HNUE JOURNAL OF SCIENCE DOI: 10.18173/2354-1059.2020-0015
Natural Sciences, 2020, Volume 65, Issue 3, pp. 123-129
This paper is available online at http://stdb.hnue.edu.vn

TỐI ƯU QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTID RS320 THUỘC GEN *LIPOPROTEIN LIPASE* Ở NGƯỜI VIỆT NAM

Phạm Thị Bích Đào[1], Dương Tuấn Linh[2], Bùi Thị Thúy Nga[2], Nguyễn Ánh Ngọc[2], Trần Quang Thuyên[3], Trần Thị Lan Anh[4], Phùng Thanh Hương[4] và Trần Quang Bình[2]

[1]*Bộ môn Y sinh, Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương*
[2]*Viện Dinh Dưỡng,* [3]*Viện Y học Dự phòng Quân đội*
[4]*Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Dược Hà Nội*

Tóm tắt. Đa hình rs320 trên gen *Lipoprotein lipase (LPL)* đã được báo cáo có liên quan đến triglycerid, cholesterol toàn phần, lipoprotein tỉ trọng cao, lipoprotein tỉ trọng thấp. Để phân tích đa hình này ở quần thể người Việt Nam, nghiên cứu có mục tiêu tối ưu phương pháp khuếch đại gen - Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism - PCR - RFLP) với các cặp mồi, chu trình nhiệt, enzyme giới hạn được lựa chọn, thử nghiệm để xác định điều kiện tối ưu. Kết quả, chúng tôi đã tối ưu được quy trình PCR với nhiệt độ bắt cặp 57 ^{o}C, phản ứng cắt của của enzyme giới hạn cần ít nhất 3 đơn vị enzyme *Hind*III. Một số mẫu đại diện cho 3 kiểu gen GG, TG, TT sau khi xác định bằng PCR - RFLP được phân tích lại bằng phương pháp giải trình tự cho kết quả tương đồng. Quy trình xác định kiểu gen của đa hình rs320 bằng phương pháp PCR - RFLP có thể áp dụng trên quy mô lớn để xác định tỉ lệ kiểu gen và phân tích mối liên quan giữa đa hình rs320 với rối loạn lipid máu.

Từ khóa: Gen *LPL*, rs320, PCR - RFLP.

1. Mở đầu

Rối loạn lipid máu là tình trạng bệnh lí khi có một hoặc nhiều thông số lipid bị rối loạn: tăng cholesterol hoặc tăng triglycerid (TG), hoặc tăng lipoprotein tỉ trọng thấp (LDL-C), hoặc giảm lipoprotein tỉ trọng cao (HDL-C) [1]. Yếu tố nguy cơ dẫn tới rối loạn lipid máu gồm yếu tố di truyền, yếu tố môi trường, chế độ ăn, tập thể dục, béo phì hay các bệnh như tiểu đường, bệnh thận, bệnh gan. Trong đó yếu tố di truyền chiếm tới 40 - 60% [2]. Cho tới nay đã phát hiện được hơn 500 đa hình đơn nucleoid (SNP) trong 167 loci trên bộ gen người có liên quan đến rối loạn lipid máu [3]. Một số gen liên quan đến rối loạn lipid máu đã được xác định là: LPL, ABCA1 (ATP-binding cassette subfamily A member 1), LIPG (lipase G), PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), LIPC (lipase C), CETP (Cholesteryl ester transfer protein), APOB (apoprotein B), APOE-C1-C4-C2 (apoprotein E-C1-C4-C2), APOA1-C3-A4-A5 (apoprotein A1-C3-A4-A5) [4]. Gen *LPL* nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 8, vị trí 21.3 bao gồm 10 exon và 9 intron, chiều dài 30 kb [5], mã hóa cho enzyme LPL (Lipoprotein lipase) có vai trò thủy phân TG của chylomicron và Lipoprotein tỉ trọng rất thấp (VLDL - Very Low Density Lipoproteins)

