

CHẨN ĐOÁN DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ  
BỆNH RỐI LOẠN DỰ TRỮ GLYCOGEN TYPE 6

Triệu Tiến Sang<sup>1\*</sup>, Trần Văn Khoa<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Phong<sup>1</sup>  
Trịnh Thế Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Thanh Tùng<sup>2</sup>

**Tóm tắt**

**Mục tiêu:** Báo cáo kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh rối loạn dự trữ glycogen type 6 (glycogen storage disease type 6 - GSD6; OMIM#232700).

**Phương pháp nghiên cứu:** Gồm mẫu máu ngoại vi của một gia đình 3 thành viên gồm bố, mẹ và con trai bị bệnh cùng 7 mẫu sinh thiết phôi của cặp vợ chồng sau khi thực hiện thụ tinh ống nghiệm. Dựa trên biến thể gene *PYGL* đã xác định ở người con trai bị bệnh GSD6, tiến hành thiết kế mỗi phục vụ giải trình tự gene Sanger tìm biến thể gây bệnh và phân tích di truyền liên kết. Áp dụng các kỹ thuật này để xác định các biến thể gene trên các mẫu phôi. **Kết quả:** Hai phôi bình thường không mang biến thể gene gây bệnh; một phôi mang biến thể *PYGL*: c.1334T>C (p.Leu445Pro), một phôi mang biến thể mất đoạn exon 14 - exon 17 trên gene *PYGL* và ba phôi bị bệnh GSD6. **Kết luận:** Tiến hành thành công kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh GSD6.

**Từ khóa:** *PYGL*; Bệnh rối loạn dự trữ glycogen type 6; Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ.

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS OF  
GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 6

**Abstract**

**Objectives:** To report the preimplantation genetic diagnosis of the glycogen storage disease type 6 (GSD6; OMIM#232700). **Methods:** Including peripheral blood samples from a family of three members: The father, mother, and son diagnosed with GSD6, and 7 blastocyst biopsy samples from the couple obtained after undergoing in vitro fertilization (IVF). Based on the *PYGL* gene variant identified in the son with GSD6, primers were designed for Sanger sequencing to identify

<sup>1</sup>Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện Quân y

<sup>2</sup>Viện Mô phôi và Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y

\*Tác giả liên hệ: Triệu Tiến Sang (trieusangk83@yahoo.com.vn)

Ngày nhận bài: 26/02/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 31/3/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1235>

the disease-causing variant and conduct linkage analysis. These techniques were applied to identify variants in the blastocyst samples. **Results:** Two embryos were normal and did not carry the disease-causing variant; one embryo carried the variant *PYGL*: c.1334T>C (p.Leu445Pro); one embryo carried a deletion variant spanning exon 14 to exon 17 of the *PYGL* gene, and three embryos were affected by GSD6. **Conclusion:** Preimplantation genetic diagnosis for glycogen storage disorder type 6 (GSD6) has been successfully performed.

**Keywords:** *PYGL*; Glycogen storage disease type 6; Preimplantation genetic diagnosis.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh rối loạn dự trữ glycogen loại 6 (GSD6; OMIM#232700), còn được gọi là bệnh Hers, là bệnh di truyền kiểu lặn trên nhiễm sắc thể thường, với tỷ lệ khoảng 1/1.000.000 người trên toàn thế giới [1]. Bệnh đặc trưng bởi tình trạng suy giảm chức năng phân giải glycogen ở gan, kết quả của bất thường trên gene *PYGL* mã hóa tổng hợp enzyme phosphorylase (enzyme quan trọng trong phân hủy glycogen) [2]. Các biến thể gây bệnh trên gene *PYGL* dẫn đến lượng enzyme hoạt động không đủ, tích tụ glycogen trong tế bào gan, gây ra các triệu chứng đặc trưng của GSD6.

