

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

**LUẬN VĂN THẠC SỸ KHOA HỌC**

**Đề tài:**

**XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH KIỂU GENE *ACE I/D* BẰNG KỸ THUẬT PCR  
VÀ *ACTN3 R577X* BẰNG KỸ THUẬT PCR-RFLP CỦA MỘT SỐ VẬN  
ĐỘNG VIÊN ĐIỀN KINH VÀ BƠI LỘI Ở VIỆT NAM**

*Hà Nội, tháng 12 năm 2014.*

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

## LUẬN VĂN THẠC SỸ KHOA HỌC

**Đề tài:**

**XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH KIỂU GENE *ACE I/D* BẰNG KỸ THUẬT PCR  
VÀ *ACTN3 R577X* BẰNG KỸ THUẬT PCR-RFLP CỦA MỘT SỐ VẬN  
ĐỘNG VIÊN ĐIỀN KINH VÀ BƠI LỘI Ở VIỆT NAM**

**Họ và tên học viên:** PHẠM THỊ NHÀN

**Người hướng dẫn:** TS. LUYỆN QUỐC HẢI

**Cơ sở đào tạo:** Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

**Chuyên ngành:** Hóa Sinh

**Mã số:** 60420114

*Hà Nội, tháng 12 năm 2014.*

## MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, có rất nhiều các nghiên cứu đã chỉ ra các yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của các VĐV đỉnh cao, bao gồm: yếu tố di truyền, yếu tố về chế độ tập luyện, chế độ dinh dưỡng, cảm xúc, môi trường và thiết bị luyện tập, trí tuệ, khả năng nhận thức và các yếu tố môi trường khác. Tuy nhiên, yếu tố di truyền được xác định là quyết định tới 50% vai trò ảnh hưởng lên sự vận động thể chất của con người (Hopkins, 2001). Một báo cáo của Ahmetov và Rogozkin năm 2009 cũng cho rằng, yếu tố di truyền quyết định tới 66% sự thành công ở các VĐV đỉnh cao. Bản đồ gene người được công bố năm 2007 cũng đã đưa ra 239 gene có ảnh hưởng đến hoạt động thể chất, trong đó có 214 gene trên nhiễm sắc thể thường, 7 gene trên nhiễm sắc thể X và 18 gene ty thể. Đặc biệt, dựa trên các nghiên cứu ở cấp độ phân tử, các nhà khoa học đã tìm ra khoảng 36 gene đóng vai trò quyết định tới đặc tính sức mạnh và sức bền của các hoạt động thể chất, được phân loại thành các nhóm chỉ thị di truyền liên quan đến thành tích thi đấu của các VĐV thể thao (Ahmetov và cs, 2012). Những công bố này như một nền tảng vững chắc cho việc ứng dụng công nghệ gene trong phân loại, đào tạo và tuyển chọn VĐV.

Cần phải khẳng định rằng, thành tích thể thao của một cá nhân bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau trong đó có yếu tố di truyền. Các gene đóng vai trò khác nhau trong việc xác định sự khác biệt giữa người này và người kia thông qua sự biểu hiện các tính trạng như: thành phần của sợi cơ và mức tiêu thụ oxy. Ví dụ: ở những môn thể thao cần sức bền thì tố chất di truyền (do gene quy định) ảnh hưởng lên đến hơn 50% thành tích có thể đạt được (Hopkins, 2001). Đây là những dữ liệu khoa học từ các nghiên cứu dựa trên dữ liệu di truyền của một số lượng lớn các VĐV thành tích cao. Việc phát hiện các biến dị di truyền có liên quan mật thiết tới thành tích của các VĐV đỉnh cao cho phép chúng ta đánh giá tiềm năng thành tích có thể đạt được ở những người cùng mang các biến dị đó.