Ngày nhận bài: 4/7/2019. Ngày sửa bài: 6/2/2020. Ngày nhận đăng: 13/2/2020.
Tác giả liên hệ: Phạm Thị Bích Đào. Địa chỉ e-mail: dao.ptbich@gmail.com

thành acid béo tự do và glycerol. Đây là bước quyết định tốc độ của quá trình chuyển hóa lipoprotein [6]. Các nghiên cứu lâm sàng cũng đã kiểm tra các đột biến mất chức năng của *LPL* dẫn tới rối loạn lipid máu như bệnh tăng chylomicron máu có tính chất gia đình [7] hoặc bệnh tăng lipoprotein I [8]. Cho tới nay có khoảng 100 biến thể đã được xác định trên gen *LPL*. Trong đó đa hình đơn nucleotid rs320 là đa hình phổ biến trên gen *LPL* [5] đã được báo cáo có liên quan đến triglycerid và nồng độ HDL-C [9-11], cholesterol toàn phần [12, 13], LDL-C [14] ở một số dân tộc.

Có nhiều phương pháp xác định SNP như PCR - RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) [15], AS - PCR (*Allele-Specific PCR)*, realtime- PCR [16], giải trình tự. Trong đó phương pháp PCR - RFLP là kĩ thuật chính xác, ít tốn kém và không yêu cầu các thiết bị đắt tiền, thiết kế cho PCR-RFLP dễ dàng [15]. Phương pháp PCR- RFLP cũng đã được sử dụng để phân tích đa hình đơn nucleotid trên một số gen tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam như *APOA5* (Apolipoprotein A5) [17], *CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A)* [18].

Nghiên cứu này có mục tiêu tối ưu phương pháp PCR-RFLP có tham khảo cặp mồi trong nghiên cứu của Ranjit [19] để phân tích đa hình đơn nucleotid rs320 thuộc gen *LPL* ở người Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này sẽ giúp cho việc phân tích đa hình gen LPL rs320 trên quy mô lớn trong nghiên cứu tiếp theo.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Đối tượng, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

**** Đối tượng nghiên cứu*:** Gồm 15 người dân tộc Kinh từ 40 - 64 tuổi tại tỉnh Hà Nam tham gia nghiên cứu. Đề tài là một phần của "Nghiên cứu thuần tập 5 năm về bệnh đái tháo đường Typ 2 và hội chứng chuyển hóa ở người Việt Nam: Vai trò yếu tố di truyền và lối sống" đã được Hội đồng y đức của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương theo quyết định số IRB-VN01057-34/2016.

**** Hóa chất:*** Kit Wizard® Genomic ADN Purification (Promega, USA), GoTaq Green Master mix 2x (Promega), nước tinh sạch GIBCO® UltraPure Distilled Water (Invitrogen), enzyme *Hin*dIII (NEB, Anh Quốc), thạch Agarose (Promega, Mỹ), đệm UltraPureTM 10X TBE Buffer (Invitrogen, Mỹ), Redsafe (Intron Biotechnology, Hàn Quốc), thang chuẩn ADN (Intron Biotechnology, Hàn Quốc)

**** Phương pháp tách chiết ADN từ máu toàn phần*:** Phương pháp tách ADN từ tế bào bạch cầu trong máu toàn phần sử dụng bộ Kit Wizard® Genomic ADN Purification (Promega, USA).

**** Xác định kiểu gen bằng phương pháp RFLP-PCR***

Bước 1. Dùng phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen chứa SNP rs320

Cặp mồi sử dụng gồm mồi xuôi LPL rs320F: 5'- GATGCTACCTGGATAATCAAAG -3' và mồi ngược LPL rs320R 5'- CTTCAGCTAGACATTGCTAGTGT -3' (IDT, Mỹ) theo nghiên cứu của Ranjit [19].

Kiểm tra mồi trên trang mạng Blast primer [20] và Primer3web [21] xác định tính đặc hiệu của mồi, chiều dài của sản phẩm. Tiến hành thử nghiệm với các nhiệt độ bắt cặp khác nhau để lựa chọn nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho quy trình.

Bước 2. Điện di để kiểm tra sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được điện đi trên thạch agarose 2,0% ở 100V trong 40 phút, nhuộm với Redsafe, thang chuẩn ADN và được chụp hình ảnh điện di trên máy Geldoc.

