

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE ĐẶC HIỆU GEN HV2 TRÊN VÙNG D-LOOP TY THỂ CỦA NGƯỜI BỆNH CÓ BỆNH LÝ MẠCH VÀNH

STUDY ON CHARACTERISTICS OF SPECIFIC NUCLEOTIDE SEQUENCES OF HV2 GENE IN THE D-LOOP REGION OF MITOCHONDRIAL DNA OF CORONARY ARTERY DISEASE

Nguyễn Văn Song^{1,3*}, Nguyễn Trọng Thiện², Đặng Đức Long³, Nguyễn Thị Kim Loan¹

¹Trường Đại học Kỹ thuật Y-Dược Đà Nẵng

²Bệnh viện C Đà Nẵng

³Viện Nghiên cứu và đào tạo Việt-Anh - Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: ngvysong@yahoo.com

(Nhận bài: 18/8/2020; Chấp nhận đăng: 16/3/2021)

Tóm tắt - Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã phân tích 60 mẫu (30 bệnh và 30 chứng) của những người đến khám và điều trị tại bệnh viện C Đà Nẵng). Độ tuổi trung bình của nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 68,9 và 71,7. DNA tổng số từ máu toàn phần được tách chiết theo McFall SM (2015) [1]. Sản phẩm PCR khuếch đại từ cặp mồi đặc hiệu ở nhiệt độ gắn mồi 560C được điện di trên agarose gel 0,8% và tinh sạch bằng Winzard®SV Gel and PCR Clean-Up system Kit (Promega, USA). Tạo dòng và phân tích trình tự nucleotide bằng kỹ thuật BigDye Terminator. Phân tích biến thể cho thấy, có 20 vị trí của gen HV2 ở nhóm bệnh và 17 vị trí gen HV2 trên nhóm chứng có sự thay đổi nucleotide. Kết quả ghi nhận chèn nucleotide ở vị trí 273 và mất ở vị trí 14. Tỷ lệ biến thể trên gen HV2 ở các vị trí 226 A>G, 286 T>C, 345 G>A và 379 T>A của nhóm bệnh và nhóm chứng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p tương ứng 0,042, 0,020, 0,030 và 0,042.

Từ khóa - Gen HV2; biến thể nucleotide; DNA ty thể; bệnh lý mạch vành; vùng siêu biến

1. Đặt vấn đề

DNA ty thể (mtDNA) có kích thước 16.569 bp bao gồm 37 gen, mã hóa cho 13 chuỗi polypeptid tham gia vào chuỗi hô hấp tế bào, 22 tRNA và 2 rRNA. Đây là một phân tử DNA sợi kép, dạng vòng, gồm hai chuỗi khác nhau về thành phần nucleotide. Chuỗi nặng có chứa nhiều Guanine và chuỗi nhẹ chứa nhiều Cytosine [2]. Những đặc điểm trên của mtDNA là một công cụ hữu hiệu trong nghiên cứu di truyền và tiến hóa của con người. MtDNA là một hệ di truyền độc lập so với hệ di truyền của nhân tế bào. Các bệnh do biến thể trên mtDNA thường được biểu hiện rất đa dạng, chúng có thể liên quan đến rối loạn quá trình mã hóa protein hoặc đơn thuần chỉ là những đột biến do thay đổi các nucleotide [3]. Đột biến mtDNA đã được chứng minh có liên quan đến nhiều bệnh lý ở người như bệnh phổi, ung thư đại trực tràng, bệnh cơ tim giãn, bệnh cơ tim phì đại, một số loại bệnh tim mạch khác, ... [4], [5], [6]. Cho đến nay, nhiều công bố thống kê được trên 150 bệnh di truyền theo mẫu hệ khác nhau do mtDNA quyết định. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu về sự đột biến mtDNA dẫn đến bệnh lý động mạch vành. Năm 2010, Abu-Amero và cộng sự (cs) [7] đã tìm thấy có mối

Abstract - In this study, we analyzed 60 samples (30 patients and 30 controls) of those who came to be examined and treated at Danang C hospital. The average age of the patients group and the control group was 68.9 and 71.7 respectively. Total DNA from whole blood was extracted according to McFall SM (2015) [1]. The PCR product was amplified by a pair of specific primer at 560C annealing and separated on the 0.8% agarose gel and purified by Winzard®SV Gel and PCR Clean-Up system Kit (Promega, USA). PCR products were cloned in TA-cloning vector and nucleotide sequence analysis by BigDye Terminator method. Nucleotide variation analysis showed that, there were 20 positions of HV2 gene in patient group and 17 positions of HV2 gene in control group with nucleotide modified. The results recorded nucleotide insertion at position 273 and missing base at position 14. The prevalence of variation on the HV2 gene at position 226 A> G, 286 T> C, 345 G> A and 379 T> A of the patient group and the control group had statistically significant differences with p value of 0.042; 0.020; 0.030 and 0.042 respectively.