Trong số các gene có liên quan đến thành tích thể thao, biến dị di truyền của các gene *ACE* và *ACTN3* được tập trung nghiên cứu nhiều nhất với nhiều công trình đã được công bố trên các tạp chí khoa học thể thao uy tín trên thế giới, vì chúng được cho rằng có mối quan hệ mật thiết đến thành tích thể thao của VĐV. Tuy nhiên, bên cạnh rất nhiều nghiên cứu chỉ ra sự liên quan mật thiết giữa kiểu gene *ACTN3* và *ACE* tới hiệu suất thể thao của các vận động viên, cũng có những nghiên cứu cho kết quả phủ nhận giả thuyết này. Chính vì thế, việc thực hiện nghiên cứu trên từng quốc gia/dân tộc để xem xét, kiểm chứng lại giả thuyết đã đưa ra là vô cùng cần thiết (Fang Ma và cs, 2013).

Hiện nay chưa có nghiên cứu nào được tiến hành để khảo sát và đánh giá về tần suất cũng như mức độ ảnh hưởng của 2 gene này đối với hiệu suất thể thao của VĐV người Việt Nam. Chính vì vậy, tôi đã lựa chọn đề tài nghiên cứu: ***“Xác định đa hình kiểu gene ACE I/D bằng kỹ thuật PCR và ACTN3 R577X bằng kỹ thuật PCR-RFLP của một số vận động viên điền kinh và bơi lội ở Việt Nam”***.

## **MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI**

- Xác định kiểu gene *ACE* I/D của một số vận động viên điền kinh và bơi lội bằng kỹ thuật PCR. Bước đầu phân tích sự phân bố của các đa hình gene này giữa các nhóm vận động viên khác nhau, xem xét sự ảnh hưởng của các đa hình gene tới thành tích thể thao của vận động viên.

- Xác định kiểu gene *ACTN3* R577X của một số vận động viên điền kinh và bơi lội bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Bước đầu phân tích sự phân bố của các đa hình gene này giữa các nhóm vận động viên khác nhau, xem xét sự ảnh hưởng của các đa hình gene tới thành tích thể thao của vận động viên.

## **NỘI DUNG CỦA ĐỀ TÀI**

- Hệ thống cơ sở lý luận và thực tiễn trong việc nghiên cứu, giải mã gene người nói chung và gene của các tài năng thể thao nói riêng.

- Tiến hành thu thập mẫu của các VĐV điền kinh và bơi lội cũng như các mẫu đối chứng để làm mẫu nghiên cứu.
- Xây dựng quy trình tách chiết DNA tổng số từ mẫu tế bào niêm mạc miệng và mẫu máu trên thẻ FTA.
- Thiết kế môi đặc hiệu để khuếch đại và xác định kiểu gene *ACE I/D* và *ACTN3 R577X*.
- Tối ưu hóa phản ứng PCR để khuếch đại và xác định kiểu gene *ACE I/D*.
- Tối ưu hóa phản ứng PCR-RFLP để khuếch đại và xác định kiểu gene *ACTN3 R577X*.
- Phân tích tần số kiểu gene *ACE I/D* và *ACTN3 R577X* của các đối tượng nghiên cứu.

# CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1.1. Tổng quan về tình hình nghiên cứu, giải mã hệ gene người

### 1.1.1. Giới thiệu chung về hệ gene người

Hệ gene người chứa toàn bộ thông tin di truyền của con người. Những hiểu biết về hệ gene người là tiền đề cho việc ứng dụng di truyền phân tử trong lĩnh vực y học và các lĩnh vực nghiên cứu khoa học khác.

