

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR-RFLP XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH KIỂU GEN *ACTN3* R577X CỦA CÁC VẬN ĐỘNG VIÊN ĐIỀN KINH VÀ BƠI LỢI Ở VIỆT NAM

Phạm Thị Nhân¹, Lê Đức Chương², Nghiêm Ngọc Minh³, Luyện Quốc Hải¹

¹Công ty cổ phần Công nghệ Sinh học Bionet Việt Nam

²Bộ Văn hóa, Thể thao và Du lịch

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 22.02.2014

Ngày nhận đăng: 31.3.2014

TÓM TẮT

Mặc dù hệ gen người đã được giải mã thành công nhưng ảnh hưởng của đa hình gen đến tổ chức thể thao vẫn còn nhiều điều chưa biết. Nhiều nghiên cứu có đồng quan điểm cho rằng đa hình gen α -actinin-3 (*ACTN3*) có liên quan đến thành tích của các vận động viên (VĐV) ưu tú. Gen *ACTN3* mã hóa cho protein α -actinin-3, chỉ được biểu hiện trong sợi cơ cơ nhanh loại II. Biến đổi C \rightarrow T (rs.1815739 C/T) ở exon 16 của gen *ACTN3* làm xuất hiện mã kết thúc (đa hình R577X) dẫn đến thiếu hụt protein α -actinin-3 ở dạng đồng hợp tử XX (không có α -actinin-3). Vai trò của đa hình *ACTN3* R577X được chứng minh có ảnh hưởng đến thành tích thể thao của các VĐV. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tách chiết DNA tổng số từ tế bào niêm mạc miệng và đánh giá chất lượng sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau đó được xử lý bằng enzyme giới hạn *DdeI* để xác định kiểu gen *ACTN3* R577X và tần số allele của 88 VĐV thuộc các đội tuyển trẻ và đội tuyển Quốc gia. Chúng tôi đã xác định tần số kiểu gen *ACTN3* R577X, tần số allele R/X của 54 VĐV điền kinh (44% RR; 43% RX; 13% XX; tần số allele R: 66%; X: 34%) và 34 VĐV bơi lội (29% RR, 53% RX; 18% XX, tần số allele R: 56%; X: 44%). Kết quả nghiên cứu này sẽ được sử dụng kết hợp với các thông tin về đặc điểm thể lực và thành tích thể thao của các VĐV đã thu thập được để phân tích và đánh giá ảnh hưởng của gen *ACTN3* đến thành tích của VĐV Việt Nam. Mục đích tiếp theo của chúng tôi là tập trung nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen trong tuyển chọn VĐV nhằm góp phần giảm thiểu chi phí trong tuyển chọn, đào tạo và nâng cao thành tích của thể thao Việt Nam.

Từ khóa: α -actinin-3, *ACTN3* R577X, allele, PCR-RFLP, thành tích thể thao

MỞ ĐẦU

Hệ gen người đã được giải mã thành công nhưng ảnh hưởng của đa hình gen đến tổ chức thể thao vẫn còn nhiều điều chưa biết. Nhiều nghiên cứu có đồng quan điểm cho rằng đa hình gen α -actinin-3 (*ACTN3*) có liên quan đến thành tích thể thao đỉnh cao. α -actinin-3 chủ yếu có ở các sợi cơ cơ nhanh loại II, tham gia vào cấu tạo của đoạn α -actinin (thành phần chính của Z-line) (Squire, 1997). Z-line là một cấu trúc quan trọng của cơ-xương, có vai trò liên kết các sợi actin và giúp nâng đỡ, sắp xếp các sợi myosin, hỗ trợ quá trình co-duỗi của cơ (Yang *et al.*, 2007). Các nhà nghiên cứu nhận thấy α -actinin-3 có thể giúp làm giảm sự tổn thương cơ bằng cơ chế co lệch tâm (Yang *et al.*, 2007). Vai trò này đặc biệt quan trọng trong quá trình co-duỗi cơ nhanh.

