

Tối ưu hoá kỹ thuật PCR HRM nhằm bước đầu khảo sát mối liên hệ giữa SNP rs10941679 và bệnh ung thư vú ở người Việt Nam

- Phan Thành Phát
- Cao Thị Dạ Lan
- Nguyễn Thị Tuyết Lan
- Nguyễn Thị Ngọc Thanh
- Nguyễn Thị Huệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 08 năm 2016)

TÓM TẮT

Ung thư là loại phổ biến thứ hai trên thế giới, ảnh hưởng đến hàng triệu người và gây ra rất nhiều trường hợp tử vong. Việc nhận diện các chỉ thị di truyền là một trong số những cách thức chẩn đoán từ sớm, giúp bệnh nhân phát hiện bệnh, cũng như nhận được hướng chữa trị hợp lý. Các nghiên cứu gần đây cho thấy một vài điểm đa hình (SNP) ứng viên như rs10941679 (ở vị trí thượng nguồn gen MRPS30) có mối liên hệ chặt chẽ với ung thư vú ở người châu Âu và các dân tộc khác. Trong nghiên cứu này, mối liên hệ giữa SNP rs10941679 và ung thư vú ở người Việt Nam đã được khảo sát bước đầu. Phương pháp tầm soát kiểu gen của SNP sử dụng trong nghiên cứu này là phương pháp high resolution melt (HRM). HRM được thiết kế sử dụng phần mềm Umelt và được tối ưu hóa bằng cách thay đổi nhiệt độ bắt cặp mỗi, cũng như nồng độ $MgCl_2$ để kết quả có thể phân biệt 3 dạng đường cong nóng chảy của 3 kiểu gen cho SNP rs10941679. Điều kiện tối ưu

được lựa chọn là 58 °C và 3,0 mM. Bộ mẫu 100 ca/chứng được phân tích kiểu gen cho SNP rs10941679 bằng điều kiện hrM tối ưu. Kết quả phân tích cho thấy tần số của allele nguy cơ là 48,5 % trong nhóm bệnh nhân ung thư vú và 54,0 % trong nhóm người không bệnh. Phân tích hồi quy tuyến tính giữa sự hiện diện allele nguy cơ và kiểu gen chứa allele nguy cơ với biểu hiện bệnh cho thấy rs10941679 không liên quan với ung thư vú ở người Việt Nam ($OR = 0,80$; 95 % CI = $[0,54 - 1,19]$; $p_G = 0,27$; $p_{GG/GA} = 0,56$). Với cỡ mẫu nhỏ 100 ca/chứng độ tin cậy của phân tích này chỉ đạt 12,02 %. Để đạt được độ tin cậy 90 % cần sử dụng bộ mẫu lên tới 1691 ca/chứng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy khả năng của rs10941679 liên quan đến sự phát triển ung thư vú ở người Việt Nam là rất thấp vì vậy chưa cần tập trung nghiên cứu SNP này trong các nghiên cứu sắp tới nhằm tìm kiếm chỉ thị di truyền cho ung thư vú ở người Việt Nam.

Từ khóa: ung thư vú, MRPS30, rs10941679, High Resolution Melt

MỞ ĐẦU

Ung thư vú là loại ung thư phổ biến thứ 2 trên thế giới với khoảng 1,67 triệu ca mới được chẩn đoán vào năm 2012 (chiếm 25 % tổng số ung thư) [1]. Đây là loại ung thư phổ biến ở phụ

nữ trên cả các nước phát triển và các nước đang phát triển. Ở Việt Nam, tốc độ mắc ung thư vú đã tăng gấp 2 lần từ năm 2000 đến năm 2010 [2]. Vào năm 2012, số ca mắc ung thư vú trên cả

nước là 11067, cùng với 4671 ca tử vong [3]. Thêm vào đó, phần lớn phụ nữ thường được chẩn đoán bị ung thư vú khi ở giai đoạn 2 [2], trong khi ở các nước phát triển là từ giai đoạn 1 hoặc 0 [4]. Do đó, mặc dù có tỉ lệ mắc bệnh thấp nhưng tỉ lệ tử vong ở bệnh nhân ung thư vú tại Việt Nam lại cao hơn so với các nước phát triển; và do đó cũng cho thấy rằng việc tìm kiếm các phương pháp chẩn đoán mới và đầy đủ hơn cho ung thư vú ở người Việt Nam là hết sức cần thiết.

Có rất nhiều yếu tố đã được xác định có liên quan đến sự hình thành và phát triển của ung thư vú như yếu tố tuổi tác, giới tính, lối sống, môi trường,... Trong số đó, mặc dù chỉ chiếm từ 5 – 10 % số trường hợp mắc ung thư vú [5] nhưng yếu tố di truyền lại có thể được sử dụng cho việc chẩn đoán và phát hiện bệnh từ rất sớm, góp phần giảm tỉ lệ tử vong và định hướng cho các điều trị trúng đích. Các điểm đa hình (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) hiện diện trên các gen tham gia vào sự điều hòa và phát triển của ung thư vú đang là đối tượng rất được quan tâm bởi tác động của nó và các haplotype giữa các SNP đối với sự phát triển ung thư vú [6].

Một trong số những SNP nhạy cảm với ung thư vú đang được quan tâm là rs10941679 (A>G) hiện diện ở thượng nguồn gen tiền-apoptosis MRPS30 (mitochondrial ribosomal protein s30) [7, 8]. SNP này đã được nhận thấy có liên quan đến ung thư vú ở các quần thể người châu Âu và Mỹ, với khả năng làm gia tăng ung thư từ 1,12 – 1,19 lần [9, 10]. SNP này cũng cho thấy có sự liên quan chặt chẽ đến các khối u dương tính với progesterone receptor [11] và người có đột biến BRCA2, chứ không phải trên những người có đột biến BRCA1 [12]. Mặc dù vậy, rs10941679 lại không cho thấy có sự liên hệ với ung thư vú ở quần thể người Trung Quốc [13, 14] và Mỹ gốc Phi [15]. Những nhận định trên cho thấy rằng mối liên hệ giữa rs10941679 và ung thư vú là đặc trưng cho từng quần thể, dân tộc; và do đó cũng cho thấy việc phân tích mối liên hệ của nó với

ung thư vú ở từng quần thể riêng biệt, như người Việt Nam là hết sức cần thiết.

Phương pháp High Resolution Melt (HRM) đã được sử dụng trong việc tầm soát kiểu gen của SNP trong một số nghiên cứu trước đây [16, 17] và cho thấy nhiều ưu điểm so với các phương pháp khác bởi tính nhanh, nhạy, hiệu quả và tiết kiệm [18]. Đây là một phương pháp xác định kiểu gen với độ phân giải cao, có thể phân biệt được các trình tự DNA chỉ khác nhau một nucleotide dựa vào kết quả phân tích nhiệt độ nóng chảy (T_m) của sản phẩm PCR, trong đó, độ đặc hiệu cũng như sự tách biệt của các đường cong nóng chảy đại diện cho các kiểu gen của SNP là các thông số quan trọng nhất, quyết định đến kết quả phân tích kiểu gen.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa phương pháp HRM nhằm tầm soát kiểu gen của rs10941679 trên bộ mẫu 100 ca/chúng và phân tích mối liên hệ của SNP này với ung thư vú ở người Việt Nam.

