

XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH C677T TRÊN GENE MTHFR BẰNG KỸ THUẬT PCR-RFLP

*Hà Thị Minh Thi, Nguyễn Thị Nguyệt Minh,
Lê Thanh Nhã Uyên, Nguyễn Việt Nhân
Trường Đại học Y Dược Huế*

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đa hình C677T trên gene MTHFR là một yếu tố nguy cơ của nhiều bệnh lý khác nhau. Đề tài được thực hiện nhằm các mục tiêu: (1) Hoàn thiện kỹ thuật PCR-RFLP với cặp mồi tự thiết kế để xác định đa hình C677T trên gene MTHFR. (2) Xác định tỷ lệ các đa hình tại vị trí 677 của gene MTHFR trên nhóm người tình nguyện. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tách chiết DNA từ máu ngoại vi của 60 người tình nguyện. Thiết kế cặp mồi bằng phần mềm FastPCR và hoàn thiện kỹ thuật PCR. Chuẩn hóa phản ứng cắt bằng enzyme *HinfI*, kiểm chứng kết quả bằng phương pháp xác định trình tự. **Kết quả:** Đã thiết kế được cặp mồi cho phép khuếch đại đoạn gene MTHFR chứa vị trí đa hình 677 và luôn có một vị trí cắt bắt buộc (làm chứng nội). Phản ứng cắt chỉ cần dùng 0,5 μ l *HinfI* (10 U/ μ l). Tỷ lệ 677CC là 71,67%; 677CT là 25%; 677TT là 3,33%. **Kết luận:** Đã hoàn thiện thành công kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đa hình C677T trên gene MTHFR. **Từ khóa:** Đa hình C677T, gene MTHFR, PCR-RFLP.

Abstract

IDENTIFYING THE C677T POLYMORPHISM OF MTHFR GENE BY PCR-RFLP TECHNIQUE

*Ha Thi Minh Thi, Nguyen Thi Nguyet Minh,
Le Thanh Nha Uyen, Nguyen Viet Nhan*

Background: The C677T polymorphism of MTHFR gene is a risk factor of many diseases. This study aimed to: (1) improve a PCR-RFLP process with the own designed primers to identify the C677T polymorphism of MTHFR gene. (2) Evaluate the prevalence of the C677T polymorphism of MTHFR gene in volunteer group. **Materials and method:** DNA samples were extracted from peripheral blood of 60 volunteers. Designing primers by using FastPCR software, then improving PCR technique. Standardizing the optimal conditions of restriction digest by *HinfI*. Confirming the results of polymorphism by DNA sequencing technique. **Results:** We designed successfully primers to amplify fragment of MTHFR gene including C677T polymorphism and an obligatory restriction site of *HinfI* (as internal control). 0.5 μ l of *HinfI* enzyme (10 U/ μ l) was enough for restriction digest. The MTHFR genotype frequencies were: 71.67 % (677CC); 25% (677CT); and 3.33 % (677TT). **Conclusion:** We standardized successfully PCR-RFLP technique to identifying C677T polymorphism of MTHFR gene. **Keywords:** C677T polymorphism, MTHFR gene, PCR-RFLP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ giữa thập niên 1980 và đầu thập niên 1990, các nghiên cứu của nhiều tác giả như Boers, Genest, Clarke,... đã cho thấy tăng nồng độ homocysteine trong máu là một yếu

tố nguy cơ của các bệnh lý về mạch máu như bệnh mạch vành, tắc mạch não và động mạch ngoại biên [2], [3], [5]. Càng ngày người ta nhận thấy sự tăng nồng độ này còn liên quan đến rất nhiều bệnh lý khác nhau như sẩy thai

liên tiếp, vô sinh nam, bệnh ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, rối loạn tâm thần... Quá trình chuyển hoá homocysteine có liên quan đến hai con đường - chuyển sulfur và tái methyl hoá. Trong đó, con đường thứ hai phụ thuộc vào enzyme methylene-tetrahydrofolate reductase - một sản phẩm của gene MTHFR.

Năm 1995, Frosst lần đầu tiên đã phát hiện một biến dị di truyền với sự thay đổi nucleotide C (cytosine) thành T (thymine) tại vị trí 677 - gọi là đa hình C677T - trên gene MTHFR của những bệnh nhân bị bệnh về mạch máu, biến dị này chiếm 38% trong nghiên cứu của tác giả [4]. Đa hình C677T trên gene MTHFR sẽ làm thay đổi một acid amin ở vị trí 226 trong chuỗi polypeptide tương ứng, từ alanine trở thành valine. Sự thay đổi này làm enzyme methylenetetrahydrofolate reductase bị giảm hoạt tính dẫn đến tăng homocysteine huyết tương. Vì vậy đa hình C677T của gene MTHFR được xem là một yếu tố nguy cơ trong nhiều bệnh lý khác nhau có liên quan đến tình trạng tăng nồng độ homocysteine máu.