Key words - HV2 gene; nucleotide variation; mtDNA; coronary artery disease; D-Loop

liên quan giữa đột biến 16189T>C trên DNA ty thể với bệnh lý động mạch vành. Mặt khác, trong nghiên cứu này, tác giả còn nhận thấy mối liên hệ này có bị ảnh hưởng bởi tuổi tác cũng như sự xuất hiện của bệnh nhồi máu cơ tim và cao huyết áp [7]. Haber và cs [8] đã nghiên cứu mối liên quan giữa đa hình này với bệnh lý động mạch vành ở người Li Băng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự đa hình này ở các dân tộc khác nhau có nguy cơ bị bệnh lý mạch vành là khác nhau. Một trong những đột biến trên DNA ty thể được nghiên cứu nhiều nhất là đột biến điểm xóa bỏ mtDNA⁴⁹⁷⁷ đã được phát hiện trong nghiên cứu của Jia và cs [9], Sabatino và cs [10]. Điều này cho thấy mức độ đột biến trên mtDNA là rất cao ở các người bệnh có bệnh lý mạch vành. Việc loại bỏ trình tự đoạn nucleotides mtDNA khỏi vị trí 8483-13459 đã được xác định là sự xóa bỏ phổ biến và đa dạng nhất [9]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu khác cũng cho thấy, tỷ lệ di truyền của bệnh lý động mạch vành (CAD) chiếm tỷ lệ khá cao khoảng từ 40% đến 60%. Điều này chứng tỏ, di truyền đóng một vai trò quan trọng đối với nguy cơ mắc CAD cùng với các yếu tố nguy cơ truyền thống khác như rối loạn chuyển hóa, hút thuốc lá, cao huyết áp, tiểu đường và béo phì...

¹ Danang University of Medical Technology and Pharmacy (Song Nguyen Van, Nguyen Thi Kim Loan)

² Da Nang C Hospital (Nguyen Trong Thien)

³ The University of Danang - VN-UK Institute for Research and Executive Education (Song Nguyen Van, Dang Duc Long)

[11], [12], [13]. Cho đến nay, việc nghiên cứu những biến thể trên vùng D-loop ty thể của những người bệnh bị bệnh lý mạch vành vẫn chưa có những kết quả đầy đủ về mối liên quan. Nhằm cung cấp thêm những số liệu khoa học về biến thể trên người bệnh có bệnh lý mạch vành nhóm tác giả đã tiến hành *Nghiên cứu đặc điểm trình tự nucleotide đặc hiệu gen HV2 trên vùng D-Loop ty thể của các người bệnh có bệnh lý mạch vành*. Hy vọng kết quả nghiên cứu sẽ tiếp tục cung cấp những dữ liệu về biến thể đặc hiệu gen HV2 trên vùng D-loop để làm cơ sở tìm kiếm chỉ thị sinh học trong công tác phòng ngừa và điều trị đích.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là người bệnh đến khám và điều trị tại khoa Nội tim mạch Bệnh viện C Đà Nẵng từ tháng 2 đến tháng 7 năm 2020.

2.2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được các biến thể trình tự nucleotide trên vùng đặc hiệu gen HV2.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp mô tả cắt ngang

Nghiên cứu được thực hiện quy mô pilot với cỡ mẫu là 60 mẫu (30 mẫu bệnh và 30 mẫu chứng) được phân thành hai nhóm thỏa mãn điều kiện thu mẫu. Nhóm bệnh là những người đã được chụp mạch vành, xác định bệnh lý mạch vành và có chỉ định can thiệp. Nhóm chứng là những người đã được chụp mạch vành nhưng xác định không có bệnh lý mạch vành.