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Thu nhận mẫu và tách chiết DNA bộ gene từ máu toàn phần

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu nhận mẫu máu cho nghiên cứu từ Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu máu ung thư vú được thu nhận từ các bệnh nhân đã được chẩn đoán có khối u ác tính trong vú ở khoa ngoại 4. Trong khi đó, các mẫu máu không bệnh được thu nhận ở khoa ngoại 6 từ những người được chẩn đoán không mắc ung thư vú. Mẫu máu sau khi thu nhận sẽ được vận chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở -20 °C. Các mẫu máu được thu nhận và tiến hành xử lý với sự đồng thuận của người cho mẫu.

DNA bộ gen được ly trích từ tế bào máu bằng phương pháp muối theo quy trình của Nguyễn Thị Huệ và cs (2012) [19] với một số điều chỉnh như sau: 500 µL máu cùng với 1,5 mL cell lysis buffer được cho vào trong eppendorf rồi

tiến hành vortex và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, dung dịch huyền phù này được ly tâm 10000 rpm trong 3 phút để thu nhận phần cặn (pellet) dưới đáy. Tiến hành lặp lại các bước trên thêm 2 lần cùng với 1 mL cell lysis buffer để thu nhận phần cặn đã loại bỏ hoàn toàn màng tế bào và cho bổ sung với 300 μ L nucleic lysis buffer. Huyền phù trên được ủ trong 10 phút ở 37 °C và tiếp tục được bổ sung với 100 μ L NaCl 5 M và 600 μ L chloroform. Tiến hành ly tâm 10000 rpm trong 5 phút và thu nhận dịch nổi có chứa DNA qua eppendorf mới. Bổ sung 1000 μ L ethanol 100 % vào eppendorf trên, đảo đều và ly tâm 13000 rpm trong 5 phút ở 4 °C. Loại bỏ phần dịch nổi rồi bổ sung 700 μ L ethanol 70 %, đảo đều và tiếp tục ly tâm 13000 rpm trong 5 phút ở 4 °C. Sau đó, loại bỏ phần dịch nổi và làm khô eppendorf ở 55 °C trong 30 phút. Thêm 50 μ L nước phân tử vào trong eppendorf và dung dịch chứa DNA trên được bảo quản ở -20 °C. DNA sau tách chiết sẽ được xác định nồng độ và độ tinh sạch bằng cách đo giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ với máy Nanodrop. các mẫu DNA có giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ từ 1,7 – 2,0, và nồng độ \geq 10 ng/ μ L được chọn lựa cho phân tích HRM.

Thiết kế môi cho kỹ thuật HRM phân tích SNP

Môi sử dụng cho phân tích HRM được thiết kế dựa trên phần mềm Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) và kiểm tra độ đặc hiệu bằng phần mềm Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) cũng như sự hình thành cấu trúc bậc 2 từ phần mềm Oligoanalyzer 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). Cuối cùng, các cặp môi ứng viên sẽ được sử dụng để dự đoán kết quả HRM với nồng độ MgCl₂ từ 2,0 – 3,5 mM bằng phần mềm Umelt (<https://www.dna.utah.edu/hets/umh.php>). Cặp môi cho kết quả dự đoán đường cong nóng chảy (Melting curve) của 3 kiểu gen với sự tách biệt rõ

ràng nhất sẽ được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tìm các mẫu chứng và tối ưu điều kiện PCR HRM

Để đảm bảo sản phẩm khếch đại có đủ lượng sử dụng cho HRM, trước tiên các cặp môi được lựa chọn được tối ưu nhiệt độ bắt cặp Ta bằng phương pháp PCR. Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích là 25 μ L, bao gồm: 12,5 μ L Toptaq Mastermix 1, 0,5 μ L cho mỗi loại môi ngược và môi xuôi 0,2 μ m, 1 μ L DNA 50 ng/ μ L, và 10,5 μ L dH₂O. Chu trình nhiệt PCR được tiến hành như sau: 94 °C trong 1 phút; theo sau bởi 40 chu kỳ bao gồm 94 °C trong 30 giây, gradient Ta 56 – 64 °C trong 30 giây, 72 °C trong 60 giây; và cuối cùng là 72 °C trong 60 giây. sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di 90 V, 30 phút trên gel agarose 1,5 % nhằm kiểm tra kích thước sản phẩm mục tiêu, cũng như sự hiện diện của các sản phẩm phụ.

Sau khi đã tối ưu nhiệt độ bắt cặp, chúng tôi tiến hành HRM cho một số mẫu DNA ngẫu nhiên với nhiệt độ bắt cặp đã được tối ưu trước đó và nồng độ MgCl₂ được lựa chọn từ phần mềm Umelt, nhằm tìm kiếm 3 dạng đường cong nóng chảy đại diện cho 3 kiểu gen (đồng hợp tử đột biến, đồng hợp tử bình thường, dị hợp tử). phản ứng HRM được tiến hành với tổng thể tích 6 μ L, bao gồm: 3 μ L Lightcycler @ 480 high resolution melting dye 1x 0,12 μ L cho mỗi loại môi ngược và môi xuôi 0,2 μ m; MgCl₂ 2,0 – 3,5 mM tùy thuộc kết quả dự đoán umelt, 1 μ L DNA 30 ng/ μ L và dH₂O cho đủ 6 μ L. Chu trình nhiệt cho phản ứng HRM được tiến hành như sau: 95 °C trong 300 giây; theo sau bởi 40 chu kỳ bao gồm 95 °C trong 30 giây, 30 giây với nhiệt độ bắt cặp đã lựa chọn, 72 °C trong 30 giây (đọc tín hiệu 1 lần); theo sau bởi các bước 95 °C trong 90 giây, 40 °C trong 60 giây, 65 °C trong 30 giây, 95 °C (đọc tín hiệu liên tục) và làm nguội với 37 °C trong 30 giây.

Các mẫu DNA ứng viên dựa trên kết quả HRM sẽ được giải trình tự nhằm xác định chính xác kiểu gene của mẫu DNA bằng phương pháp giải trình tự động. Chúng tôi tiến hành khuếch đại một đoạn DNA dài 319 bp với mỗi xuôi (5'-GTGTGTGAATGAAGGCGGTTTCCA-3') và mỗi ngược (5'-GCTAAACCTG AATGCAGCAAAATAGCA-3'). Sau đó sản phẩm PCR được giải trình tự tại trung tâm nghiên cứu OUCRU bằng thiết bị giải trình tự động ABI 3130. Kết quả giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3.

Sau khi đã có được 3 mẫu DNA đại diện cho 3 kiểu gen, chúng tôi tiến hành tối ưu phương pháp HRM dựa trên khả năng có thể phân biệt được 3 kiểu gen đại diện của SNP. Phản ứng HRM được tiến hành với các điều kiện đã sử dụng trước đó trong bước tiến hành HRM trên các mẫu DNA ngẫu nhiên, với nồng độ MgCl₂ được khảo sát từ 2,5 – 3,5 mM. Điều kiện MgCl₂ sau khi được tối ưu sẽ được sử dụng cho bước xác định kiểu gene bằng phương pháp HRM.