Để tạo điều kiện cho việc nghiên cứu về vai trò của đa hình C677T trên gene MTHFR trong các bệnh lý liên quan, một nghiên cứu cơ bản nhằm thiết lập quy trình về kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định đa hình này là hết sức cần thiết. Sự thay đổi từ C trở thành T tại nucleotide thứ 677 của gene MTHFR đã tạo ra một vị trí cắt mới (GAGTC) cho enzyme *HinfI*. Vì vậy việc sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại đoạn gene MTHFR chứa vị trí 677 rồi sau đó cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *HinfI* (kỹ thuật PCR-RFLP) là quy trình sinh học phân tử được lựa chọn hàng đầu trong việc xác định đa hình C677T.

Tại Việt Nam chưa có công trình nào nghiên cứu về đa hình C677T của gene MTHFR trên nhóm người bình thường cũng như bệnh lý. Do đó, việc thực hiện đề tài "**Xác định đa hình C677T của gene MTHFR bằng kỹ thuật PCR-RFLP**" là

rất cần thiết, đặc biệt là đối với các phòng thí nghiệm Di truyền phân tử tại các cơ sở nghiên cứu và đào tạo như trường Đại học Y Dược Huế.

Đề tài nghiên cứu này được thực hiện nhằm các mục tiêu sau:

-Hoàn thiện kỹ thuật PCR – RFLP với cặp mồi tự thiết kế để xác định đa hình C677T trên gene MTHFR.

-Xác định tỷ lệ các đa hình tại vị trí 677 của gene MTHFR trên nhóm người tình nguyện.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

60 người tình nguyện, là những người đến kiểm tra sức khỏe tổng quát tại Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế và không có bệnh lý. Mỗi người lấy khoảng 1 ml máu tĩnh mạch có chống đông bằng EDTA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA

Từ 300 µl máu tĩnh mạch theo protocol chuẩn của kit mD_x InstaGene Genomic DNA (Cat. No. 7326028, Bio-Rad).

2.2.2. Thực hiện kỹ thuật PCR nhằm khuếch đại đoạn gene MTHFR có chứa nucleotide 677

- Thiết kế mồi bằng phần mềm FastPCR 5.3

+ Tìm trình tự gene MTHFR (GB: AY338232.1) trên GenBank. Sử dụng đoạn gene dài 1020bp chứa vị trí đa hình C677T (từ nucleotide 8221 đến 9240) để thiết kế mồi.

+ Nhập vào phần mềm FastPCR trình tự gene đã chọn và câu lệnh: -lpadl-350 -rpd550-1020. Nhập các thông số cơ bản để thiết kế mồi. Sau khi chạy chương trình FastPCR, phần mềm hiển thị một số trình tự cặp mồi tối ưu, từ đó chọn một cặp mồi là:

Mồi xuôi:

5' TCATGAGCCCAGCCACTCAC 3'

Mồi ngược :

5' CAGCGAACTCAGCACTCCAC 3'

+ Trình tự này được gửi đến công ty IDT để đặt hàng tổng hợp mỗi.

- Thành phần tham gia phản ứng PCR: Thể tích phản ứng là 25 μ l gồm 12,5 μ l GoTaq Green Master Mix 2 $\times$ (Promega); 1 μ l mỗi xuôi (10 pmol/ μ l); 1 μ l mỗi ngược (10 pmol/ μ l); 1 μ l DNA khuôn mẫu; 9,5 μ l nước cất.

- Điều kiện luân nhiệt: Giai đoạn biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút. Tiếp đến là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: biến tính 95°C trong 1 phút 30 giây; gắn mỗi 60°C trong 1 phút; kéo dài mỗi 72°C trong 1 phút. Giai đoạn kéo dài cuối cùng 72°C trong 8 phút.

- Phản ứng được thực hiện trong máy luân nhiệt Applied Biosystems 2720 tại bộ môn Di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế.

- Sản phẩm PCR thu được sẽ được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% kích thước 10 cm x 6,5 cm x 0,4 cm trong 60 phút, ở điện thế 80V, có kèm thang chuẩn 100bp. Đọc kết quả dưới đèn cực tím sau khi nhuộm ethidium bromide. Kích thước sản phẩm dự kiến là 465 bp.

2.2.3. Xác định điều kiện tối ưu của phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *HinfI*

Dựa trên khuyến cáo của nhà sản xuất là lượng enzyme *HinfI* (Fermentas, 10 U/ μ l) từ 0,5-2 μ l, vì vậy chúng tôi lần lượt thử với các mức enzyme là 0,5; 1; 1,5 và 2 μ l.

Thành phần phản ứng cắt được thực hiện ở bước thử đầu tiên là: 13 μ l sản phẩm PCR; 0,5 μ l enzyme *HinfI*; 1,5 μ l đệm phản ứng (thể tích phản ứng là 15 μ l).

Hỗn hợp trên được trộn đều rồi ủ qua đêm, ở nhiệt độ 37°C trong bể ổn nhiệt.