Mẫu máu toàn phần (2 ml) của người tham gia nghiên cứu sau khi thu được xử lý bằng chất chống đông EDTA và bảo quản trong đá tuyết cho đến khi tách chiết DNA tổng số. Các thông tin mẫu nghiên cứu như tuổi, giới tính, nghề nghiệp, ... được khai thác, thu thập và phân tích từ hồ sơ bệnh án tại khoa Nội tim mạch Bệnh viện C Đà Nẵng.

2.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử

a. Tách chiết DNA tổng số từ máu toàn phần

DNA tổng số từ máu toàn phần được tách chiết theo McFall SM [1] có cải tiến. Máu toàn phần (400 μ l) được ly giải tế bào hồng cầu bằng 800 μ l dung dịch 0,1 mM EDTA. Hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút để thu bạch cầu. Bạch cầu được hòa tan trong 80 μ l dung dịch 1M NaCl bằng vortex. Ly giải tế bào bạch cầu bằng 480 Cell Lysis Solution (10 mM Tris-HCl, 26 mM EDTA, 17,3 mM SDS (0,5%)). RNA được loại bỏ bằng 5 μ l RNase và ủ ở 37°C trong 60 phút. Protein được tinh sạch bằng hỗn hợp dung dịch phenol: chloroform: isoaminalcohol (25:24:1). DNA được kết tủa bằng 2 lần thể tích ethanol 99% lạnh và hòa tan tủa trong đệm TE.

b. Đánh giá chất lượng DNA tổng số

Nồng độ DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ trên máy NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) ở bước sóng 260 nm. Độ tinh sạch được xác định bằng chỉ số A260/A280 nm. Chất lượng DNA tổng số được đánh giá bằng điện di trên agarose gel 1%.

c. Phân tích khối lượng protein tổng số

Khối lượng phân tử protein tổng số từ huyết tương được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Máu toàn phần được ly tâm 3.000 rpm trong 10 phút để tách huyết tương. Huyết tương được pha loãng trong đệm PBS theo tỷ lệ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 và 1/32. Mẫu (5 μ l) được sử dụng để điện di trên polyacrylamide gel (30%). Polyacrylamide Gel được nhuộm bởi dung dịch (Coomassie brilliant blue (R-250) 0,2 % (m/v); Methanol 50%; acetic acid 7%) và rửa bằng dung dịch (Methanol 30%, acetic acid 7%).

d. Khuếch đại gen HV2

Gen HV2 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3' và 5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3'. Thành phần PCR (trong 25 μ L) bao gồm DNA khuôn mẫu (100 ng DNA tổng số), 10 pmol primer mỗi loại, 200 μ M dNTP mỗi loại, đệm 10 \times Taq polymerase tiêu chuẩn và 1,25 unit Taq polymerase (Promega, USA). Phản ứng khuếch đại được thiết lập với các điều kiện như sau: Biến tính toàn bộ genomic DNA ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ với 1 phút ở 95°C, 1 phút ở (50, 55, 56, 57°C) và 1 phút ở 72°C và cuối cùng là kéo dài 72°C trong 5 phút.

e. Phân tích trình tự nucleotide

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Winzard®SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA) và gắn vector TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). Hỗn hợp gắn được chuyển vào tế bào khả biến One Shot®TOP10 và nuôi cấy lên môi trường LB + IPTG, X-gal + Km +Amp. Plasmids tái tổ hợp được tách chiết và phân tích trình tự nucleotide trên máy ABI3730. Kết quả phân tích được so sánh với trình tự nucleotide gen HV2 được công bố trên ngân hàng gen (GenBank, J01415).

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SSP (Version 19, 2012). Mức ý nghĩa thống kê xác lập khi $p < 0,05$.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên tinh thần tôn trọng bí mật riêng tư và được sự chấp nhận của đối tượng nghiên cứu. Tất cả thông tin của người tham gia nghiên cứu được xử lý và công bố dưới hình thức số liệu, không nêu danh cá nhân. Nghiên cứu được sự đồng ý của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Bệnh viện C Đà Nẵng và Trường Đại học Kỹ thuật Y-Dược Đà Nẵng.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Kết quả phân tích Bảng 1 cho thấy, độ tuổi trung bình của nhóm bệnh (30 người) là 68,9 và nhóm chứng (30 người) là 71,7. Trong đó, nhóm bệnh có số người cao tuổi là 22 (73,3%) và số người nhỏ hơn 60 tuổi là 8 người (26,7%). Nhóm chứng có tỷ lệ người cao tuổi chiếm 80% và nhỏ hơn 60 tuổi là 20%. Nhìn chung, độ tuổi mẫu nghiên cứu khá cao, điều này phù hợp thực tế bệnh lý tim mạch có mối liên quan chặt chẽ với người cao tuổi. Nghiên cứu cũng chỉ ra tỷ lệ nam giới ở nhóm bệnh là 36,7% và nữ giới là

