

CHẨN ĐOÁN BỆNH THỪA SẮT BẰNG KỸ THUẬT RFLP*DIAGNOSIS OF HEMOCHROMATOSIS BY RFLP TECHNIQUE***TRƯƠNG THẾ QUANG^(*)**

TÓM TẮT: Tách chiết DNA theo quy trình chuẩn của Bộ môn Hóa sinh và Sinh học phân tử, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh từ máu người đạt kết quả tốt. Tối ưu hóa thành công phản ứng PCR khuếch đại trình tự gene HFE với độ chính xác 5 ng/μl. Xác định điểm đột biến C282Y tại vị trí nucleotide 845 trên trình tự gene HFE bằng kỹ thuật RFLP với enzyme cắt giới hạn RsaI. Xây dựng thường quy xét nghiệm chẩn đoán bệnh thừa sắt đột biến thể đồng hợp C282Y. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học trong nghiên cứu dịch tễ học và chẩn đoán bệnh thừa sắt ở người Việt Nam.

Từ khóa: bệnh thừa sắt; gene HFE; điện di; kỹ thuật RFLP.

ABSTRACT: DNA extraction according to the standard procedure of Biochemistry and Molecular Biology Department, Pham Ngoc Thach Medical University, Ho Chi Minh City from the samples of human blood has achieved good results. PCR reactions have been optimized successfully to amplify HFE gene sequence with the accuracy of 5 ng/μl. Position of C282Y mutation at nucleotide 845 of HFE gene sequence has been determined by RFLP technique with RsaI restriction enzyme. Diagnostic procedure for C282Y mutant hemochromatosis has been established. The results of research are scientific basis for research of epidemiology and diagnosis of hemochromatosis for Vietnamese people.

Key words: Hemochromatosis; HFE gene; electrophoresis; RFLP technique.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắt (Fe) là nguyên tố kim loại phổ biến trên trái đất. Ở người, sắt là một trong những chất dinh dưỡng vi lượng có vai trò quan trọng bậc nhất, sắt là thành phần quan trọng của hemoglobin, myoglobin và một số enzyme oxy hóa khử như catalase, peroxydase, các cytochrom. Gan là nơi dự trữ sắt chính trong cơ thể, chiếm 1/3 tổng lượng sắt dự trữ trong cơ thể. Trong điều kiện sinh lý, phần lớn sắt nằm trong tế bào gan, một lượng nhỏ nằm trong tế bào của

hệ liên võng nội mô trong gan. Tế bào gan lấy sắt qua những con đường khác nhau, sắt gắn với transferrin, sắt trong hem và vận chuyển vào trong tế bào bởi hemopexin, sắt trong hemoglobin tạo phức hợp với haptoglobin, sắt gắn với chất gấp có trọng lượng phân tử thấp và sắt trong ferritin. Khác với hồng cầu, tế bào gan nhận sắt từ phức hợp transferrin Fe³⁺ thông qua TfR 2 (Transferrin Receptor 2), cơ chế này không được điều hòa bởi nồng độ sắt trong tế bào mà được điều hòa bởi sự thiếu nhóm yếu tố

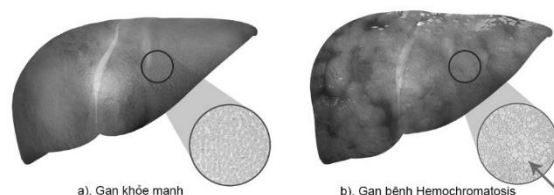
^(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, truongthequang@vanlanguni.edu.vn, Mã số: TCKH12-19-2018

đáp ứng sắt IRE (Iron Responsive Element) trên vùng 3' của mRNA (messenger Ribonucleic Acid). Điều này đã giải thích, tại sao tế bào gan bị quá tải sắt trong bệnh thừa sắt. Mỗi tế bào gan có 3.10^4 vị trí gắn với sắt. Cơ chế nhận sắt từ ferritin bị ức chế bởi chất gấp sắt và được tăng cường bởi ascorbate, chloroquin ức chế nhận sắt của tế bào gan, acid ascorbic ức chế sắt thoái giáng của ferritin [7, tr.28-43].

