bị cartridge hóa chất;
- Nạp mẫu thư viện;
- Giải trình tự trên máy NGS.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số chạy NGS, như mật độ cluster, độ phủ (coverage),...

- Xuất kết quả từ máy NGS và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học (MiSeq reporter, CLC Genomic Workbench, IGV,...).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Deng, X., Zhang, M., Zhou, J. et al. Next-generation sequencing for MRD monitoring in B-lineage malignancies: from bench to bedside. *Exp Hematol Oncol* 11, 50 (2022).

2. Cheng, S., et al. (2022). Next generation sequencing as the new gold standard for MRD detection in B-ALL. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*

3. Qiumei Yao et al. Upgraded Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 22, No. 5, May 2020

4. MACS CD3 Microbeads human protocol

48. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÒN BỆNH TỐI THIỂU (MRD) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tỷ lệ bệnh tồn dư tối thiểu (MRD- Minimal Residual Disease) ở mức độ phân tử sau điều trị bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next-Generation Sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Số lượng tế bào mang gen đột biến trong bệnh lý ác tính suy giảm sau quá trình điều trị, đặc biệt là điều trị nhắm đích. Tỷ lệ tồn dư các tế bào mang đột biến này có thể được đánh giá thông qua giải trình tự gen đích và so sánh alen đột biến với alen tham chiếu. Kỹ thuật NGS có độ phân giải cao, do đó, tỷ lệ tồn dư tối thiểu của bệnh có thể được đánh giá chính xác ở tỷ lệ thấp.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Vật tư, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit giải trình tự gen	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	
Ống ly tâm vô trùng 1,5-2mL	
Đầu tip pipet 10-1000ul vô trùng	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;

- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 μ L;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy giải trình tự gen và thiết bị đi kèm.

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).

- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện 2-8°C.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Thực hiện kỹ thuật bằng hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Bước 1. Chuẩn bị mẫu:

- Tiếp nhận và kiểm tra thông tin mẫu bệnh phẩm (máu ngoại vi, tủy xương, dịch sinh học....).

- Tách chiết DNA hoặc RNA/ctDNA/cfDNA từ mẫu theo hướng dẫn của bộ kit tương thích với hệ thống.

- Đánh giá nồng độ và độ tinh sạch acid nucleic bằng thiết bị tương đương (ví dụ Qubit, NanoDrop....)

Bước 2. Chuẩn bị hệ thống và hóa chất

- Chuẩn bị cartridge/ hộp hóa chất và vật tư tiêu hao theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đảm bảo hóa chất và vật tư còn hạn dùng, bảo quản đúng điều kiện.

- Lắp đặt hóa chất, tip, khay chứa vào vị trí quy định trên hệ thống.

Bước 3. Nạp mẫu và khai báo thông tin

- Nạp DNA/ctDNA hoặc RNA đã tách chiết vào cartridge hoặc vị trí mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu trên phần mềm điều khiển (mã số, loại mẫu, bảng gen/panel, thông số phân tích....).

Bước 4. Vận hành hệ thống

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, hệ thống tự động hoàn toàn các bước sau: chuẩn bị thư viện giải trình tự, gắn index/adapter, tinh sạch thư viện, định lượng thư viện và pha loãng, nạp thư viện vào flow cell hoặc buồng giải trình tự. Thực hiện giải trình tự tự động.

Bước 5. Phân tích dữ liệu , kiểm tra và báo cáo kết quả.

4.1.2.Thực hiện kỹ thuật bằng phương phápNGS bán tự động/ thủ công

Tùy theo từng hãng và từng hệ thống máy, từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tuy nhiên, có một số bước chung như sau:

4.1.2.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20°C.

4.1.2.2. Giải trình tự gen

- Khuếch đại DNA đích bằng phản ứng PCR theo chương trình thiết lập từ hướng dẫn của bộ kit;

- Phân mảnh DNA (nếu sử dụng quy trình yêu cầu bước phân mảnh);
- Gắn index bằng phản ứng PCR theo quy trình của nhà sản xuất;
- Tinh sạch thư viện DNA sử dụng hạt từ;
- Khuếch đại thư viện DNA bằng chương trình PCR;
- Tinh sạch lần 2;
- Đánh giá chất lượng và đo nồng độ thư viện sử dụng Qubit;
- Biện tính, pha loãng thư viện DNA;
- Chuẩn bị cartridge hóa chất;
- Nạp mẫu thư viện;
- Giải trình tự trên máy NGS.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số chạy NGS, như mật độ cluster, độ phủ (coverage),...
- Xuất kết quả từ máy NGS và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học (MiSeq reporter, CLC Genomic Workbench, IGV,...).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Deng, X., Zhang, M., Zhou, J. et al. Next-generation sequencing for MRD monitoring in B-lineage malignancies: from bench to bedside. *Exp Hematol Oncol* 11, 50 (2022).
2. Cheng, S., et al. (2022). Next generation sequencing as the new gold standard for MRD detection in B-ALL. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*
3. Qiumei Yao et al. Upgraded Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 22, No. 5, May 2020
4. Hira S Mian, et al. Minimal Residual Disease Testing Infrastructure in Multiple Myeloma: Guidance for Clinical Trial and Routine Practice Use in Canada, *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, Volume 25, Issue 6, 2025.