Lịch sử về giải trình tự DNA người được bắt đầu vào năm 1977 khi Sanger công bố phương pháp xác định thứ tự các nucleotide của phân tử DNA. Cùng năm đó, gene người đầu tiên cũng được giải mã thành công. Năm 2003, sau 13 năm nghiên cứu, dự án hệ gene người dưới sự đứng đầu của James Watson (Viện sức khỏe quốc gia - Mỹ) và sau đó là Francis Collins đã hoàn tất trước thời hạn 2 năm, hàng nghìn trình tự hệ gene người đã được giải mã. Thành công này đã mở ra triển vọng mới trong việc chẩn đoán và chữa trị các bệnh cho con người. Trình tự của hệ gene người bao gồm 2.851.330.913 nucleotide, nằm trong phần euchromatic của hệ gene. Chúng bị dán đoạn bởi 341 chỗ trống (gaps), trong đó 33 gaps dài khoảng 198 Mb là heterochromatin và 308 gaps (dài khoảng 28 Mb) là euchromatin. Do vậy, hệ gene euchromatin dài xấp xỉ 2.88 Gb và hệ gene người tổng thể dài xấp xỉ 3.08 Gb (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Elizabeth, 2012). Mặc dù các trình tự về hệ gene người được xác định gần như hoàn chỉnh bởi trình tự DNA, nhưng những hiểu biết về chức năng của tất cả các gene lại chưa được rõ ràng.

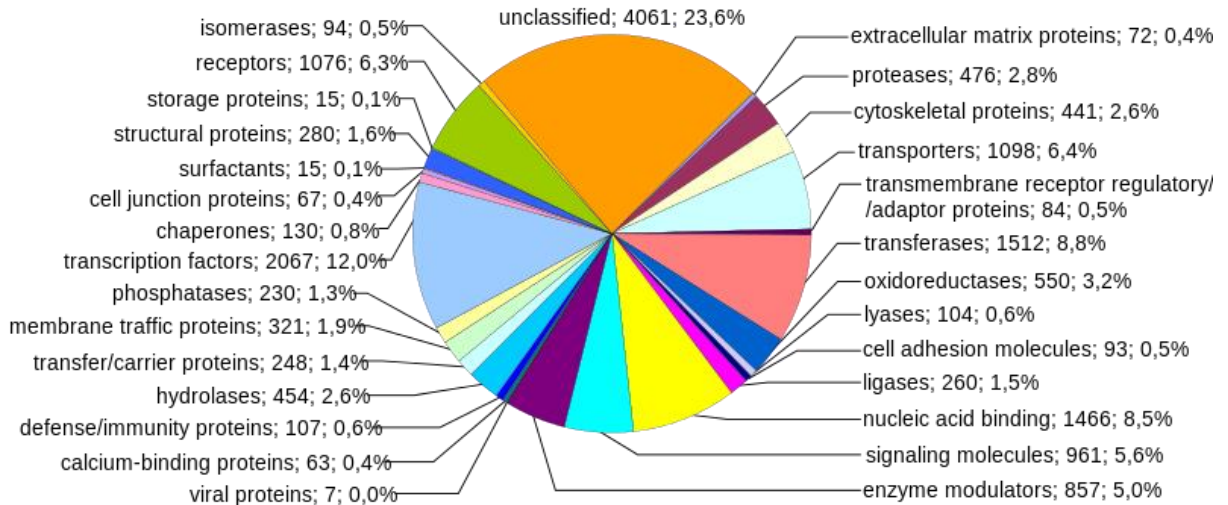
Hệ gene người đơn bội chứa khoảng 20.000 gene mã hóa protein, ít hơn nhiều so với dự đoán. Các trình tự mã hóa protein chỉ chiếm một phần nhỏ của bộ gene (chiếm khoảng 1,5%), phần còn lại liên quan đến các phân tử RNA không mang mã, các trình tự DNA điều hòa, LINEs, SINEs, introns và các trình tự chưa biết chức năng. Với chiều dài tổng thể của hệ gene người khoảng 3 tỷ cặp base pair (bp), hệ gene người được tổ chức trong 22 cặp nhiễm sắc thể thường, nhiễm sắc thể X (1 nhiễm sắc thể với nam và 2 nhiễm sắc thể với nữ giới) và 1 nhiễm sắc thể Y (chỉ có ở nam giới). Các phân tử DNA dạng thẳng

chứa trong nhân tế bào. DNA ty thể dạng vòng có trong ty thể (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

