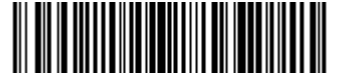




(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003579

(51) **C12Q 1/68**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00442 (22) 08/09/2020
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/03/2022 408
(73) Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
Nhà Y1, Số 2, Phạm Văn Đồng, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội
(72) Đinh Đoàn Long (VN); Phạm Thị Hồng Nhung (VN); Vũ Thị Thơm (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH RS36211723 CỦA GEN MÃ HÓA PROTEIN C
LIÊN KẾT VỚI MYOSIN Ở CƠ TIM (MYBPC3)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein C liên kết với myosin ở cơ tim (MYBPC3), quy trình này bao gồm các bước: 1) tách chiết ADN tổng số từ mẫu máu toàn phần; 2) chuẩn bị phản ứng PCR; 3) nhân đoạn gen MYBPC3 mong muốn bằng cặp mồi đặc hiệu; 4) thu sản phẩm phản ứng PCR; và 5) xác định tính đa hình rs36211723 của gen MYBPC3 thu được. Quy trình theo giải pháp hữu ích xác định được các đa hình rs36211723 của gen MYBPC3 hữu ích để sàng lọc các bệnh nhân có khả năng mắc bệnh cơ tim phì đại.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng trong phân tích, cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein C liên kết với myosin ở cơ tim (*MYBPC3*). Quy trình theo giải pháp hữu ích thích hợp để sàng lọc các bệnh nhân có khả năng mắc bệnh cơ tim phì đại (BCTPĐ).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh cơ tim phì đại (BCTPĐ) là một bệnh lý tim mạch di truyền thường gặp, được mô tả lần đầu tiên vào năm 1958 bởi Donald Teare tại bệnh viện Saint George, London (Teare D., 2018). Những báo cáo sớm nhất về bệnh cơ tim phì đại chủ yếu giới hạn về mặt địa lý ở các nước phát triển vùng Bắc Mỹ và Tây Âu, trên các bệnh nhân da trắng. Tuy nhiên, cùng với sự nâng cao nhận thức của con người và trình độ chẩn đoán phát hiện, nghiên cứu dịch tễ học cho thấy bệnh cơ tim phì đại là một bệnh lý có tính chất toàn cầu với người mắc bệnh tại nhiều quốc gia, ở đa dạng các chủng tộc và trên cả hai giới. Tính đến năm 2018, bệnh cơ tim phì đại đã được phát hiện ở 122 quốc gia có dân số chiếm 88% tổng dân số thế giới. Các quốc gia này phân bố ở tất cả các khu vực lục địa đông dân cư, đa dạng về địa lý và văn hóa, có thể kể đến như Iceland, Việt Nam, Sri Lanka, Afghanistan, Botswana, Iran, Greenland và Mông Cổ (Maron B. J., 2018). BCTPĐ được cho là bệnh tim mạch di truyền thường gặp nhất do phổ biến gấp 35 lần so với những bệnh tim mạch di truyền khác như rối loạn kênh Ion, bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp, hội chứng Marfan hay bệnh cơ tim giãn (Maron B. J., 2018). Tỷ lệ mắc bệnh cơ tim phì đại ước tính là 1/500 (0,2%) cho dân số toàn thế giới. Tuy nhiên theo nghiên cứu của Christopher Semsarian và cộng sự năm 2015, tỷ lệ người mang gen bệnh cơ tim phì đại có thể lớn gấp 2,5 lần so với con số ước tính này. Trên thế giới, số người mắc BCTPĐ là khoảng 20 triệu người. Tại Mỹ, con số này là 750.000 người (Maron B. J., 2018), trong đó có khoảng 150.000 người trẻ từ 6 đến 21 tuổi (Shah M., 2017). Tại Việt Nam, số lượng người mắc BCTPĐ chưa được thống kê cụ thể, tuy nhiên theo ước tính từ tỷ lệ mắc bệnh 0,2% cho dân số chung thế giới, số người bệnh có thể lên đến 180.000 người – một con số không hề nhỏ.