49. XÉT NGHIỆM MARKER DI TRUYỀN CẤP GHÉP BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích

Định lượng tế bào người cho (hiến) ở người nhận (người bệnh) được ghép tế bào gốc tạo máu bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Trong ghép tế bào gốc tạo máu đồng loài, mục tiêu chính của việc đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép là giúp tiên lượng các biến chứng sau ghép như thải ghép, bệnh ghép chống chủ nhằm can thiệp bằng cách điều chỉnh, sử dụng các phác đồ điều trị hợp lý.

- Ở mức độ phân tử, nguyên lý cơ bản của phân tích mọc mảnh ghép là xác định sự khác biệt về hệ gen giữa người cho và người nhận. Một phần khác biệt rất nhỏ của hệ gen có thể được dùng làm chỉ thị phân tử để phân biệt hai cá thể khác nhau như STR (short tandem repeat - các đoạn lặp ngẫu nhiên), VNTR (variable number tandem repeat - đa hình số lượng các đoạn lặp), indel (insert/deletion polymorphism - đa hình thêm/mất đoạn), SNP (single nucleotide polymorphism - đa hình nucleotide đơn)...

- Phương pháp q-PCR định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép dựa trên chỉ số C_q là thời điểm đường biểu diễn khuếch đại vượt qua đường huỳnh quang nền của các chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận.

1.3. Phạm vi áp dụng

- Nhân viên được đào tạo về sinh học phân tử.
- Quy trình được áp dụng để định lượng tế bào người cho ở người nhận được ghép tế bào gốc tạo máu.

1.4. Các thuật ngữ sử dụng trong quy trình:

- q-PCR: Quantitative realtime Polymerase chain reaction- định lượng phản ứng chuỗi tổng hợp.
- DNA: axit deoxyribonucleic.
- Chimerism: Trong ghép tủy đồng loài, chimerism (thể khảm) là thuật ngữ chỉ sự xuất hiện các dòng tế bào của người cho trong cơ thể người nhận

KQXN: Kết quả xét nghiệm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Yêu cầu vật liệu, hóa chất sinh phẩm

- Dung dịch Ficol Paque Plus
- Kháng thể CD3 micro beads, cột tách từ, dung dịch rửa
- Kit tách DNA gồm: buffer lysis, Wash I, Wash II, proteinase K, cột lọc.
- Hóa chất định danh cá thể (phân biệt người cho và người nhận)
- Hoá chất theo dõi mọc mảnh ghép

2.3 Vật tư - trang thiết bị

- Máy realtime-PCR.
- Máy ly tâm ly tâm đáy nhọn, máy ủ nhiệt, máy vortex.
- Box vô trùng.
- Đầu côn 1mL, 200 μ L, 20 μ L vô trùng, free-nuclease.
- Ống ly tâm đáy nhọn 1,5 mL, 0,2mL vô trùng, free-nuclease.
- Pipetman 1mL, 200 μ L, 20 μ L.

2.4 Bệnh phẩm

- Là mẫu bệnh phẩm của người cho và người nhận trước ghép (mẫu D0) và mẫu bệnh phẩm của người bệnh sau ghép (D+).

- Mẫu D0 cần 6 ống máu toàn phần được chống đông bằng EDTA, thể tích là 2 mL/1 ống.

- Mẫu D+ :

+ Nếu làm theo dõi mọc mảnh ghép trong máu toàn phần (whole blood) cần lấy 3 ống máu toàn phần được chống đông bằng EDTA, thể tích là 2 mL/ 1mẫu.

+ Nếu làm theo dõi mọc mảnh ghép trong tế bào T (T cell) cần lấy 5 ống máu toàn phần được chống đông bằng EDTA, thể tích là 2 mL/ 1mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Khoảng: 08-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

4. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

4.1. Thực hiện phản ứng realtime-PCR

Tùy theo loại máy, theo kit các hãng khác nhau sẽ có các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể gồm một số bước như sau:

- Rã đông hoá chất, nhẹ nhàng vortex và ly tâm tất cả các ống.
- Chuẩn bị ống 0,2 mL, ghi tên hoặc mã số bệnh phẩm.
- Chuẩn bị PCR master mix theo hồ sơ xét nghiệm. Vortex và ly tâm.
- Chia 6µl PCR master mix vào tất cả các ống.
- Thêm 5µl KMRtype mix 01 - 10 vào từng ống. Riêng ống POS và NTC thêm 5µl mẫu tham chiếu.
- Thêm 9µl DNA đã pha loãng vào các ống 01 - 10 và ống POS. Riêng ống NTC thêm 9µl H₂O.
- Trộn đều và ly tâm nhanh tất cả các ống.
- Đặt các ống vào máy q-PCR và chạy theo chu trình nhiệt và sơ đồ mẫu đã cài ở bước 2 mục 7.3.1.