Khởi phát của bệnh GSD6 thường xảy ra ở trẻ sơ sinh hoặc trẻ từ 1 - 3 tuổi, với các triệu chứng điển hình như gan to, chậm phát triển, hạ đường huyết có tăng ketone, tăng men gan và triglyceride, một số khác lại biểu hiện triệu chứng nhẹ và cải thiện theo tuổi tác [3]. Liệu pháp điều trị hiện vẫn là thay đổi chế độ

ăn, sử dụng một số loại tinh bột thay thế để ổn định đường huyết. Tuy nhiên, liệu pháp chỉ giúp kiểm soát triệu chứng mà không thể chữa khỏi hoàn toàn, người bệnh vẫn có nguy cơ xuất hiện các biến chứng như loãng xương, ung thư gan và bệnh cơ tim.

Phát hiện bệnh sớm sẽ giúp người bệnh cải thiện chất lượng cuộc sống và phòng tránh được các biến chứng. Bên cạnh đó, việc phòng bệnh hoàn toàn có thể thực hiện thông qua chẩn đoán di truyền tiền làm tổ, giúp cho những cặp vợ chồng mang gene bệnh có thể sinh con khỏe mạnh, không mang gene bệnh. Tuy vậy, hiện chưa có công bố nào tại Việt Nam về chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh GSD6, do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Báo cáo kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh GSD6, qua đó bổ sung dữ liệu về chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh lý di truyền đơn gene được thực hiện tại Việt Nam.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm mẫu máu ngoại vi của một gia đình 3 thành viên gồm bố, mẹ và con trai bị bệnh GSD6 cùng 7 mẫu sinh thiết phôi của cặp vợ chồng có được sau khi thực hiện thụ tinh ống nghiệm.

Mẫu máu của người con trai 8 tuổi với các biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng nghi ngờ rối loạn dự trữ glycogen (chậm phát triển vận động, gan to, hạ đường huyết, men gan cao...) đã được tiến hành giải trình tự gene thế hệ mới (next-generation sequencing: NGS) và xác định được đối tượng mang một biến thể trên gene *PYGL* (NM\_002863.5), được ACMG phân loại là có khả năng gây bệnh *PYGL*: c.1334T>C (p.Leu445Pro). Bên cạnh đó, một biến thể khác cũng đã được phát hiện là mất đoạn exon 14 - exon 17 trên gene *PYGL*. Với sự phù hợp từ lâm sàng và kết quả xét nghiệm gene, người con đã được kết luận mắc bệnh GSD6. Cặp vợ chồng có nguyện vọng sinh con khoẻ mạnh nên đã tiến

hành thụ tinh ống nghiệm và có được 07 phôi (phôi N1-N7) và các phôi này được tiến hành chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh GSD6.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử:

- Tách chiết DNA từ mẫu máu ngoại vi: Mẫu máu được tách chiết DNA bằng bộ kit G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology). DNA sau tách chiết được pha loãng về nồng độ 20 ng/μL, độ tinh sạch A260/280 từ 1,8 - 2,2.

- Kỹ thuật sinh thiết phôi và khuếch đại toàn bộ bộ gene (whole genome amplification - WGA): 7 phôi được nuôi cấy đến ngày thứ 5 và tiến hành sinh thiết ở giai đoạn phôi nang. Mỗi phôi sinh thiết từ 3 - 5 tế bào, rửa với dung dịch PBS 1X và 1% PVP, sau đó khuếch đại bộ gene phôi bằng bộ kit REPLI-g® Single Cell Kit (Quiagen).

- Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gene chứa biến thể *PYGL*: c.1334T>C

Sử dụng phần mềm Primer-BLAST để thiết kế hai cặp mồi được để khuếch đại đoạn gene chứa biến thể *PYGL*: c.1334T>C, với kích thước 266bp. Trình tự mồi khuếch đại đoạn gene chứa biến thể *PYGL*: c.1334T>C như sau:

PYGL-F: 5'-TTCCATTAATGGATCAGTGTCAGACC-3'

PYGL-R: 5'-TGTTGCATTAAACCTGAGTGACCA-3'