Bước 3. Ủ sản phẩm PCR với enzyme giới hạn đặc hiệu với SNP rs320

Enzyme giới hạn *Hin*dIII tham khảo [19] có trình tự và vị trí cắt:

5' …A↓AGCTT…3'

3'…TTCGA↑A…5

Kiểm tra sản phẩm cắt trên trang mạng [22] với enzyme *Hin*dIII để xác định sản phẩm sau khi ủ enzyme.

Lấy sản phẩm PCR ủ với enzyme *Hin*dIII trong 20 phút ở 37 ^{o}C.

Bước 4. Điện di kiểm tra sản phẩm sau khi ủ enzyme

Điện di kiểm tra sản phẩm sau ủ với enzyme trên thạch 2,0%, dùng đệm TBE 0,5X, nhuộm RedSafe, sử dụng thang chuẩn DNA. Kiểm tra sản phẩm sau khi điện di trên máy Geldoc. Đánh giá kết quả kiểu gen bằng kích thước của các băng điện di thu được trên hình ảnh điện di.

**** Phương pháp giải trình tự gen***

Phương pháp giải trình tự gen dùng để kiểm tra kết quả xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP. Sản phẩm PCR được tinh sạch. Lấy một số mẫu tương ứng với 3 kiểu gen TT, TG, GG gửi công ti Marogen, Hàn Quốc làm giải trình tự gen. Kết quả giải trình tự được so sánh với kết quả phân tích kiểu gen của phương pháp PCR-RFLP.

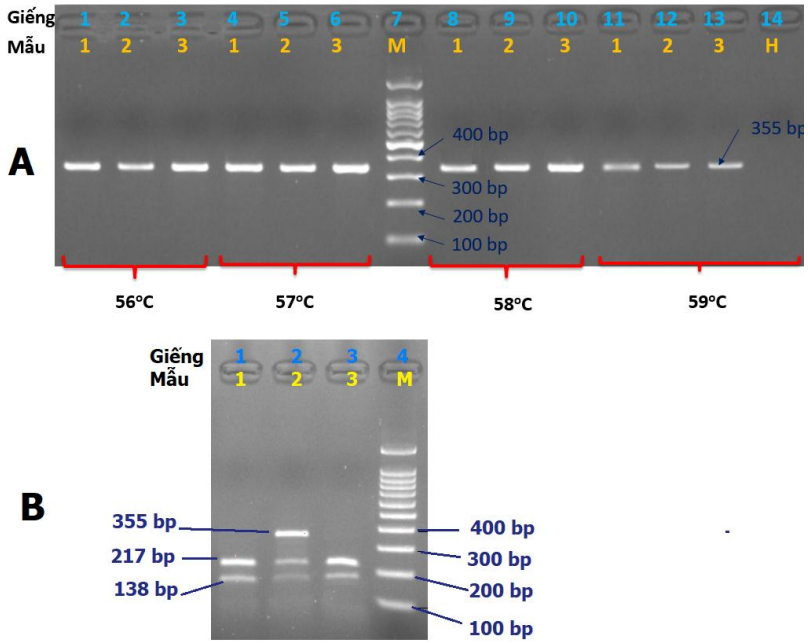
2.2. Kết quả và bàn luận

2.2.1. Khảo sát nhiệt độ bắt cặp và enzyme

Kiểm tra mồi trên trang mạng Blast primer [20] và Primer3web [21] cho sản phẩm có kích thước 355 bp. Sau đó được tiến hành phản ứng PCR để xác định nhiệt độ bắt cặp tối ưu.

Thành phần của phản ứng PCR: 2,5 µL nước tinh sạch; 6,0 µL master mix GoTaq Green PCR; 0,75 pmol mồi mỗi loại (nồng độ 10 pmol/µl); 2 µL DNA (nồng độ 10 ng/µl) trong tổng thể tích là 12 µL.