Biểu hiện trên lâm sàng của bệnh nhân BCTPĐ không đồng nhất, đặc trưng bởi sự dày lên bất thường của thành cơ tim. Theo hướng dẫn năm 2014 của Hội Tim mạch châu Âu (ESC) về chẩn đoán và điều trị BCTPĐ, dấu hiệu của bệnh trên siêu âm tim hoặc chụp cộng hưởng từ là độ dày thành tâm thất trái ≥ 15 mm. Tùy thuộc vào vị trí và mức độ phì đại cơ tim, bệnh nhân có thể phát triển một hoặc nhiều bất thường như tắc nghẽn đường ra, rối loạn chức năng tâm trương, thiếu máu cơ tim cục bộ, hở van hai lá. Tuy nhiên, triệu chứng trên lâm sàng của bệnh nhân BCTPĐ rất đa dạng, một số hoàn toàn không có triệu chứng, trong khi một số khác xuất hiện các triệu chứng như mệt mỏi, khó thở, đau ngực, đánh trống ngực, thậm chí suy tim hay đột tử (John F., 2019). Khó thở khi gắng sức là biểu hiện phổ biến nhất của người mắc BCTPĐ khi nó xảy ra trên 90% bệnh nhân có triệu chứng (Wigle E.D., 1995). Đau thắt ngực khi gắng sức xuất hiện trên 25-30% bệnh nhân BCTPĐ và thường xuất hiện khi chụp động mạch vành bình thường (Elliott P.M., 1996; Pasternac A., 1982). Khoảng 28% bệnh nhân BCTPĐ cho biết họ có ít nhất một lần ngất xỉu, 20% khác phàn nàn về chứng tiền ngất (Haghjoo M., 2009). Tử vong liên quan đến BCTPĐ thường do đột tử tim, suy tim và đột quỵ do tắc mạch. Ngoài ra, nghiên cứu gần đây cho thấy tiên lượng BCTPĐ có xu hướng xấu hơn ở bệnh nhân nữ, bao gồm tắc nghẽn đường ra thất trái, hở van hai lá nhiều hơn; rối loạn chức năng tâm trương, tăng áp động mạch phổi nặng hơn; hoạt động gắng sức tim phổi kém hơn nam giới (Geske J. B., 2017; Olivotto I., 2005).

Tính chất đa dạng trong biểu hiện lâm sàng của BCTPĐ, đặc biệt là các ca bệnh không triệu chứng, gây ra khó khăn trong việc phát hiện bệnh. Đa số bệnh nhân mắc BCTPĐ không có triệu chứng và chỉ được phát hiện một cách tình cờ trong các xét nghiệm định kỳ hoặc khi đã xuất hiện các biến chứng nặng (Maron B.J., 1995). Lúc này, việc điều trị trở nên phức tạp, kéo theo đó là chi phí điều trị tăng cao. Vì vậy, sàng lọc để phát hiện sớm người mắc BCTPĐ là yêu cầu cấp thiết, góp phần giảm gánh nặng kinh tế - xã hội, nâng cao khả năng quản lý và chăm sóc sức khỏe cho người dân.

Trong những năm gần đây, xét nghiệm di truyền các bệnh lý tim mạch ngày càng phát triển, giúp xác định các đột biến gây bệnh và đối tượng có nguy cơ mắc BCTPĐ trong gia đình có người mắc BCTPĐ. Xét nghiệm di truyền áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, giúp xác định kiểu gen của bất cứ gen nào trong hệ gen người, đặc

biệt phù hợp với những bệnh lý ảnh hưởng bởi nhiều đột biến thuộc các gen khác nhau như BCTPD. Đây được xác định là bệnh di truyền theo kiểu gen trội trên nhiễm sắc thể thường (Sen-ChowdhryS., 2016). Trong đó, một đột biến duy nhất thường đủ để gây bệnh và người mang gen gây bệnh có 50% nguy cơ truyền đột biến này cho con.