Tầm soát và ước tính tần số kiểu gen và alen

100 mẫu DNA từ bệnh nhân ung thư vú và 100 mẫu DNA từ người không mắc bệnh sẽ được xác định kiểu gene bằng phương pháp HRM cùng với 3 mẫu chứng và 1 mẫu chứng âm (H₂O). Dựa vào hình dạng đường cong nóng chảy đại diện cho 3 kiểu gene của các mẫu chứng, các mẫu DNA với các đường cong nóng chảy đặc trưng sẽ được xác định kiểu gen của chúng. Tần số kiểu gen và alen của SNP rs10941679 (A/G) trong từng nhóm đối tượng bệnh và không bệnh được tính toán dựa trên công thức sau:

Tần số 1 loại kiểu gen

$$= \frac{\text{Số cá thể mang kiểu gene đó}}{\text{Tổng số cá thể}}$$

$$\text{Tần số alen A} = \frac{2 \cdot \text{AA} + \text{AG}}{2 \cdot \text{AA} + \text{AG} + 2 \cdot \text{GG}}$$

Phân tích mối liên hệ giữa SNP rs10941679 và ung thư vú

Trong các nghiên cứu ca/chứng về di truyền, phân tích Hardy-Weigberg (HW) cho mẫu chứng (không bệnh) thường được tiến hành trước khi phân tích mối liên hệ để phát hiện lỗi trong quá trình xác định kiểu gene [20]. Do đó, trong nghiên cứu này, các mẫu chứng cũng được tiến hành phân tích HW nhằm đảm bảo sự chính xác trong quá trình phân tích kiểu gen, cũng như sự chọn lựa mẫu nghiên cứu. Sau khi kiểm tra sự cân bằng HW, chúng tôi tiến hành phân tích mối liên hệ giữa các điểm đa hình và ung thư vú bằng cách so sánh sự xuất hiện của các allele hay kiểu gene nguy cơ trong 2 nhóm đối tượng nghiên cứu bệnh và không bệnh; sau đó sẽ tiến hành tính xác suất thống kê theo hồi quy tuyến tính để xác định sự tương quan của việc xuất hiện các yếu tố nguy cơ và sự xuất hiện bệnh. Để đạt được độ chính xác cao nhất trong phân tích hồi quy tuyến tính, cũng như sự cân bằng HW, chúng tôi sử dụng phần mềm Stata 12.

Kết quả phân tích HW dựa vào giá trị P-value, với P > 0,05 cho thấy quần thể nghiên cứu nằm trong cân bằng HW. Kết quả phân tích mối liên hệ di truyền dựa vào giá trị P-Value của kiểm định hồi quy tuyến tính, với P < 0,05 cho thấy kết quả phân tích có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ước tính độ tin cậy và cỡ mẫu sử dụng

Trong các nghiên cứu di truyền quần thể, cỡ mẫu sử dụng là yếu tố ảnh hưởng đến độ tin cậy của kết quả nghiên cứu. Việc sử dụng đúng cỡ mẫu sẽ mang lại độ tin cậy cao và tiết kiệm được kinh phí thực hiện. Trong nghiên cứu này cỡ mẫu được ấn định là 100 ca/chứng để phân tích bước đầu mối liên hệ của SNP rs10941679 và ung thư vú ở người Việt Nam. Sau khi đã có các thông tin

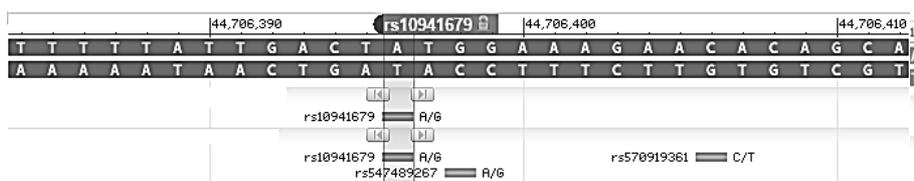
về sự phân bố kiểu gen trong quần thể, chúng tôi tiến hành ước lượng độ tin cậy của kết quả nghiên cứu và dự đoán cỡ mẫu thích hợp cho các nghiên cứu sâu hơn trong tương lai bằng phần mềm phân tích của Philippe Glaziou (<http://samsize.sourceforge.net/iface/s3.html>).

KẾT QUẢ

Thiết kế mồi

Các cặp mồi được thiết kế cho phân tích rs10941679 dựa vào trình tự DNA có chứa SNP

trên NCBI (Hình 1); đồng thời, trình tự sản phẩm khuếch đại cũng không chứa các SNP khác với tần số > 1 %. Cặp mồi đã thiết kế được trình bày chi tiết ở Bảng 1. Cặp mồi này khi được kiểm tra bằng phần mềm Primer-BLAST cho thấy có sự đặc hiệu cao, với duy nhất 1 sản phẩm mục tiêu được khuếch đại. Bên cạnh đó, cấu trúc bậc 2 từ các cặp mồi không bền vững khi dự đoán với phần mềm Oligo Analyzer, với giá trị Tm cao nhất của các sản phẩm bậc 2 này là 35,4 °C và giá trị ΔG cao nhất là -6,21 kcal/mole.



Hình 1. Vị trí của SNP rs10941679 trên bộ gene

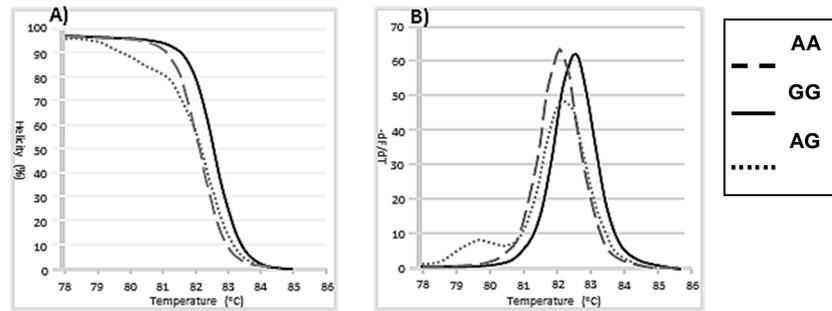
Bảng 1. Mồi dùng cho phân tích HRM

Mồi	Trình tự	Tm	Chiều dài	Sản phẩm
Xuôi	AATGCCAGTAAAATGTGGGATGCT	67.3	24 bp	90 bp
Ngược	TCGGTTGGGCTGTAAGATAAAAATA	64.5	25 bp	
AATGCCAGTAAAATGTGGGATGCTTTTTATTGACTATGGAAAGAACACAGCATAAAAA AAGCAAATATTTTTATCTTACAGCCCAACCGA				

Dự đoán kết quả HRM

Sau khi đã có thông tin về cặp mồi, các sản phẩm khuếch đại cho mỗi SNP đã được dự đoán sự hình thành 3 dạng đường cong nóng chảy đại diện cho 3 kiểu gen trên Umelt. Kết quả dự đoán tại điều kiện ban đầu (2,0 mM MgCl₂, 0 % DMSO) cho thấy các sản phẩm khuếch đại có 3 dạng đường cong nóng chảy riêng biệt tương ứng với 3 kiểu gene AA, AG VÀ GG (Hình 2). Trên biểu đồ Normalized Melting Curves (Hình 2A) kiểu gen dị hợp tử được hiển thị bằng đường cong màu đỏ và cắt đường cong đồng hợp tử thứ

nhất khi tăng dần nhiệt độ; đường cong đồng hợp tử thứ 2 có nhiệt độ tách mạch cao hơn và không cắt 2 đường cong nóng chảy trên trong khoảng nhiệt độ tách mạch của sản phẩm. Với biểu đồ Normalized Melting Peak (Hình 2B), đường dị hợp tử có 2 đỉnh nóng chảy không tương xứng, trong khi đó, 2 đường đồng hợp tử chỉ có một đỉnh nóng chảy. Tại điều kiện ban đầu được khảo sát trên Umelt, các kiểu gen của rs10941679 vẫn chưa có sự tách biệt rõ ràng, do đó, các nồng độ MgCl₂ và DMSO đã được khảo sát nhằm cải thiện sự tách biệt của các dạng đường cong nóng chảy cho 3 kiểu gen của SNP trong nghiên cứu.

