

thuận tiện với các chương trình này cho người cao tuổi.

V. KẾT LUẬN

Sau chương trình can thiệp có sự thay đổi về kiến thức và thực hành ở nhóm can thiệp tăng cao. Mức độ nguy cơ ngã cao của ĐTNCC ở nhóm can thiệp giảm hơn một nửa sau can thiệp (34,5% xuống 16,1%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2019), Home and recreational safety, Retrieved from. <https://www.cdc.gov/homeandrecreationalafety/falls/adultfalls>
2. **WHO** (2007), WHO Global report on falls Prevention in older Age, Switzerland, World Health Organization Avenue Appia 20 CH-1211 Geneva 27
3. **WHO** (2021), Step safely: strategies for preventing

- and managing falls across the life-course.
4. **Loganathan, A. et al** (2015), Barriers faced by healthcare professionals when managing falls in older people in Kuala Lumpur, Malaysia: a qualitative study, *BMJ Open*, 5(11), e008460.
 5. **Schepens, Stacey L., Panzer et al** (2011), Randomized Controlled Trial Comparing Tailoring Methods of Multimedia-Based Fall Prevention Education for Community-Dwelling Older Adults, *The American Journal of Occupational Therapy*, 65(6), 702-709.
 6. **Kocic, Mirjana et al** (2018), The effectiveness of group Otago exercise program on physical function in nursing home residents older than 65 years: A randomized controlled trial, *Archives of gerontology and geriatrics*, 75, 112-118.
 7. **Shubert, Tiffany E. et al** (2018), Disseminating the Otago Exercise Program in the United States: Perceived and actual physical performance improvements from participants, *Journal of Applied Gerontology*, 37(1), 79-98.

XÂY DỰNG BỘ CÔNG CỤ CHẨN ĐOÁN BIẾN THỂ ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIT RS738409 TRÊN GEN *PNPLA3* BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR SỬ DỤNG CHẤT PHÁT HUỖNH QUANG SYBR

Phan Nguyễn Thanh Vân¹, Nguyễn Hưng Thịnh¹,
Nguyễn Đoàn Huỳnh Anh Phúc¹, Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn¹

TÓM TẮT

Giới thiệu: Biến thể đa hình đơn nucleotit rs738409 của gen *PNPLA3* ảnh hưởng trực tiếp đến sự sản xuất và phân huỷ chất béo trong tế bào gan. Kỹ thuật real-time PCR phân tích rs738409 được phát triển giúp xác định biến thể đa hình đơn nucleotit bằng các trang thiết bị cơ bản, không đòi hỏi những hoá chất đắt tiền và đem lại hiệu quả chẩn đoán với độ tin cậy cao. Việc xác định thông tin về rs738409 với chi phí tối thiểu là tiền đề thuận lợi cho các nghiên cứu về ảnh hưởng của rs738409 lên tình trạng bệnh lý NAFLD, góp phần tích cực vào sự phát triển y học cá thể hóa. **Mục tiêu:** Xây dựng bộ công cụ chẩn đoán biến thể đa hình đơn nucleotit rs738409 trên gen *PNPLA3* bằng kỹ thuật real-time PCR sử dụng chất phát huỳnh quang SYBR. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Xây dựng quy trình real-time PCR bằng cặp đoạn mồi tự thiết kế để chẩn đoán biến thể rs738409 trên gen *PNPLA3* bằng công cụ primer-BLAST (NCBI, Hoa Kỳ). Đánh giá độ đặc hiệu, tối ưu hóa nồng độ của đoạn mồi đã thiết kế. Tạo các dòng DNA plasmid mang lần lượt biến thể C và biến thể G của rs738409 bằng phương pháp TA cloning. Thăm định khả năng xác định kiểu gen của biến thể