Dựa vào nhiệt độ nóng chảy của cặp mồi, lựa chọn 59°C làm nhiệt độ gắn mồi tối ưu nhất. Mỗi ống phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gene chứa biến thể riêng có thể tích 25µL, trong đó chứa 12,5µL GoTaq Green Mastermix 2X; 5,5µL nước; 1,0µL mỗi mồi xuôi - ngược và 5,0µL DNA mẫu. Chu trình nhiệt khuếch đại gene như sau: 95°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 95°C - 30 giây, 59°C - 30 giây, 72°C - 30 giây và 72°C - 10 phút. Sau khi chạy phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 2% kiểm tra, trước khi tiến hành giải trình tự Sanger.

- Giải trình tự Sanger: Sản phẩm PCR được giải trình tự Sanger trên máy SeqStudio, sử dụng bộ kit BigDye®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher) để phát hiện biến thể *PYGL*: c.1334T>C. Trình tự nucleotide của đoạn gene được phân tích và xác định bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor.

- Phân tích di truyền liên kết: Dựa vào vị trí của gene *PYGL*, bốn chỉ thị STR (short tandem repeats) liên kết gene nằm tại vùng 14q22.1 được lựa chọn gồm: D14S269, D14S50.05, D14S50.06 (lần lượt cách gene *PYGL* khoảng 1,60Mbps, 0,85Mbps và 0,84Mbps về phía centromere) và D14S50.96 (cách gene *PYGL* khoảng 0,01Mbps về phía telomere). Cặp mồi khuếch đại các STR này được thiết kế bằng phần mềm Primer-BLAST (Bảng 1).

**Bảng 1.** Trình tự mồi khuếch đại các STR liên kết gene *PYGL*.

Mồi	Trình tự (5' - 3')	Kích thước
D14S269	F /6-FAM/- CACATGGCATTACCAACC R GCAACATGCTTGACAGG	~227bp
D14S50.05	F /6-FAM/-ACGAGGAAGCACGAGAAAGG R GAGACTCAGAGCAGCC	~200bp
D14S50.06	F /6-FAM/-TGGGTATCCTGGACCATTGTC R GGGAACAGCAGATTTATATCCCCT	~207bp
D14S50.96	F /6-FAM/- GCAGTACAGTCCAGCCTCG R AAGAGGGTTTACAAAGAGCTT	~205bp

Mỗi ống phản ứng PCR để khuếch đại đoạn STR riêng có tổng thể tích 25 $\mu$ L, trong đó chứa 12,5 $\mu$ L GoTaq Green Mastermix 2X, 5,5 $\mu$ L nước, 1,0 $\mu$ L mỗi mỗi xuôi - ngược và 5,0 $\mu$ L DNA mẫu. Chu trình nhiệt khuếch đại STR như sau: 95°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 95°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 25 giây và 72°C - 10 phút. Sản phẩm PCR được biến tính và điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer, phân tích trên phần mềm GeneMapper ID 6.0.

- Sàng lọc lệch bội nhiễm sắc thể (preimplantation genetic testing for aneuploidy): Tiến hành chẩn đoán di truyền tiền làm tổ cho phôi dựa trên kết quả của các kỹ thuật giải trình tự Sanger và phân tích

liên kết đã thực hiện. Nếu phôi không bị bệnh sẽ được sàng lọc các bất thường nhiễm sắc thể bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới (hệ thống Ion Torrent) sử dụng bộ kit Ion ReproSeq™ for PGT-A.