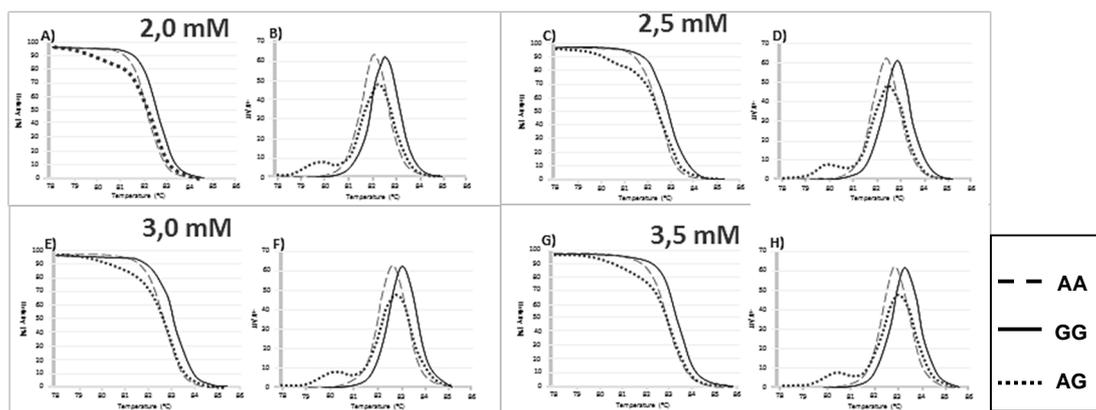


Hình 2. Dự đoán đường cong nóng chảy của sản phẩm PCR chứa các SNP rs10941679 với điều kiện ban đầu. A) Normalized Melting Curves; B) Normalized Melting Peaks

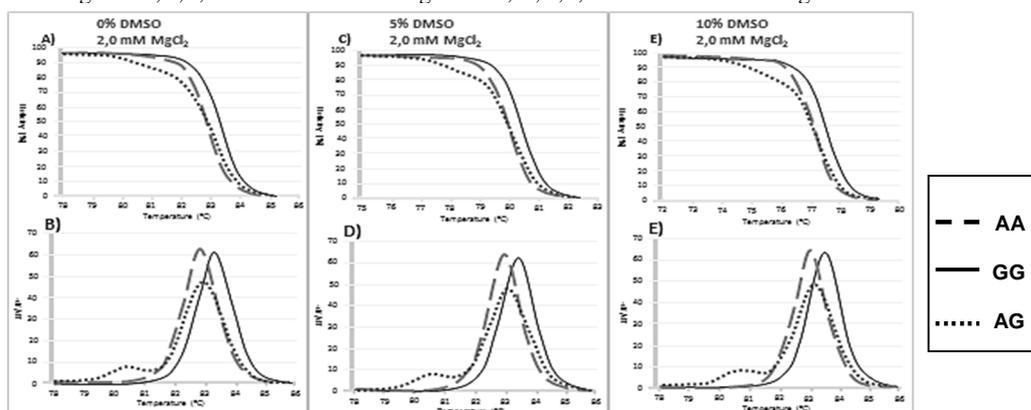
Dựa vào các nghiên cứu đã tiến hành, cũng như đề nghị của nhà sản xuất MasterMix HRM được sử dụng trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ $MgCl_2$ từ 2,0 đến 3,5 mM đối với sự phân biệt của 3 dạng đường cong nóng chảy. Kết quả phân tích trên Umelt cho thấy tại các nồng độ $MgCl_2$ khảo sát, hình dạng của các đường cong nóng chảy đại diện cho 3 kiểu gen đều có sự tương đồng (Hình 3). Bên cạnh đó, khoảng nhiệt độ nóng chảy từ 2 đỉnh của kiểu gene đồng hợp tử đều cách nhau 0,4 °C. Mặc dù vậy, sự tách biệt của 3 nhóm kiểu gen cũng tương đối rõ ràng, với khoảng nhiệt độ tách mạch là 78 – 86 °C, phù hợp với phương pháp HRM. Do đó, nồng độ 2,0 mM $MgCl_2$ được lựa chọn cho phân tích HRM tiếp theo nhằm tiết kiệm lượng $MgCl_2$ sử dụng.

Với nồng độ $MgCl_2$ là 2,0 mM đã được lựa chọn trong thí nghiệm trước, 3 nồng độ DMSO (0 %, 5 % và 10 %) được khảo sát để xem ảnh hưởng của chúng đối với sự phân biệt của 3 kiểu gen khi phân tích HRM bằng phần mềm Umelt. Ở các nồng độ được khảo sát, DMSO được nhận thấy không có tác động đến sự tách biệt của 3 dạng đường cong nóng chảy cho 3 kiểu gen của rs10941679 (Hình 4) mà chỉ làm giảm nhiệt độ T_m của sản phẩm PCR. Như vậy, DMSO không có ảnh hưởng đến sự tách biệt của 3 kiểu gene, và do đó, không cần sử dụng cho các phân tích HRM tiếp theo.

Như vậy, điều kiện thích hợp cho phân tích kiểu gene của SNP rs10941679 bằng phương pháp HRM đã được xác định dựa trên phần mềm Umelt, với nồng độ $MgCl_2$ là 2,0 mM và 0 % DMSO.



Hình 3. Dự đoán đường cong nóng chảy của sản phẩm PCR chứa SNP rs10941679 theo khuynh độ nồng độ $MgCl_2$. A,C,E,G: Normalized Melting Curves; B,D,F,H: Normalized Melting Peak



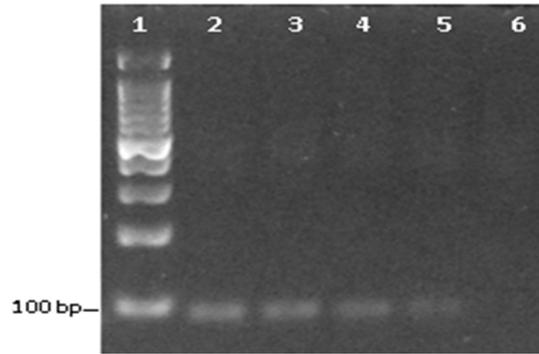
Hình 4. Dự đoán đường cong nóng chảy của sản phẩm PCR chứa rs10941679 theo khuynh độ nồng độ DMSO. A,C,E,G: Normalized Melting Curves; B,D,F,H: Normalized Melting Peak