Bệnh thừa sắt (Hemochromatosis) là bệnh lý rối loạn hấp thu sắt do đột biến gene HFE (Hereditary Hemochromatosis) [15], TfR 2, ferroportin-1, và hepcidine. Đột biến gene HFE nằm trên nhiễm sắc thể số 6 đã tạo ra protein HFE bất thường gây ra thay đổi trong tương tác giữa HFE với hepcidine do vậy cơ thể tăng hấp thu sắt [1, tr.159-169]. Khi quá tải sắt, sắt trong huyết thanh tăng 10 đến 15 lần, dẫn đến phân bố lại sắt trong các tế bào của nhiều cơ quan. Khả năng mang sắt của transferrin rất cao dẫn đến ngộ độc sắt, nhưng khi các vị trí gắn sắt của transferrin đã bão hòa hết, sắt sẽ gắn không đặc hiệu với các chất khác như albumin, citrate, amino acid và đường. Những tế bào ngoài hồng cầu, đặc biệt là gan, tuyến nội tiết, thận và tim thường có ưu thế nhận sắt từ con đường không phụ thuộc transferrin. Những hồ sắt này sẽ liên quan đến tạo ra các dẫn xuất oxy hóa có hại, phá hủy các tổ chức sống gây nên các chứng bệnh như xơ gan, ung thư biểu mô tế bào gan, tiểu đường, suy tim, bất lực, viêm khớp, cuối cùng sẽ dẫn đến tử vong nếu không có phương pháp điều trị kịp thời [4], khi độ bão hòa sắt trên 45% sẽ làm tăng nguy cơ bị ung thư [7, tr.28-43]. Bệnh thừa sắt là nguyên nhân gây xơ gan và làm tăng đáng

kể nguy cơ phát triển ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào gan là một trong ba bệnh ung thư phổ biến ở Việt Nam và bệnh có tỷ lệ tử vong rất cao làm 17.000 người chết mỗi năm [13].

Cho tới nay, chưa có một nghiên cứu cụ thể nào ở Việt Nam nghiên cứu về bệnh này trong dân số, cũng như chưa có một kỹ thuật nào xác định chính xác các bất thường di truyền ở cấp độ phân tử trên bệnh nhân có những biểu hiện thừa sắt trong cơ thể. Điều này làm cho công tác chẩn đoán các trường hợp mắc bệnh thừa sắt trở nên khó khăn hơn. Vì thế, nghiên cứu quy trình chẩn đoán bệnh thừa sắt bằng kỹ thuật đa hình chiều dài các đoạn DNA (DeoxyriboNucleic Acid) bởi enzyme cắt giới hạn RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là cần thiết. Hy vọng kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp những thông tin hỗ trợ cho công tác dịch tễ học và chẩn đoán bệnh thừa sắt trong cộng đồng người Việt Nam.



Hình 1. Gan khỏe mạnh và gan bệnh Hemochromatosis [17]

2. CÁC ĐỘT BIẾN LIÊN QUAN ĐẾN GENE HFE

Bệnh thừa sắt là bệnh di truyền lặn nằm trên nhiễm sắc thể thường và sự kết hợp sinh bệnh chính nằm ở phức hợp gene HLA-A3 nhóm 1 nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 và gene chịu trách nhiệm chính là gene HFE [6].

Protein HFE là một protein xuyên màng có mặt ở tế bào ruột non và các tế bào gan, được cấu tạo từ 348 amino acid. Hầu hết protein này nằm ở ngoại bào, gồm phần ngoài màng $\alpha 1$ và $\alpha 2$ tác động TfR, phần xuyên màng $\alpha 3$ liên kết với β -2 microglobulin quan trọng trong điều hòa hấp thu sắt và phần bên trong màng.

2.1. Đột biến C282Y

Được phát hiện lần đầu tiên năm 1996, đây là đột biến quan trọng nhất trên gene HFE. Tại vị trí nucleotid 845 của gene HFE, G (Guanine) bị biến đổi thành A (Adenine), làm cho amino acid thứ 282 là cysteine bị thay thế thành tyrosine. Chính sự thay đổi này đã phá hủy sự hình thành cầu nối disulfide. Do đó, vùng $\alpha 3$ không thể liên kết với β -2 microglobulin để đóng vai trò như một nhân tố ổn định sự hấp thu sắt. Kết quả là các protein HFE đột biến bị suy thoái trước khi nó có cơ hội kết hợp vào các màng tế bào [18]. Tế bào trở nên quá tải sắt khi không có protein HFE vì chức năng ngăn chặn việc điều tiết lưu lượng sắt vào tế bào chất trong tế bào bị hạn chế [11]. Theo thời gian, tình trạng quá tải sắt trong các tế bào này có thể gây tổn hại mô và cơ quan, xuất hiện các triệu chứng và biến chứng nghiêm trọng [18].