63,3%. Trong khi nhóm chứng có nam giới chiếm tỷ lệ 56,7% và nữ giới là 43,3%. Tuổi lớn nhất trong nghiên cứu này là 81 và tuổi nhỏ nhất là 47.

Bảng 1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm bệnh		Nhóm chứng	
	Tần số	Tỉ lệ (%)	Tần số	Tỉ lệ (%)
Giới tính				
Nam	11	36,7	17	56,7
Nữ	19	63,3	13	43,3
Nhóm tuổi				
47-59	8	26,7	6	20,0
60-81	22	73,3	24	80,0
Tuổi trung	68,9		71,7	
Nghề nghiệp				
Làm nông	4	13,3	3	10,0
Cán bộ viên	18	60,0	22	73,3
Khác	8	26,7	5	16,7

Kết quả thống kê một số đặc điểm khác cho thấy, đa số các đối tượng tham gia nghiên cứu này là cán bộ viên chức chiếm tỷ lệ 60% (18 người), làm nông nghiệp có tỷ lệ nhỏ nhất là 13,3% (4 người) và nghề nghiệp khác chiếm 26,7% (8 người). Tỷ lệ này đối với nhóm chứng lần lượt là 73,3%, 10,0% và 16,7%.

3.2. Chất lượng, nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số từ máu toàn phần

DNA tổng số được tách chiết từ 400 μ l máu toàn phần được hòa tan trong 50 μ l đệm TE để xác định nồng độ, độ tinh sạch và chất lượng DNA.

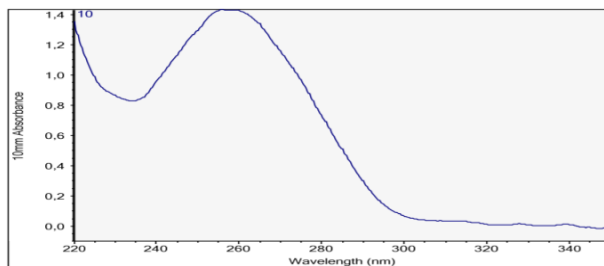
Bảng 2. Một số kết quả nồng độ và độ tinh sạch DNA tổng số

Ký hiệu mẫu	Nồng độ ng/ μ l	A260	A280	260/280
HV2GDNA22	115,1	2,302	1,207	1,91
HV2GDNA23	115,4	2,309	1,216	1,90
HV2GDNA24	113,8	2,276	1,190	1,91
HV2GDNA25	145,8	2,915	1,517	1,92
HV2GDNA26	149,5	2,990	1,563	1,91
HV2GDNA27	146,9	2,938	1,529	1,92
HV2GDNA28	226,0	4,520	2,325	1,94
HV2GDNA29	232,2	4,645	2,397	1,94
HV2GDNA30	230,6	4,612	2,329	1,98
HV2GDNA31	234,3	4,687	2,421	1,94
HV2GDNA32	235,6	4,713	2,386	1,98
HV2GDNA33	239,2	4,784	2,422	1,98

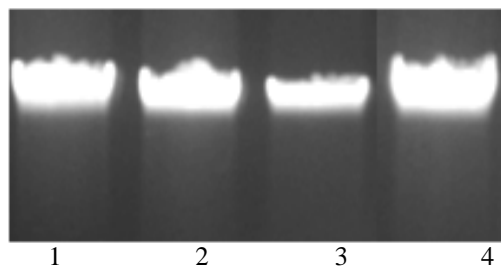
Kết quả thu được cho thấy, nồng độ DNA tổng số trung bình của các mẫu bệnh phẩm 115,1-239,2 ng/ μ l (Bảng 2). Nồng độ DNA tổng số các mẫu có sự khác nhau, điều này có thể do hàm lượng bạch cầu trong mỗi mẫu người bệnh có sự thay đổi. Kết quả phân tích cũng cho thấy, độ tinh sạch của sản phẩm DNA tổng số đạt chỉ số từ 1,90-1,98. Với nồng độ và độ tinh sạch thu được, DNA tổng số hoàn toàn có thể đảm bảo để thực hiện các phân tích PCR hay real-time PCR.