Chu trình phản ứng: giai đoạn biến tính ở nhiệt độ 94 ^{o}C trong 3 phút; tiếp theo 32 chu kì ở 94 ^{o}C trong 30 giây; giai đoạn bắt cặp trong 30 giây được thực hiện ở 4 nhiệt độ khác nhau: 56 ^{o}C, 57 ^{o}C, 58 ^{o}C, 59 ^{o}C; giai đoạn kéo dài ở 72 ^{o}C trong 30 giây, giai đoạn ủ ở nhiệt độ 72 ^{o}C trong 8 phút.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của một số mẫu nghiên cứu

Hình 1A: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của 3 mẫu nghiên cứuở 4 nhiệt độ bắt cặp 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C; giếng 1, 2, 3: nhiệt độ bắt cặp là 56 °C; giếng 4, 5, 6: nhiệt độ bắt cặp là 57 °C; giếng 8, 9, 10: nhiệt độ bắt cặp là 58 °C; giếng 11, 12, 13: nhiệt độ bắt cặp là 59 °C; giếng 14: là mẫu chứng âm (nước); giếng 7: thang chuẩn ADN.

Hình 1B: Hình ảnh điện di sản phẩm sau khi ủ enyzm của 3 mẫu PCR ở nhiệt độ 57 °C; Giếng 1, 2, 3: 3 mẫu sản phẩm PCR sau khi ủ enzyme, giếng 4: thang chuẩn ADN.

Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 mẫu nghiên cứu ở 4 nhiệt độ bắt cặp 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C được thể hiện ở Hình 1A cho thấy ở cả 4 nhiệt độ bắt cặp đều có các băng điện di sản phẩm PCR, trong đó ở nhiệt độ 57 °C băng đậm và rõ nét nhất.

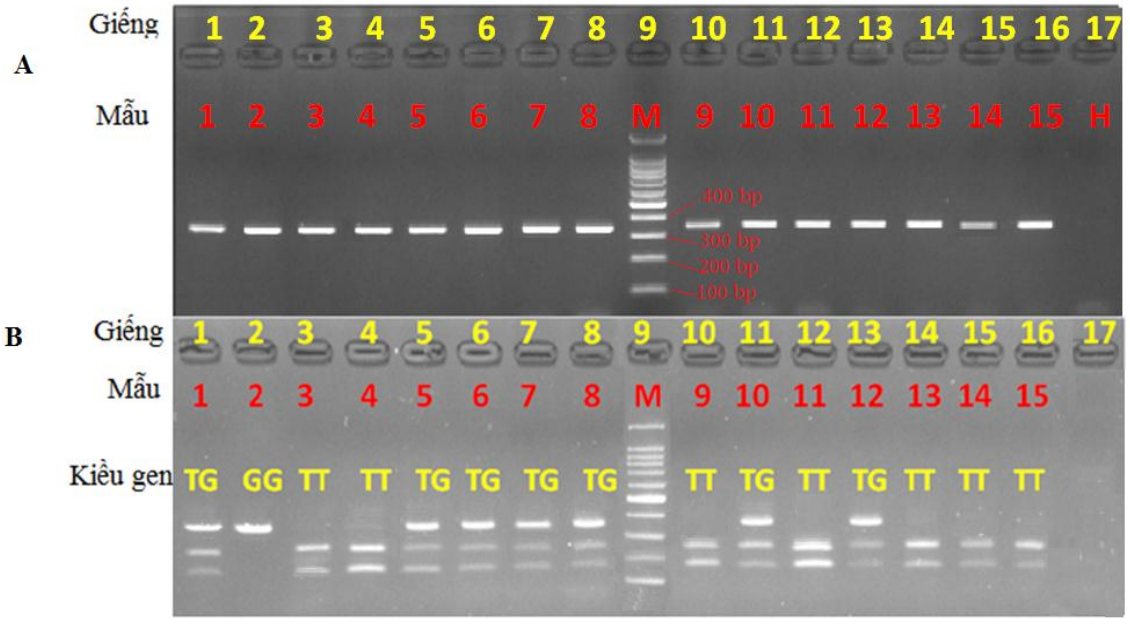
Lấy sản phẩm ở nhiệt độ bắt cặp 57 °C ủ enzyme *Hin*dIII trong 20 phút ở 37 °C. Mỗi phản ứng cắt enzyme chứa 12,85 µL nước tinh sạch; 2,0 µL 10x NEBuffer; 0,15 µL *Hin*dIII (3 đơn vị) và 5,0 µL sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau ủ enzyme được điện di thể hiện ở Hình 1B cho thấy mẫu 1, 3 có 2 băng 138 bp và 217 bp, mẫu 2 có 3 băng 138 bp và 217 bp, 355 bp.