4.2. Tính toán kết quả

Tùy theo hướng dẫn của từng máy, kit của các hãng khác nhau thì tính toán kết quả sẽ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 1: Xuất kết quả q-PCR từ phần mềm như sau:

- Vào Quantification data
- Chọn EXPORT → Custom export
- Chọn Export format CSV(*.csv) → Export
- Save file dữ liệu vào D/Chimerism /Gene Dx/Folder tên người bệnh

Bước 2: Nhập kết quả q-PCR vào phần mềm KMRengine và xuất report

➔ Chọn BROSE EXPERIMENT

➔ Open file theo tên Experiment name (đã tạo ở bước 1 mục 7.3.1)

➔ IMPORT (mũi tên màu xanh lá cây) ➔ Chọn file kết quả (.csv) đã lưu ở bước 1 mục 7.4.4

➔ Bấm APPROVE

➔ Bấm REPORT ➔ Save as file report vào folder tên người bệnh trong ổ D

Đọc kết quả từ file report và trả kết quả xét nghiệm theo các biểu mẫu đính kèm quy trình.

4.3. Biện luận và phân tích kết quả

Kết quả xác định chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận trước ghép tế bào gốc tạo máu và kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép tế bào gốc tạo máu được phần mềm của máy tính toán. Trong đó, kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép được thể diện dưới dạng %. Công thức tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ \% mọc mảnh ghép (\% chimerism)} = 100\% / 2^{\Delta\Delta Cq}$$

Trong đó:

+ Cq: thời điểm đường biểu diễn khuếch đại vượt qua đường huỳnh quang nền.

+ ΔCq : số chu kỳ sai khác giữa Cq gen chỉ thị và Cq gen tham chiếu.

+ $\Delta\Delta Cq$: số chu kỳ sai khác giữa ΔCq mẫu người nhận trước ghép và ΔCq mẫu người nhận sau ghép.

+ $2^{\Delta\Delta Cq}$: số lần sai khác tính từ lượng DNA khởi đầu giữa mẫu người nhận sau.

5. SAI XÓT VÀ XỬ TRÍ

- Lấy mẫu chưa đúng qui cách (thiếu thể tích mẫu, sử dụng sai chất chống đông).

- Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu.

- Lây nhiễm trong quá trình tách bạch cầu, tách DNA, thực hiện q-PCR (nhầm mẫu, các mẫu bị dây sang nhau trong quá trình thao tác...) cho kết quả sai lệch như có đường khuếch đại ở chứng H2O, không có đường khuếch đại ở mẫu sau ghép...

6. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Trong một lần xét nghiệm kết quả chỉ được chấp nhận khi: chứng dương có đường khuếch đại với Cq như khuyến cáo của kit sử dụng; chứng H₂O không xuất hiện đường khuếch đại; độ lặp lại của mẫu tương đương nhau.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mehdi A. et al., Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction, Blood 2002, 99 : 4618 - 4625.

2. Bach C. et al., Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities, Transfus Med Hemother 2015, 42: 38 - 45.

50. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN BỆNH LÝ (CES) BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích:

Hướng dẫn thực hiện xét nghiệm giải trình tự hệ gen bệnh lý (Clinical Exome Sequencing - CES) bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS)

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Giải trình tự hệ gen bệnh lý (Clinical Exome Sequencing - CES) là xét nghiệm sử dụng phương pháp Giải trình tự thế hệ mới (NGS) để phát hiện các biến thể trong gen liên quan đến các bệnh ví dụ: di truyền hoặc ung thư... bằng cách sử dụng phương pháp giải trình tự một phần hệ exome đã được mô tả có liên quan đến lâm sàng (bệnh lý).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Hệ thống giải trình tự gen NGS;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu giải trình tự;
- Máy PCR;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C;

- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μL đến 1000 μL .

2.3.2. Trang thiết bị phụ trợ

- Máy vi tính;
- Máy in;
- Máy in mã vạch;
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 2mL máu toàn phần chống đông EDTA. Bảo quản mẫu ở 2 - 8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 72 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 72h giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

(Theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ sinh phẩm).

- Nếu sử dụng hệ thống NGS tự động thì quy trình xét nghiệm sẽ tự động theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Nếu sử dụng hệ thống NGS bán tự động thì các bước sẽ tùy theo hệ thống máy, kit sẽ có hướng dẫn các bước chi tiết khác nhau, tuy nhiên cơ bản sẽ gồm các bước chung sau:

4.1. Chuẩn bị thư viện

Bước 1. Chuẩn bị enzyme

Bước 2. Gắn Adapter

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng trong ống PCR vô trùng
- Trộn kỹ bằng cách nhẹ nhàng hút lên xuống. KHÔNG vortex. Spin down nhanh.