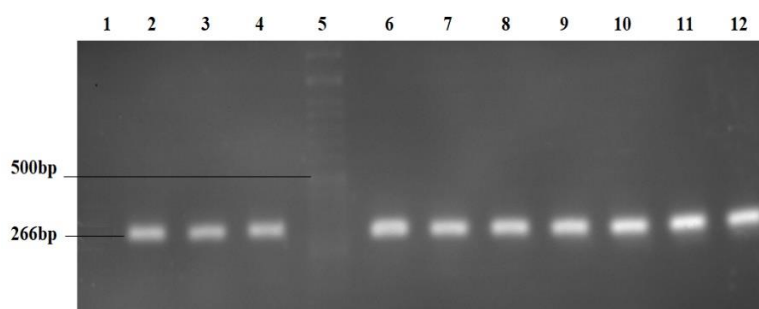
### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo Quyết định của Hội đồng Đạo đức số 1394/QĐ-HVQY ngày 17/7/2012 của Học viện Quân y. Dữ liệu kết quả nghiên cứu được Bộ môn Sinh học và Di truyền y học, Viện Mô phôi và Lâm sàng Quân đội cho phép sử dụng và công bố. Thông tin của bệnh nhân được đảm bảo giữ bí mật. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Kết quả phản ứng PCR và giải trình tự Sanger chứa biến thể *PYGL: c.1334T>C*

\* Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gene chứa biến thể *PYGL: c.1334T>C*



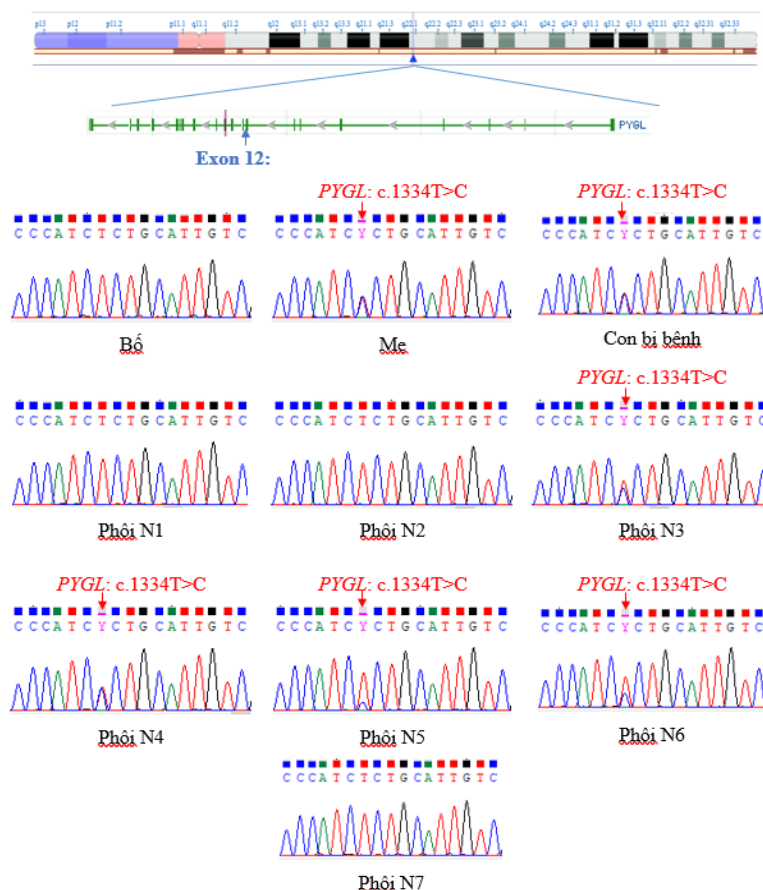
**Hình 1.** Kết quả khuếch đại đoạn gene chứa biến thể *PYGL: c.1334T>C*

Giếng 1: Chứng âm; Giếng 2: Mẫu bố; Giếng 3: Mẫu mẹ;  
Giếng 5: Thang DNA 50bp; Giếng 6-12: Mẫu phôi N1-N7.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di agarose 2% trên các mẫu máu của thành viên trong gia đình và mẫu phôi cho thấy đã khuếch đại thành công các đoạn gene

có kích thước như đã thiết kế (266bp) (Hình 1). Các mẫu đảm bảo điều kiện để tiến hành giải trình tự Sanger.