Bên cạnh nồng độ và độ tinh sạch, chất lượng DNA là

một trong những yếu tố quan trọng quyết định khả năng thành công khi triển khai PCR. Tồi ưu hóa quá trình tách chiết bằng cách loại bỏ huyết thanh nhằm hạn chế nhiễm bẩn của các thành phần trong huyết thanh đã nâng cao được chất lượng của DNA và hạn chế quá trình nhiễm. Kết quả điện di DNA tổng số được trình bày ở Hình 2 cho thấy, DNA tổng số không bị đứt gãy, ít nhiễm bẩn protein hay RNA. Với chất lượng DNA tổng số thu được từ phương pháp tách chiết theo McFall SM [1] có cải tiến hoàn toàn có thể sử dụng làm nguồn nguyên liệu để khuếch đại gen HV2.



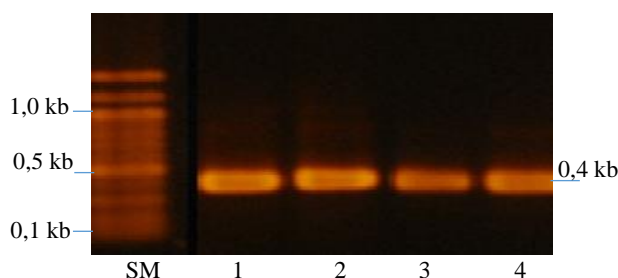
Hình 1. Đồ thị biểu diễn nồng độ và độ tinh sạch sản phẩm DNA trên NanoDrop 2000



Hình 2. Kết quả điện di DNA tổng số

3.3. Khuếch đại trình tự đặc hiệu gen HV2

Gen HV2 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu và tối ưu hóa ở các nhiệt độ gắn mồi khác nhau. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên 0,8% agarose gel và nhuộm với ethidium bromide. Phân tích hình ảnh gel bằng hệ thống Gel documentation.



Hình 3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện PCR

SM: thang chuẩn, 1-4: Sản phẩm PCR được khuếch đại tương ứng với các nhiệt độ gắn mồi từ 50, 55, 56 và 57°C

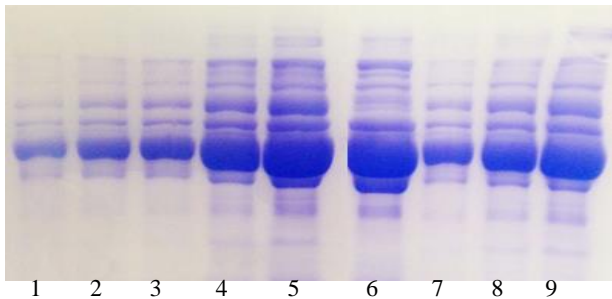
Kết quả trình bày ở Hình 3 cho thấy, primer đã bắt cặp được với trình tự đích và khuếch đại sản phẩm có kích thước khoảng 0,4 kb tương đương với kích thước như dự kiến của gen HV2 ở các nhiệt độ gắn mồi 50, 55, 56 và 57°C. Tuy nhiên, ở các nhiệt độ gắn mồi từ 50-55°C các sản phẩm PCR đã có hiện tượng bắt cặp không đặc hiệu. Bên cạnh sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 0,4 kb đã xuất hiện các sản phẩm khuếch đại có kích thước lớn hơn 0,4 kb.

Ở khoảng nhiệt độ gắn mồi từ 56-57°C cho thấy, kh

năng khuếch đại sản phẩm yếu hơn nhưng đặc hiệu. Sản phẩm khuếch đại được có kích thước khoảng 0,4 kb tương ứng với kích thước dự kiến khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen HV2. Với kết quả trên nhóm tác giả đã bước đầu hoàn thiện quy trình khuếch đại trình tự đặc hiệu gen HV2 và sản phẩm PCR có thể sử dụng để thực hiện phân tích trình tự nucleotide.