Biểu hiện bệnh thừa sắt chỉ xảy ra trong 70% trường hợp mang gene đồng hợp C282Y, và trong đó có khoảng 10% những trường hợp đồng hợp C282Y này sẽ phát triển bệnh mạnh mẽ, lượng sắt tích trữ nghiêm trọng trong các mô, các cơ quan [4].

Một lưu ý rằng, có khoảng từ 85% đến 90% bệnh nhân thừa sắt mang kiểu gene đồng hợp C282Y, bên cạnh đó có một số nhỏ những người mang kiểu gene dị hợp, nghĩa là một allele là đột biến C282Y và một

allele là đột biến H63D hoặc đột biến S65C. Như vậy, từ 10% đến 15% số bệnh nhân thừa sắt còn lại sẽ mang những đột biến khác không liên quan đến gene HFE [4].

2.2. Đột biến H63D

Đột biến thứ hai là H63D phổ biến rộng rãi hơn đột biến C282Y [8, tr.275-278], trong đó C (Cytosine) bị thay đổi thành G ở vị trí nucleotide 187 của gene HFE. Kết quả, amino acid thứ 63 là histidine bị thay thế thành aspartate. Đột biến này có thể ảnh hưởng đến sự tương tác của vùng $\alpha 2$ trên protein HFE với các thụ thể transferrin, do đó ngăn chặn sự điều hòa hấp thu sắt trong cơ thể [14].

Khi có mặt C282Y để tạo thành kiểu dị hợp C282Y/H63D, thì H63D chỉ dẫn đến thể bệnh nhẹ [2, tr.953-962]. Kiểu đồng hợp H63D này cũng ít gây bệnh thừa sắt, tuy nhiên khi kết hợp với những biến chứng như suy hồng cầu, thiếu máu tán huyết hoặc hấp thu lượng còn quá nhiều do nghiện rượu, cũng sẽ dẫn đến bệnh thừa sắt [12].

2.3. Đột biến S65C

Dạng đột biến thứ ba này ít xuất hiện hơn, trong đó A bị thay đổi thành T (Thymine) ở vị trí nucleotide 193 trên gene HFE. Kết quả serine bị thay thế thành cysteine ở vị trí 65 của sản phẩm gene HFE. Sự có mặt của C282Y cùng với S65C dẫn đến dạng bệnh nhẹ. Đột biến này ngăn chặn quá trình điều hòa sắt hiện nay vẫn chưa rõ cơ chế [14].

2.4. Các đột biến khác

Bên cạnh những đột biến C282Y, H63D và S65C, những đột biến khác đã được xác định trên gene HFE như G93R [3], I105T, Q127H [5, tr.1517-1522], E168X [9, tr.441-445] và W169X. Ảnh hưởng của những đột biến này rất hiếm gặp, vẫn cần được nghiên cứu rõ hơn.

Theo Pointon đánh giá, khoảng từ 2% đến 10% trường hợp bệnh thừa sắt là do những đột biến khác đột biến C282Y trên gene HFE [10, tr.151-162].

3. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

3.1. Mục tiêu nghiên cứu

Chẩn đoán bệnh thừa sắt bằng kỹ thuật RFLP. Kết quả nghiên cứu được ứng dụng trong xét nghiệm, chẩn đoán và tiên lượng những bệnh nhân mắc bệnh thừa sắt, đồng thời là cơ sở khoa học trong nghiên cứu dịch tễ học của bệnh thừa sắt ở người tại Việt Nam.

3.2. Nội dung nghiên cứu

Tách chiết và định lượng DNA thu được từ máu bệnh nhân. Thiết kế cặp mồi, chọn cặp mồi đặc dụng khuếch đại gene HFE và chứng nội gene β -globin bằng kỹ thuật PCR. Khảo sát điểm đột biến trên gene HFE bằng enzyme cắt giới hạn RsaI và điện di trên gel agarose 2,5%. Chẩn đoán bệnh thừa sắt bằng kỹ thuật RFLP.