Suốt thập kỷ qua, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xác định các gen gây BCTPD. Kết quả cho thấy BCTPD phần lớn liên quan tới đột biến trên các gen mã hóa cho protein của các đốt cơ (sarcomere) trên sợi cơ tim hoặc đĩa Z. Nghiên cứu của Ingles J và cộng sự (2019) đã phát hiện được 12 gen như vậy với độ thâm nhập và biểu hiện gen khác nhau. Trong đó, đến 83% trường hợp bệnh nhân BCTPD mang các biến thể gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh liên quan đến đột biến gen *MYH7* mã hóa chuỗi nặng beta-myosin và gen *MYBPC3* mã hóa cho protein C liên kết với myosin (Alfares A. A., 2015). Tuy nhiên, khoảng 40% bệnh nhân vẫn chưa xác định được nguyên nhân di truyền gây bệnh (MarianA. J., 2017).

Gen *MYBPC3* mã hóa cho protein C liên kết với myosin ở cơ tim được xác định là nguyên nhân di truyền phổ biến nhất gây BCTPD khi chiếm khoảng 50% các đột biến gây bệnh (Alfares A. A., 2015). *MYBPC3* được chứng minh liên quan đến việc khởi phát muộn và ít phì đại hơn, có độ thâm nhập thấp hơn và tiên lượng tốt hơn đột biến gen *MYH7* mã hóa cho chuỗi nặng beta-myosin (P. Charron, 1998; Konno T., 2003; Niimura H., 2002). Khoảng một phần ba các đột biến *MYBPC3* gây thay thế đơn axit amin, khoảng một phần ba các đột biến gây lệch khung đọc mở và các đột biến làm làm xuất hiện bộ ba mã hóa kết thúc sớm hoặc ảnh hưởng đến quá trình cắt nối intron.

Đa hình rs36211723 xảy ra ở nucleotit cuối cùng trong exon 24 gen *MYBPC3*. Đây là đột biến thay thế nucleotide G thành A (c.2308G>A) tại vị trí 2308 tính từ đầu 5' của gen *MYBPC3*, dẫn đến thay thế Asp thành Asn ở codon 770. Đột biến thay A bằng G của gen *MYBPC3* đã được chứng minh có liên quan với việc nguy cơ mắc BCTPD.

Tài liệu Helms A.S., et al. (2004). "Sarcomere mutation-specific expression patterns in human hypertrophic cardiomyopathy", *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(4):434-443, đã đề cập đến đột biến c.2308G>A làm thay đổi quá trình cắt nối

intron, tạo ra dạng protein bị cắt ngắn, làm thiếu vị trí liên kết giữa myosin và titin, gây ảnh hưởng rõ rệt đến kiểu hình bệnh.

Tài liệu Carmen S.C. et al. (2020). “Protein haploinsufficiency drivers identify MYBPC3 mutations that cause hypertrophic cardiomyopathy”, medRxiv. 2020:2020.05.04.20087726., đề cập đến đa hình c.2308G>A (rs36211723) của gen *MYBPC3* có liên quan mạnh mẽ đến khả năng gây BCTPĐ, thông tin di truyền về đa hình này có thể cải thiện việc quản lý lâm sàng cho bệnh nhân mắc BCTPĐ và gia đình họ.

Chính vì vậy, quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* sẽ cung cấp các thông tin di truyền, làm cơ sở cho việc đánh giá khả năng mắc BCTPĐ.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*. Quy trình cho phép sàng lọc các bệnh nhân có khả năng mắc bệnh cơ tim phì đại do gen *MYBPC3*. Quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein c liên kết với myosin ở cơ tim (*MYBPC3*) theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

Bước 1) thu ADN tổng số bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu toàn phần, sau đó điện di trên gel agarosa nồng độ 1,2% pha trong đệm TAE và đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm và 280nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số với nồng độ nằm trong khoảng từ 17,7 µg/ml đến 34,3 µg/ml;