Tối ưu hóa HRM - PCR

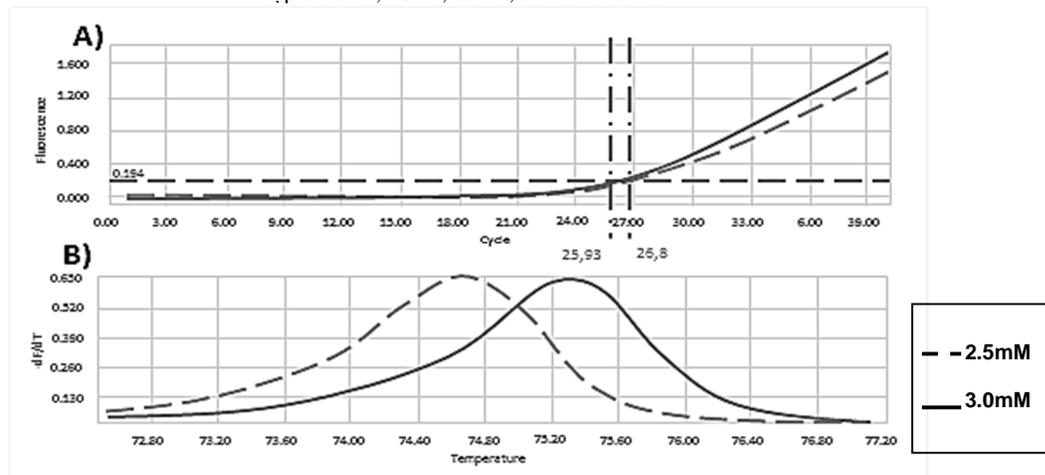
Dựa vào nhiệt độ T_m của cặp mồi đã thiết kế, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR theo khuynh độ nhiệt độ từ 56 – 64 °C để tìm ra nhiệt độ bắt cặp tối ưu của cặp mồi này. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5 % cho thấy sản phẩm mục tiêu đã được khuếch đại thành công với vạch sản phẩm PCR nằm lân cận vị trí 90 bp trên thang DNA chuẩn và không xuất hiện sản phẩm phụ, cho thấy cặp mồi được lựa chọn có độ đặc hiệu rất cao (Hình 5). Trong khoảng nhiệt độ được khảo sát, các vạch có độ sáng cao nhất ở nhiệt độ 56 – 58 °C, giảm dần từ nhiệt độ 60 – 62 °C và mất hẳn ở nhiệt độ 64 °C. Để đảm bảo lượng sản phẩm được khuếch đại, cũng như độ đặc hiệu của

phản ứng, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ bắt cặp mồi tối ưu là 58 °C.

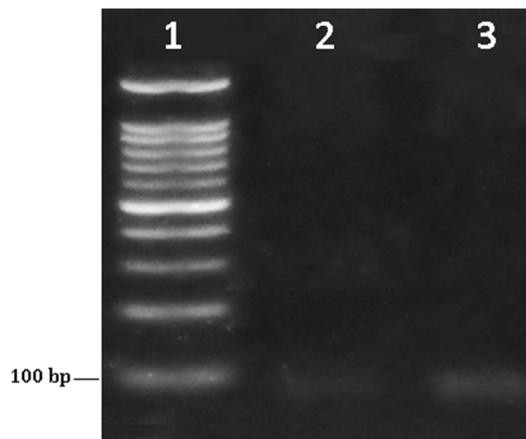
Bắt đầu tối ưu hoá điều kiện HRM trong thực tế bằng điều kiện đã tối ưu *in silico*, kết quả phân tích trên 1 mẫu DNA tại nồng độ 2,0 mM $MgCl_2$ cho thấy không có sự xuất hiện của sản phẩm PCR (dữ liệu không trình bày). Khi tăng nồng độ $MgCl_2$ lên 2,5 mM và 3,0 mM, chúng tôi thấy có sự xuất hiện của sản phẩm khuếch đại và các đỉnh nóng chảy (Hình 6). Nồng độ 3,0 mM $MgCl_2$ cho giá trị Ct thấp hơn (Hình 6A) và lượng sản phẩm khuếch đại nhiều hơn (Hình 7) so với tại nồng độ 2,5 mM; do đó 3,0 mM $MgCl_2$ được lựa chọn cho phân tích HRM cho các thí nghiệm kế tiếp.



Hình 5. Sản phẩm khuếch đại của SNP rs10941679 trên gel agarose 1,5 %. 1) Thang DNA 100bp; 2-6) Nhiệt độ bắt cặp ở 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C và 64 °C



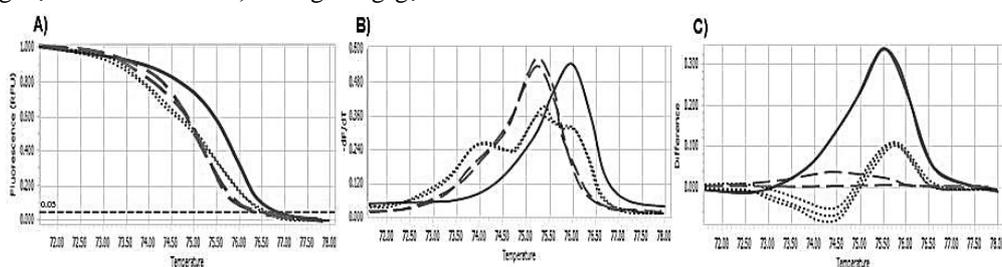
Hình 6. Phân tích sự khuếch đại (A) và đỉnh nóng chảy (B) của sản phẩm PCR



Hình 7. Sản phẩm khuếch đại của SNP rs10941679 trên gel agarose 1,5 % theo nồng độ MgCl₂ 1) Thang DNA 100 bp; 2) 2,5 mM MgCl₂; 3) 3,0 mM MgCl₂

Để xác định 3 mẫu chứng đại diện cho 3 kiểu gen của các SNP mục tiêu, chúng tôi tiến hành phản ứng hrn cho vài mẫu DNA ngẫu nhiên với nhiệt độ Ta và nồng độ MgCl₂ đã được lựa chọn trước đó. Sau khi phân tích 8 mẫu DNA, chúng tôi thu nhận được 3 dạng đường cong nóng chảy tách biệt rõ ràng (Hình 8). Với hình dạng đường cong nóng chảy có 2 đỉnh, đường chấm trong biểu đồ Normalized Melting Peak (Hình 8B) có khả năng rất cao chính là đường dị hợp tử AG. Nhận định trên cũng được củng cố thêm ở biểu đồ Normalized Melting Curves với hình dạng đường cong chấm cắt đường cong gạch và đường cong liền khi tăng dần nhiệt độ (Hình 8A). Từ những dự đoán trên Umelt, đường cong gạch có

thể là kiểu gen AA cho SNP rs10941679 (A/G). Bên cạnh đó, đường cong liền được nhận thấy có nhiệt độ tách mạch cao nhất, đồng thời hiện diện với 1 đỉnh nóng chảy duy nhất được dự đoán là kiểu gen GG. Khoảng nhiệt độ cách biệt của 2 đường cong gạch và đường cong liền là 0,7 °C, thay vì 0,4 °C như đã được dự đoán trước đó trên Umelt. Các nhận định trên cũng được phản ánh thông qua biểu đồ different plot (Hình 8C) với đường cong liền luôn duy trì cường độ huỳnh quang cao nhất trong khoảng nhiệt độ tách mạch, và đường cong chấm được dự đoán là kiểu gen dị hợp tử có cường độ thay đổi từ thấp đến cao so với đường cong gạch.

