

vệ nhẹ trong mô hình viêm gan gây ra bởi liều cao đơn độc CCl₄. Việc bảo vệ thể hiện qua giảm lượng MDA, tăng nhẹ GSH và giảm phần trăm hoại tử ở gan.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh (DOST HCMC) cho PGS.TS.Lê Minh Trí, tại Quyết định số 1055/QĐ-SKHCN và Hợp đồng số 52/2021/HĐ-QKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ Y Tế** (2015), "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc tử dược liệu", Quyết định số 141.
2. **Brunt E. M.** (2000), "Grading and staging the

- histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond", *Hepatology*. **31** (1), pp. 241-246.
3. **Draper H. et al.** (1993), "A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials", *Free Radical Biology Medicine*. **15** (4), pp. 353-363.
 4. **Rahman I. et al.** (2006), "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method", *Nature protocols*. **1** (6), pp. 3159-3165.
 5. **Scholten D. et al.** (2015), "The carbon tetrachloride model in mice", *Laboratory animals*. **49** (1_suppl), pp. 4-11.
 6. **Zhu R. et al.** (2013), "Oroxylin A accelerates liver regeneration in CCl₄-induced acute liver injury mice", *PLoS one*. **8** (8), pp. e71612.

THIẾT KẾ MỒI XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *SLC22A5* GÂY BỆNH THIẾU HỤT CARNITIN

Nguyễn Thị Phương Thúy¹, Nguyễn Thị Thảo Vi², Tạ Văn Thọ¹,
Trịnh Thị Phương Dung¹, Bùi Thị Bảo³

TÓM TẮT

Bệnh lý thiếu hụt carnitin nguyên phát (CDSP) gây ra bởi một đột biến lặn trên gen *SLC22A5* mã hóa cho protein vận chuyển carnitin (OCTN2) trong huyết thanh và được đặc trưng bởi triệu chứng hạ đường huyết giảm lượng ketone máu (hypoketotic hypoglycemia), bệnh lý về xương và nhược cơ tim có thể dẫn tới tử vong nếu không được điều trị kịp thời [1,2]. Bệnh nhân mắc bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát thường đáp ứng tốt với việc bổ sung L-Carnitin đường uống và cải thiện đáng kể các triệu chứng lâm sàng của họ [3]. Do đó, chẩn đoán sớm và can thiệp kịp thời có ý nghĩa rất quan trọng với bệnh nhân thiếu hụt carnitin nguyên phát. Xét nghiệm phân tích gen *SLC22A5* mã hóa protein vận chuyển carnitin có giá trị chẩn đoán xác định bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát bởi kỹ thuật này xác định được chính xác các đột biến trên gen *SLC22A5* ảnh hưởng trực tiếp tới việc tổng hợp protein vận chuyển carnitin. Ở Việt Nam hiện nay để xác định đột biến gen *SLC22A5* chủ yếu sử dụng các bộ mồi được tham khảo từ nghiên cứu trước đây trên thế giới tuy nhiên vẫn gặp phải sự không đặc hiệu về mồi dẫn đến khó xác định được đột biến. Nghiên cứu này tập trung vào thiết kế và tối ưu hóa bộ mồi đặc hiệu trong xác định đột biến gen *SLC22A5* gây

bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát ở người Việt Nam.

Từ khóa: Thiếu hụt carnitin nguyên phát (CDSP); đột biến gen *SLC22A5*; OCTN2; β-oxi hóa của axit béo; mồi PCR

SUMMARY

PREPARING PRIMERS FOR IDENTIFYING THE *SLC22A5* GENE MUTATION IN PRIMARY CARNITIN DEFICIENCY

Primary systemic carnitine deficiency (PSCD) is caused by defects in OCTN2 function as a result of mutations in the *SLC22A5* gene. Systemic primary carnitine deficiency (CDSP) presents episodic periods of hypoketotic hypoglycemia. The main symptoms of CDSP are episodic periods of hypoketotic hypoglycemia, skeletal and cardiac myopathy [1]. The disease brings serious complications including death if not treated promptly. Patients with primary carnitine deficiency often respond well to oral L-carnitine supplementation and significantly improve their clinical symptoms [3]. Therefore, early diagnosis and timely intervention are very important for patients with primary carnitine deficiency. The analysis of the carnitin-encoding gene *SLC22A5* has diagnostic value in determining primary carnitine deficiency because this technique accurately identifies mutations in the *SLC22A5* gene that directly affect carnitin protein synthesis. In Vietnam, currently, to identify the *SLC22A5* gene mutation, mainly using primer sets referenced from previous studies in the world, but still encountering non-specificity about primers, making it difficult to identify mutations. This study focuses on the design and optimization of specific primers in identifying the *SLC22A5* gene mutation causing primary carnitine deficiency in Vietnamese.