- Đặt ống vào thiết bị PCR và chạy chương trình PCR

Bước 3. Tinh sạch mẫu bằng hạt từ

- Hòa lại các hạt đã được cân bằng ở nhiệt độ phòng bằng cách vortex.
- Dùng pipet lấy 40 μ l (0,5X) hạt vào 80 μ l sản phẩm gắn adapter. Trộn kỹ bằng cách vortex nhẹ hoặc pipet lên xuống 10 lần rồi chuyển sang Lo Bind Tube 1,5mL mới (ống PCR 0,2mL hoặc đĩa 96 giếng)..

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 6 phút.

- Đặt mẫu lên giá từ. Đợi cho đến khi dung dịch trong (khoảng 5 phút). Giữ nó trên giá từ và cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên mà không làm xáo trộn các hạt.

- Giữ mẫu trên giá từ, thêm 500 μ l (hoặc 200 μ l nếu sử dụng Ống PCR 0,2mL hoặc đĩa 96 giếng) ethanol 80% mới chuẩn bị để rửa hạt. KHÔNG huyền phù lại các hạt. Ủ trong 30 giây ở nhiệt độ phòng và cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên mà không làm xáo trộn các hạt.

- Lặp lại Bước 5.

- Quay nhanh, đặt ống vào thiết bị tách từ và loại bỏ ethanol dư.

- Giữ ống trên giá đỡ từ, mở ống và làm khô hạt trong không khí trong 5 - 10 phút (tránh sấy khô quá mức) cho đến khi không còn cặn ethanol. QUAN TRỌNG: Cácbeads bị khô quá mức cho đến khi xuất hiện vết nứt làm giảm hiệu quả ly giải.

- Thêm 20 μ L nước không có nuclease vào mẫu có hạt beads, huyền phù lại và tiến hành bước 4

Bước 4. Khuếch đại thư viện đã gắn Adapter

Bước 5. Tinh sạch mẫu bằng hạt từ

- Hòa lại các hạt đã được cân bằng ở nhiệt độ phòng bằng cách vortex.

- Dùng pipet lấy 40 μ l (0,5X) hạt vào 80 μ l sản phẩm gắn adapter. Trộn kỹ bằng cách vortex nhẹ hoặc pipet lên xuống 10 lần rồi chuyển sang Lo Bind Tube 1,5mL mới (ống PCR 0,2mL hoặc đĩa 96 giếng)..

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 6 phút.

- Đặt mẫu lên giá từ. Đợi cho đến khi dung dịch trong (khoảng 5 phút). Giữ nó trên giá từ và cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên mà không làm xáo trộn các hạt.

- Giữ mẫu trên giá từ, thêm 500 μ l (hoặc 200 μ l nếu sử dụng Ống PCR 0,2mL hoặc đĩa 96 giếng) ethanol 80% mới chuẩn bị để rửa hạt. KHÔNG huyền phù lại các hạt. Ủ trong 30 giây ở nhiệt độ phòng và cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên mà không làm xáo trộn các hạt.

- Lặp lại Bước 5.

- Quay nhanh, đặt ống vào thiết bị tách từ và loại bỏ ethanol dư.

- Giữ ống trên giá đỡ từ, mở ống và làm khô hạt trong không khí trong 5 - 10 phút (tránh sấy khô quá mức) cho đến khi không còn cặn ethanol. QUAN TRỌNG: Cácbeads bị khô quá mức cho đến khi xuất hiện vết nứt làm giảm hiệu quả ly giải.

- Thêm 20 μ L nước không có nuclease vào mẫu có hạt beads, huyền phù lại và tiến hành bước 4.

Bước 6. Đánh giá chất lượng và số lượng của từng thư viện được gắn Index

Bước 7. (Tùy chọn) Loại bỏ Adaptor-Dimer

1. Lai rửa

2. khuếch đại thư viện

3. Gộp thư viện

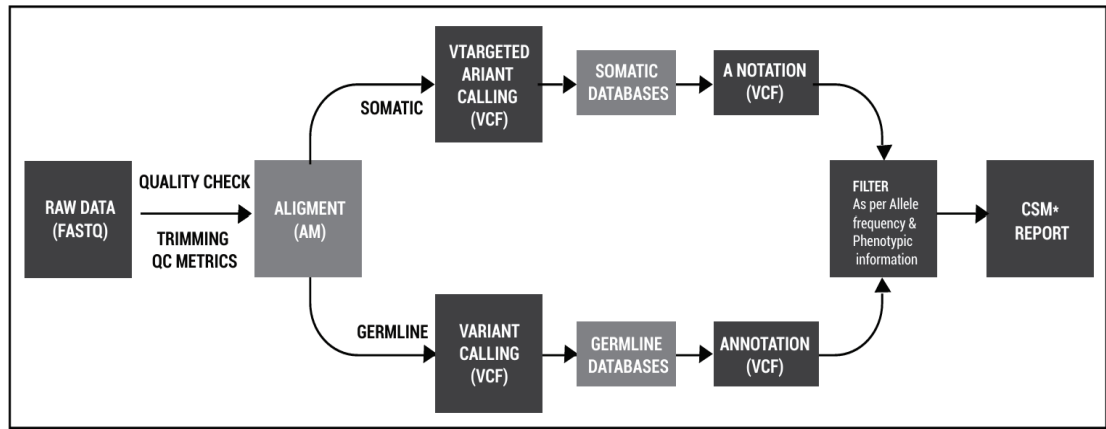
Thiết lập giải trình tự gộp thư viện. Dựa trên hệ thống Giải trình tự và Flow cell được sử dụng, chúng tôi khuyên bạn nên làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất về cách gộp và giải trình tự.