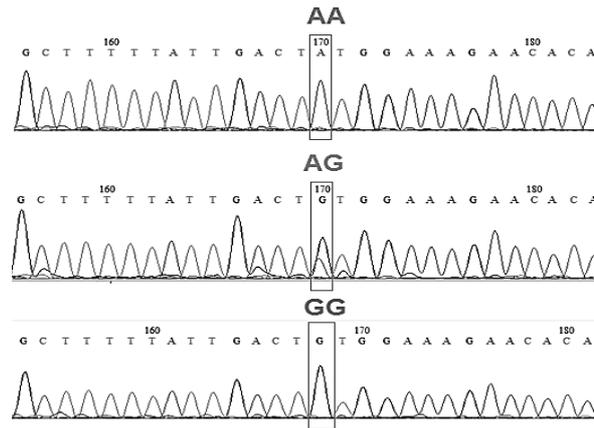


Hình 8. Thực hiện HRM với 8 mẫu ngẫu nhiên. A) normalized melting curves; B) normalized melting peak; C) different plot

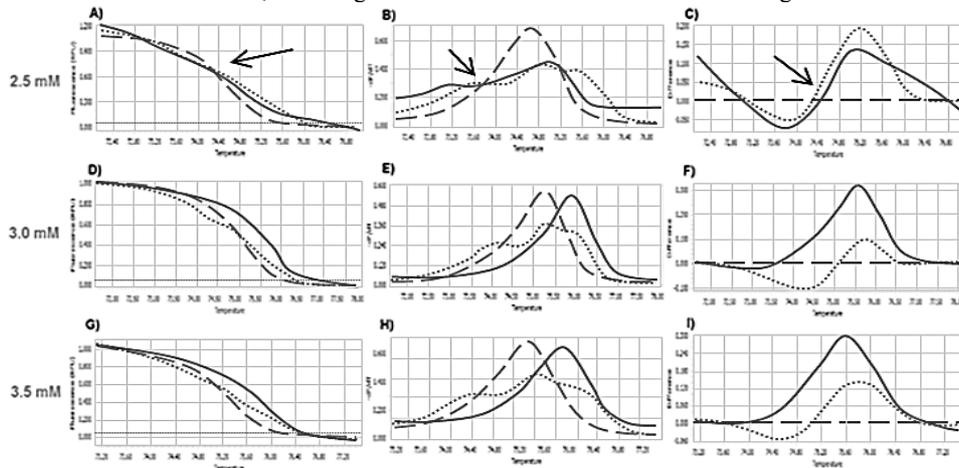
3 mẫu DNA ứng viên đại diện cho 3 dạng đường cong nóng chảy đã được giải trình tự nhằm xác định kiểu gen của chúng. Cặp mỗi được sử dụng cho giải trình tự cũng được thiết kế dựa trên phần mềm Primer3Plus và kiểm tra độ đặc hiệu bằng phần mềm Primer-Blast. Kết quả giải trình tự cho thấy 3 mẫu DNA ứng viên có 3 kiểu gen khác nhau, tương ứng với 3 dạng đường cong nóng chảy từ phân tích HRM trước đó (Hình 9). Tại vị trí đa hình của mẫu được dự đoán có kiểu gen AA là 1 đỉnh huỳnh quang của nu A; đồng thời, mẫu có kiểu gen GG cũng được xác nhận với 1 đỉnh huỳnh quang G tại vị trí này. Mẫu DNA được dự đoán mang kiểu gene AG có 2 đỉnh huỳnh quang của A và G trùng lặp tại vị trí SNP.

Sau khi đã xác nhận được 3 mẫu chứng, chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ MgCl₂ ở bước cuối cùng nhằm tìm ra điều kiện để 3 dạng đường

cong nóng chảy tách biệt rõ ràng nhất. Các mẫu DNA đại diện cho 3 kiểu gen của rs10941679 được khảo sát sự tách biệt với nồng độ MgCl₂ từ 2,5 – 3,5 mM (Hình 10). Với nồng độ 2,5 mM, ba dạng đường cong nóng chảy có sự trùng lặp trong nhiều giai đoạn của quá trình tách mạch (Hình 10A,B,C). Ở nồng độ 3,5 mM, khoảng cách giữa 2 đỉnh AA và GG là 0,6 °C, thấp hơn 0,1°C so với ở nồng độ 3,0 mM (Hình 10 E,H). Bên cạnh đó, tại nồng độ 3,0 mM, hình dạng của đường cong nóng chảy cho kiểu gen AG có sự tách biệt rõ ràng nhất so với kiểu gen AA và GG. Do đó, nồng độ 3,0 mM MgCl₂ là nồng độ tối ưu cho phân tích HRM của SNP rs10941679. Đồng thời, khoảng nhiệt độ tách mạch cũng được xác định tại nồng độ này trong khoảng 72 – 78 °C. Thông tin trên giúp tiết kiệm thời gian tiến hành phân tích HRM trong các bước phía sau.



Hình 9. Xác nhận 3 kiểu gen của SNP rs10941679 từ 3 mẫu DNA ứng viên

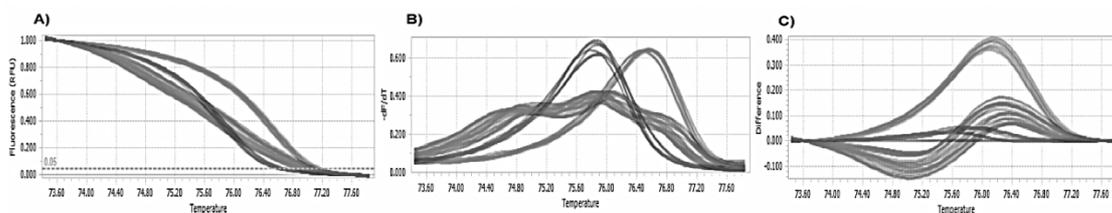


Hình 10. Tối ưu nồng độ $MgCl_2$ cho phân tích HRM rs10941679. A,D,G) Normalized Melting Curves; B,E,H) normalized melting peak; C,F,I) Different plot

Như vậy, các điều kiện tối ưu cho phân tích kiểu gene của SNP rs10941679 bằng phương pháp HRM đã được xác nhận, với các thông số như sau: Thành phần phản ứng HRM bao gồm: LightCycler@480 High Resolution Melting Dye 1X; mỗi xuôi và mỗi ngược 0,2 μM mỗi loại; DNA 30 ng; $MgCl_2$ 3,0 mM; H_2O cho đủ 6 μL . Thông số chu trình nhiệt HRM như sau: 95 °C trong 300 giây; tiếp theo bởi 40 chu kỳ bao gồm: 95 °C trong 30 giây, 58 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây; tiếp theo bởi 1 chu kỳ HRM bao gồm: 95 °C trong 90 giây, 40 °C trong 60 giây, 72 °C trong 30 giây và đọc liên tục ở 78 °C; kết thúc bằng bước làm nguội ở 37 °C trong 30 giây.

Tầm soát kiểu gene và alen của rs10941679

200 mẫu DNA đã được xác định kiểu gene bằng phương pháp HRM đã tối ưu trước đó, bao gồm 100 mẫu DNA từ người mắc ung thư vú và 100 mẫu DNA người không mắc bệnh. Kết quả phân tích cho thấy 200 mẫu DNA trên phân bố vào 3 dạng đường cong nóng chảy đại diện cho ba kiểu gen; đồng thời không có sự xuất hiện của các dạng đường cong nóng chảy khác (Hình 11). Tần số allele nguy cơ G trong quần thể người bệnh ung thư vú chiếm 48,5 %; trong khi đó ở quần thể người không mắc bệnh là 54,0 % (Bảng 2).