¹Trường đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Xanh Pôn

³Phòng khám chuyên khoa xét nghiệm Chemedic Việt Nam

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Phương Thúy

Email: nguyenphuongthuy.1508@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.10.2022

Ngày duyệt bài: 28.10.2022

Keywords: Primary systemic carnitine deficiency; PSCD; SLC22A5; OCTN2; fatty acid oxidation; PCR primer.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Carnitin là một thành phần quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng của cơ thể. Carnitin giúp cơ thể vận chuyển chất béo chuỗi dài vào ty thể, tại đây chất béo được oxi hóa và tạo ra năng lượng [1]. Bệnh lý thiếu hụt carnitin nguyên phát (CDSP) gây ra bởi một đột biến lặn trên gen SLC22A5 mã hóa cho protein vận chuyển carnitin trong huyết thanh và được đặc trưng bởi triệu chứng hạ đường huyết giảm lượng ketone máu (hypoketotic hypoglycemia), bệnh lý về xương và nhược cơ tim. [2] Bệnh mang đến những biến chứng nghiêm trọng bao gồm cả tử vong nếu không được điều trị kịp thời [1,2]. Tuy nhiên, bệnh nhân mắc bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát thường đáp ứng tốt với việc bổ sung L-Carnitin đường uống và cải thiện đáng kể các triệu chứng lâm sàng của họ [3]. Do đó, chẩn đoán sớm và can thiệp kịp thời có ý nghĩa rất quan trọng với bệnh nhân thiếu hụt carnitin nguyên phát. Để phát hiện tình trạng thiếu hụt carnitin các xét nghiệm thường được chỉ định là: định lượng nồng độ carnitin tự do trong huyết tương, xây dựng cây phả hệ theo dõi di truyền của bệnh, đánh giá sự vận chuyển carnitin fibroblast, phân tích gen mã hóa protein vận chuyển carnitin... Trong đó xét nghiệm phân tích gen SLC22A5 mã hóa protein vận chuyển carnitin có giá trị chẩn đoán xác định bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát bởi kỹ thuật này xác định được chính xác các đột biến trên gen SLC22A5

ảnh hưởng trực tiếp tới việc tổng hợp protein carnitin. Ở Việt Nam hiện nay để xác định đột biến gen SLC22A5 chủ yếu sử dụng các bộ mồi được tham khảo từ nghiên cứu trước đây trên thế giới tuy nhiên vẫn gặp phải sự không đặc hiệu về mồi dẫn đến khó xác định được đột biến. Do vậy, nghiên cứu này tập trung vào thiết kế và tối ưu hóa bộ mồi đặc hiệu trong xác định đột biến gen SLC22A5 gây bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát ở người Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm tại Phòng khám chuyên khoa xét nghiệm Chemedic Việt Nam trên các mẫu DNA được tách từ mẫu máu gót chân trên giấy thấm khô của trẻ sơ sinh (gửi tới làm xét nghiệm sàng lọc sơ sinh).
- Sử dụng phần mềm Ugene để thiết kế bộ mồi đặc hiệu cho từng exon của gen SLC22A5.
- Tối ưu hóa các điều kiện cho PCR xác định đột biến gen SLC22A5 khi sử dụng các cặp mồi đã được thiết kế ở trên bao gồm: khảo sát nhiệt độ gắn mồi, nồng độ mồi và số chu kỳ nhiệt trong PCR. Quá trình tối ưu hóa 3 điều kiện trên được tiến hành lần lượt để đảm bảo mỗi lần khảo sát chỉ đánh giá 1 tiêu chí với nhiều mức khác nhau để chọn ra được mức tối ưu khi tham gia PCR cho mỗi tiêu chí.
- Xác định tính đặc hiệu của mồi đã thiết kế được ở trên qua phân tích gen SLC22A5 bằng quy trình PCR đã được tối ưu hóa và giải trình tự gen theo phương pháp Sanger sau đó đối chiếu kết quả với trình tự gen SLC22A5 trong ngân hàng gen.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Các bộ mồi cho phản ứng PCR phân tích gen SLC22A5