Như vậy nhiệt độ 57 °C là nhiệt độ bắt cặp tối ưu của quy trình xác định gen của đa hình rs320. Lượng enzyme *Hin*dIII ủ là 3 đơn vị/phản ứng.

2.2.2. Kết quả xác định kiểu gen

Sau khi khảo sát nhiệt độ bắt cặp và enzyme *Hin*dIII, chúng tôi tiến hành xác định kiểu gen của một số mẫu nghiên cứu.

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 2A) và sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *Hin*dIII (Hình 2B) của một số mẫu nghiên cứu cho thấy tỉ lệ xác định kiểu gen của các mẫu nghiên cứu là 100%. Căn cứ vào các băng sản phẩm sau khi ủ với enzyme giới hạn để xác định kiểu gen. Các mẫu 3, 4, 9, 11, 13, 14, 15 mang kiểu gen TT. Các mẫu 1, 5, 6, 7, 8, 10, 12 có kiểu gen TG. Mẫu 2 mang kiểu gen GG.



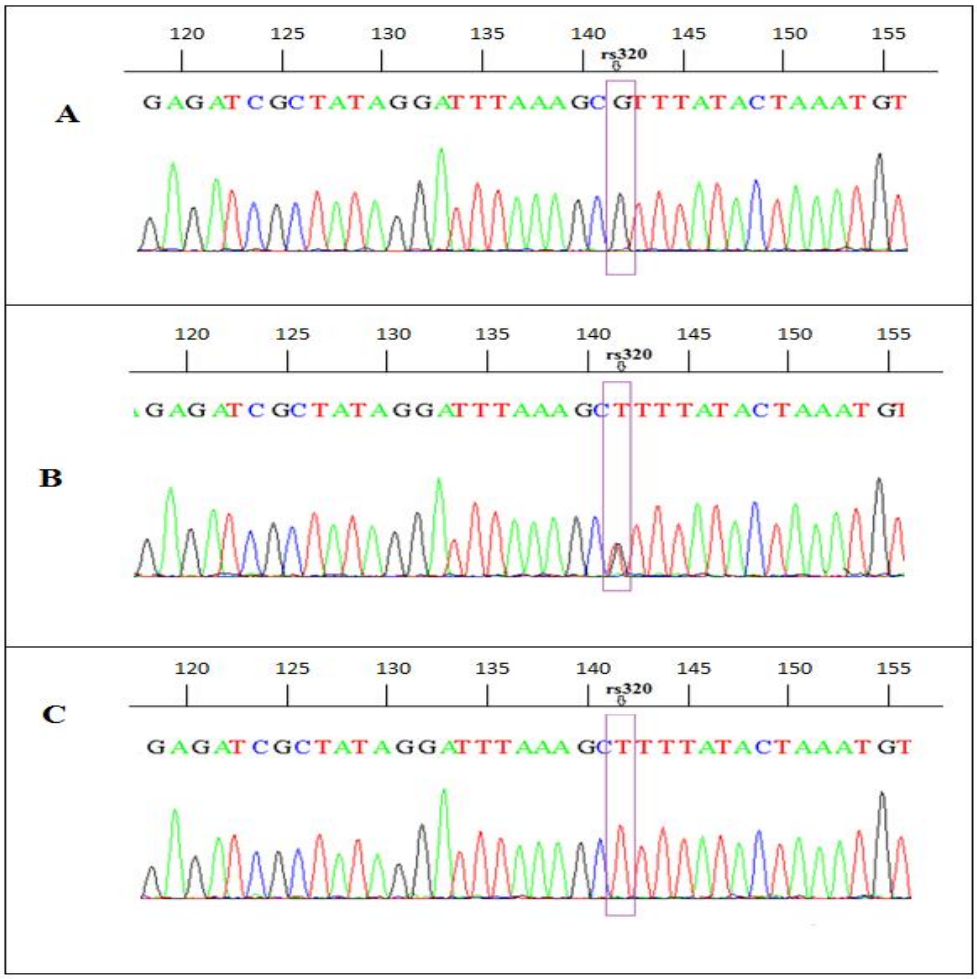
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR (A) và sau khi cắt với enzyme giới hạn (B) của một số mẫu nghiên cứu