Bước 2) chuẩn bị phản ứng PCR với thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 17,7 µg/ml đến 34,3 µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2 mM; HF buffer 10X với nồng độ 1X; mỗi xuôi 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3mM; mỗi ngược 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3mM; Phusion ADN polymeraza 5 u/µl với nồng độ 0,03 u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl;

Bước 3) nhân đoạn gen *MYBPC3* mong muốn bằng cách thực hiện phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30

giây, 60,5 °C trong 45 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút;

Bước 4) thu sản phẩm phản ứng PCR bằng cách điện di trên gel agarosa 1,5% trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 100V trong 30 phút thu được băng kích thước 497 bp chứa vùng đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*; và

Bước 5) xác định tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* bằng cách tinh sạch 20µl sản phẩm PCR kích thước 497 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh điện di ADN tổng số trên gel agarosa 1,2%. M: thang chuẩn 1kb ADN. Từ 01 đến 04: ADN tổng số của 4 người tham gia nghiên cứu.

Hình 2 là ảnh điện di sản phẩm PCR nhân vùng chứa rs36211723 trên gel agarosa 1,5%. (-): Đối chứng âm. M: thang chuẩn Ruler 100 bp Plus ADN. Từ 01 đến 04: sản phẩm PCR tương ứng với bệnh nhân mã 1, 2, 3 và 4.

Hình 3: Kết quả giải trình tự vị trí đa hình rs36211723 của mẫu 1 (hình A) với kiểu gen GA, mẫu 2 (hình B) với kiểu gen GG.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết với những phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể. Các phương án và các ví dụ này được đưa ra nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Mẫu để phân tích được sử dụng là mẫu máu của đối tượng cần xác định kiểu gen của đa hình rs36211723 trên *MYBPC3*. Mẫu này thường bao gồm từ 300 µl đến 1,5 ml máu lấy từ tĩnh mạch vào ống đựng mẫu chứa EDTA chống đông. Mẫu được kiểm soát và bảo quản ở -20°C cho đến khi được sử dụng để phân tích theo quy chuẩn mẫu phân tích áp dụng ở các cơ sở y tế.

Các hóa chất được sử dụng là các loại hóa chất có thể mua hoặc đặt tổng hợp từ các công ty chuyên cung cấp sinh phẩm, ví dụ, các cặp môi có thể được thiết kế và được đặt tổng hợp bởi IDT- Hoa Kỳ. Các hóa chất chuyên dụng sử dụng cho PCR hoặc các kit được sử dụng để tinh sạch ADN có thể mua được trên thị trường, ví dụ từ

các nhà cung cấp Fermentas, Thermo Scientific, Affymetrix, Omega Bio-tex, Merk hoặc Omega-Biotek.

Quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein C liên kết myosin (*MYBPC3*) bao gồm các bước: 1) thu ADN tổng số; 2) chuẩn bị phản ứng PCR; 3) nhân đoạn gen *MYBPC3* mong muốn; 4) thu sản phẩm phản ứng PCR; và 5) xác định tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*.

Trong bước thu ADN tổng số, mẫu phân tích, cụ thể là mẫu máu của các đối tượng tham gia nghiên cứu được tách chiết theo quy trình chuẩn. Các quy trình xử lý mẫu, tách chiết ADN được thực hiện theo quy trình chuẩn hoặc bằng kit tách ADN thương mại theo hướng dẫn của nhà cung cấp, ví dụ kit E.Z.N.A blood DNA Mini Kit.

ADN sau khi chiết được điện di trên gel agarosa nồng độ 1,2% và pha trong đệm TAE. Nồng độ ADN thu được sau khi điện di được đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm và 280nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số. Các mẫu có chất lượng tốt sẽ cho băng điện di sáng và có một băng duy nhất. Nồng độ ADN tổng số được sử dụng làm mẫu với nồng độ nằm trong khoảng từ 17,7 µg/ml đến 34,3 µg/ml. Theo các phương án thay thế, ADN tinh sạch có thể được định lượng bằng các thiết bị chuyên dụng, ví dụ thiết bị Eppendorf Bio Photometer Plus.