Exon	Vị trí	Mồi	Trình tự	KT sản phẩm	%GC	T _m
1	7...662 (656)	Forward	GGACTACGACGAGGTGA	361	58.8	57.31
		Reverse	GTCCTGACTGAACTCCC	361	58.8	57.52
2	8675...8778 (104)	Forward	ATGATACACCCCTTTGCTC	157	50	58.68
		Reverse	CAGTGCTGAGGTCCCCTGGT	157	65	58.97
3	14444...14598 (155)	Forward	GCTGGTTATCTGTCACTCTCCTT	250	47.83	58.94
		Reverse	ACAGTTGTCTCCAGAAAGGT	250	45	59.17
4	15625...15796 (172)	Forward	GCTAACTCGACCTCCCTTGTT	257	52.38	59.77
		Reverse	TGTTGCTGCCCTCTAGTGAA	257	50	59.09
5	19218...19318 (101)	Forward	GACCACCTCTTCTCCCATACA	371	50	60.36
		Reverse	ATCCCCACAAGAGTCCATA	371	45	62.76
6	20987...21201 (215)	Forward	AGCTGGTTATCTGTCACTCTCCTT	248	46	59.85
		Reverse	GTTGTCTCCAGAAAGGTAGG	248	50	59.14
7	22730...22912 (183)	Forward	TCCTACCCTCTTTCTTTGCT	231	47.62	59.36
		Reverse	TCCGTTGCTCTAGTGTGCC	231	60	59.55
8	23973...24108 (136)	Forward	AGGCTCCGTCTGCTTTG	244	58.82	57.52
		Reverse	GTGCTGTGAGAGGGAGTTTG	244	52.38	56.89

9	24482..25909 (1426)	Forward	TCTTGTTTGTGGAGACTGG	266	42.86	50.45
		Reverse	AGTTTCTCCCTTACTGGAAG	266	45	49.73

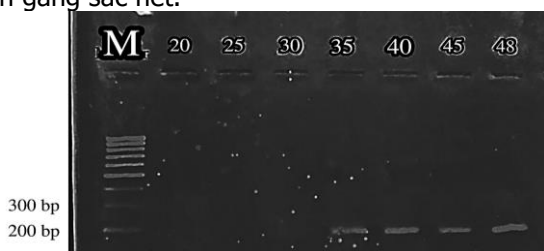
Dùng phần mềm Ugene và trình tự gen SLC22A5 đã được công bố trong ngân hàng gen thiết kế được 9 bộ mỗi đặc hiệu cho toàn bộ các exon trên gen SLC22A5 với các thông số kỹ thuật như bảng trên. Sử dụng các thông số kỹ thuật đó để đặt các công ty sinh phẩm sản xuất 9 cặp

mồi để sử dụng trong phân tích xác định đột biến gen SLC22A5 gây bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát. Tiến hành ưu hóa các điều kiện cho PCR xác định đột biến gen SLC22A5 khi sử dụng các cặp mồi đã được thiết kế ở trên thu được kết quả như sau:



Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại exon 2 trên gen SLC22A5 ở các nồng độ môi khác nhau

- Ở tất cả các nồng độ môi của exon 2 (trừ nồng độ 0.01 và 0.25 $\mu\text{mol/L}$), sản phẩm PCR thu được có kích thước đúng với thiết kế (157 bp). Ở nồng độ 0.01 và 0.25 $\mu\text{mol/L}$ vạch DNA thu được rất mờ nên không đánh giá kích thước.
- Ở khoảng nồng độ môi từ 0.01 $\mu\text{mol/L}$ đến 0.075 $\mu\text{mol/L}$ hiệu quả khuếch đại exon 2 của gen SLCA5 đạt hiệu quả chưa cao (các băng DNA sản phẩm rất mờ)
- Ở khoảng nồng độ môi từ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ đến 0.75 $\mu\text{mol/L}$ hiệu quả khuếch đại exon 2 của gen SLCA5 đạt hiệu quả cao (các băng DNA sản phẩm rõ nét, đậm độ sáng cao)
- Ở khoảng nồng độ môi từ 1 $\mu\text{mol/L}$ đến 1.5 $\mu\text{mol/L}$ hiệu quả khuếch đại exon 2 của gen SLCA5 đạt hiệu quả cao (các băng DNA sản phẩm có đậm độ sáng cao) tuy nhiên với nồng độ môi cao có thể gây hiện tượng thừa DNA môi nên trên hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các môi này xuất hiện các vạch sáng nhòe không gọn gàng sắc nét.



Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại exon 2 trên gen SLC22A5 với các chu kỳ nhân lên khác nhau

- PCR với số chu kỳ nhân lên trong khoảng từ 20 đến 30 chu kỳ chưa thu được sản phẩm

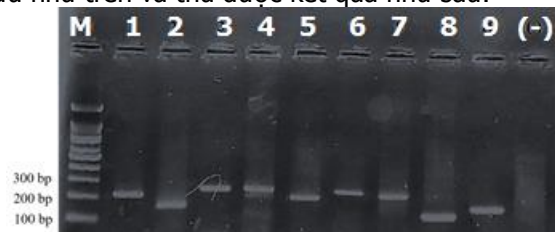
- (không thấy bằng sáng DNA trên bản gel điện di).
- PCR với số chu kỳ nhân lên trong khoảng từ 35 đến 48 chu kỳ mới xuất hiện bằng DNA trên bản gel điện di với kích thước đúng như thiết kế (157bp)



Hình 3. Kết quả PCR khuếch đại exon 2 trên gen SLC22A5 ở các nhiệt độ gần môi khác nhau

- Khoảng nhiệt độ gần môi thành công cho PCR khuếch đại exon 2 có khoảng nhiệt từ 50°C đến 60°C: các băng DNA sáng sắc nét, gọn và đúng kích thước.
- Từ khoảng nhiệt 62°C đến 65°C kết quả PCR cho vạch mờ hơn nhưng vẫn đúng kích thước

Tiến hành chạy PCR phân tích gen SLC22A5 trên cả 9 cặp mồi sử dụng các điều kiện được tối ưu như trên và thu được kết quả như sau:



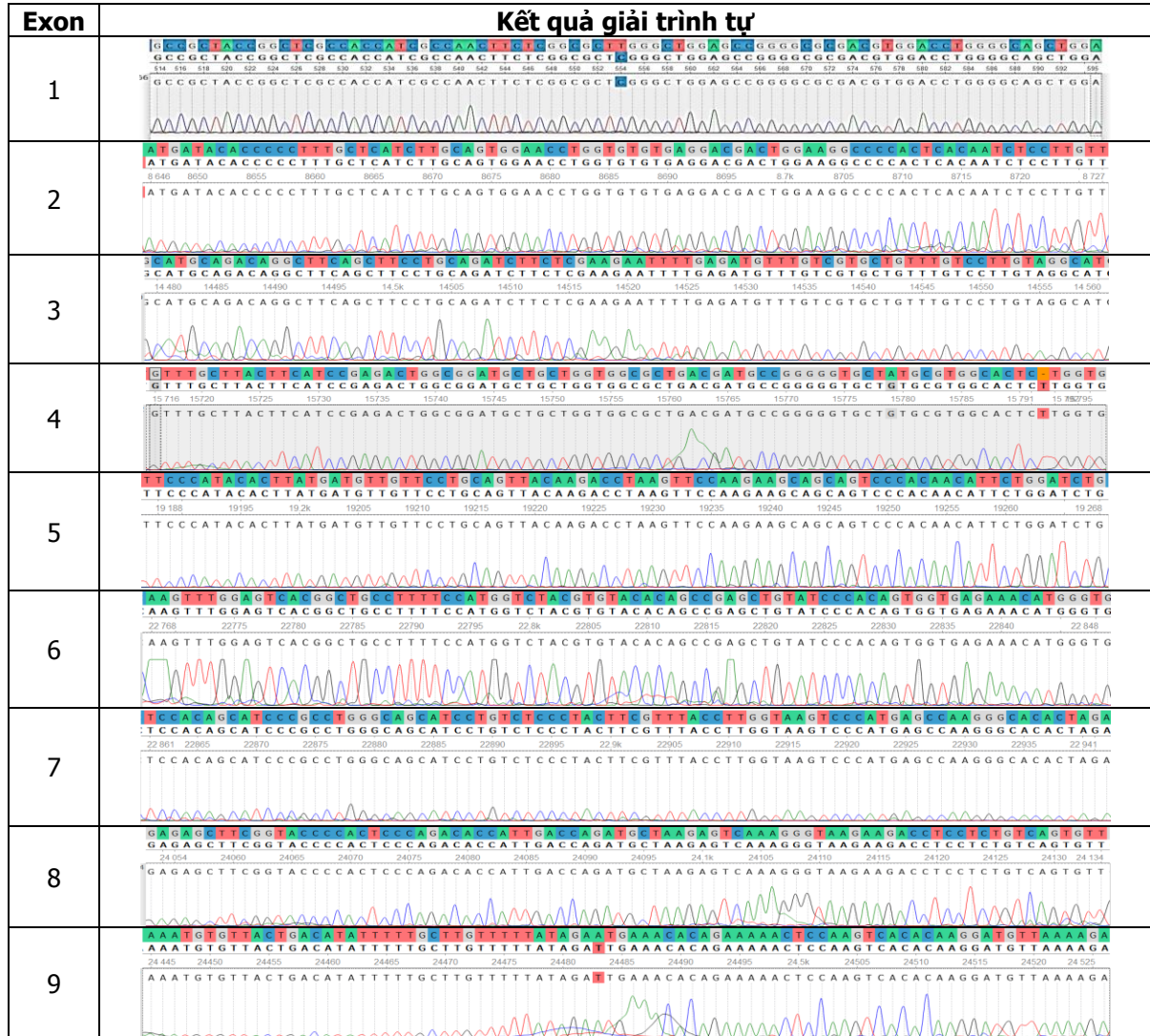
Hình 4. Kết quả PCR khuếch đại 9 exon

trên gen SLC22A5 ở nồng độ mỗi 0.5 $\mu\text{mol/L}$, nhiệt độ gần mỗi 50°C với 40 chu kỳ nhân lên

- Ở vị trí 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 là kết quả điện di các đoạn gen được khuếch đại từ các mẫu tương ứng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Tại các vị trí

này đều xuất hiện các băng sáng gọn và rõ nét có kích thước phù hợp mỗi đã thiết kế.

Với các mẫu PCR thành công (xuất hiện băng sáng trên bản gel) sẽ được thu hồi, tinh sạch và tiến hành giải trình tự gen theo phương pháp Sanger, kết quả thu được như sau:



Hình 5. Kết quả giải trình tự exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 trên gen SLC22A5

- Kết quả giải trình tự gen hoàn toàn phù hợp với trình tự của gen SLC22A5.
- Các peak rõ ràng, sản phẩm khuếch đại sau PCR đã đạt yêu cầu về số lượng và chất lượng, độ tinh sạch tương đối tốt.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này sử dụng phần mềm Ugene và trình tự gen SLC22A5 đã được công bố trong ngân hàng gen để thiết kế được 9 cặp mồi sử dụng trong PCR phân tích các exon trên gen SLC22A5. Năm 2010, trong nghiên cứu khảo sát gen SLC22A5 trên chủng tộc người Trung Quốc

và người Ấn Độ sinh sống tại Singapore, tác giả Edmund Jon Deoon LEE & CS đã sử dụng 11 cặp mồi [5]. Năm 2012, tác giả Hyung-Doo Park & CS cũng sử dụng 11 cặp mồi xác định đột biến trên gen SLC22A5 để chẩn đoán xác định bệnh nhân thiếu hụt carnitin nguyên phát – ca bệnh đầu tiên của bệnh lý này được chẩn đoán bằng

xét nghiệm gen tại Hàn Quốc [6]. Năm 2017, tác giả Nicola Longo & CS đã sử dụng 10 cặp mỗi trong nghiên cứu cấu trúc và chức năng của gen SLC22A5 [7]. Sự khác biệt về số lượng cặp mỗi trong các nghiên cứu trên vẫn đảm bảo khảo sát trên toàn bộ gen SLC22A5 nên sự khác biệt này không có ý nghĩa.

Trong nghiên cứu này đã thiết kế 9 cặp mỗi khuếch đại thành công 9 exon trên gen SLC22A5. Cụ thể, các đoạn exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 được khuếch đại đều có kích thước đúng với thiết kế ban đầu (Hình 4). Đồng thời, kết quả giải trình tự gen của các exon này hoàn toàn trùng khớp với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gen (Hình 5). Như vậy nghiên cứu này đã thiết kế thành công 9 cặp mỗi đặc hiệu (số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) ứng dụng trong xác định đột biến trên gen SLC22A5 gây bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát với quy trình PCR đã được tối ưu hóa.

V. KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công các cặp mỗi số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 đặc hiệu với gen SLC22A5 và hoàn toàn có thể sử dụng trong việc xác định các đột biến gen SLC22A5 gây bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát với quy trình PCR như sau: Nồng độ mỗi tối ưu trong khoảng: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ đến 0.75 $\mu\text{mol/L}$; Số chu kỳ nhân lên tối ưu

trong khoảng: 35 – 48 (chu kỳ); Nhiệt độ gắn mỗi tối ưu trong khoảng: 50°C – 60°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Rebouche CJ.** Carnitin. In: Modern Nutrition in Health and Disease, 9th Edition (edited by Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross, AC). Lippincott Williams and Wilkins, New York, 1999, pp. 505-12.
2. **Primary carnitin deficiency.** Genetics Home Reference. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Library of Medicine, Lister Hill National Center for Biomedical Communications; 2016. Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/primary-carnitin-deficiency>. Accessed December 8, 2016.
3. **Systemic primary carnitin deficiency:** an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management, 18/09/2012
4. **Dorothy Su Lin, Jie Yin, Seok Hwee, Michael Murray and Edmund Jon,** "Genetic Variations of the SLC22A5 Gen in the Chinese and Indian Populations of Singapore", 2010, p112-118
5. **Young Ahn Yoon, Dong Hwan Lee, Chang-Seok Ki, Soo-Youn Lee, Jong-Won Kim, Yong-Wha Lee, and Hyung-Doo Park,** "SLC22A5 Mutations in a Patient with Systemic Primary Carnitine Deficiency: The First Korean Case Confirmed by Biochemical and Molecular Investigation", 2012, p424-427
6. **Marta Frigeni, Bijina Balakrishnan, Xue Yin, Fernanda R.O. Calderon, Rong Mao, Marzia Pasquali, and Nicola Longo,** "Functional and Molecular Studies in Primary Carnitine Deficiency", December 2017, p2-9.

THIẾT LẬP GIÁ TRỊ THAM CHIẾU CHO MỘT SỐ CHỈ SỐ HUYẾT HỌC TẾ BÀO VÀ ĐÔNG MÁU CỦA THAI PHỤ GIAI ĐOẠN BA THAI KỲ

Lê Thị Nga¹, Trần Thị Chi Mai^{1,2}, Trần Thị Ngọc Anh³

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu thiết lập khoảng tham chiếu cho 8 chỉ số huyết học tế bào và 5 chỉ số đông máu của thai phụ giai đoạn ba thai kỳ. Phương pháp nghiên cứu: mô tả cắt ngang tiến cứu. Đối tượng nghiên cứu: 142 phụ nữ mang thai khỏe mạnh từ 18-35 tuổi, có tuổi thai từ 28-38 tuần, thai đơn, protein niệu âm tính, huyết áp tâm trương <90 mmHg; những lần mang thai và sinh nở trước đây không có tiền sử bệnh lý thai nghén và tai biến. Số lượng hồng cầu (RBC), Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, số

lượng bạch cầu (WBC), số lượng tiểu cầu (PLT) được phân tích trên máy CellDyn Ruby của hãng Abbott. Chỉ số đông máu PT (giây, INR), APTT (giây, tỷ lệ bệnh/chứng), fibrinogen (g/L) được thực hiện trên máy ACL top 500 của hãng IL. Khoảng tham chiếu của các chỉ số huyết học tế bào và đông máu ở thai phụ giai đoạn ba thai kỳ đã được thiết lập, là một nguồn tham khảo cho các phòng xét nghiệm và các bác sỹ lâm sàng.

Từ khóa: Phụ nữ có thai, khoảng tham chiếu, huyết học, đông máu, giai đoạn ba thai kỳ

SUMMARY

REFERENCE INTERVALS FOR HEMATOLOGICAL AND HEMOSTATIC PARAMETERS IN HEALTHY PREGNANT WOMEN DURING THE THIRD TRIMESTER

The aim of this study was to establish reference intervals for some hematological and hemostatic parameters in healthy women during the third trimester of pregnancy. A prospective cross-sectional

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

³Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức

Chịu trách nhiệm chính: Trần Thị Ngọc Anh

Email: tranchimai@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 30.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.10.2022

Ngày duyệt bài: 28.10.2022