A: Kết quả điện di 15 sản phẩm PCR 355bp, giếng 1 - 8 và 10 - 16: các mẫu nghiên cứu, giếng 9: thang chuẩn ADN; giếng 17: Chứng âm; B: Kết quả điện di 15 sản phẩm PCR sau khi ủ với enzyme HindIII, giếng 1 - 8 và 10 - 16: các mẫu nghiên cứu, giếng 9: thang chuẩn ADN

2.2.3. Kiểm tra độ chính xác của phương pháp

Một số mẫu tương ứng với 3 kiểu gen GG, TG, TT sau khi xác định bằng PCR- RFLP được đem giải trình tự. Kết quả Hình 3 cho thấy tại vị trí SNP rs320 (vị trí nucleotid 142) kiểu gen GG được biểu thị màu đen (Hình 3A), kiểu gen TG được biểu thị màu đỏ và đen (Hình 3B), kiểu gen TT được biểu thị màu đỏ (Hình 3C). Kết quả cho thấy xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP hoàn toàn trùng khớp với kết quả giải trình tự.

Như vậy phương pháp xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR - RFLP ở nghiên cứu này đã được khảo sát và triển khai là kĩ thuật chính xác, không yêu cầu các thiết bị đắt tiền, không yêu cầu kỹ thuật cao, thiết kế dễ dàng và có thể áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm tại Việt Nam để xác định kiểu gen *LPL* rs320 ở người Việt Nam.



Hình 3. Kết quả giải trình tự của 3 mẫu có kiểu gen GG, TG và TT

Hình A: kiểu gen GG, hình B: kiểu gen TG, hình C: kiểu gen TT

3. Kết luận

Quy trình xác định kiểu gen *LPL* rs320 bằng phương pháp PCR-RFLP ở quần thể người Việt Nam đã được tối ưu gồm 4 bước sau:

Bước 1: dùng phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen chứa SNP rs320 với nhiệt độ bắt mồi là 57 ^{o}C; Bước 2: điện di để kiểm tra sản phẩm PCR; Bước 3: sản phẩm PCR được cắt bằng

enzyme giới hạn *Hin*dIII với 3 đơn vị/phản ứng; Bước 4: điện di sản phẩm sau khi ủ enzyme trên thạch agarose 2,0% trong 40 phút ở 100 V.

Quy trình này có thể áp dụng để xác định tỉ lệ kiểu gen và phân tích mối liên quan giữa đa hình rs320 với rối loạn lipid.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.01-2015.10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Bộ Y tế, 2015. *Hướng dẫn và điều trị bệnh nội tiết - chuyển hóa*. Nhà xuất bản Y học, tr. 255-275.

[2] Weiss, L. A., Pan, L., Abney, M., & Ober, 2006. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nature Genetics*, 38, 2, 218.

[3] Hernandez, M. M., Williams, F. M. M., Potter, T., Valdes, A. M., Spector, T., & Menni, 2017. Genetic and microbiome influence on lipid metabolism and dyslipidemia. *Physiological Genomics*, 50, 2, 117-126.

[4] Luo, H., Zhang, X., Shuai, P., Miao, Y., Ye, Z., & Lin, Y., 2017. Genetic variants influencing lipid levels and risk of dyslipidemia in Chinese population. *Journal of Genetics*, 96, 6, 985-992.

[5] Rojas, M. P., Prieto, C., Bermúdez, V., Garicano, C., Nava, T. N., Martínez, M. S., ...& Martínez, N. G., 2017. Dyslipidemia: Genetics, lipoprotein lipase and HindIII polymorphism. *F1000Research*, 6, 2073

[6] Chamberlain, J. C., Thorn, J. A., Oka, K., Galton, D. J., & Stocks, J., 1989. DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: associations in normal and hypertriglyceridaemic subjects. *Atherosclerosis*, 79, 1, 85-91.

[7] Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P., 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine*, 80, 12, 753-769.

[8] Holmes, R. S., Vandeberg, J. L., & Cox, L. A., 2011. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: a key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part D: Genomics and Proteomics, 6, 2, 224-234.