Nói chung, dựa trên các yêu cầu về độ sâu giải trình tự và nồng độ mol của dung lượng flow cell được tính toán và gộp lại trước đó để tạo ra đủ dữ liệu cho mỗi mẫu.

4. Giải trình tự gen

5. Phân tích kết quả

Dữ liệu giải trình tự gen được phân tích trên các phần mềm chuyên biệt ví dụ như: Miseq reporter, IGV, CLC cancer research workbench...



4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề	Nguyên nhân	Cách khắc phục
DNA không tinh sạch, lẫn RNA.	- Lượng tế bào bạch cầu quá nhiều so với cỡ cột tách; - Bước rửa không thực hiện tốt.	- Điều chỉnh lượng tế bào ban đầu theo mức phù hợp với cột; - Tăng thêm 1 bước rửa.
Tổng hợp gen đích không thành công	- Môi không đủ đặc hiệu; - Nồng độ các thành phần phản ứng không phù hợp; - Chưa tối ưu nhiệt độ.	- Kiểm tra lại môi, nồng độ các thành phần phản ứng và tiến hành chạy gradient nhiệt để tối ưu nhiệt độ phản ứng;
Kết quả đọc trình tự bị nhiễu	- Thư viện DNA không đạt đủ độ tinh sạch; - Biến tính chưa hoàn toàn; - Bước gắn barcode không thành công;	- Kiểm tra bước tinh sạch và chuẩn hoá thư viện; - Đảm bảo nhiệt độ và thời gian biến tính;

Vấn đề	Nguyên nhân	Cách khắc phục
	- Lượng thư viện đưa vào quá nhiều; - Nhiễm chéo giữa các mẫu.	- Kiểm tra bước gắn barcode theo quy trình chuẩn; - Kiểm soát lượng thư viện đưa vào đọc trình tự; - Đánh số và thay đầu côn sau khi thao tác với mỗi mẫu để loại bỏ nhiễm chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Đánh giá chất lượng: chất lượng mẻ chạy giải trình tự đạt yêu cầu khi đạt được các chỉ số theo quy định của từng hãng, từng bộ kit, từng panel khác nhau: ví dụ : Q30 > 70%; mật độ cụm : > 500K/mm²; độ lặp bao phủ: > 100.....

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest 2007; 67: 71-86
2. Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T et al. Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations. Arch Inn Med 2001; 4: 165-170.
3. Delague V, Kriegshauser G, Oberkanins C, Me'garbane' A. Reverse hybridization vs. DNA sequencing in the molecular diagnosis of Familial Mediterranean fever. Genet Test 2004; 8: 65-68

51. NUÔI CÂY TẾ BÀO DỊCH ỎI

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy tế bào từ dịch ối nhằm nhân số lượng các tế bào thai thu được từ dịch ối để phục vụ các xét nghiệm chẩn đoán di truyền trước sinh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Tế bào ối (amniocytes) là các tế bào của thai nhi, có nguồn gốc từ da, hệ bài tiết, hô hấp và màng ối, có trong nước ối. Các tế bào này được coi là mẫu đại diện của thai nhi, vì chúng bong ra trực tiếp từ các mô của thai.

Trong thủ thuật chọc ối (amniocentesis), một lượng nhỏ dịch ối được lấy ra. Tuy nhiên, số lượng tế bào ối ban đầu rất ít, không đủ cho phân tích. Do đó, cần phải nuôi cấy tế bào trong phòng xét nghiệm để đạt được hai mục đích chính:

Tăng số lượng tế bào: Nhờ quá trình nguyên phân, tế bào ối sẽ sinh sản, tạo ra một quần thể đủ lớn cho các xét nghiệm di truyền trước sinh.

Loại bỏ tế bào mẹ: Quá trình nuôi cấy chọn lọc giúp tách và loại bỏ các tế bào của mẹ có thể lẫn vào mẫu, đảm bảo kết quả phân tích chỉ phản ánh chính xác vật chất di truyền của thai nhi.