Trong bước chuẩn bị phản ứng PCR, tiến hành chuẩn bị các thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 17,7 µg/ml đến 34,3 µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2 mM; HF buffer 10X với nồng độ 1X. Mỗi xuôi 10µM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3µM. Mỗi ngược 10µM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3µM. Phusion ADN polymeraza 5 u/µl với nồng độ 0,03 u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl.

Để nhân đặc hiệu đoạn gen chứa đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*, cặp mồi đặc hiệu được thiết kế có trình tự sau:

mồi xuôi: 5'-CTGACTTGGATCTCACCC-3' (SEQ ID NO.1)

mồi ngược: 5'-ACCATCTTCTCAGCCTCC-3' (SEQ ID NO.2)

để nhân đoạn gen có kích thước 497bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 với vị trí đa hình cần kiểm tra ở vị trí nucleotit 197, tương ứng rs36211723 của gen *MYBPC3*. Đoạn mồi đặc hiệu được thiết kế đặc hiệu cho vị trí rs36211723 của gen *MYBPC3*.

Trong bước nhân đoạn gen *MYBPC3* mong muốn, tiến hành phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 60,5 °C trong 45 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút.

Trong bước thu sản phẩm phản ứng PCR, tiến hành điện di trên gel agarosa 1,5% trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 100V trong 30 phút thu được băng kích thước 497 bp chứa vùng đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*. Đoạn gen được nhân có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.

Trong bước xác định tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*, tiến hành tinh sạch 20 µl sản phẩm PCR kích thước 497 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* này. Quá trình này được xác định dựa vào các ảnh thu được của quá trình giải trình tự, từ đó xác định được đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*.

Tùy vào kết quả thu được, có thể xác định được tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* tại vị trí nucleotit 197, các đa hình có thể thuộc các trường hợp đồng hợp kiểu đại GG, dị hợp GA hoặc , đồng hợp đột biến AA.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân tích tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* trên mẫu bệnh phẩm

Để phân tích tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* trên các mẫu nghiên cứu, tiến hành phân tích mẫu máu của 4 đối tượng tham gia nghiên cứu là gia đình một bệnh nhân mắc bệnh cơ tim phì đại được chẩn đoán bởi Viện Tim Mạch, Bệnh viện Bạch Mai. Mẫu máu phân tích có thể tích từ 1 đến 2 ml được giữ trong ống chuyên dụng chứa chất chống đông là EDTA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho các phân tích gen.

Từng mẫu máu được tan đông ở nhiệt độ phòng, tiếp đó chuyển 250 µl mẫu vào ống ly tâm vô trùng rồi thêm 25 µl dung dịch proteaza OB và 250 µl đệm BL. Trộn đều trong 10 giây và ủ 65°C trong 5 phút, tiếp đó trộn đều trong 15 giây và ủ 65°C trong 5 phút. Bổ sung 260 µl etanol 100% và trộn đều trong 20 giây rồi ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 15 giây để đảm bảo mẫu không dính trên thành và nắp ống.

Chèn HiBind ADN Mini Column vào ống Collection Tube 2ml (E.Z.N.A blood DNA Mini kit) rồi chuyển toàn bộ mẫu vào cột (để pipet ở mức 790 µl). Ly tâm

14.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch lọc và ống Collection Tube. Lắp HiBind ADN Mini Column vào Collection Tube 2ml mới rồi thêm 500 µl đệm HBC. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch lọc và sử dụng lại Collection Tube. Thêm 700 µl đệm rửa ADN rồi ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch lọc và sử dụng lại Collection Tube, lặp lại các bước rửa lần 2 với đệm rửa ADN. Ly tâm HiBind ADN Mini Column 14.000 vòng/phút trong 2 phút để làm khô cột. Chuyển HiBind ADN Mini Column vào ống ly tâm 2ml mới rồi bổ sung 100 µl dung dịch Elution Buffer (đã được làm ấm đến 65°C). Ủ ở 65°C trong 5 phút. Ly tâm tại 14.000 vòng/phút trong 1 phút. Thêm 50 µl Elution Buffer trong 5 phút ở nhiệt độ phòng rồi ly tâm tại 14.000 vòng/phút trong 1 phút. Sau đó, thu và bảo quản ADN ở -20°C.