Kiểm tra sản phẩm cắt bằng điện di trên gel agarose 1,5% kích thước 10 cm x 6,5 cm x 0,45 cm trong 75 phút ở điện thế 80V có kèm thang chuẩn 100 bp. Đọc kết quả dưới đèn cực tím sau khi nhuộm ethidium bromide.

Lần lượt thực hiện phản ứng cắt này với các mẫu DNA theo thứ tự. Sau khi phát hiện được đủ 3 loại kiểu gene 677CC, 677CT và 677TT, chúng tôi tiếp tục thử mỗi kiểu gene với lượng enzyme nhiều hơn là 1 μ l; 1,5 μ l và 2 μ l.

2.2.4. Kiểm chứng quy trình PCR - RFLP

- Lấy 4 sản phẩm PCR tương ứng bao gồm 2 mẫu có kiểu gene 677CC, 1 mẫu có kiểu gene 677CT và 1 mẫu có kiểu gene 677TT để gửi đi xác định trình tự DNA. Đối chiếu trình tự của sản phẩm PCR với trình tự của gene MTHFR bằng chương trình BLAST của NCBI để kiểm chứng tính đặc hiệu của cặp mỗi sử dụng.

- Từ kết quả xác định trình tự của 4 mẫu trên, tìm vị trí đa hình 677. Đối chiếu với kết quả đa hình xác định được nhờ phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *HinfI*.

2.2.5. Tính tỷ lệ các kiểu gene 677CC, 677TT và 677CT trong nhóm nghiên cứu

2.2.6. Cách đánh giá kết quả

Bảng 2.1: Xác định kiểu gene dựa vào kích thước sản phẩm cắt

Kiểu gene	Kích thước sản phẩm PCR	Kích thước các đoạn DNA sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzyme <i>HinfI</i>
677CC	465	83; 382bp
677CT	465	83; 165; 217bp
677TT	465	83; 165; 217; 382bp

2.2.7. Xử lý số liệu

Tính tỷ lệ % các kiểu gene 677CC, 677CT và 677TT; tỷ lệ % các allele C và T.

Sử dụng phân tích cân bằng Hardy-Weinberg để đánh giá sự phân bố ngẫu nhiên của các

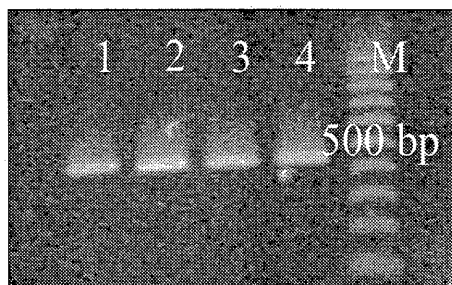
kiểu gene trong nhóm nghiên cứu. Nếu $p > 0,05$ thì sự phân bố được đánh giá là phù hợp với cân bằng Hardy-Weinberg.

So sánh các tỷ lệ % với các nghiên cứu khác bằng test χ^2 , sử dụng phần mềm MedCalc.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả hoàn thiện kỹ thuật PCR-RFLP

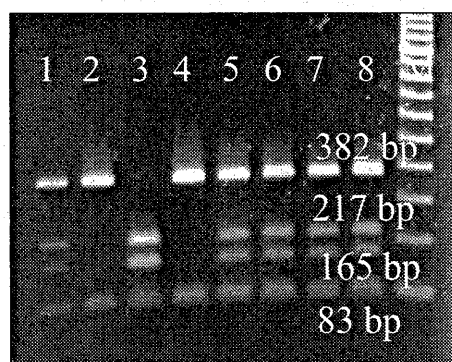
3.1.1. Kết quả thực hiện kỹ thuật PCR với cặp mồi tự thiết kế



Cột 1 – 4: sản phẩm PCR; Cột M: thang chuẩn 100 bp
Nhận xét: Sản phẩm PCR cho băng rõ nét, kích thước phù hợp với kích thước dự kiến (465 bp).

Hình 3.1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR

3.1.2. Kết quả thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng *HinfI*



Cột 1, 5 - 8 có 4 băng kích thước 83, 165, 217, 382 bp: kiểu gene CT.

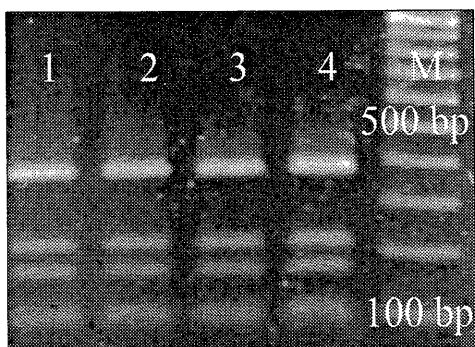
Cột 2, 4 có 2 băng kích thước 83, 382 bp: kiểu gene CC

Cột 3 có 3 băng kích thước 83, 165, 217 bp: kiểu gene TT. Cột M: thang chuẩn 100 bp.