Nuôi cấy tăng sinh tế bào ối dựa trên quá trình nguyên phân của tế bào, đây là quá trình phân chia của tế bào soma trong đó, từ một tế bào ban đầu, sau n lần phân chia liên tiếp sẽ tạo được 2^n tế bào con có bộ nhiễm sắc thể giống hệt nhau và giống hệt tế bào mẹ ban đầu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư, hóa chất

- Ống lấy mẫu vô trùng 15mL;
- Chai nuôi cấy vô trùng đáy 25 cm²;
- Bơm tiêm, đèn cồn, nhãn dán;
- Dung dịch Trypsin;

- Môi trường nuôi cấy tế bào ồi (AminoMax II- Gibco hoặc tương đương) (đảm bảo chất lượng như màu sắc, hạn sử dụng..). Bảo quản môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ -20°C, rã đông từ từ ở nhiệt độ 2-15°C. Môi trường nuôi cấy sau khi đã đông bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, không cho đông lại. Sử dụng môi trường đã rã đông trong thời hạn tối đa 1 tuần;

- Colcemid, dung dịch KCl 0.075 M;
- Dung dịch cố định Methanol: Acetic acid (3:1 tỷ lệ thể tích);
- Lam kính, pipet vô trùng.

2.3. Trang thiết bị

- Buồng cấy vô trùng.
- Kính hiển vi thường Nikon, kính hiển vi đảo ngược Carl Zeiss.
- Tủ ấm 37 °C/5% CO₂.
- Máy ly tâm, tủ lạnh.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Đối với mẫu dịch ối: 10-15mL dịch ối được lấy vô trùng trong phòng thủ thuật, đựng trong 2 ống đáy nhọn loại 15mL vô trùng được vận chuyển về phòng xét nghiệm. Chất lượng mẫu: dịch ối trong, có màu vàng chanh và không lẫn máu. Trường hợp dịch ối lẫn máu sẽ ảnh hưởng đến chất lượng kết quả xét nghiệm.

- Kiểm tra đối chiếu tên, tuổi, địa chỉ, tuổi thai, chỉ định và ngày chọc ối trên tuýp dịch ối với hồ sơ người bệnh, gắn mã số bệnh phẩm theo mã số của phòng xét nghiệm.

- Mẫu được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ phòng không quá 25°C, không quá 24 giờ.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 7 đến 10 ngày.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Sử dụng trang thiết bị bảo hộ cá nhân: găng tay, áo blouse, khẩu trang khi thực hiện xét nghiệm.

- Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học phòng xét nghiệm.

- Các thao tác trong quy trình cần đảm bảo vô trùng.
- Không để hóa chất tiếp xúc với da, mắt. Trong trường hợp tiếp xúc với mắt, rửa ngay mắt với nước sạch và tìm tư vấn y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước 1: chuẩn bị dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất

- Mỗi mẫu chuẩn bị 02 chai nuôi cấy, mỗi chai nuôi cấy ghi thông tin người bệnh, ngày cấy, và mã số Lab của phòng xét nghiệm.
- Môi trường nuôi cấy :AmnioMaxTM -II complete của hãng Gibco - USA hoặc môi trường tương đương, để ấm trong bể ổn nhiệt 37°C.

Bước 2: Nuôi cấy ối

- Dung dịch ối sau khi hút ra cho vào ống 15mL vặn chặt nút. Cho vào ly tâm 1000 rpm trong 10 phút, hút bỏ dịch nổi, để lại khoảng 0,5-1mL cặn ối.
- Hòa tan nhẹ cặn ối bằng pipet vô trùng.
- Cho vào mỗi ống 4mL môi trường cấy ối đã làm ấm, trộn đều rồi hút ra chai nuôi cấy.
- Đặt chai nuôi cấy vào tủ ấm 37°C/5% CO₂.
- Sau 5 ngày nuôi cấy lấy ra kiểm tra tế bào mọc dưới KHV đảo ngược, chai chứa tế bào ối mọc tốt sẽ được thay môi trường (4mL môi trường 1 lần thay), theo dõi hàng ngày (tới ngày thứ 7- 10) cho đến khi mật độ tế bào khoảng 70-90%..

Bước 3: Đánh bong tế bào

- Loại bỏ môi trường đã nuôi cấy trong chai.
- Tráng lắc chai tế bào nuôi cấy bằng 2 mL PBS1x rồi loại bỏ dịch. (PBS 1x đã được để ấm 37°C).
- Thêm vào mỗi chai cần thu tế bào 1mL dung dịch trypsin đã để ấm ở 37°C, để 3-5 phút/ 37°C. Kiểm tra sự bong của tế bào bằng kính hiển vi đảo ngược. Đánh nhẹ thành chai nuôi cấy để tế bào bong ra.
- Thêm 2mL môi trường có huyết thanh rồi đổ toàn bộ dung dịch và cặn tế bào sang ống 15 mL đáy nhọn. Kiểm tra chai nuôi cấy để chắc chắn tế bào đã bong hết và đã đổ hết tế bào sang ống 15mL đáy nhọn. Trường hợp vẫn còn nhiều tế bào chưa bong, lặp lại từ bước 3 ý 3.

- Ly tâm 1000rpm trong 10 phút, hút bỏ dịch nổi phía trên. Để lại cặn 0.5-1mL. Cặn này có thể dùng để cấy truyền hoặc bảo quản để làm xét nghiệm di truyền.