3.4. Đặc điểm protein tổng số

Trong nghiên cứu này nhóm tác giả đã tiến hành khảo sát protein tổng số từ huyết tương của nhóm bệnh và nhóm chứng tại 04 vị trí có biến thể khác nhau có ý nghĩa thống kê là 226A>G; 286T>C; 345G>A và 379T>A. Các protein huyết tương pha loãng trong đệm PBS ở các tỷ lệ khác nhau được phân tích bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả trình bày ở Hình 4 cho thấy, protein tổng số được tách từ huyết tương chưa xuất hiện các protein có trọng lượng phân tử khác nhau giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Kết quả này chỉ mang tính tương đối để phát hiện các protein khác biệt về trọng lượng phân tử. Điều này có thể do các biến thể chưa thực hiện quá trình dịch mã protein; Các protein mới dịch mã có cùng trọng lượng phân tử với các protein của hệ huyết tương hay khả năng biểu hiện thấp của gen khó phát hiện.



Hình 4. Kết quả điện di protein tổng số từ huyết tương. Các đường 1-5: Mẫu bệnh pha loãng từ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 và -1/32. Các đường 6-9: Mẫu nhóm chứng mẫu chứng

Để đánh giá các protein biểu hiện từ các gen có cùng trọng lượng phân tử nhưng khác nhau về những đặc tính sinh học như trật tự amino acid hay điện tích cần phải đánh giá thêm bằng cách phối hợp điện di IEF và SDS-PAGE (2-D) để xác định các cấu trúc protein khi có sự biến đổi trình tự nucleotides trên gen HV2.

3.5. Biến thể nucleotide trên gen HV2

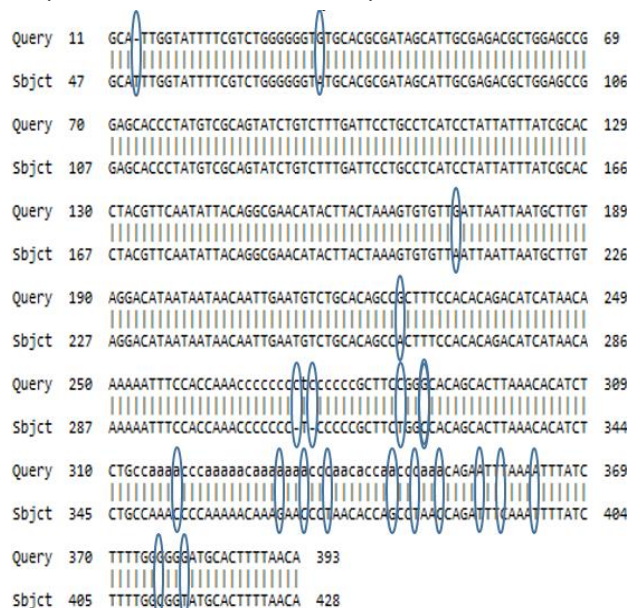
So sánh với trình tự nucleotide của các gen HV2 được phân lập trên mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide gen HV2 chuẩn từ ngân hàng gen (GenBank, J01415) đã xác định được có 20 vị trí định vị trên của gen HV2 ở mẫu có sự thay đổi trình tự nucleotide. Cụ thể, trong 30 mẫu nghiên cứu của nhóm bệnh nhóm tác giả đã xác định có 03 vị trí có sự thay đổi trình tự nucleotide như sau: 06 mẫu thay đổi trình tự nucleotide A>G tại vị trí 37 (37A>G); Có 02 mẫu thay đổi trình tự A>G tại vị trí 173 (173A>G) và 09 mẫu có trình tự nucleotide thay đổi tại vị trí 226 (226A>G).

Đối với sự thay đổi trình tự nucleotide T>C, nghiên cứu đã ghi nhận có 03 vị trí trên gen HV2 với số mẫu tương ứng với các vị trí cụ thể như sau: Số mẫu có sự thay đổi trình tự nucleotide T>C tại vị trí 286 là 13 mẫu (286T>C); Vị trí

337 là 05 mẫu (337T>C) và vị trí 348 là 07 mẫu (348T>C).