4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

4.1. Tách chiết DNA

Tiến hành lấy 20 mẫu máu của 20 người nghi ngờ mắc bệnh thừa sắt, mỗi người lấy 4 ml máu ngoại biên, cho vào ống chống đông bằng EDTA 2^o/_{oo}. Sau đó, các mẫu máu sẽ được tách chiết DNA theo quy trình chuẩn của Bộ môn Hóa sinh và Sinh học phân tử, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh [16].

4.2. Định lượng DNA

Định lượng DNA bằng phương pháp hai bước sóng 260nm và 280nm, đo trên máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS 1300 Spectrophotometer (Hãng GeneQuant, Mỹ). Nồng độ DNA được tính cứ một đơn vị ở bước sóng 260nm bằng 1ng DNA/ml.

Độ tinh khiết của DNA được tính bằng tham số Ratio theo công thức (1), DNA tinh khiết ứng với Ratio nằm trong khoảng từ 1,8 đến 2,0. Nếu Ratio < 1,6 chứng tỏ mẫu bị lẫn protein hoặc Ratio > 2,0 chứng tỏ mẫu bị lẫn RNA, lúc này phải thực hiện lại quy trình tách chiết DNA.

$$\text{Ratio} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad (1)$$

Trong công thức (1), A_{260} là độ hấp thụ ánh sáng có bước sóng 260nm và A_{280} là độ hấp thụ ánh sáng có bước sóng 280nm của mẫu.

4.3. Thiết kế primers

Thiết kế primers chạy PCR bằng công cụ Primer - Blast trên NCBI (National Center for Biotechnology Information), tổng hợp primers và sàng lọc chọn primers đặc hiệu dùng để khuếch đại gene HFE, chứng nội gene β -Globin từ DNA khuôn đã được tách chiết từ mẫu máu.

4.4. Tối ưu hóa phản ứng PCR

Sự bắt cặp không đặc hiệu giữa primers và DNA mạch khuôn làm kết quả các vạch DNA khuếch đại ghi nhận được qua điện di khó ổn định. Do đó, cần phải tối ưu hóa các thành phần phản ứng PCR trước khi áp dụng để phân tích mẫu. Với mỗi thí nghiệm khảo sát nồng độ tối ưu được thực hiện lặp lại ba lần nhằm thu được kết quả ổn định trước khi thực hiện phản ứng RFLP.

4.5. Kiểm tra sản phẩm PCR

Sản phẩm DNA sau khi được khuếch đại bằng phản ứng PCR với nồng độ tối ưu của các thành phần phản ứng sẽ được kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 2,5% với dung dịch đệm TBE 0,5X trong vòng 60 phút. Sau đó, gel được ngâm trong dung dịch ethidium bromide 0,25mg/ml và

các vạch DNA sẽ được quan sát dưới đèn cực tím UV (Ultra Violet). Kích thước các đoạn DNA sẽ được xác định bằng cách so sánh với thang chuẩn 100bp.

4.6. Thực hiện phản ứng RFLP

Trong sinh học phân tử, đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn hay RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là kỹ thuật khai thác những khác biệt trong trình tự DNA. Trong phân tích RFLP, DNA mẫu được cắt thành các đoạn nhỏ bằng cách sử dụng các enzyme cắt giới hạn và sau đó các đoạn DNA nhỏ tạo thành được phân tách dựa theo kích thước bằng kỹ thuật điện di trên gel [19].

Xác định điểm đột biến C282Y trên trình tự gene HFE với enzyme cắt giới hạn RsaI bằng cách thực hiện phản ứng RFLP. Sau khi có được kết quả của quá trình tối ưu hóa PCR, lấy nồng độ tối ưu nhất ở mỗi thành phần kết hợp với thể tích nước sao cho tổng thể tích đủ 50 μ l. Hút 20 μ l sản phẩm PCR trộn với 1 μ l enzyme cắt giới hạn RsaI (10 UI) ủ trong 1 giờ ở 37°C. Đem điện di 20 μ l sản phẩm RFLP trên gel agarose 2,5%, sử dụng thang 100bp và phân tích kết quả theo bảng 1 để chẩn đoán bệnh thừa sắt.