Biến đổi C \rightarrow T (rs.1815739 C/T) ở exon 16 của gen *ACTN3* làm thay đổi bộ ba mã hóa từ 577 CGA

(mã hóa cho Arginine, ký hiệu là allele R) thành TGA (mã kết thúc, ký hiệu là allele X) dẫn đến tạo ra một protein α -actinin-3 không hoàn chỉnh (North *et al.*, 1999). Allele R có lợi đối với các vận động viên cần tốc độ nhờ vào cấu tạo sợi cơ cơ nhanh loại II trong quá trình thực hiện các động tác với cường độ cao như là chạy nước rút (Cieszczyk *et al.*, 2011). Allele X có lợi cho các vận động viên cần sức bền (Roth *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2011). Mỗi cá thể người đều có hai bản sao của gen *ACTN3*, do vậy có 3 kiểu tổ hợp kiểu gen khác nhau: (1) XX: sự kết hợp giữa hai allele X gây ra thiếu hụt hoàn toàn α -actinin - 3, tạo ra nhiều sợi cơ chậm và sẽ phát huy tối đa lợi thế ở các môn thể thao đòi hỏi sức bền như marathon (Yang *et al.*, 2003); (2) RX: tạo ra lượng sợi cơ nhanh và sợi cơ chậm bằng nhau; (3) RR: sự kết hợp giữa hai allele R tạo ra nhiều sợi cơ nhanh, phù hợp với các môn thể thao đòi hỏi sức mạnh hay tốc độ (Clarkson *et al.*, 2005; Delmonico *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2007).

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là xác định đa hình kiểu gen *ACTN3* R577X trong nhóm vận động viên điền kinh và bơi lội ở Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ mở ra một hướng mới trong việc ứng dụng công nghệ gen nhằm hỗ trợ công tác tuyển chọn vận động viên, giúp góp phần giảm thiểu chi phí trong tuyển chọn, đào tạo và nâng cao thành tích của thể thao Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu tế bào niêm mạc miệng của 54 vận động viên điền kinh và 34 vận động viên bơi lội thuộc đội tuyển quốc gia và đội tuyển trẻ đang tập trung tập luyện tại ba Trung tâm Huấn luyện thể thao quốc gia ở thành phố Hà Nội, thành phố Đà Nẵng và thành phố Hồ Chí Minh. Tất cả các đối tượng nghiên cứu đều đã được xác minh không có quan hệ huyết thống. Bằng thành tích thể thao của các đối tượng nghiên cứu cũng được thu thập để phục vụ cho việc phân tích.

Primer

Cặp primer sử dụng để nhân exon 16 của gen *ACTN3*, ký hiệu 2ACTN3-F và 2ACTN3-R được tổng hợp tại Bio Basic INC (Canada) có trình tự như sau:

2ACTN3-F: 5'-ACTCTGTGGAGGAGACCCAG-3'

2ACTN3-R: 5'-TGAGCCCGAGACAGGCAAG-3'

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA

DNA tổng số của các đối tượng nghiên cứu được tách chiết từ mẫu tế bào niêm mạc miệng bằng bộ Kit Buccal Swab DNA Extraction (GenShun, Trung Quốc) và các hướng dẫn đi kèm.

Phân ứng PCR

Đoạn exon 16 của gen *ACTN3* được nhân lên

bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 2ACTN3-F và 2ACTN3-R. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 5 phút, 95°C trong 60 giây, 62°C trong 90 giây, 72°C trong 45 giây, lặp lại 35 lần từ bước 2, 72°C trong 10 phút, giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được giữ ở -20°C đến khi sử dụng.

Phân tích đa hình gen

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR and DNA Fragment Purification Kit (GenShun, Trung Quốc). Kiểu gen *ACTN3* R577X được xác định bằng phương pháp phân tích RFLP, sử dụng enzyme cắt giới hạn *DdeI* (BioLabs, Mỹ), các điều kiện của phản ứng cắt enzyme giới hạn được tiến hành theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Sản phẩm cắt giới hạn sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 3% (Code: V3841, Promega). Xác định kiểu gen của từng đối tượng dựa vào kết quả điện di.