Nhận xét: Sản phẩm PCR sau cắt bằng enzyme *HinfI* cho băng rõ nét, đúng kích thước.

Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sau cắt bằng enzymen *HinfI*

3.1.3. Kết quả thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng *HinfI* ở các nồng độ khác nhau



Các cột từ 1-4 lần lượt là sản phẩm cắt từ mẫu PCR của kiểu gene CT tương ứng với các thể tích enzyme là 0,5; 1; 1,5 và 2 μ l được sử dụng trong mỗi phản ứng cắt.

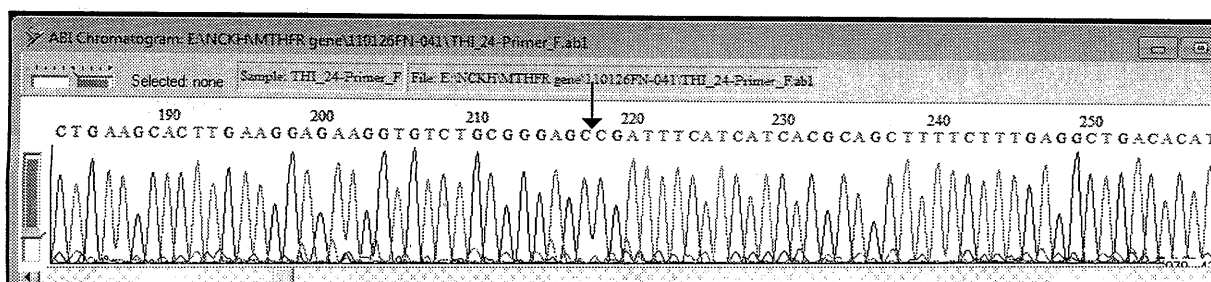
Nhận xét: Tất cả đều có 4 băng rõ nét với kích thước 83 bp, 165 bp, 217 bp, 382 bp phù hợp cho kiểu gene CT. mẫu di hợp từ 677CT sau cắt bằng enzymen *HinfI* ở các nồng độ khác nhau.

Hình 3.3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR

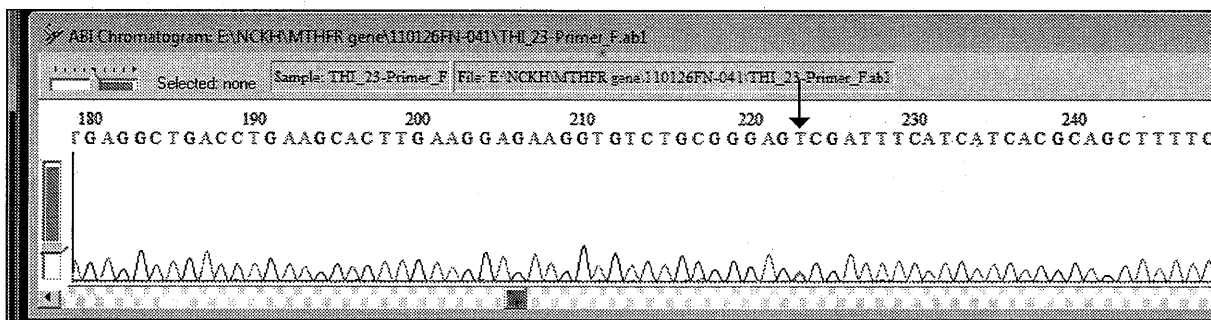
Ngoài ra chúng tôi cũng thử các phản ứng cắt với nồng độ enzyme thay đổi như trên đối với các sản phẩm PCR của kiểu gene CC và TT, kết quả cũng cho thấy chỉ cần 0,5 μ l enzyme là đủ.

3.1.4. Kết quả kiểm chứng kỹ thuật PCR-RFLP trong việc xác định các đa hình C677T

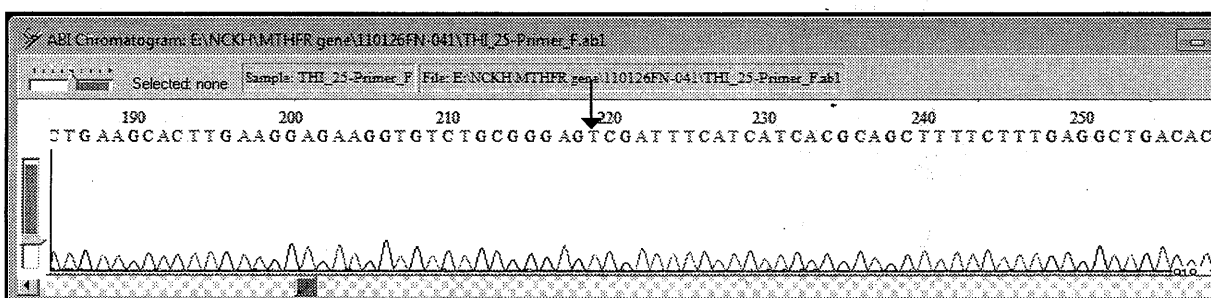
Kết quả xác định trình tự cho thấy việc xác định các đa hình C677T bằng phương pháp PCR-RFLP ở 4 mẫu kiểm chứng là chính xác.