rs738409 trên gen *PNPLA3* thông qua phản ứng real-time PCR với bộ DNA plasmid chứng giả lập các kiểu gen biến thể quạn tâm bằng bộ sinh phẩm SensiFAST SYBR (Bjoline). Áp dụng quy trình lên 147 mẫu đã được khẳng định kết quả kiểu gen biến thể bằng giải trình tự Sanger để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của quy trình đã xây dựng. **Kết quả:** Xây dựng thành công quy trình kỹ thuật real-time PCR SYBR chẩn đoán biến thể rs738409 trên gen *PNPLA3*. Các đoạn mồi đặc hiệu alen đạt độ đặc hiệu khi kiểm tra bằng điện di mao quản và phân tích đường cong nóng chảy. Nồng độ tối ưu của các đoạn mồi là 250 nM, với CV% giá trị Ct giữa các lần lặp lại phản ứng đều nhỏ hơn 11% và giá trị Ct trung bình trong khoảng 25-30. Xác định được giá trị $|\Delta Ct|$ bằng 3 là khoảng phân biệt các kiểu gen của biến thể (CV% nhỏ hơn 11%). Độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của kỹ thuật lần lượt là 98,6%, 100% và 99,3%. **Kết luận:** Đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật real-time PCR SYBR để xác định biến thể rs738409 trên gen *PNPLA3*. **Từ khoá:** Gan nhiễm mỡ không do rượu, NAFLD, real-time PCR, rs738409.

SUMMARY

CONSTRUCTING A REAL-TIME PCR PROCESS USING SYBR FLUORESCENT REPORTER TO DIAGNOSE THE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM VARIANT RS738409 IN THE *PNPLA3* GENE

Introduction: The single nucleotide polymorphism (SNPs) rs738409 of the *PNPLA3* gene

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch
Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn
Email: nhntuan@pnt.edu.vn
Ngày nhận bài: 3.01.2024
Ngày phản biện khoa học: 20.2.2024
Ngày duyệt bài: 6.3.2024

affects the production and breakdown of fat in liver cells. The real-time PCR technique analyzing rs738409 polymorphism has been developed to determine SNPs using basic equipment, budget chemicals, and provides reliable diagnostic results. Determining information about rs738409 at minimal cost is a premise for research on the impact of rs738409 on the NAFLD pathogenic conditions and contributes positively to personalized medical development.

Objective: Establishing a molecular procedure to identify the variant rs738409 on the *PNPLA3* gene using the real-time PCR technique with SYBR fluorescent reporter. **Methods:** Constructing a real-time PCR procedure to diagnose the rs738409 polymorphism on the *PNPLA3* gene with self-designed primer pairs by using the primer-BLAST tool from NCBI (USA). Evaluating the specificity and optimizing the concentration of the designed primers. Generating DNA plasmid lines containing the C and G allele of rs738409 using the TA cloning method. Validating the ability to determine the genotype of the variant through real-time PCR reactions with a set of plasmid DNA controls using SensiMix™SYBR@Low-ROX Kit reagents (Bioline). Applying the procedure to 147 samples confirmed for genotype variants by Sanger sequencing to evaluate the sensitivity, specificity, and accuracy of the developed procedure. **Results:** Successfully constructed a technical procedure for real-time PCR SYBR to diagnose the rs738409 polymorphism on the *PNPLA3* gene. The specific primer sequences achieve specificity when tested by capillary electrophoresis and melt curve analysis. The optimal primer concentration is 250 nM, with a CV% of Ct values between replicate reactions less than 11% and the average Ct value ranging from 25 to 30. The determined value of $|\Delta Ct|$ is 3, which distinguishes the genotype variants (CV% less than 11%). The sensitivity, specificity, and accuracy of the technique are 98.6%, 100%, and 99.3%, respectively. **Conclusion:** A technical procedure for real-time PCR SYBR was successfully developed to determine the rs738409 variant on the *PNPLA3* gene.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD, real-time PCR, rs738409.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) đang là một trong những vấn đề sức khỏe lớn toàn cầu vì (i) tỷ suất hiện mắc cao (25,24%) [1], (ii) bệnh có thể diễn biến nặng ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân, thậm chí tử vong [2], (iii) các liệu pháp điều trị có hiệu quả còn cách xa mong đợi và tạo nên một gánh nặng đáng kể cho hệ thống y tế. Nhiều bằng chứng đến từ các nghiên cứu thực nghiệm, bao gồm những nghiên cứu về gen và cận gen, đã chỉ ra tính di truyền mạnh liên quan đến lượng mỡ tích tụ trong gan, ảnh hưởng đến tính nhạy cảm, sự tiến triển và kết quả điều trị bệnh NAFLD của một cá thể [3]. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra có rất nhiều biến thể di truyền trong các gen