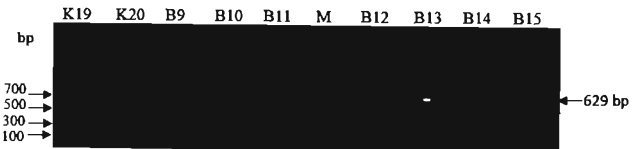
Xác định trình tự gen *ACTN3* R577X

Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự tại MCLAB (Mỹ) nhằm kiểm tra lại đa hình R577X sau khi được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP. Phân tích trình tự thu được bằng phần mềm BioEdit V7.0.9.

KẾT QUẢ

Nhân đoạn exon 16 của gen *ACTN3* bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số của 88 vận động viên đã được tách chiết và kiểm tra nồng độ bằng phương pháp quang phổ. DNA tổng số này được dùng làm khuôn để nhân đoạn exon 16 của gen *ACTN3*. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1) cho thấy: khi sử dụng cặp mồi 2ACTN3-F và 2ACTN3-R cho sản phẩm PCR đặc hiệu, rõ nét ở các mẫu nghiên cứu với kích thước khoảng 629 bp, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Sản phẩm PCR có chất lượng phù hợp với các bước nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng exon 16 của gen *ACTN3* của một số VĐV. Giếng M. Marker 1kb ladder plus. Giếng ký hiệu K19-K20: mẫu vận động viên điền kinh, Giếng ký hiệu B9-B15: mẫu vận động viên bộ môn bơi lội.

Sử dụng enzyme giới hạn *Ddel* trong phân tích RFLP

Các sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ được cắt bằng enzyme giới hạn *Ddel* để xác định kiểu gen *ACTN3* R577X. Trong đoạn trình tự 629 bp được khuếch đại có chứa 2 điểm cắt của *Ddel* đối với allele X và một điểm cắt đối với allele R. Kiểu gen của *ACTN3* R577X được xác định bằng điện di trên gel agarose. Theo tính toán lý thuyết, kiểu gen RR đặc trưng với 2 băng có kích thước 429 bp và 200 bp; kiểu gen RX đặc trưng với 4 băng có kích thước 429 bp, 332 bp, 200 bp và 97 bp; kiểu gen XX đặc

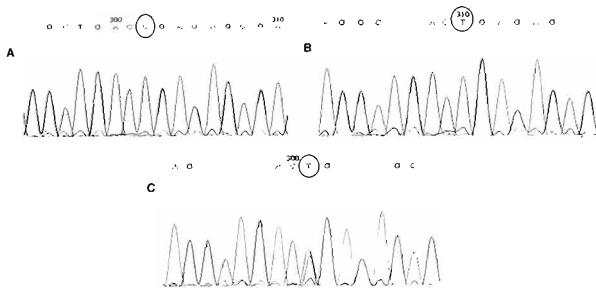
trung với 3 băng có kích thước 332 bp, 200 bp và 97 bp. Kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt bằng *Ddel* (Hình 2) cho thấy: sản phẩm là các băng rõ nét, có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.

Xác định đa hình kiểu gen *ACTN3* R577X bằng giải trình tự

Để kiểm chứng lại đa hình *ACTN3* R577X của từng mẫu, chúng tôi tiến hành tinh sạch lượng lớn sản phẩm PCR và xác định trình tự gen tại công ty MCLAB (Mỹ). Kết quả được minh họa đại diện (Hình 3A, 3B, 3C) như sau:



Hình 2. Kết quả điện di sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn *Ddel*. Giếng M: Marker 1kb ladder plus; Giếng ký hiệu K19-K20: mẫu ván đóng viên điện kinh; Giếng ký hiệu B9-B15: mẫu ván động viên bộ môn bơi lội.