Hình 3.4: Kết quả xác định trình tự mẫu đồng hợp tử 677CC



Hình 3.5: Kết quả xác định trình tự mẫu dị hợp tử 677CT



Hình 3.6: Kết quả xác định trình tự mẫu đồng hợp tử 677TT

Nhận xét: Mẫu đồng hợp tử 677CC chỉ cho 1 đỉnh nucleotide C (màu xanh) tại vị trí tương ứng (có mũi tên), mẫu đồng hợp tử 677TT chỉ cho 1 đỉnh nucleotide T (màu đỏ), trong khi mẫu dị hợp tử 677CT cho 2 đỉnh là nucleotide C và T (1 đỉnh màu xanh và 1 đỉnh màu đỏ có chiều cao bằng nhau) tại cùng một vị trí tương ứng.

3.2. Tỷ lệ các đa hình

Bảng 3.1: Sự phân bố các đa hình và kết quả phân tích cân bằng Hardy-Weinberg

Kiểu gene	Tần số quan sát (Tỷ lệ %)	Tần số kỳ vọng theo H-W (Tỷ lệ %)	Allele C (Tỷ lệ %)	Allele T (Tỷ lệ %)	P
677CC	43 (71,67)	42,5 (70,84)	86	0	0,631
677CT	15 (25,00)	15,99 (26,65)	15	15	
677TT	2 (3,33)	1,5 (2,51)	0	4	
Tổng	60 (100,00)	60 (100,00)	101 (84,17)	19 (15,83)	
			120 (100,00)		

Nhận xét: Tỷ lệ kiểu gene đồng hợp tử 677TT chỉ chiếm tỷ lệ rất thấp (3,33%), trong khi đó tỷ lệ kiểu gene đồng hợp tử 677CC chiếm đến 71,67%. Sự phân bố các kiểu gene CC, TT và CT trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với cân bằng Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Allele T chỉ chiếm tỷ lệ 15,83%.

4. BÀN LUẬN

4.1. Hoàn thiện kỹ thuật PCR – RFLP với cặp mồi tự thiết kế để khuếch đại đoạn gene MTHFR chứa nucleotide thứ 677

4.1.1. Thiết kế mồi

Từ trình tự gene MTHFR lấy từ GenBank (GB: AY338232.1), chúng tôi sử dụng đoạn gene dài 1020bp chứa vị trí đa hình C677T (từ nucleotide 8221 đến nucleotide 9240) để thiết kế mồi. Trong trình tự này, vị trí 677 (số thứ tự này chỉ tính cho phần mang mã di truyền – các exon) tương ứng với vị trí thứ 8747 trên toàn bộ gene, nghĩa là trình tự nhận biết của enzyme *HinfI* ở đa hình C677T gồm 5 nucleotide GAGTC (từ vị trí 8744 đến 8748). Trong đoạn gene dài 1020 bp được chọn để thiết kế mồi này còn có 2 vị trí nhận biết khác của enzyme *HinfI* là GACTC (từ vị trí 8579 đến 8583) và GATTC (từ vị trí 9112 đến 9116).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy vị trí cắt GACTC (từ 8579 đến 8583) khá gần vị trí đa hình C677T (từ 8744 đến 8748) nên đã tận dụng đặc điểm này để thiết kế mồi tạo sản phẩm PCR có chứa cả hai vị trí cắt. Trong đó, vị trí cắt GACTC tồn tại ở tất cả mọi người, nghĩa là sản phẩm PCR sẽ luôn bị cắt ở đây. Điều này giúp chúng tôi có được một chứng nội tại (internal control) cho phản ứng cắt về sau.

Để sản phẩm PCR chứa cả 2 vị trí nhận biết của enzyme *HinfI* nói trên chúng tôi chọn phương án thiết kế mồi xuôi nằm trong đoạn từ nucleotide thứ 1 đến 350 và mồi ngược nằm trong đoạn từ 550 đến 1020 (tính trong đoạn gene dài 1020 đưa vào thiết kế mồi). Vì vậy, câu lệnh cần dùng là “-lpdl-350-rpd550-1020”. Các thông số sử dụng trong khung “PCR Primer or Probe Design Options” của chương trình FastPCR được tham khảo từ các tiêu chuẩn cơ bản về mồi PCR.