khác nhau, chịu trách nhiệm mã hóa các protein điều hòa chuyển hóa lipid ở gan có liên quan đến sự phát triển và tiến triển của NAFLD [4, 5], trong số đó biến thể rs738409 có liên quan chặt chẽ đến việc tăng nguy cơ mắc NAFLD [6]. Hiện tại kỹ thuật được xem là "tiêu chuẩn vàng" để khảo sát các biến thể đơn nucleotit là giải trình tự Sanger [7]. Tuy nhiên kỹ thuật này có chi phí cao, khó thực hiện được trên cộng đồng, nên việc sử dụng kỹ thuật realtime PCR là cần thiết với các ưu điểm là dễ tiếp cận hơn và có thể sử dụng trên cộng đồng. Thực tế trên đã đặt ra nhu cầu về sự cấp thiết xây dựng một công cụ chẩn đoán có độ tin cậy cao và giá thành phù hợp nhằm mô tả đặc điểm biến thể nhằm tiến đến triển khai thường quy trên thực hành lâm sàng khi có nhu cầu, nhằm xác định biến thể di truyền trên gen PNPLA3, đặc biệt là rs738409. Đó là lý do nhóm nghiên cứu tiến hành thực hiện đề tài "Xây dựng quy trình real-time PCR sử dụng chất phát huỳnh quang SYBR chẩn đoán biến thể đa hình đơn nucleotit rs738409 trên gen PNPLA3".

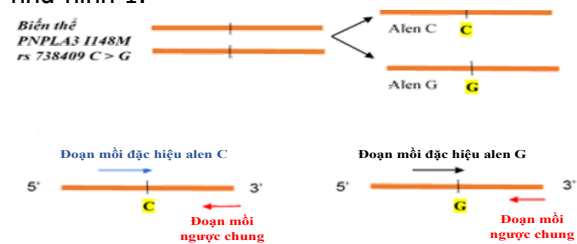
II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Các đặc điểm của quy trình real-time PCR sử dụng đoạn mỗi đặc hiệu alen và chất huỳnh quang SYBR để xác định biến thể rs738409 gen PNPLA3.

Vật liệu nghiên cứu: Các mẫu DNA bộ gen đã được xác định kiểu gen của biến thể rs738409 trên gen PNPLA3 bằng phương pháp giải trình tự Sanger, được lưu trữ tại Đơn vị Phân tử, Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường ĐHYK Phạm Ngọc Thạch.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, thực hiện tại phòng thí nghiệm Đơn vị Phân tử, Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường ĐHYK Phạm Ngọc Thạch, qua các bước sau:

(1) Thiết kế cặp đoạn mỗi đặc hiệu alen giúp xác định biến thể rs738409 gen PNPLA3 theo phương pháp huỳnh quang SYBR bằng phần mềm primer-BLAST (NCBI, Hoa Kỳ). Trong đó, thiết kế một đoạn mỗi ngược chung và hai đoạn mỗi xuôi đặc hiệu cho từng alen C và alen G biến thể quan tâm. Mô hình thiết kế mỗi như hình 1.



Hình 1. Mô hình real-time PCR xác định

biến thể rs738409 gen PNPLA3 bằng đoạn môi đặc hiệu alen

(2) Tạo dòng DNA plasmid chứng mang alen C và alen G của biến thể rs738409: bằng cách khuếch đại vùng gen PNPLA3 của người có kiểu gen CG biến thể rs738409, từ đó chèn vào plasmid pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit, Ref: 11543147, Invitrogen). Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào E.coli bằng phương pháp sốc nhiệt (One Shot TOP10F' Chemically Competent, Ref: C404010, Invitrogen). Sàng lọc khuẩn chứa vector tái tổ hợp mong muốn bằng phương pháp colony PCR. Quy trình thực hiện tạo dòng tuân thủ khuyến cáo nhà sản xuất. Kết quả tạo dòng DNA plasmid chứng được khẳng định lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger. DNA plasmid chứng được sử dụng làm chứng dương kiểm soát chất lượng quy trình real-time PCR xây dựng.

(3) Đánh giá độ đặc hiệu của đoạn môi thiết kế bằng phản ứng real-time PCR SYBR khuếch đại vùng gen PNPLA3 trên DNA plasmid chứng đã xây dựng tại bước (2). Sử dụng sinh phẩm SensiMix™SYBR@Low-ROX Kit (REF: QT625-05, Biorline) và hệ thống QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Thực hiện thí nghiệm theo khuyến cáo nhà sản xuất: nồng độ môi 400 nM; 2,5 ng DNA plasmid; nhiệt độ bắt cặp 60°C 1 phút, 35 chu kỳ. Cặp môi được cho là đặc hiệu khi: (i) Giá trị Ct ở trong khoảng 25-30 (ii) Điện di mao quản bằng LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (PerkinElmer) chỉ xuất hiện duy nhất một sản phẩm có độ dài tương đương với độ dài ước tính khuếch đại (±10% theo với khuyến cáo nhà sản xuất) (iii) Phân tích bằng đường cong nóng chảy của sản phẩm real-time PCR (Melting Curve) chỉ xuất hiện một đỉnh trên biểu đồ.