Sản phẩm ADN thu được được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di: Nồng độ agarosa sử dụng: 1,2% (1,2 g agarosa pha trong 100 ml đệm TAE 1X). Điện di trên đệm TAE 1X, hiệu điện thế 100V trong 60 phút. Thể tích mẫu điện di: 4 µl mẫu + 1µl ADN dye 6X; 4 µl Lambda ADN/HindIII Marker. ADN thu được từ quá trình tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa nồng độ 1,2% pha trong đệm TAE và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 260 nm (OD_{260}), bước sóng 280 nm (OD_{280}) để xác định độ tinh sạch và nồng độ ADN. Kết quả điện di ADN tổng số của 4 mẫu nghiên cứu được đánh số từ 01 đến 04 được thể hiện trên Hình 1.

Các mẫu ADN tổng số thu được ở trên được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Mỗi mẫu ADN tổng số này được tiến hành các phản ứng PCR riêng có thành phần bao gồm: ADN khuôn có nồng độ 17,7 µg/ml – 34,3 µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2 mM; đệm HF buffer 10X với nồng độ 1X; mỗi xuôi 10µM với nồng độ 0,3µM; mỗi ngược 10µM với nồng độ 0,3µM; Phusion ADN polymeraza 5 u/µl với nồng độ 0,03 u/µl và thêm nước khử ion đến thể tích cuối cùng là 25 µl. Trong đó, cặp mồi đặc hiệu được thiết kế có trình tự như sau:

mỗi xuôi: 5'-CTGACTTGGATCTCACCC-3' (SEQ ID NO.1)

mỗi ngược: 5'-ACCATCTTCTCAGCCTCC-3' (SEQ ID NO.2)

Chu trình PCR được tiến hành như sau: Biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95°C trong 30 giây, 60,5°C trong 45 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc: 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR thu được có thể được bảo quản ở -20°C hoặc được tinh sạch và giải trình tự.

Sản phẩm ADN thu được được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di. Sản phẩm PCR nhân vùng chứa rs36211723 của gen *MYBPC3* khi điện di cho băng 497 bp như được thể hiện trên Hình 2.

Lấy 20 µl sản phẩm PCR của mỗi băng đặc hiệu và sáng nét được gửi đi tinh sạch và giải trình tự 2 chiều tại hãng First Base (Malaysia). Kết quả giải trình tự được mở bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, dựa vào các pic thu được để xác định các đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*. Kết quả được thể hiện trên Hình 3. Bệnh nhân BCTPĐ và bố của bệnh nhân đều có kiểu gen dị hợp GA, mẹ và chị gái bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp kiểu dại GG.

Kết hợp với kết quả phân tích lâm sàng với 02 người kiểu gen dị hợp GA, một người có biểu hiện BCTPĐ từ nhỏ và một người có biểu hiện BCTPĐ chưa rõ nhưng cần được theo dõi sự phát triển của bệnh lý này định kì.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã xác định được các đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* với các kiểu gen GA, GG hoặc AA. Kết quả xác định tính đa hình này được xem là một tiền đề để sàng lọc các bệnh nhân có nguy cơ mắc BCTPĐ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein C liên kết với myosin ở cơ tim (*MYBPC3*), trong đó quy trình bao gồm các bước:

Bước 1) thu ADN tổng số bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu toàn phần theo quy trình chuẩn, sau đó điện di trên gel agarosa nồng độ 1,2% pha trong đệm TAE và đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm và 280nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số với nồng độ nằm trong khoảng từ 17,7µg/ml đến 34,3 µg/ml;