Sau khi chạy phần mềm FastPCR, chúng tôi thu được một số trình tự cặp mồi gợi ý, trong đó chúng tôi chỉ chọn cặp mồi có chất lượng trên 90% (primer quality). Đồng thời sản phẩm PCR tương ứng phải đáp ứng điều kiện là khi cắt bởi enzyme *HinfI* sẽ cho ra các đoạn DNA có kích thước chênh lệch đủ lớn (tối thiểu là 50 bp) để có thể dễ dàng phân tách khi điện di trên gel agarose. Chúng tôi đã chọn được cặp mồi với trình tự nêu trong phần phương pháp nghiên cứu. Cặp mồi này đã khuếch đại được đoạn DNA từ vị trí 8497 đến vị trí 8962 trên trình tự gen MTHFR với kích thước sản phẩm thu được là 465 bp.

Enzyme *HinfI* nhận biết và cắt đặc hiệu tại các vị trí có trình tự 5'-GANTC-3' của đoạn DNA. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ cặp mồi do chúng tôi thiết kế sẽ luôn luôn có chứa vị trí cắt của enzyme *HinfI* là GACTC (từ nucleotide 8579 đến 8583), gọi đó là vị trí cắt bắt buộc. Vị trí này sẽ chia sản phẩm PCR ra thành hai đoạn có kích thước 83bp và 382 bp.

- Nếu sản phẩm PCR được khuếch đại từ allele 677T thì có thêm vị trí cắt thứ 2 (GAGTC), vị trí cắt này sẽ chia đoạn 382 bp thành hai đoạn có kích thước là 165 bp và 217 bp.

- Nếu sản phẩm PCR được khuếch đại từ allele 677C thì không có vị trí cắt thứ 2 này.

Do đó, kết quả phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *HinfI* sẽ khác nhau rõ rệt giữa các kiểu gene 677CC, 677TT và 677CT như trình bày ở bảng 2.1. Số loại sản phẩm cắt thu được nhiều nhất là ở kiểu gene dị hợp tử 677CT, gồm 4 đoạn với kích thước 83bp, 165bp, 217bp, 382bp.

Việc tồn tại một vị trí cắt bắt buộc của enzyme *HinfI* trên sản phẩm PCR có vai trò như là chứng nội tại, giúp chúng tôi kiểm

chứng sự hoạt động của enzyme. Khi không có sản phẩm 83 bp xuất hiện sẽ chứng tỏ enzyme *HinfI* không hoạt động. Rõ ràng việc thiết kế được cặp mồi khuếch đại được đoạn DNA chứa một điểm cắt bắt buộc ngoài vị trí đa hình C677T đã chứng tỏ sự ưu việt của cặp mồi này so với các cặp mồi không chứa điểm cắt bắt buộc, giúp loại trừ khả năng xác định sai kiểu đa hình (xác định nhầm là đồng hợp tử 677CC trong trường hợp enzyme không hoạt động).

4.1.2. Hoàn thiện kỹ thuật PCR

Dựa vào thông số cung cấp từ trình tự mồi được tổng hợp, chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi cho phản ứng PCR là 60°C. Hình 3.1 cho thấy các sản phẩm PCR thu được có băng tương ứng rõ nét, kích thước phù hợp với 465 bp, không có các băng không đặc hiệu, không có hiện tượng primer dimer. Đồng thời kết quả kiểm chứng bằng cách xác định trình tự nucleotide sản phẩm PCR của 4 mẫu đã chọn cũng cho thấy các sản phẩm này đúng là đoạn DNA cần khuếch đại trên gene MTHFR. Như vậy, quy trình PCR nhằm khuếch đại đoạn gene MTHFR mong muốn đã đạt tiêu chuẩn, sản phẩm PCR thu được có thể sử dụng cho các phân tích phân tử tiếp theo.

4.2. Xác định điều kiện tối ưu của phản ứng cắt sản phẩm khuếch đại đoạn gene MTHFR chứa đa hình C677T bằng enzyme *HinfI*

Theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzyme, lượng enzyme cần sử dụng cho mỗi phản ứng cắt là khoảng 0,5-2 μ l. Vì vậy, chúng tôi sử dụng enzyme tối thiểu là 0,5 μ l, ủ trong thời gian tối đa (16 giờ) nhằm sử dụng tiết kiệm enzyme mà vẫn đảm bảo tất cả sản phẩm PCR đều được cắt hết. Kết quả ở hình 3.2 cho thấy ở các cột 1, 5, 6, 7 và 8 đều cho hình ảnh 4 băng tương ứng kích thước 83bp, 165bp, 217bp và 382bp, tương ứng kiểu gene dị hợp tử 677CT. Cột 2 và 4 đều có 2 băng kích thước 83bp và 382 bp, tương ứng kiểu gene đồng hợp tử 677CC. Cột 3 có 3 băng kích thước 83bp, 165bp và 217 bp, tương ứng kiểu gene 677TT.

Để chứng minh lượng enzyme chỉ 0,5 μ l là đủ, chúng tôi đã thực hiện phản ứng cắt với những lượng enzyme cao hơn lần lượt là 1 μ l ; 1.5 μ l ; 2 μ l, vẫn thu được cùng kết quả, cùng hình ảnh sản phẩm cắt (hình 3.3).