Hình 11. Kết quả xác định kiểu gen của rs10941679. A) Normalized Melting Curves; B) Normalized Melting Peak; C) Different Plot (1) AA; (2) GG; (3) AG

Bảng 2. Kết quả xác định kiểu gen của rs10941679

Nhóm	Kiểu gen			Alen		HW P
	AA	AG	GG	A	G	
Bệnh	29 %	45 %	26 %	51,5 %	48,5 %	-
Chứng	23 %	46 %	31 %	46,0 %	54,0 %	0,46

HWP : mức ý nghĩa cân bằng quần thể Hardy-Weinberg

Phân tích mối liên hệ giữa rs1094167 và bệnh ung thư vú

Phân tích HW trên nhóm mẫu chứng có giá trị P là 0,46 (Bảng 2) cho thấy tần số kiểu gen và allele của SNP rs10941679 duy trì ổn định qua các thế hệ. Như vậy, việc phân tích mối liên hệ giữa SNP trên và ung thư vú có thể được tiến hành phân tích với độ chính xác cao. Do sự đóng góp của alen mang nguy cơ thấp hơn ở nhóm

bệnh và nhiều hơn ở nhóm chứng so với allele không mang nguy cơ, nên giá trị OR khi phân tích trên alen là 0,80 (Bảng 3). Tuy nhiên, kết quả này lại không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P_G = 0,27$). Bên cạnh đó, kiểu gen của điểm đa hình trên cũng không cho thấy có sự liên quan đến ung thư vú ở người Việt Nam ($PGG/GA = 0,56$). Độ tin cậy (power) của nghiên cứu cũng được xác nhận với 12,02 %.

Bảng 3. Phân tích mối liên hệ giữa SNP rs1041679 và ung thư vú

Allele *	Tần số allele (%)**		OR [95% CI]	P_G	$P_{GG/GA}$	Power
	Nhóm bệnh	Nhóm chứng				
G/A	48,5	54,0	0,80 [0,54 – 1,19]	0,27	0,56	12,02 %

* Allele mang nguy cơ/ allele wild-type; ** Tần số allele nguy cơ

P_G và $P_{GG/GA}$ được tính toán dựa vào hồi quy tuyến tính

Bảng 4. Ước lượng cỡ mẫu (ca/chứng)

Tần số allele mang nguy cơ G trong nhóm chứng	OR	Độ tin cậy		
		70 %	80 %	90 %
54,0 %	0,8	994	1264	1691

Ước lượng cỡ mẫu sử dụng

Để khẳng định mối liên quan giữa rs10941679 với ung thư vú ở người Việt Nam một cỡ mẫu lớn hơn cần được phân tích nhằm cung cấp thông tin cho việc nghiên cứu sâu hơn

về chức năng sau này. Ước lượng số lượng mẫu ca/chứng dựa theo thông số về tần số (54 %) và OR (0,8) đã bước đầu tìm thấy trong nghiên

cứu này. Kết quả cho thấy để đạt được độ tin cậy từ 80 % trở lên thì số lượng mẫu phải trên 1000 (Bảng 4). Để chứng minh rằng kết quả về mối liên quan nghịch của SNP này và bệnh ung thư vú ở người Việt Nam trong cứu này là chính xác đến 90 % thì số mẫu phải lên đến 1691 ca/chứng.

THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát bước đầu mối liên hệ giữa rs10941679 và bệnh ung thư vú ở người Việt Nam với công cụ tầm soát kiểu gen là phương pháp PCR HRM. Đây là một phương pháp xác định kiểu gen với độ phân giải cao, có thể phân biệt được các trình tự DNA chỉ khác nhau 1 nucleotide dựa vào kết quả phân tích nhiệt độ nóng chảy (T_m) của sản phẩm PCR. Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu này cho sản phẩm khuếch đại có chiều dài 90 bp. Đây là kích thước thích hợp cho phương pháp HRM. Độ dài của sản phẩm PCR ảnh hưởng rất lớn đến khả năng phân biệt ba kiểu gen. Với chỉ 1 nucleotide khác biệt tại vị trí đa hình, sản phẩm PCR càng dài thì tỉ lệ khác biệt đóng góp vào tổng T_m của sản phẩm càng không đáng kể, do đó gây khó khăn trong việc phân biệt đường cong nóng chảy của ba kiểu gen. Bên cạnh đó, độ đặc hiệu và sự hình thành các cấu trúc thứ cấp của mồi cũng ảnh hưởng kết quả phân tích kiểu gen với HRM. Nếu có sự hiện diện của sản phẩm không đặc hiệu hoặc các cấu trúc thứ cấp của mồi, đường cong nóng chảy đại diện cho ba kiểu gen của SNP sẽ không còn chính xác.

$MgCl_2$ là (cofactor) đồng yếu tố của enzyme *Taq polymerase* trong quá trình kéo dài mạch; đồng thời giúp ổn định mạch DNA bằng liên kết ion với các gốc phosphate trên mạch, từ đó giúp quá trình tách mạch khi tăng nhiệt độ ở bước HRM diễn ra ổn định hơn [21]. DMSO là tác nhân hóa học với khả năng phá vỡ liên kết hydrogen giữa guanine và cytosine, từ đó làm giảm T_m của đoạn DNA [22]. Hai nhân tố này thường được sử dụng để thử nghiệm dự đoán điều kiện HRM cho các cặp mồi thiết kế. Với

nhận định ban đầu về điều kiện tối ưu của phương pháp HRM *in silico*, nồng độ 2,0 mM $MgCl_2$ và 0 % DMSO được lựa chọn. Tuy nhiên, trong điều kiện *in vitro*, 3,0 mM lại là nồng độ tối ưu cho sự tách biệt rõ ràng nhất của 3 dạng đường cong nóng chảy đại diện cho 3 kiểu gen của rs10941679. Mặc dù điều kiện dự đoán có khác biệt với điều kiện thực tế nhưng phần mềm Umelt là công cụ hỗ trợ đắc lực cho việc bắt đầu tối ưu điều kiện thực tế, giúp giảm số lượng phân ứng tối ưu trong một số trường hợp.

Kết quả tầm soát kiểu gen của rs10941679 cho thấy alen nguy cơ G xuất hiện thường xuyên hơn ở nhóm chứng với 54,0 %, nhưng lại ít xuất hiện hơn ở nhóm bệnh (48,5 %), và do đó, OR phân tích trên allele mang giá trị là 0,80; tuy nhiên, kết quả này lại không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P_G = 0,27$). Thêm vào đó, kiểu gen cũng không cho thấy có sự tương quan với ung thư vú ($P_{GG/GA} = 0,56$).