[9] Ahn, Y. I., Kamboh, M. I., Hamman, R. F., Cole, S. A., & Ferrell, R. E., 1993. Two DNA polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their associations with factors related to cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research*, 34, 3, 421-428.

[10] Jemaa, R. I. A. D. H., Fumeron, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Arveiler, Fruchart, J. C., 1995. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. *Journal of Lipid Research*, 36, 10, 2141-2146.

[11] Peacock, R. E., Hamsten, A., Nilsson-Ehle, P., & Humphries, S. E., 1992. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. *Atherosclerosis*, 97, 2-3, 171-185.

[12] Mattu, R. K., Needham, E. W., Morgan, R., Rees, A., Hackshaw, A. K., Stocks, J., & Galton, D. J., 1994. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. Arteriosclerosis and thrombosis: *Journal of Vascular Biology*, 14, 7, 1090-1097.

[13] Thorn, J. A., Chamberlain, J. C., Alcolado, J. C., Oka, K., Chan, L., Stocks, J., & Galton, D. J., 1990. Lipoprotein and hepatic lipase gene variants in coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 85, 1, 55-60.

[14] Larson, I., Hoffmann, M. M., Ordovas, J. M., Schaefer, E. J., März, W., & Kreuzer, J., 1999. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism: association with total cholesterol and LDL-cholesterol, but not with HDL and triglycerides in 342 females. *Clinical Chemistry*, 45, 7, 963-968.

[15] Rasmussen, H. B., 2012. Gel electrophoresis-principles and basics. *In Tech*, 315-334

[16] Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M., 2013. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *J. of Anwer Khan Modern Medical College*, 4, 1, 30-36.

[17] Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Phạm Trần Phương, Trần Quang Bình, 2016. Tối ưu hoá quy trình xác định kiểu gen của đa hình APOA5 rs662799 ở trẻ em nam 6 - 11 tuổi tại Hà Nội. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 61, 4, 130-136.

[18] Nguyễn Thị Trung Thu, Phạm Trần Phương, Trần Quang Bình, 2017. Xác định đa hình rs10811661 gen CDKN2A trên quần thể người Việt Nam sử dụng phương pháp AS-PCR và RFLP-PCR. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 62, 3, 114-120.

[19] Pusapati Madan Ranjit, Girijasankar Guntuku, 2017. Association of Lipid Profile, Atherogenic Indices, and LPL HindIII Gene Polymorphism with Coronary Artery Disease Positive Subjects. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, 1, 6-15.

[20] Primer-blast https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/truy cập 24/11/2018.

[21] Primer3web http://primer3.ut.ee/ truy cập 24/11/2018.

[22] Restrictionmapper http://www.restrictionmapper.org/ truy cập ngày 28/11/2018.

ABSTRACT

The optimal protocol for analysis of single nucleotide polymorphism rs320 on Lipoprotein Lipase gene of Vietnamese populations

Pham Thi Bich Dao[1], Duong Tuan Linh[2], Bui Thi Thuy Nga[2], Nguyen Anh Ngoc[2], Tran Quang Thuyen[3], Tran Thi Lan Anh[4], Phung Thanh Huong[4], Tran Quang Binh[2]

[1]*Department of Biomedicine Hai Duong Central College of Pharmacy*

[2]*National Institute of Nutrition,* [3]*Military Institute of Preventive Medicine*

[4]*Department of Biochemistry, Hanoi University of Pharmacy*

The rs320 polymorphism of *LPL* gene has been reported to be associated with triglycerides, total cholesterol, HDL-C, and LDL-C. To analyze this polymorphism in Vienamese populations, the study aimed to optimize the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method with primers, thermal cycles, and restriction enzyme which were selected and tested to identify opimal condition of PCR-RFLP method. The GG, TG, and TT genotypes by PCR - RFLP methods were confirmed by the sequencing method. The experimental results determined the annealing temperature of 57 ^{o}C for PCR, the minimum 3 units of *Hin*dIII for incubation with PCR product. In conclusion, this optimal PCR-RFLP method can be applied to genotype *LPLrs320* in large populations to investigate the association between the rs320 polymorphism and dyslipidemia.

Keywords: *LPL* gene, rs320, PCR - RFLP.