Kết quả xác định trình tự của các mẫu 677CC, 677CT và 677TT đều phù hợp với kết quả thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP (các hình 3.4; 3.5; và 3.6).

Như vậy chúng tôi đã xác định được điều kiện tối ưu của phản ứng cắt bởi enzyme *HinfI* nhằm sử dụng tiết kiệm enzyme mà vẫn đảm bảo tất cả sản phẩm PCR đều được cắt hết hoàn toàn. Đó là thực hiện phản ứng cắt ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ với lượng enzyme là 0,5 μ l và 1,5 μ l đệm phản ứng cho 13 μ l sản phẩm PCR.

4.3. Xác định tỷ lệ đa hình C677T của gene MTHFR trên nhóm người tình nguyện

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở bảng 3.1 cho thấy tỷ lệ người đồng hợp tử CC tại vị trí 677 trên gene MTHFR chiếm đa số 71,67%; tỷ lệ người dị hợp tử 677CT chiếm 25%; và tỷ lệ người đồng hợp tử 677TT rất thấp, chỉ chiếm 3,33%. Sử dụng phép phân tích cân bằng Hardy – Weinberg cho thấy sự phân bố của các kiểu đa hình là cân bằng ($p = 0,631 > 0,05$). Sự phân bố của các alen 677C và 677T lần lượt là 84,17% và 15,83%.

Nghiên cứu của Unfried (2002) cho thấy trong nhóm gồm 74 phụ nữ bình thường có sự phân bố của các kiểu gene CC, CT và TT lần lượt là 62,2%; 32,4% và 5,4%. Tỷ lệ alen 677T của gene MTHFR là 21,6 % [6]; tỷ lệ này không có sự khác biệt so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi ($p = 0,2981 > 0,05$). Kết quả nghiên cứu mới nhất của Bagheri (2010) về tỷ lệ đa hình C677T trên tổng số 216 người bình thường cho thấy sự phân bố của các kiểu gene CC, CT và TT lần lượt là 54,6%; 38% và 7,41%, trong đó tỷ lệ allele 677T là 26% [1]. Như vậy tỷ lệ allele 677T trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu này ($p = 0,0283 < 0,05$). Ngoài ra, Bagheri đã trích dẫn tỷ lệ các allele 677T và 677C ở

các quốc gia khác nhau, trong đó allele 677T cao nhất là 58,60 % (tại Mexico), thấp nhất là 4,5% (tại Sri Lanka). Ngoài ra tỷ lệ này cũng khá cao ở một số nước như Ý (44%), Hàn Quốc (40,3%), Nhật Bản (36,9%); ngược lại rất thấp ở các nước như Kenya (4,9 %) và Indonesia (8,1 %). Một số nước có tỷ lệ này tương đương với nghiên cứu của chúng tôi như quần thể người Mỹ gốc Phi (14%, n = 496; p = 0,6862) và Yemen (17,4%, n = 46; p = 0,9056), Anh (18,6%, n = 94; p = 0,6384).

Tóm lại, với đề tài nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc hoàn thiện một quy trình PCR – RFLP nhằm xác định đa hình C677T trên gene MTHFR, xác định điều kiện tối ưu của phản ứng cắt sản phẩm khuếch đại đoạn gene MTHFR chứa đa hình C677T bằng enzym *HinfI*, đồng thời bước đầu đã xác định được sự phân bố đa hình này trong một nhóm người bình thường. Chúng tôi hy vọng những kết quả này sẽ là cơ sở dữ liệu đóng góp một phần trong việc nghiên cứu sâu hơn về các yếu tố

nguy cơ trong các tình trạng bệnh lý có liên quan đến đa hình của gene MTHFR.

5. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

5.1. Đã thành công trong việc hoàn thiện kỹ thuật PCR-RFLP với cặp mồi tự thiết kế. Đặc biệt cặp mồi này khuếch đại được sản phẩm PCR có chứa một vị trí cắt bắt buộc của enzyme *HinfI* như là một chứng nội tại cho phản ứng cắt tiếp theo trong kỹ thuật PCR-RFLP. Đồng thời đã xác định điều kiện tối ưu của phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *HinfI*, trong đó chúng tôi chỉ cần dùng lượng enzyme là 0,5 μ l (10 U/ μ l) cho tổng thể tích phản ứng 15 μ l.