(4) Xác định nồng độ tối ưu đoạn môi lần lượt ở mức 150 nM, 200 nM và 250 nM với khuôn mẫu là DNA plasmid chứng mang alen C. Phản ứng lặp lại 3 lần/mẻ và 3 mẻ độc lập. Nồng độ được chọn là mức nồng độ mà ở đó kết quả real-time PCR có giá trị Ct thấp nhất; CV dưới 11% [6].

(5) Khẳng định độ đặc hiệu trên DNA bộ gen người tình nguyện đã biết trước kiểu gen CC và GG biến thể rs738409. Chuẩn bị phản ứng real-time PCR: nồng độ môi đã tối ưu, 2,5 ng DNA,

hiệt độ bắt cặp 60°C 1 phút, 35 chu kỳ. Sản phẩm real-time PCR được đánh giá bằng điện di mao quản và phân tích melting curve để kiểm tra độ đặc hiệu môi.

(6) Với DNA plasmid chứng đã tạo, tiến hành thẩm định khả năng xác định kiểu gen biến thể rs738409 của kỹ thuật real-time PCR SYBR đã xây dựng. Thông qua khả năng dự đoán kiểu gen bằng $\Delta Ct = x - y$ theo bảng 1, với x là Ct của phản ứng real-time PCR với cặp môi đặc hiệu cho alen C; y là Ct của phản ứng real-time PCR với cặp môi đặc hiệu cho alen G. Thực hiện phản ứng real-time PCR với bộ DNA plasmid chứng giả lập 3 kiểu gen biến thể quan tâm. Thực hiện lặp lại 3 lần/mẻ và 3 mẻ độc lập. Kỹ thuật có thể áp dụng khi CV dưới 11% và có khả năng dự đoán đúng kiểu gen của plasmid.

Bảng 1. Tiêu chuẩn ban đầu dự đoán kiểu gen biến thể rs738409 gen PNPLA3

$\Delta Ct = x - y$	Tương quan x và y	Kiểu gen
$ \Delta Ct < 3$	Không áp dụng	CG
$ \Delta Ct \geq 3$	$x < y$	CC
	$x > y$	GG

(7) Xác định độ nhạy (SE), độ đặc hiệu (SP) và độ xác thực (AC) bằng phản ứng real-time PCR vừa xây dựng với 147 mẫu DNA đã biết trước kiểu gen (bằng giải trình tự Sanger) được sắp xếp ngẫu nhiên tạo thành bộ mẫu giả lập. Với công thức ước lượng cỡ mẫu về SE và SP lần lượt là

$$n_{se} = (TP + FN) / p$$

$$TP + FN = Z_{1-\alpha/2}^2 \times p_{se}(1-p_{se}) / w^2$$

$$n_{sp} = (TN + FP) / (1-p)$$

$$TN + FP = Z_{1-\alpha/2}^2 \times p_{sp}(1-p_{sp}) / w^2$$

Trong đó n_{se} : cỡ mẫu cho độ nhạy; n_{sp} : cỡ mẫu cho độ đặc hiệu; TP (True positive): dương tính thật FN (False negative): âm tính giả; $Z_{1-\alpha/2}^2$: hằng số phân phối chuẩn, với $\alpha=0,05$ thì $Z_{1-\alpha/2}^2=1,96$; p_{sp} : độ đặc hiệu mong muốn và p_{se} : độ nhạy mong muốn đạt 95%; w: sai số cho phép (0,1). Cỡ mẫu tối thiểu là 88 mẫu. Kỹ thuật được xem là đạt khi có AC, SE, SP đều $\geq 95\%$.

Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel.

Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch số 882/TĐHYKPNT - HĐĐĐ ngày 19/10/2023.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

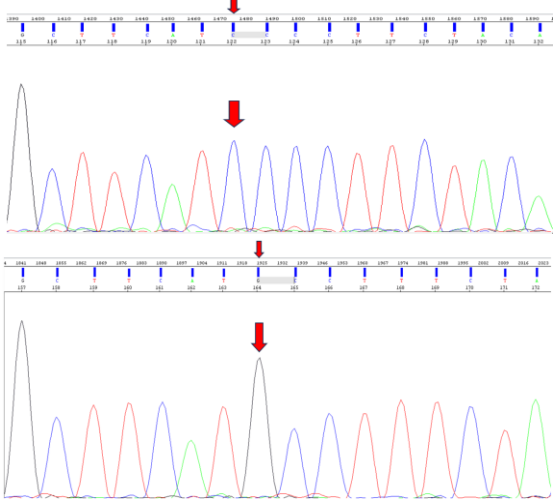
Thiết kế cặp đoạn môi đặc hiệu các alen biến thể rs738409 gen PNPLA3

Bảng 1. Thông tin đoạn môi đặc hiệu alen biến thể rs738409 gen PNPLA3

Tên	Trình tự (5' – 3')	Độ dài (nucleotit)	GC%	Độ dài sản phẩm (bp)
Môi xuôi C	CCTTGGTATGTTCCCTGCCTTCATC*	23	47,83	116
Môi xuôi G	CCTTGGTATGTTCCCTGCCTTCATG*	23	47,83	
Môi ngược	CACACTTCAGAGGCCCCC	18	66,67	

*: Trình tự nucleotit trên đoạn mỗi được thiết kế đặc hiệu từng loại alen G và C của biến thể rs738409

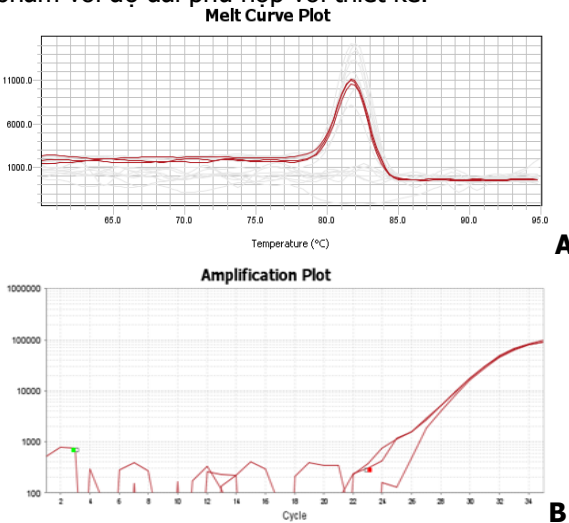
Tạo dòng DNA plasmid chứng mang alen C và mang alen G của biến thể rs738409



Hình 2. Kết quả giải trình tự Sanger DNA plasmid mang alen C (A) và alen G (B)

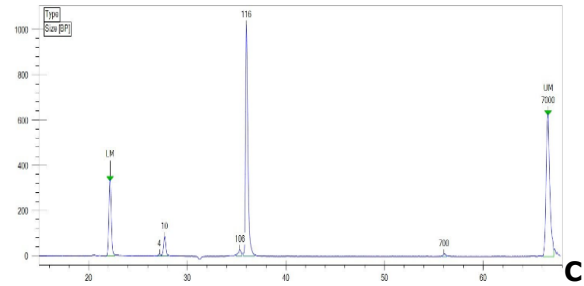
Kết quả giải trình tự cho thấy đã xây dựng thành công bộ DNA plasmid chứng mang hai alen của biến thể rs738409 gen PNPLA3 (Hình 2).

Đánh giá độ đặc hiệu môi trên DNA plasmid chứng đã tạo. Thành phần phản ứng real-time PCR: Master mix 1X, đoạn mỗi 400nM, DNA plasmid chứng 2,5 ng, nước bươm cho đủ thể tích 10 µL. Kết quả cho thấy đường biểu diễn khuếch đại có kết quả Ct cho cặp đoạn mỗi C ở cả ba lần chạy lặp lại đều tương đồng nhau, giá trị Ct trung bình là 28. Đồng thời, khi phân tích đường cong nóng chảy chỉ cho một đỉnh sản phẩm và kết quả điện di mao quản cũng hiện diện một sản phẩm với độ dài phù hợp với thiết kế.