4.2. Nhận định kết quả

- Nhìn thấy vệt đục cặn tế bào dưới đáy ống sau ly tâm.
 - Trường hợp không nhìn thấy cặn tế bào sau ly tâm, kiểm tra lại chai nuôi cấy để chắc chắn tế bào đã được đánh bong hoàn toàn và được chuyển hết sang ống ly tâm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Giao mẫu hoặc lưu mẫu và ghi vào nhật kí nuôi cấy tế bào.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trypsin không đánh bong hết tế bào nuôi cấy: Cần rửa môi trường nuôi cấy trước khi đánh bong bằng PBS1x. Kiểm tra trypsin đã để ấm trước khi cho vào đánh bong tế bào.

- Không thu được cặn tế bào hoặc tu được ít cặn: Cần kiểm tra tế bào đã được chuyển hoàn toàn từ chai cấy sang ống ly tâm hay chưa bằng soi chai cấy trên KHV soi ngược.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm tra chất lượng các hóa chất theo tiêu chuẩn của hãng

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Marilyn S. Arsham, Margaret J. Barch, (2017), “The ACT Cytogenetics Laboratory Manual”, 4th ed. Wiley, DOI:10.1002/9781119061199.

52. NUÔI CÂY TẾ BÀO GAI RAU

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình nuôi cấy tế bào gai rau nhằm mục đích có đủ tế bào tế bào gai rau (trophoblast cells) để phục vụ các xét nghiệm chẩn đoán di truyền

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sau khi thụ tinh, hợp tử trải qua quá trình phân bào, biệt hóa thành hai dòng tế bào chính: khối tế bào bên trong (inner cell mass) sẽ tạo ra phôi thai, và nguyên bào nuôi (trophectoderm) sẽ phát triển thành nhau thai. Gai rau (Chorionic Villi) là các cấu trúc vi thể từ màng đệm của phôi, tạo nên nhau thai và là giao diện trao đổi chất giữa mẹ và thai. Cả gai rau và thai nhi đều có chung nguồn gốc từ một hợp tử duy nhất, do đó, vật chất di truyền của chúng về cơ bản là giống nhau. Nguyên lý này là cơ sở của phương pháp sinh thiết gai rau (Chorionic Villus Sampling - CVS), một kỹ thuật chẩn đoán trước sinh.

Tuy nhiên, sự tương đồng di truyền không phải lúc nào cũng tuyệt đối do hiện tượng khảm (mosaicism). Trường hợp phổ biến nhất là khảm giới hạn ở bánh rau, khi chỉ có các tế bào gai rau có bất thường di truyền. Tế bào mẹ lẫn vào mẫu sinh thiết cũng là một nguyên nhân gây sai lệch.

Do đó, khi kết quả CVS không rõ ràng, các chuyên gia sẽ đề nghị thêm các xét nghiệm bổ sung như chọc ối để xác nhận chẩn đoán.

Nuôi cấy tế bào gai rau là quá trình bắt buộc để có đủ số lượng tế bào cho phân tích di truyền. Quá trình này dựa trên nguyên phân, giúp một tế bào ban đầu tạo ra nhiều tế bào con có bộ nhiễm sắc thể giống hệt nhau, đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư, hóa chất

- Ống lấy mẫu vô trùng 15mL.
- Chai nuôi cấy vô trùng đáy 25 cm².
- Bơm tiêm, đèn cồn, nhãn dán, kéo cắt mô, kẹp vô trùng.

- Dung dịch Trypsin 0,4 - 0,5%.
- Môi trường nuôi cấy tế bào ồi (AminoMax II- Gibco hoặc tương đương) (đảm bảo chất lượng như màu sắc, hạn sử dụng..). Bảo quản môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ -20°C, rã đông từ từ ở nhiệt độ 2-15°C. Môi trường nuôi cấy sau khi đã đông bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, không cho đông lại. Sử dụng môi trường đã rã đông trong thời hạn tối đa 1 tuần.

- Colcemid, dung dịch KCl 0,075 M.
- Dung dịch cố định Methanol : Acetic acid (3:1 tỷ lệ thể tích).
- Lam kính, pipet vô trùng.

2.3. Trang thiết bị

- Buồng cấy vô trùng.
- Kính hiển vi thường Nikon, kính hiển vi đảo ngược Carl Zeiss.
- Tủ ấm 37°C/5% CO₂
- Máy ly tâm, tủ lạnh.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Ít nhất 20mg tua rau được đựng trong lọ chứa dung dịch Hank's vô trùng được vận chuyển về phòng xét nghiệm trong vòng 24h ở nhiệt độ phòng (22-24°C).

- Kiểm tra đối chiếu tên, tuổi, địa chỉ, tuổi thai, chỉ định và ngày lấy mẫu trên tuýp tua rau với hồ sơ người bệnh, gắn mã số bệnh phẩm theo mã số của phòng xét nghiệm.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Từ 7 đến 14 ngày.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Sử dụng trang thiết bị bảo hộ cá nhân: găng tay, áo blouse, khẩu trang khi thực hiện xét nghiệm.

- Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học phòng xét nghiệm.
- Các thao tác trong quy trình cần đảm bảo vô trùng.
- Không để hóa chất tiếp xúc với da, mắt. Trong trường hợp tiếp xúc với mắt, rửa ngay mắt với nước sạch và tìm tư vấn y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước 1: chuẩn bị dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất

- Mỗi mẫu chuẩn bị 02 chai nuôi cấy, mỗi chai nuôi cấy ghi thông tin người bệnh, ngày cấy, và mã số Lab của phòng xét nghiệm.
- 03 đĩa petri đường kính 3cm, 01 kéo cắt mô, 02 kẹp
- Dung dịch Hanks 10mL; Dung dịch Trypsin 0,4 - 0,5%.
- Môi trường nuôi cấy: AmnioMax™ -II complete của hãng Gibco - USA, hoặc môi trường tương đương để ấm trong bể ổn nhiệt 37°C.

Bước 2: Chọn tua rau

- Lấy mô tua rau khoảng 20-50mg ra khỏi ống chứa mẫu và đặt vào đĩa petri vô trùng chứa 3mL dung dịch Hanks (HBSS). Rửa mẫu tua rau lần lượt qua 3 đĩa petri chứa dung dịch Hanks.
- Dưới kính hiển vi soi ngược, dùng kẹp vô trùng để tách tua rau đảm bảo không lẫn màng rụng và cục máu đông của mẹ.

Bước 3: Nuôi cấy tua rau

- Cắt mẫu tua rau thành những mảnh rất nhỏ $\leq 1\text{mm}^2$ bằng kéo vô trùng.
- Đặt khoảng 5-10 mảnh mô đã cắt nhỏ vào mỗi đáy chai (2 chai). Đặt bình nằm yên trong 20 phút, sau đó nhẹ nhàng thêm 4 mL môi trường nuôi cấy vào chai.
- Đặt chai nuôi cấy vào tủ ấm 37°C/5% CO₂.
- Sau 5 ngày nuôi cấy lấy ra kiểm tra tế bào mọc dưới KHV soi ngược, chai chứa tế bào ồi mọc tốt sẽ được thay môi trường (4mL môi trường 1 lần thay), theo dõi hàng ngày (tới ngày thứ 7- 10) cho đến khi mật độ tế bào khoảng 70-90%..

Bước 4: Đánh bong tế bào

- Loại bỏ môi trường đã nuôi cấy trong chai.
- Tráng lách chai tế bào nuôi cấy bằng 2 mL PBS1x rồi loại bỏ dịch. PBS 1x đã được để ấm 37°C.
- Thêm vào mỗi chai cần thu tế bào 1mL dung dịch trypsin đã để ấm ở 37°C, để 3-5 phút/ 37°C. Kiểm tra sự bong của tế bào bằng kính hiển vi đảo ngược. Đánh nhẹ thành chai nuôi cấy để tế bào bong ra.

- Thêm 2mL môi trường có huyết thanh rồi đổ toàn bộ dung dịch và cấy tế bào sang ống 15 mL đáy nhọn.

- Kiểm tra chai nuôi cấy để chắc chắn tế bào đã bong hết và đã đổ hết tế bào sang ống 15mL đáy nhọn. Trường hợp vẫn còn nhiều tế bào chưa bong, lặp lại từ bước 4 ý 3.

- Ly tâm 1000rpm trong 10 phút, hút bỏ dịch nổi phía trên. Để lại cặn 0.5-1mL.

- Cặn này có thể dùng để cấy truyền hoặc bảo quản để làm xét nghiệm di truyền.

4.2. Nhận định kết quả

- Nhìn thấy vệt đục cặn tế bào dưới đáy ống sau ly tâm
- Trường hợp không nhìn thấy cặn tế bào sau ly tâm, kiểm tra lại chai nuôi cấy để chắc chắn tế bào đã được đánh bong hoàn toàn và được chuyển hết sang ống ly tâm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Giao mẫu hoặc lưu mẫu và ghi vào nhật kí nuôi cấy tế bào.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trypsin không đánh bong hết tế bào nuôi cấy: Cần rửa môi trường nuôi cấy trước khi đánh bong bằng PBS1x. Kiểm tra trypsin đã để ấm trước khi cho vào đánh bong tế bào.

- Không thu được cặn tế bào hoặc thu được ít cặn: Cần kiểm tra tế bào đã được chuyển hoàn toàn từ chai cấy sang ống ly tâm hay chưa bằng soi chai cấy trên KHV soi ngược.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm tra chất lượng các hóa chất theo tiêu chuẩn của hãng

7.TÀI LIỆU THAM KHẢO

Marilyn S. Arsham, Margaret J. Barch, (2017), “The ACT Cytogenetics Laboratory Manual”, 4th ed. Wiley, DOI:10.1002/9781119061199.