SNP rs10941679 (A/G) hiện diện ở thượng nguồn gen *MRPS30*, (gen tham gia vào quá trình apoptosis của tế bào) [7, 8], đã được nhận thấy có liên quan đến ung thư vú ở các quần thể người Mỹ và Châu Âu [9, 10]. Trong nghiên cứu của Stacey và cs (2008) trên 5028 bệnh nhân ung thư vú và 32090 người không mắc bệnh tại Châu Âu, allele G của rs10941679 được nhận thấy có liên quan chặt chẽ với ung thư vú (OR=1,19; 95 % CI = 1,13 – 1,26; $P = 2,9 \times 10^{-11}$) [10]. Mối liên hệ của SNP trên với ung thư vú cũng được xác nhận thông qua nghiên cứu của Campa và cs (2011) trên 8576 bệnh nhân và 11892 người không mắc bệnh ở quần thể người Mỹ và Châu Âu (OR=1,12; 95 % CI = 1,07 – 1,17; $P = 5 \times 10^{-7}$) [9]. rs10941679 cũng cho thấy có liên quan chặt chẽ đến các khối u dương tính với PR (OR=1,16; 95 % CI = 1,12 – 1,20; $P = 10 \times 10^{-18}$) [11] và người có đột biến *BRCA2* (OR = 1,09; 95 % CI = 1,01 – 1,19; $P = 0,032$), chứ không phải trên những người có đột biến *BRCA1* [12].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, rs10941679 không cho thấy có sự liên quan với ung thư vú ở người Việt Nam khi phân tích trên bộ mẫu 100 ca/chúng. Cỡ mẫu nhỏ chính là một hạn chế trong nghiên cứu này nhằm phát hiện sự tương quan giữa việc xuất hiện allele nguy cơ và sự phát triển của bệnh ung thư vú. Tuy nhiên, trong một số nghiên cứu được tiến hành với cỡ mẫu lớn hơn trên quần thể người Trung Quốc và người Mỹ gốc Phi, điểm đa hình trên cũng cho thấy không có sự liên hệ đến ung thư vú [13, 15]. Trong nghiên cứu của Zheng và cs (2010) trên 3039 bệnh nhân ung thư vú và 3082 người không mắc bệnh, rs10941679 được nhận thấy không liên quan đến ung thư vú ($P = 0,097$) [13]. Kết quả trên cũng tương đồng với nghiên cứu của Long và cs (2010) khi tiến hành trên 6498 bệnh nhân và 3999 người không mắc bệnh ($P = 0,07$) [14]. Ở quần thể người Mỹ gốc Phi, điểm đa hình trên cũng cho thấy không có sự liên hệ với ung

thư vú ($P = 0,11$) [15]. Những thông tin ở trên cho thấy rằng mối liên hệ giữa rs10941679 và ung thư vú là đặc trưng cho từng quần thể, dân tộc. Trong quần thể người Việt Nam, SNP này không thể hiện sự liên quan. Mặc dù độ tin cậy của việc không liên quan này chỉ đạt 12,02 % nhưng chúng tôi không kiến nghị tiếp tục nghiên cứu SNP trong các nghiên cứu sắp tới vì để khẳng định đến 90 % về kết luận không liên quan này cần được tiến hành trên bộ mẫu khá lớn 1691 ca/chúng (Bảng 4) với nhiều chi phí và khả năng tìm được mối liên quan là rất thấp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.01-2013.09. Ngoài ra, chúng tôi cũng xin cảm ơn Bệnh viện Ung bướu Tp. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho nhóm nghiên cứu được tiến hành thu nhận mẫu máu.

Optimizing the PCR HRM for initial study of the association between rs10941679 and breast cancer in Vietnamese population

- Phan Thanh Phát
- Cao Thi Da Lan
- Nguyen Thi Tuyet Lan
- Nguyen Thi Ngoc Thanh
- Nguyen Thi Hue

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

As the second most popular cancer in the world, breast cancer affects millions of people and causes a large number of deaths every year. Identifying the genetic marker is one of approaches of early diagnosis for following cancer and give a correct treatment. Many recent studies have shown several SNPs including rs10941679 (located at the upstream of MRPS30 gene) are strongly associated with breast cancer

in European and other populations. The association between rs10941679 and breast cancer in Vietnamese population has been investigated in this study using High Resolution Melt (HRM) method as a tool for genotyping. HRM was designed on Umelt software and was optimized based on annealing temperature and $MgCl_2$ concentration gradient in order to have 3 distinct melting curves from 3 genotypes of

rs10941679. The optimal HRM conditions were selected with $T_m=58^\circ\text{C}$ and $\text{MgCl}_2=3.0\text{ mM}$ and 100 Cases/control samples were genotyped by the optimal HRM condition. The results showed that the frequency of the risk allele G in case and control group were 48.5 % and 54.0 %, respectively. Regression analysis on the presence of the risk allele and risk allele-containing genotypes has shown no association between rs10941679 and breast cancer in Vietnamese

population ($OR = 0.80$; $95\% CI = [0.54 - 1.19]$; $P_G = 0.27$; $PGG/GA = 0.56$). The power of this result was estimated to be 12.02 %. To obtain the power up to 90 %, the sample size up to 1691 cases/controls is needed. Due to its low possibility in the association with breast cancer in Vietnamese population, rs1094169 is not recommended for further study in finding the genetic for markers cancer in Vietnamese population.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [2]. GLOBOCAN 2012, Estimated incidence, mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [cited 2015 August 10th]; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (2012).
- [3]. N.H. Lan, W. Laohasiriwong, J.F. Stewart, Survival probability and prognostic factors for breast cancer patients in Vietnam. *Glob Health Action*, 6, 1-9 (2013).
- [4]. GLOBOCAN 2012, Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. [cited 2015 August 12th]; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (2012).
- [5]. S.P. Leong et al., Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J Surg*, 34, 10, 2308 – 24 (2010).
- [6]. P.M. Campeau, W.D. Foulkes, M.D. Tischkowitz, Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*, 124, 1, 31–42 (2008).
- [7]. P.D. Pharoa et al., Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*, 31,1, 33-6 (2002).
- [8]. K.E. Cavdar et al., A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett*, 492, 1-2, 166 –70 (2001).
- [9]. L.Sun et al., A novel 52 kDa protein induces apoptosis and concurrently activates c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mouse C3H10T1/2 fibroblasts. *Gene*, 208, 2,157–66 (1998).
- [10]. D. Campa et al., Interactions between genetic variants and breast cancer risk factors in the breast and prostate cancer cohort consortium. *J Natl Cancer Inst*, 103,16, 1252 – 63 (2011).
- [11]. S.N. Stacey et al., Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet*, 40, 6, 703-6 (2008).
- [12]. R.L. Milne et al., Confirmation of 5p12 as a susceptibility locus for progesterone-receptor-positive, lower grade breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 10, 2222-31 (2011).
- [13]. A.C. Antoniou et al., Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res*, 70, 23, 9742-54 (2010).
- [14]. W. Zheng et al., Genetic and clinical predictors for breast cancer risk assessment and stratification among Chinese women. *J Natl Cancer Inst*, 102, 13, 972-81 (2010).
- [15]. J. Long et al., Evaluation of breast cancer susceptibility loci in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19, 9, 2357-65 (2010).
- [16]. E.A. Ruiz-Narvaez et al., Genetic variants on chromosome 5p12 are associated with risk of breast cancer in African American women: the Black Women's Health Study. *Breast Cancer Res Treat*, 123, 2, 525-30 (2010).
- [17]. C.T. Wittwer et al., High-resolution genotyping by amplicon melting analysis

- using LCGreen. *Clin Chem*, 49, 6, Pt 1, 853-60 (2003).
- [18]. M. Liew et al., Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*, 50, 7, 1156-64 (2004).
- [19]. Z. Vali et al., Development of a high-resolution melting analysis method based on sybr green-i for rs7216389 locus genotyping in asthmatic child patients. *Avicenna J Med Biotechnol*, 6, 2, 72– 80 (2014).
- [20]. N.T. Hue, et. al., Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hairs roots.: *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 2, (2012).
- [21]. C. Yu et al., A likelihood ratio test of population Hardy-Weinberg equilibrium for case-control studies. *Genet Epidemiol*, 33, 3, 275 – 80 (2009).
- [22]. S.M. Michael McPherson, *PCR (THE BASICS (Garland Science))*. 2nd ed.: Taylor & Francis Group (2006).
- [23]. M.A. Jensen, M. Fukushima, R.W. Davis, DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*, 5, 6, e11024 (2010).