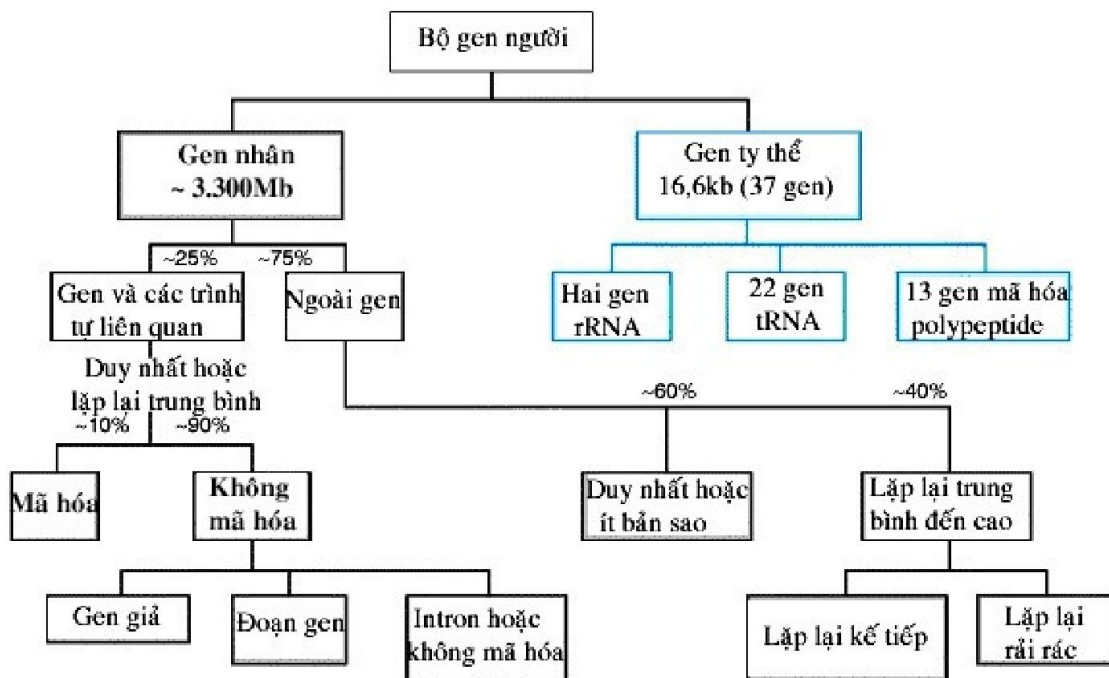
Thành phần của hệ gene người thường phân chia thành các trình tự DNA mang mã và không mang mã. DNA mang mã là các trình tự có thể phiên mã sang mRNA và dịch mã sang protein trong quá trình sống, những trình tự này chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ trong hệ gene (khoảng dưới 2%). DNA không mang mã chiếm khoảng hơn 98% trong hệ gene và không được sử dụng để mã hóa protein. Một số DNA không mang mã chứa các gene cho các phân tử RNA với những chức năng sinh học quan trọng, gọi là RNA không mang mã. Các phân tử RNA không mang mã (ncRNA) có vai trò quan trọng trong tế bào, đặc biệt trong nhiều phản ứng tổng hợp protein và quá trình chế biến RNA. Hệ gene người chứa các gene mã hóa cho 18.400 ncRNA bao gồm tRNA, rRNA, microRNA và các gene RNA không mang mã khác.