Có 03 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide C>A với số mẫu tương ứng là 02 mẫu ở vị trí 318 (318C>A); 06 mẫu ở vị trí 334 (334C>A) và 06 mẫu ở vị trí 351 (351C>A). Có 03 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide T>A với số mẫu tương ứng là 08 mẫu ở vị trí 356 (356 T>A); 10 mẫu ở vị trí 363 (363 T>A) và 09 mẫu ở vị trí 379 (379 T>A). Có 02 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide C>G với số mẫu tương ứng là 07 mẫu ở vị trí 289 (289 C>G) và 08 mẫu ở vị trí 376 (376 C>G). Số liệu cũng chỉ ra có 02 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide G>A với số mẫu tương ứng là 11 mẫu ở vị trí 331 (331 G>A) và 11 mẫu ở vị trí 345 (345 G>A).

Kết quả phân tích nhóm chứng cho thấy, số mẫu tương ứng ở các vị trí như sau: 08 mẫu thay đổi trình tự nucleotide A>G tại vị trí 37 (37A>G); 05 mẫu tại vị trí 173 (173 A>G); 02 mẫu tại vị trí 226 (226 A>G). Có 03 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide T>C với số mẫu tương ứng ở các vị trí: 04 mẫu tại vị trí 286 (286 T>C); 08 mẫu ở vị trí 337 (337 T>C) và 09 mẫu ở vị trí 348 (348 T>C). Có 03 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide C>A với số mẫu tương ứng là 05 mẫu ở vị trí (318 C>A); 03 mẫu ở vị trí 334 (334 C>A) và 08 mẫu ở vị trí 351 (351 C>A). Có 03 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide T>A với số mẫu tương ứng là 04 mẫu ở vị trí 356 (356 T>A); 07 mẫu ở vị trí 363 (363 T>A) và 02 mẫu ở vị trí 379 (379 T>A). Có 02 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide C>G với số mẫu tương ứng là 09 mẫu 289 (289 C>G) và 04 mẫu ở vị trí 376 (376 C>G). Có 02 vị trí có sự biến đổi trình tự nucleotide G>A với số mẫu tương ứng là 08 mẫu ở vị trí 331 (331 G>A) và 03 mẫu ở vị trí 345 (345 G>A). Bên cạnh sự thay đổi nucleotide của nhóm bệnh và nhóm chứng kết quả nghiên cứu cũng đã ghi nhận có sự chèn nucleotide ở vị trí 273 và mất nucleotide ở vị trí 14 trên cả hai nhóm.



Hình 5. Vị trí biến đổi trình tự nucleotide gen HV2

Thống kê các biến đổi nucleotide trên nhóm chứng và nhóm bệnh đã ghi nhận 17 vị trí trên gen HV2 có sự biến đổi nucleotide (Bảng 3). Kết quả phân tích bảng 3 cho thấy, có biến thể nucleotide trên gen HV2 của nhóm bệnh và nhóm chứng tại 13 vị trí là 37A>G; 173A>G; 289C>G;

318C>A; 331G>A; 334G>A, 337T>C; 348T>C; 351C>A; 356T>A; 359C>T; 363T>A; 376C>G có tỷ lệ các biến đổi trình tự nucleotide khác nhau nhưng không có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.

Bảng 3. Mối liên quan tỷ lệ biến thể trình tự nucleotide trên gen HV2 của nhóm bệnh và nhóm chứng

Biến thể	Nhóm chứng (n=30)		Nhóm bệnh (n=30)		p
	Tần số	Tỷ lệ (%)	Tần số	Tỷ lệ (%)	
37 A>G	8/30	26,7	6/30	20,0	0,761
173 A>G	5/30	16,7	2/30	6,7	0,423
226 A>G	2/30	6,7	9/30	30,0	0,042
286 T>C	4/30	13,3	13/30	43,3	0,020
289 C>G	9/30	30,0	7/30	23,3	0,770
318 C>A	5/30	16,7	2/30	6,7	0,424
331 G>A	8/30	26,7	11/30	36,7	0,579
334 C>A	3/30	10,0	6/30	20,0	0,471
337 T>C	8/30	26,7	5/30	16,7	0,532
345 G>A	3/30	10,0	11/30	36,7	0,030
348 T>C	9/30	30,0	7/30	23,3	0,771
351 C>A	8/30	26,7	6/30	20,0	0,761
356 T>A	4/30	13,3	8/30	26,7	0,333
359 C>T	5/30	16,7	3/30	10,0	0,706
363 T>A	7/30	23,3	10/30	33,3	0,567
376 C>G	4/30	13,3	8/30	26,7	0,333
379 T>A	2/30	6,7	9/30	30,0	0,042

Tại các vị trí 226 A>G, 286 T>C, 345 G>A và 379 T>A đã ghi nhận sự biến đổi trình tự nucleotide trên nhóm bệnh và nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại các vị trí trên với các giá trị p tương ứng là 0,042; 0,020; 0,030 và 0,042. Với kết quả này, bước đầu xác định có sự biến đổi nucleotide của gen HV2 trên vùng D-Loop ty thể của các người bệnh có bệnh lý mạch vành.

4. Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu trên, bước đầu nhóm tác giả đã xác định được sự biến đổi trình tự nucleotide tại 04 vị trí của gen HV2 trên vùng D-Loop ty thể là 226 A>G; 286 T>C; 345 G>A và 379 T>A. Biến thể này có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp

Bộ “Nghiên cứu biến thể trình tự nucleotides trên vùng siêu biến D-Loop ty thể của các bệnh nhân có bệnh lý mạch vành” mã số B-20200DNA-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] McFall SM, Wagner RL, Jangam SR, Yamada DH, Hardie D, Kelso DM, “A simple and rapid DNA extraction method from whole blood for highly sensitive detection and quantitation of HIV-1 proviral DNA by real-time PCR”, *Journal of virological methods*, 2015, 214:37-42.
- [2] Amorim A, Fernandes T, Taveira N, “Mitochondrial DNA in human identification: a review”, *PeerJ Preprints*, (7), 2019, e27500v1.
- [3] Borst P, “Structure and function of mitochondrial DNA”, *Trends in Biochemical Sciences*. 2(2), Elsevier, 1977, 31-34.
- [4] Dimauro S, Davidzon G, “Mitochondrial DNA and disease”, *Ann Med*, 37(3), NCBI, 2005, 222-232.
- [5] Trần Mạnh Hà, *Nghiên cứu mối liên quan giữa đột biến trong vùng điều khiển hệ gen ty thể và bệnh ung thư phổi*, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam – Viện Sinh thái Tài nguyên sinh vật, 2013.
- [6] Nguyễn Thị Ngọc Tú, *Phân tích đột biến gen tARN và ND3 của ADN ty thể ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng*, Sinh học thực nghiệm. Viện hàn lâm Khoa học Việt Nam, 2012.
- [7] Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mousa A, Gonzalez AM, Larruga JM, Cabrera VM, Dzimir N, “The mitochondrial DNA variant 16189T> C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs”, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 14(1), Pubmed, 2010, 43-47.
- [8] Haber M, Youhanna SC, Balanovsky O, Saade S, Martínez-Cruz B, Ghassibe-Sabbagh M, Shasha N, Osman R, el Bayeh H, Koshel S, Zaporozhchenko V, “MtDNA Lineages Reveal Coronary Artery Disease-Associated Structures in the Lebanese Population”, *Annals of human genetics*, 76(1), NCBI, 2012, 1-8.
- [9] Jia Z, Wang X, Qin Y, Xue L, Jiang P, Meng Y, Shi S, Wang Y, Qin Mo J, Guan MX, “Coronary heart disease is associated with a mutation in mitochondrial tRNA”, *Human Molecular Genetics*, 22(20), NCBI, 2013, 4064-4073.
- [10] Sabatino L, Botto N, Borghini A, Turchi S, Andreassi MG (2013). Development of a new multiplex quantitative real-time PCR assay for the detection of the mtDNA4977 deletion in coronary artery disease patients: A link with telomere shortening. *Environmental and molecular mutagenesis* 54(5), pp: 299-307.
- [11] Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, Stanger O, Paulweber B, Iglseider B, Oberkofler H, Maier R, “The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations”, *PLoS one*, 6(1), NCBI, 2011, e16455.
- [12] Qin Y, Xue L, Jiang P, Xu M, He Y, Shi S, Huang Y, He J, Mo JQ, Guan MX, “Mitochondrial tRNA Variants in Chinese Subjects With Coronary Heart Disease”, *Journal of the American Heart Association* 3(1), NCBI, 2014, e000437.
- [13] Rad RG, Saleh SK, Kouchaksaraei AS, Houshmand M, Salehi A and Arabgari F, “Association of Mitochondrial T16519C polymorphism with Coronary Artery Disease (CAD) in Iranian patients underwent coronary angiography”, *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 2016, 132-145.