5.2. Xác định tỷ lệ các đa hình tại vị trí 677 của gene MTHFR trên 60 người tình nguyện: kiểu gene đồng hợp tử 677CC chiếm đa số 71,67%; dị hợp tử 677CT chiếm 25 %; đồng hợp tử 677TT chiếm 3,33%. Tỷ lệ allele 677T là 15,83% và allele 677C là 84,17%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bagheri M., Rad I.A. (2010), "Frequency of the Methylenetetrahydrofolate reductase 677CT and 1298AC mutations in an Iranian Turkish female population", *Maedica-a journal of clinical medicine*, 5(3): 171-177.
2. Boers G.H.I., Smals A.G.H., Trijbels F.G.M., Fowler B., Bakkeren A.J.M., Schoonderwaldt H.C., Kleijer W.J., Kloppenborg P.W.C. (1985), "Heterozygosity for Homocystinuria in Premature Peripheral and Cerebral Occlusive Arterial Disease", *N Engl J Med*, 313:709-715.
3. Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., Graham I. (1991), "Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease", *N Engl J Med*, 324:1149-1155.
4. Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J.H., Heijer M., Klujtmann L.A.J., van den Heuvel L.P., Rozen R. (1995), "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase", *Nature Genetics*, 10: 11-113.
5. Genest J.J.Jr, McNamara J.R, Salem D.N., Wilson P.W, Schaefer E.J., Malinow M.R. (1990), "Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease", *J Am Coll Cardiol*, 16:1114 -1119
6. Unfried G, Griesmacher A, Wejsmüller W, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB (2002). "The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage", *Obstet Gynecol*, 99(4): 614-619.

NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA MỘT SỐ YẾU TỐ THÓI QUEN SỐNG VỚI RỐI LOẠN LIPID MÁU Ở NGƯỜI LỚN TẠI THÀNH PHỐ HUẾ

Đoàn Phước Thuộc⁽¹⁾, Nguyễn Thị Kim Tiên⁽²⁾

⁽¹⁾Trường Đại học Y Dược Huế, ⁽²⁾Bộ Y tế

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định mối liên quan giữa một số yếu tố thói quen lối sống với rối loạn lipid máu (RLLM) ở người trưởng thành tại thành phố Huế. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tiến hành nghiên cứu trên 410 người từ 20 tuổi trở lên ở thành phố Huế theo phương pháp mô tả cắt ngang. **Kết quả** đã cho thấy rằng: Tỷ RLLM cao liên quan với chế độ ăn nhiều chất béo, kiểu sống tĩnh tại, ít hoạt động thể chất và uống nhiều bia. Người có thói quen ăn nhiều chất béo, nguy cơ RLLM cao gấp 6,6 lần so với không ăn nhiều chất béo, ăn nhiều rau và cá, khoảng tin cậy 95% : 4,1-10,5 người không tập thể dục, nguy cơ RLLM gấp 2,6 lần so với người có tập thể dục, khoảng tin cậy 95% : 1,7-4,1; hoạt động thể lực (HĐTL) dưới 30 phút/ngày, nguy cơ RLLM cao gấp 32,6 lần so với người HĐTL trên 30 phút/ngày, khoảng tin cậy 95% : 15,3-71,4; người uống trên 500ml đối với nữ và trên 1000ml/ngày đối với nam nguy cơ RLLM cao gấp 7,6 lần so với người uống ít hoặc không uống, khoảng tin cậy 95% : 4,5-12,9. **Từ khóa:** Thói quen sống, rối loạn lipid.

THE RELATIONSHIP BETWEEN LIFESTYLE HABITS AND DYSLIPIDEMIA IN ADULTS HUE CITY

Doan Phuoc Thuoc⁽¹⁾, Nguyen Thi Kim Tien⁽²⁾

Abstract

Objective: To determine the relationship between some lifestyle habits with dyslipidemia in adults in Hue city. **Study design:** A cross sectional descriptive study in 4 wards of Hue city selected by random method was conducted in 2009. The sample size was 410 people aged 20 years or older in Hue city. **Main results:** The high rate of dyslipidemia related to saturated fat diet, sedentary lifestyle, less active lifestyle and high alcohol consumption. The risk of dyslipidemia in people with high intake of saturated fat was 6.6 times higher than low saturated fat, much vegetable and fish, 95% confidence interval (4.1, 10.5); the sedentary was 2.6 times higher than exercise, 95% confidence interval (1.7, 4.1); physical activity less than 30 minutes per day was 32.6 times higher than the physical activity over 30 minutes per day, 95% confidence interval (15.3, 71.4); drinking over 500 ml/day for women and 1000ml/day for men was 7.6 times higher than little or no drinking, 95% is (4.5, 12.9). **Keywords:** lifestyle habit, dyslipidemia.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều nghiên cứu dịch tễ học cho thấy (RLLM) là một yếu tố quan trọng gây xơ vữa và làm gia tăng nguy cơ bệnh tim mạch [2]. Có sự liên hệ chặt chẽ giữa nguy cơ bệnh mạch vành với rối loạn lipid máu [8]. Giảm rối loạn lipid máu làm giảm nguy cơ mắc bệnh mạch vành

[10]. Ở Thừa Thiên Huế tỷ lệ RLLM khá cao, ở người trưởng thành là 35,08% [3]; ở cán bộ thành phố Huế là 38,04% (điều tra năm 2008). Để dự phòng bệnh mạch vành và các bệnh có nguyên nhân xơ vữa khác cần xác định được những yếu tố nguy cơ liên quan, trong đó thói quen lối sống