Ngoài ra, DNA không mang mã cũng bao gồm các pseudogenes, introns, vùng không dịch mã của RNA, trình tự DNA điều hòa, trình tự DNA lặp lại và các trình tự liên quan đến nhân tố di truyền vận động (Ken, 2007; Lisa, 2008). Hệ gene người có nhiều trình tự điều hòa gene khác nhau có chức năng quan trọng trong việc kiểm soát sự biểu hiện của gene. Các trình tự này được biết đến từ những năm 60 của thế kỷ 19 và chiếm khoảng 8% trong hệ gene (Dunham và cs, 2012). Khoảng 8% hệ gene người chứa các trình tự DNA lặp lại. Các trình tự này khác nhau ở từng cá thể và thậm chí ở cả các cá thể có mối quan hệ gần gũi. Vì vậy, các trình tự này có thể được sử dụng để xét nghiệm DNA phả hệ và phân tích DNA pháp lý. Các trình tự lặp lại ít hơn 10 nucleotide được gọi là các trình tự microsatellite. Trong đó các trình tự lặp trinucleotide có tầm quan trọng đặc biệt vì đôi khi các trình tự này xảy ra trong vùng mã hóa protein và có thể dẫn đến rối loạn di truyền. Ví dụ, bệnh Huntington là kết quả của các trình tự lặp trinucleotide xảy ra bên trong gene *Huntingtin* trên nhiễm sắc thể số 4. Các yếu tố di truyền vận động (transposons) là các trình tự DNA có thể sao chép và chèn bản sao của chúng ở các vị trí khác trên hệ gene của vật chủ. Các yếu tố này cũng chiếm tỷ lệ lớn trong hệ gene của người. Các transposons bên trong hệ

gene người có thể được phân loại thành LTR (long terminal repeat) retrotransposons (chiếm 8,3% hệ gene), SINEs (chiếm 13,1% hệ gene) bao gồm các yếu tố Alu, LINEs (chiếm 20,4% hệ gene) và các transposons DNA loại II (chiếm 2,9% hệ gene) (Dunham và cs, 2012).



**Hình 1. 1.** Phân loại gene người theo chức năng của các protein được dịch mã (<http://www.pantherdb.org>).



**Hình 1. 2.** Sơ đồ tổ chức cấu trúc bộ gene người (Tom và Andrew, 1999)

Bộ gene người có trình tự lặp lại và không lặp lại: Nhóm DNA lặp lại nhiều chiếm khoảng 10% tổng lượng DNA của tế bào, thường là các đoạn DNA ngắn dưới 10 bp, mức độ lặp lại có thể tới 10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> một trình tự DNA nào đó trong một tế bào. DNA lặp lại nhiều lần nằm quanh tâm động và hai đầu nhiễm sắc



thể, không được phiên mã. Nhóm DNA lặp lại ít chiếm khoảng 25%, thường là các đoạn DNA ngắn khoảng 100 bp, mức độ lặp lại một trình tự nào đó khoảng 1000 – 100.000 lần. Nhóm này bao gồm các gene chịu trách nhiệm tổng hợp tRNA và rRNA. DNA nhóm này được phiên mã nhưng không được dịch mã. Nhóm DNA không lặp lại chiếm khoảng 64% bao gồm DNA của các gene cấu trúc mã hóa các phân tử protein. DNA này được phiên mã và dịch mã (**Hình 1. 1**)

Bộ gene người có trình tự mã hóa và không mã hóa (**Hình 1. 2**). Các gene mã hóa RNA - không mã hóa cho protein cấu trúc chia làm bốn loại:

- RNA vận tải (tRNAs): có chức năng vận chuyển axit amin.
- RNA ribosome (rRNAs): thành phần cơ bản của ribosome.
- RNA hạch nhân nhỏ (small nucleolar RNA hay snoRNA) cần thiết cho quá trình xử lý rRNA, biến đổi base trong vùng hạch nhân.

- RNA nhân nhỏ (small nuclear RNA hay snRNA) là thành phần chính của spliceosome: bộ máy phân tử cắt các intron khỏi pre-mRNA ở trong nhân.

Ngoài ra còn có thể có các RNA khác không mã hóa protein với biểu hiện ở mức thấp hơn. Song song với đó thì còn có các gene mã hóa cho protein tạo ra bộ protein. Gene mã hóa protein có các đặc điểm làm cho bộ protein của người rất phong phú.