A

B



C

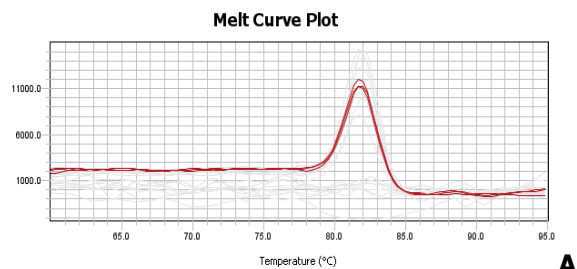
Hình 3. Kết quả biểu đồ đường cong nóng chảy (A), biểu đồ khuếch đại (B) và kết quả điện di mao quản (C) của sản phẩm real-time PCR với cặp đoạn mỗi đặc hiệu alen C Tối ưu nồng độ cặp đoạn mỗi đặc hiệu

Kết quả từ bảng 3 cho thấy tất cả các mẻ thí nghiệm đều có CV% < 11%. Kết quả của cặp mỗi đặc hiệu alen có giá trị Ct thấp nhất là ở nồng độ mỗi 250 nM. Từ đó nồng độ cặp đoạn mỗi đặc hiệu được lựa chọn là 250 nM.

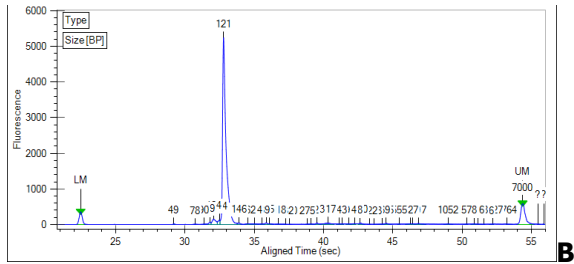
Bảng 3. Kết quả real-time PCR ở nồng độ 150 nM, 200 nM và 250 nM

Nồng độ (nM)	Giá trị Ct (lặp lại 3 lần/1 mẻ)	
	Ct _{mean}	CV%
150	29,03	1%
	29,04	1%
	28,67	1%
200	28,61	1%
	29,04	1%
	28,78	1%
250	28,16	1%
	27,31	1%
	27,84	1%

Khẳng định độ đặc hiệu môi đặc hiệu alen xác định biến thể rs738409 gen PNPLA3 trên DNA bộ gen người. Kết quả đường cong nóng chảy chỉ thể hiện một đỉnh tín hiệu duy nhất trên biểu đồ, không xuất hiện sản phẩm phụ (Hình 4A). Kết quả điện di mao quản sản phẩm real-time PCR (Hình 4B) cho thấy chỉ xuất hiện một đỉnh tín hiệu duy nhất với kích thước là 121 bp, phù hợp sai số cho phép của nhà sản xuất (± 10%). Như vậy, đoạn mỗi thiết kế là đặc hiệu khi đánh giá trong điều kiện thực nghiệm trên DNA bộ gen.



A



Hình 4. Kết quả biểu đồ đường cong nóng chảy (A) và điện di mao quản (B) của sản phẩm

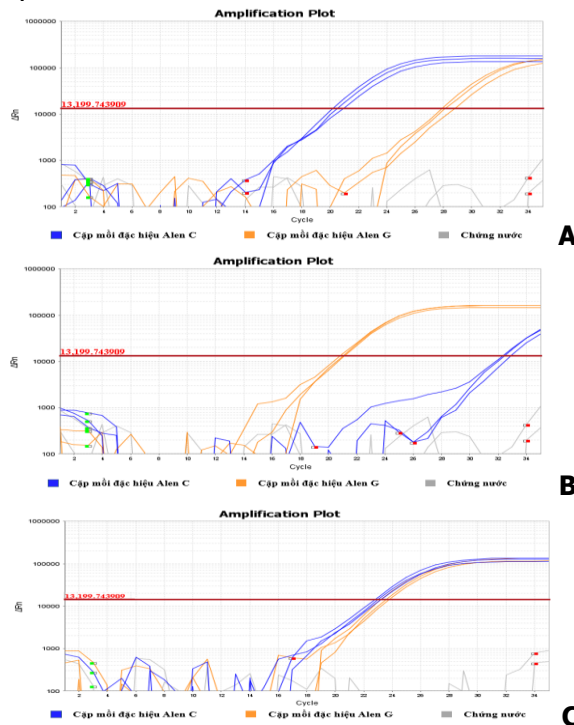
phẩm real-time PCR với cặp đoạn môi đặc hiệu alen C

Thẩm định khả năng xác định kiểu gen biến thể rs738409. Kết quả từ bảng 4 cho thấy CV% giá trị Ct từng mẹ và cả ba mẹ đều < 11% chứng tỏ các phản ứng có độ lặp và độ tái lặp tốt. Kết quả xác định kiểu gen dựa trên quy ước xây dựng phù hợp hoàn toàn trùng khớp với kết quả kiểu gen biến thể rs738409 gen PNPLA3 đã biết với $|\Delta Ct|$ bằng 3.