Hình 3. Kết quả giải trình tự DNA. A: mẫu B11; B: mẫu B9; C: mẫu K19

Từ kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu B11 cho 2 băng với kích thước: 429 bp và 200 bp. Phân tích trình tự của mẫu B11 cho thấy xuất hiện một đỉnh nucleotide C rất rõ ràng (Hình 3A). Như vậy, không có biến đổi C \rightarrow T ở vị trí này. Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gen *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu B11 được xác định là RR.

Khi có biến đổi C \rightarrow T, enzyme *DdeI* sẽ nhận biết thêm 1 vị trí cắt và cắt đoạn gen tại 2 vị trí, trong trường hợp xảy ra ở cả hai bản sao của gen thì sẽ có 3 đoạn DNA có kích thước: 332 bp, 200 bp và 97 bp. Từ kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu B9 cho 3 băng với kích thước: 332 bp, 200 bp và 97 bp. Khi phân tích trình tự của mẫu B9 cho thấy một đỉnh nucleotide T rất rõ ràng (Hình 3B). Như vậy, biến đổi C \rightarrow T xuất hiện ở cả 2 bản sao. Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gen *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu B9 được xác định là XX.

Khi biến đổi C \rightarrow T xảy ra ở một trong hai bản sao của gen, enzyme *DdeI* sẽ nhận biết thêm 1 vị trí cắt tại bản sao xảy ra đột biến và cắt đoạn gen này tại 2 vị trí nên ta thu được 4 đoạn DNA có kích thước: 429 bp, 332 bp, 200 bp và 97 bp. Từ kết quả

điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu K19 cho 4 băng với kích thước: 429 bp, 332 bp, 200 bp và 97 bp. Khi phân tích trình tự của mẫu K19 cho thấy một kiểu dị hợp nucleotide C/T rất rõ ràng (Hình 3C). Như vậy, biến đổi C \rightarrow T xuất hiện ở một bản sao (bản sao mang biến dị X). Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gen *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu K19 được xác định là RX.

Phân tích tần số kiểu gen và tần số allele

Kết quả phân tích tần số kiểu gen/allele của *ACTN3* R577X ở 54 vận động viên điền kinh; 34 vận động viên bơi lội được trình bày ở bảng 1.

Dựa trên việc xác định và thống kê tần số kiểu gen và tần số allele của đa hình gen *ACTN3* R577X trên các nhóm vận động viên, chúng tôi sẽ tiến hành chia nhóm, phân tích ảnh hưởng của đa hình gen *ACTN3* R577X đến thành tích thể thao của vận động viên. Việc phân tích này sẽ được thực hiện khi đã thu thập được một số lượng mẫu đủ lớn, bổ sung nhóm đối chứng, thu thập đủ lượng thông tin để phân loại vận động viên thành các nhóm đặc trưng phù hợp (ví dụ: nhóm vận động viên thi đấu ở các môn thể thao cần lợi thế sức mạnh, nhóm vận động viên thi đấu ở các môn cần lợi thế sức bền). Đây cũng là định hướng nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi.

Bảng 1. Tần số kiểu gen/allele của *ACTN3* R577X ở các vận động viên

Nhóm	Tần số kiểu gen			Tần số allele	
	RR (%)	RX (%)	XX (%)	R (%)	X (%)
VĐV điền kinh (n = 54)	44	43	13	66	34
VĐV bơi lội (n = 34)	29	53	18	56	44

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thực hiện thành công kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đa hình kiểu gen *ACTN3* R577X trên các nhóm đối tượng nghiên cứu. Xác định được tần số kiểu gen *ACTN3* R577X, tần số allele R/X ở 88 đối tượng nghiên cứu, bao gồm 54 vận động viên điền kinh (44% RR; 43% RX; 13% XX; tần số allele R: 66%; allele X: 34%) và 34 vận động viên bơi lội (29% RR; 53% RX; 18% XX; tần số allele R: 56%; allele X: 44%). Kết quả nghiên cứu này sẽ được sử dụng kết hợp với các thông tin về đặc điểm thể lực và thành tích thể thao của các vận động viên đã thu thập được để phân tích sâu hơn về ảnh

hưởng của gen *ACTN3* tới thành tích thể thao Việt Nam ở bài báo tiếp theo.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí của đề tài "Ứng dụng công nghệ gen trong tuyển chọn vận động viên", Bộ Văn hóa, Thể thao và Du lịch từ 1/2013-7/2014 do TS. Lê Đức Chương làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cieszczyk P, Eider J, Ostaneck M, Arczewska A, Leońska-Duniec A, Sawczyn S, Ficek K, Krupecki K (2011) Association of the *ACTN3* R577X Polymorphism in