\* Kết quả giải trình tự Sanger:



**Hình 2.** Kết quả giải trình tự Sanger phát hiện biến thể *PYGL: c.1334T>C*.

Kết quả giải trình tự gene Sanger cho thấy mẹ là người mang biến thể *PYGL: c.1334T>C* và di truyền cho con bị bệnh, người bố không mang biến thể này. Trên các mẫu phôi N2, N4, N5, N6 là các phôi mang biến thể *PYGL: c.1334T>C*, trong khi đó phôi N1, N3 và N7 không mang biến thể này.

## 2. Kết quả phân tích di truyền liên kết

Trên kết quả điện di mao quản (Bảng 2), phân tích trên trường hợp người bố, người mẹ và con bị bệnh để suy luận ra các alen liên kết với biến thể cần xác định di truyền từ mẹ là: Alen 237bp của locus D14S269, alen 215bp của locus D14S50.05 và alen 216bp của locus D14S50.06. Tương tự, phân tích kiểu gene của người bố và con bị bệnh để suy luận ra các alen liên kết với biến thể mất đoạn

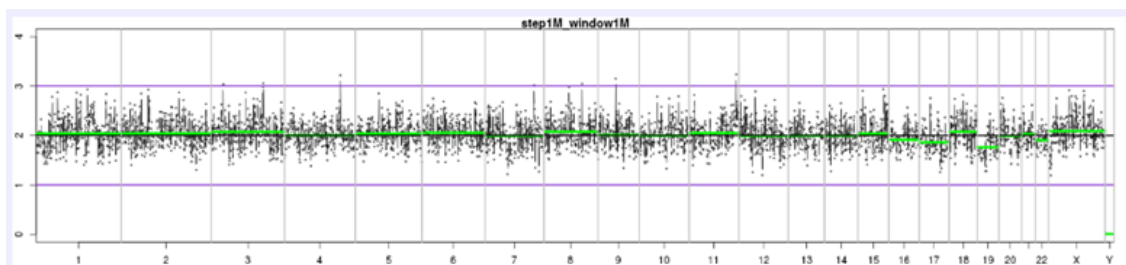
di truyền từ bố là: Alen 237bp của locus D14S269, alen 223bp của locus D14S50.05 và alen 222bp của locus D14S50.06. Thông qua phân tích di truyền liên kết đưa ra được kết luận: Các phôi N4, N5, N6 bị bệnh; phôi N2 là phôi mang biến thể nguồn gốc từ mẹ; phôi N7 là phôi mang biến thể nguồn gốc từ bố; phôi N1, N3 là phôi bình thường, không mang biến thể gây bệnh. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phát hiện biến thể *PYGL*: c.1334T>C bằng giải trình tự gene Sanger (Bảng 2).

**Bảng 2.** Tổng hợp kết quả phân tích di truyền liên kết và giải trình tự Sanger.

Mẫu	D14S269	D14S50.05	D14S50.06	D14S50.96	Sanger <i>PYGL</i> : c.1334	Kết luận
Mẹ	231/237	215/215	216/220	221/221	TC	Mang gene
Bố	231/237	215/223	216/222	221/221	TT	Mang gene
Con bị bệnh	237/237	215/223	216/222	221/221	TC	Bệnh
Phôi N1	231/231	215/215	216/220	221/221	TT	Bình thường
Phôi N2	231/237	215/215	216/216	221/221	TC	Mang gene di truyền từ mẹ
Phôi N3	231/231	215/215	216/220	221/221	TT	Bình thường
Phôi N4	237/237	215/223	216/222	221/221	TC	Bệnh
Phôi N5	237/237	215/223	216/222	221/221	TC	Bệnh
Phôi N6	237/237	215/223	216/222	221/221	TC	Bệnh
Phôi N7	231/237	215/223	220/222	221/221	TT	Mang gene di truyền từ bố

### 3. Kết quả sàng lọc lệch bội nhiễm sắc thể của phôi

Các phôi không bị bệnh (N1, N2, N3, N7) sẽ được tiến hành sàng lọc lệch bội. Kết quả cho thấy cả 4 phôi này không phát hiện bất thường nhiễm sắc thể: 46,XX (Hình 3). Các tư vấn di truyền đã được thực hiện, giúp cho cặp vợ chồng đưa ra quyết định lựa chọn phôi để tiến hành chuyển phôi.