Bảng 4: Kết quả real-time PCR xác định đặc điểm chẩn đoán biến thể rs738409

Mẹ	Kiểu gen	Cặp môi đặc hiệu Alen C (lặp 3 lần/mẹ)	Cặp môi đặc hiệu Alen G (lặp 3 lần/mẹ)	$ \Delta Ct $	Kiểu gen dựa vào $ \Delta Ct $
1	CC	Ct _{mean} = 20,55; CV% = 2%	Ct _{mean} = 28,28; CV% = 2%	7,73	CC
	GC	Ct _{mean} = 22,97; CV% = 1%	Ct _{mean} = 23,52; CV% = 1%	0,55	GC
	GG	Ct _{mean} = 32,51; CV% = 1%	Ct _{mean} = 20,97; CV% = 1%	11,54	GG
2	CC	Ct _{mean} = 20,44; CV% = 1%	Ct _{mean} = 28,24; CV% = 1%	7,8	CC
	GC	Ct _{mean} = 23,03; CV% = 1%	Ct _{mean} = 23,59; CV% = 1%	0,56	GC
	GG	Ct _{mean} = 32,38; CV% = 1%	Ct _{mean} = 21,21; CV% = 1%	11,07	GG
3	CC	Ct _{mean} = 20,52; CV% = 1%	Ct _{mean} = 28,52; CV% = 1%	8	CC
	GC	Ct _{mean} = 23,01; CV% = 1%	Ct _{mean} = 23,82; CV% = 1%	0,81	GC
	GG	Ct _{mean} = 32,52; CV% = 1%	Ct _{mean} = 21,24; CV% = 1%	11,28	GG

Kết quả từ bảng 4 và hình 5 cho thấy khả năng chẩn đoán biến thể rs738409 dựa vào khoảng chênh lệch Ct của kỹ thuật với ΔCt trung bình xác định kiểu gen CC là 7,85, kiểu gen GG là 11,33 và kiểu gen GC là 0,58. Ở cả 3 mẹ đều đạt CV% < 11%.



Hình 5. Biểu đồ khuếch đại lần lượt của

kiểu gen CC (A); GG (B); CG (C)

Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của kỹ thuật. Kết quả xác định alen của bộ mẫu giả lập gồm 147 mẫu DNA đã biết kiểu gen theo phương pháp Sanger cho thấy độ nhạy, độ đặc hiệu, độ xác thực của phương pháp lần lượt là 98,6%, 100% và 99,3%. Đồng thời, mức ΔCt trung bình của kiểu gen CC, GG và GC lần lượt là 3,2, 6,0 và 0,1.

Bảng 6. Kết quả xác định alen G bằng kỹ thuật real-time PCR SYBR và giải trình tự Sanger

		Kết quả giải trình tự Sanger	
		Có alen G	Không có alen G
Kết quả real-time PCR SYBR	Có alen G	71	0
	Không có alen G	1	75
Tổng cộng		72	75

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp giải trình tự Sanger được xem là "tiêu chuẩn vàng" để xác định các biến thể di truyền đơn nucleotit. Tuy nhiên, phương pháp này có chi phí đầu tư thiết bị và đơn giá mỗi xét nghiệm cao, cùng thời gian trả kết quả dài. Phương pháp real-time PCR sử dụng đoạn môi đặc hiệu alen và chất huỳnh quang SYBR hạn chế tối đa các khuyết điểm của giải trình tự Sanger nên có tiềm năng lớn đóng vai trò là yếu tố tích cực thúc đẩy các nghiên cứu về biến thể

rs738409 trên gen PNPLA3 ở Việt Nam.

Phản ứng real-time PCR đã được nhóm nghiên cứu xây dựng với các cặp đoạn mỗi từ thiết kế. Để khảo sát primer-dimer vốn là nguyên nhân chính của hiện tượng dương tính giả khi dùng chất phát huỳnh quang SYBR, sản phẩm PCR đã được điện di mao quản và phân tích biểu đồ nóng chảy. Kết quả thực nghiệm không ghi nhận sự hiện diện của các sản phẩm thứ cấp này. Sự đặc hiệu của các cặp đoạn mỗi được khẳng định thêm với độ chênh Ct của các phản ứng PCR cho các kiểu alen C và G lần lượt là 7,85 và 11,33.