Polish Power-Orientated Athletes *J Hum Kinet* 28 : 55 - 61.

Chiu LL, Wu YF, Tang MT, Yu HC, Hsieh LL, Hsieh SS (2011) ACTN3 genotype and swimming performance in Taiwan. *Int J Sports Med* 32 : 476 - 480.

Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H et al (2005) ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength and response to resistance training in women. *J Appl Physiol* 99. 154–163

Delmonico MJ, Kostek MC, Doldo NA et al (2007) Alpha-actinin-3 (ACTN3) R577X polymorphism influences knee extensor peak power response to strength training in older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62(2):206–212

North KN, Yang N, Wattanasinchaigoon D et al (1999) A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population *Nat Genet* 21: 353–354

Roth SM, Walsh S, Liu D, Metter EJ, Ferrucci L, Hurley BF (2008) The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur J Hum Genet* 16 : 391 - 394.

Squire JM (1997) Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol* 7: 247–257

Vincent B, De Bock K, Ramaekers M et al (2007) ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics* 32(1). 58–63

Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP et al (2003) ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 73: 627–631

Yang N, MacArthur DG, Wolde B, Onywera VO, Boit MK, Lau SY, Wilson RH, Scott RA, Pitsiladis YP, Nonh K (2007) The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med Sci Sports Exerc* 39: 1985 - 1988

APPLICATION OF PCR-RFLP METHOD FOR ACTN3 R577X POLYMORPHISM ANALYSIS IN RUNNING AND SWIMMING ATHLETES IN VIETNAM

Pham Thi Nhan¹, Le Duc Chuong², Nghiem Ngoc Minh³, Luyen Quoc Hai^{1*}

¹Bionet Vietnam Biotechnology JSC

²Ministry of Culture, Sports and Tourism

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Although the human genome has now been sequenced, the influence of gen polymorphisms on genetic predisposition to sports is largely unknown. Numerous studies were conducted concerning the determination of association of the α -actinin-3 gene (*ACTN3*) polymorphism with performance of elite athletes. *ACTN3* gene codes α -actinin-3, which is found only in fast, type II muscle fibers. C-to-T transition (rs.1815739 C/T) in exon 16 of the *ACTN3* gene leads to a stop-codon (R577X polymorphism), which results in α -actinin-3 deficiency in XX homozygotes (no α -actinin-3 protein detectable in muscle fibers). Functional *ACTN3* R577X polymorphism has been associated with athletic performance. In the present study, we was performed to determine the quality and the quantity of DNA extracted from buccal swabs and to estimate PCR products. The amplified fragment subsequently underwent digestion by *DdeI* to determine *ACTN3* R577X genotype and allelic frequencies of 88 Vietnamese athletes belong to young and national teams. We obtained genotype and allelic frequencies of *ACTN3* R577X from 54 running athletes (44% RR; 43% RX; 13% XX and 66% R, 34% X) and from 34 swimming athletes (29% RR; 53% RX, 18%XX and 56% R, 44% X) Together with physical characteristics and the obtained performance, these results are used in order to analyze and evaluate the effect of *ACTN3* gene on the performance of Vietnamese athletes. Further, our target is focusing to study gen technology on selecting athletes, that aims to reduce costs of athlete selection, coaching, and enhance Vietnamese athletes' performance.

Keywords: α -actinin-3, *ACTN3* R577X, allele, athletic performance, PCR-RFLP

*Author for correspondence. Tel: +84-66747102, E-mail. luyenquochai@bionet.vn