**Hình 3.** Kết quả sàng lọc bất thường nhiễm sắc thể trên mẫu sinh thiết phôi N1.

## BÀN LUẬN

Ở trường hợp ca bệnh trong nghiên cứu này, biến thể c.1334T>C (p.Leu445Pro) của gene *PYGL* dẫn đến sự thay thế acid amin leucine bằng proline tại codon 445, gây ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein *PYGL*. Sự thay đổi này có thể làm giảm tính linh hoạt của protein và chức năng phân giải glycogen. Biến thể này đã được ghi nhận trong cơ sở dữ liệu ClinVar (ID: 941372), được ACMG (American college of medical genetics and genomics) phân loại là có khả năng gây bệnh và cũng đã được ghi nhận ở người mắc rối loạn dự trữ glycogen trước đây [4].

Biến thể mất đoạn exon 14 - exon 17 trên gene *PYGL* là biến thể chưa từng được ghi nhận trong các cơ sở dữ liệu đột biến gene như ClinVar, HGMD (human gene mutation database). Biến thể mất đoạn lớn này có thể gây ra hậu quả nghiêm trọng đối với chức năng của protein được mã hóa bởi gene bị ảnh hưởng, có thể dẫn đến thiếu hụt protein, làm gián đoạn quá trình phân giải glycogen. Việc phát hiện biến thể mất đoạn này một cách trực tiếp gặp nhiều khó khăn do: Chưa biết chính xác vị trí mất đoạn; một số phương pháp phát hiện trực tiếp thông qua khuếch đại các

đoạn trình tự chứa vùng mất đoạn (gap-PCR, giải trình tự Sanger) thường có kích thước lớn và dễ xảy ra hiện tượng mất alen (allelic dropout - ADO) trên các mẫu phôi sau khi thực hiện nhân bản toàn bộ bộ gene (WGA). Do đó, việc sử dụng kỹ thuật phân tích di truyền liên kết trở nên đặc biệt quan trọng trong trường hợp này. Phương pháp phân tích di truyền liên kết đã giúp xác định gián tiếp các biến thể gây bệnh thông qua các chỉ thị di truyền liên kết với gene *PYGL*, từ đó, hỗ trợ phát hiện các biến thể gene khó nhận diện.

Phân tích di truyền liên kết được Hiệp hội Sinh sản và Phôi học châu Âu (ESHRE) khuyến cáo là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh lý đơn gene [5]. Trường hợp trong nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy vai trò quan trọng không thể thiếu của phân tích di truyền liên kết trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ khi giúp cải thiện khả năng chẩn đoán chính xác, đặc biệt trong các trường hợp biến thể khó xác định bởi các phương pháp giải trình tự gene truyền thống hoặc khi không xác định được vị trí chính xác của biến thể. Với các STR được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này, hoàn toàn có thể ứng dụng tương tự trong chẩn đoán tiền làm tổ cho các ca bệnh GSD6 khác.



### KẾT LUẬN

Tiến hành thành công kỹ thuật chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh GSD6 cho một cặp vợ chồng với tiền sử sinh con bị bệnh với kết quả là hai phôi bình thường không mang biến thể gene gây bệnh, một phôi mang biến thể *PYGL*: c.1334T>C (p.Leu445Pro), một phôi mang biến thể mất đoạn exon 14 - exon 17 trên gene *PYGL* và ba phôi bị bệnh.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kishnani PS, Goldstein J, Austin SL, et al. Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: A clinical practice resource of the

American college of medical genetics and genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*. 2019; 21(4):772-789.

2. Labrador E, Weinstein DA. Glycogen storage disease type VI. 2019.

3. Grünert SC, Hannibal L, Spiekerkoetter U. The phenotypic and genetic spectrum of glycogen storage disease type VI. *Genes*. 2021; 12(8):1205.

4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/941372>.

5. ESHRE PGT-M Working Group. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020; (3).