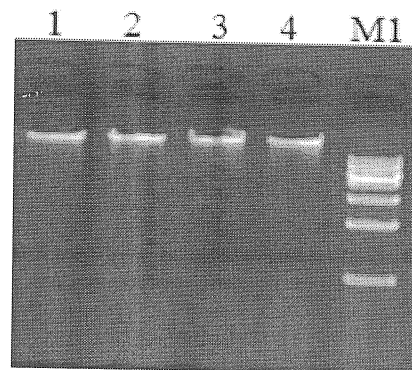
Bước 2) chuẩn bị phản ứng PCR với thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 17,7µg/ml đến 34,3 µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2 mM; HF buffer 10X với nồng độ 1X; mỗi xuôi 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3mM; mỗi ngược 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3mM; Phusion ADN polymeraza 5 u/µl với nồng độ 0,03 u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl;

Bước 3) nhân đoạn gen *MYBPC3* mong muốn bằng cách thực hiện phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 60,5 °C trong 45 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút;

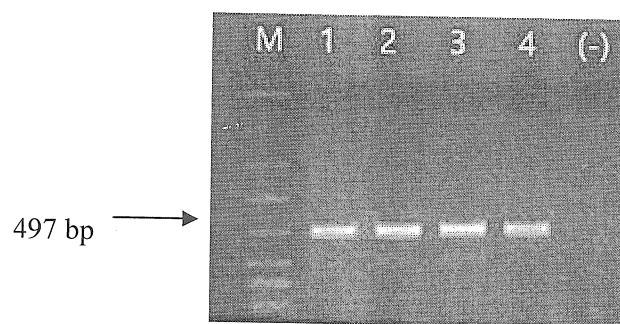
Bước 4) thu sản phẩm phản ứng PCR bằng cách điện di trên gel agarosa 1,5% trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 100V trong 30 phút thu được băng kích thước 497 bp chứa vùng đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3*; và

Bước 5) xác định tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* bằng cách tinh sạch 20µl sản phẩm PCR kích thước 497 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs36211723 của gen *MYBPC3* này.

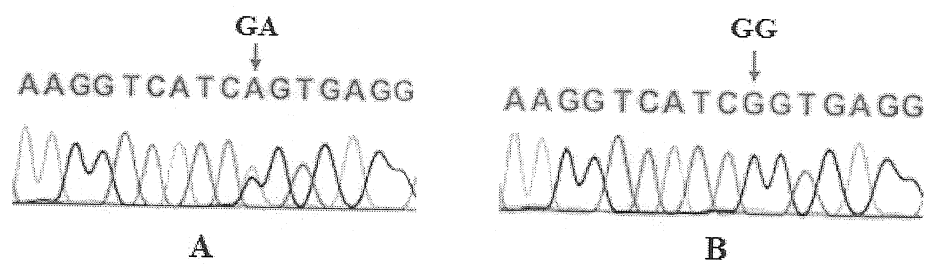
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội (ĐHQGHN)
- <120> Quy trình phân tích đa hình rs36211723 của gen mã hóa protein C liên kết với myosin ở cơ tim (MYBPC3)
- <130>
- <160> 3
- <170>
- <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 1
- CTGACTTGGATCTCACCC
- <210> 2
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 2
- ACCATCTTCTCAGCCTCC
- <210> 3
- <211> 497
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 3
- ctgacttggg tctcacccca actctgcacc cccccagctg ctgtgtgaga ccgagggccg 60
- gggtccgcgtg gagaccacca aggaccgcag catcttcacg gtcgaggggg cagagaagga 120
- agatgagggc gtctacacgg tcacagtga gaacctgtg ggcgaggacc aggtcaacct 180
- cacagtcaag gtcacgtgtg aggccggccg gggccaagc tggagaacac agagggggcag 240
- ccccaaaggag ggcccatccg ttgcgtcatt cagccactcg acaaacatca cgggcatgct 300
- ccctgagccg agcggcaaca ggacaggttt ttctgccc aaaggagcccc gctctggggg 360

agatggaggc agatgcatcc agcagatttc ctgcgacact gctgtacatg agccatgtcc 420
agagtgccgt gggagcactg agcagagagc catccctgtg cctgggggtg atgcctttag 480
gaggctgaga agatggt 497