### **1.1.2. Ứng dụng và triển vọng của nghiên cứu hệ gene người**

Hiện nay, những hiểu biết về hệ gene người đang được ứng dụng ngày càng mạnh mẽ trong nhiều lĩnh vực y - sinh học và pháp lý. Kết hợp với nền khoa học công nghệ hiện đại, nhiều bệnh tật di truyền được phát hiện và chữa trị. Đặc biệt, các bệnh liên quan đến đột biến bất thường nhiễm sắc thể gây ra các hội chứng như Down, Turner, Klinefelter, Edwards, ... được phát hiện sớm ở thai kỳ (Glenn và cs, 2012; Joy và cs, 2012). Trên cơ sở đó có thể tìm ra các phương pháp sàng lọc, chữa trị nhằm sinh ra những cơ thể khỏe mạnh.

Bên cạnh đó, liệu pháp gene cũng là một kỹ thuật sử dụng gene để ngăn ngừa và điều trị bệnh tật. Một số hướng nghiên cứu của liệu pháp gene như: Thay thế gene bệnh, gene đột biến bằng bản sao của gene khỏe mạnh, làm bất hoạt gene đột biến có sai chức năng, hoặc đưa một gene mới vào cơ thể nhằm chống lại

bệnh. Liệu pháp gene là hướng điều trị đầy hứa hẹn cho các bệnh di truyền, ung thư và một số bệnh truyền nhiễm do virus. Hiện nay, liệu pháp gene đã được ứng dụng trong việc chữa trị một số bệnh như: Parkinson (Nikhil, 2007), bệnh ung thư (Kenneth, 1994), bệnh suy giảm miễn dịch (Hacein-Bey-Abina và cs, 2003).

Các trình tự lặp lại ngẫu nhiên trên hệ gene người (Short Tandem Repeat - STR) cũng được sử dụng trong lĩnh vực y sinh học, pháp lý. Đây là các đoạn lặp ngắn, số lần lặp lại đặc trưng cho mỗi cá thể. Nhờ đó STR được sử dụng trong việc nhận dạng cá thể người, truy tìm tội phạm và xác định mối quan hệ huyết thống trong gia đình (Christian và cs, 2001).

Hướng nghiên cứu xác định các đa hình gene, tần suất và mối liên quan của các đa hình gene với những tính trạng hoặc bệnh tật đặc trưng cũng là hướng nghiên cứu được đặc biệt quan tâm hiện nay. Dự án Hapmap quốc tế được thực hiện bởi sự hợp tác của các nhà khoa học từ nhiều nước, như: Nhật Bản, Anh, Canada; Trung Quốc, Nigeria và Mỹ (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) là dự án tiêu biểu cho hướng nghiên cứu này.

## **1.2. Nghiên cứu, giải mã gene của các tài năng thể thao**

### **1.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới**

Bản đồ gene người liên quan đến thành tích thể thao đã được Wolfarth và cộng sự bắt đầu có những báo cáo định kỳ 2 năm 1 lần từ năm 2000 cho đến nay. Báo cáo này cập nhật và thống kê các công trình nghiên cứu trên khắp thế giới về nhiều vấn đề liên quan như: sự bền vững của hệ thống tim mạch, sức bền của các VĐV đỉnh cao, sức mạnh của cơ bắp, các tính trạng liên quan đến thành tích thể thao khác. Báo cáo này xuất hiện đầu tiên vào năm 2000 (gần như cùng lúc với công bố bản thảo về hệ gene người) và chỉ ra 29 vị trí gene có liên quan đến thành tích thể thao của VĐV. Đến năm 2004 thì số lượng các gene này đã tăng 5 lần với 140 vị trí gene trên nhiễm sắc thể thường, 4 vị trí gene trên nhiễm sắc thể giới tính và 16 vị trí gene trên hệ gene ty thể. Đến năm 2006 - 2007 đã có tổng số 221 vị trí gene trên nhiễm sắc thể thường và nhiễm sắc thể giới tính X, 18 vị trí gene trên hệ gene ty thể. Bảng 1.1 cho ta thấy sự quan tâm của giới khoa học trong lĩnh vực