Phương pháp xác định kiểu gen dựa trên thuật toán ΔCt đòi hỏi độ lặp lại cao và sự phân tách giá trị Ct của các phản ứng PCR. Kết quả %CV của phản ứng real-time PCR là 3%, giá trị Ct trong khoảng 28, tương ứng với SD giá trị Ct là $\pm 0,84$. Nhóm nghiên cứu đề xuất mức ΔCt là 3 (trong khoảng $\pm 3SD$) để phân biệt tốt nhất hai loại alen. Trong thực nghiệm, giá trị ΔCt được thu thập thỏa tiêu chí định ra ban đầu trên cả mô hình plasmid lẫn DNA bộ gen. Mức ΔCt trung bình của kiểu gen CC, GG và GC giả lập bằng plasmid lần lượt là 7,85, 11,33 và 0,58. Mức ΔCt trung bình của kiểu gen CC, GG và GC ghi nhận từ 147 mẫu DNA lần lượt là 3,2, 6,0 và 0,1. Khoảng chênh lệch ΔCt lớn và an toàn để phân biệt các kiểu gen.

Trong phạm vi nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác của quy trình xây dựng được cùng với 147 mẫu DNA đã biết trước kiểu gen bằng giải trình tự Sanger. Độ nhạy (98,6%), độ đặc hiệu (100%) và độ chính xác (99,3%) là minh chứng

cho độ tin cậy cao của quy trình.

V. KẾT LUẬN

Bộ công cụ chẩn đoán biến thể rs738409 gen PNPLA3 bằng kỹ thuật real-time PCR sử dụng chất phát huỳnh quang SYBR đã được xây dựng thành công. Kết quả này làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu vai trò trên lâm sàng của biến thể này ở quần thể người Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Younossi, Z.M., et al.**, Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016. 64(1): p. 73-84..
2. **European Association for the Study of the L., D.** European Association for the Study of, and O. European Association for the Study of, EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2016.64(6): p.1388-402.
3. **Eslam, M. and J. George**, Genetic and epigenetic mechanisms of NASH. *Hepatology Int*, 2016. 10(3): p. 394-406.
4. **Salari, N., et al.**, Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. 2021. 21(1): p. 1-12..
5. **Basu Ray, S., PNPLA3-I148M:** a problem of plenty in non-alcoholic fatty liver disease. *Adipocyte*, 2019. 8(1): p. 201-208.
6. **ThermoFisher Scientific. Precision in qPCR.** 2021. Access date: 12/09/2023. <https://www.thermoFisher.com/vn/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html>
7. **Grada A, Weinbrecht KJTJoid.** Next-generation sequencing: methodology and application. 2013;133(8):e11.

MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ IgE, SỐ LƯỢNG BẠCH CẦU ÁI TOAN VÀ NHIỄM ẪU TRÙNG GIUN Đũa CHÓ Ở TRẺ EM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Hà Văn Thiệu^{1,2}, Trịnh Hữu Tùng², Ngô Văn Bách¹,
Đặng Hoàng Khánh Duy¹, Lê Thị Thanh Thùy², Phạm Ngọc Nhân²,
Nguyễn Thúc Bội Ngọc², Tăng Kim Hồng¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nhiễm ấu trùng giun đũa chó (AT GĐC) có thể gặp ở mọi lứa tuổi, nếu không phát hiện,

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Bệnh viện Nhi đồng 2.

Chịu trách nhiệm chính: Hà Văn Thiệu

Email: thieuhv@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 3.01.2024

Ngày phản biện khoa học: 19.2.2024

Ngày duyệt bài: 6.3.2024

điều trị kịp thời phần lớn bệnh sẽ không tự khỏi và có gây nguy hiểm đến sức khỏe con người, đặc biệt là trẻ em. Xét nghiệm ELISA định lượng IgG đặc hiệu trong huyết thanh là xét nghiệm được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng để chẩn đoán bệnh AT GĐC, tuy nhiên không phân biệt được nhiễm trùng cũ và mới, nên một số xét nghiệm khác đã được thực hiện được sử dụng để hỗ trợ chẩn đoán. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá mối liên quan giữa nồng độ IgE, bạch cầu ái toan (BCAT) với nhiễm giun đũa chó ở trẻ em thành phố Hồ Chí Minh (TPHCM) tại Việt Nam. **Phương pháp:** Nghiên cứu cắt ngang được thực hiện từ tháng