Bảng 1. Kết quả điện di sản phẩm RFLP chẩn đoán bệnh thừa sắt [18]

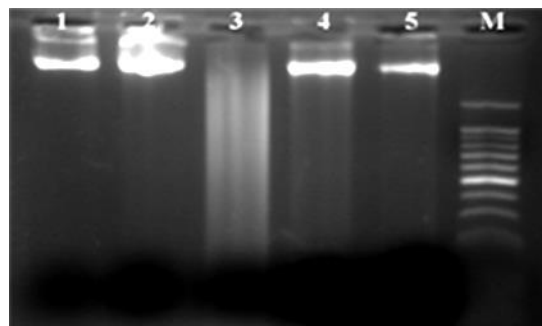
Sản phẩm RFLP	Kích thước các vạch điện di	Chẩn đoán
Chứng âm	250 + 140bp	Không bị bệnh thừa sắt
Chứng dương	250 + 111 + 29bp	Bị bệnh thừa sắt đột biến thể đồng hợp C282Y

5. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

5.1. Tách chiết và kiểm tra DNA

Tiến hành tách lấy bạch cầu và loại bỏ hồng cầu của từng mẫu máu, sau đó tách

chiết DNA và kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2,5% với M là thang đo 100bp (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di gel agarose 2,5% kiểm tra chất lượng DNA [16]

Định lượng nồng độ DNA bằng phương pháp đo hai bước sóng 260nm và 280nm. Kết quả kiểm tra, chỉ có mẫu 3 không đạt yêu cầu, các mẫu 1, 2, 4, 5 đều đạt yêu cầu (hình 2 và bảng 2).

Bảng 2. Nồng độ DNA và Ratio của các mẫu máu [16]

Mẫu	Nồng độ DNA (μ g/ml)	Ratio
1	60,00	1,9
2	75,25	1,8
3	0,25	1,7
4	66,30	1,6
5	29,80	1,7

5.2. Primers cho phản ứng PCR

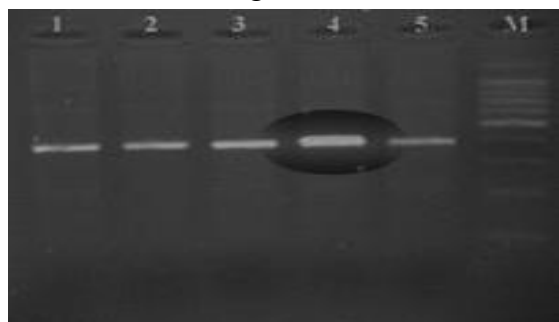
Sau khi thiết kế, tổng hợp và sàng lọc, chọn được cặp mồi (primers) đặc hiệu để khuếch đại gene HFE là G176A/B và cặp mồi đặc hiệu khuếch đại chứng nội gene β -globin là C1A/B, xem bảng 3.

Bảng 3. Primers cho phản ứng PCR khuếch đại gene HFE, gene β -globin [16]

Tên mồi	Trình tự 5' - 3'
G176A	AATCCAAATGCGGCATCTTC
G176B	TGACTTTGTACAGCCCAAGATA
C1A	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
C1B	CAACTTCATCCACGTTTACC

5.3. Tối ưu hóa phản ứng khuếch đại gene HFE bằng kỹ thuật PCR

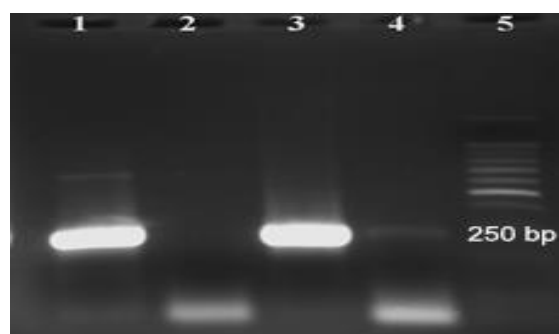
Tối ưu hóa phản ứng PCR khuếch đại gene HFE bằng phương pháp điện di. Kết quả với 25mM $MgCl_2$, 125mg mỗi G176A/B, 15mM dNTP's, 10ng DNA khuôn, 15UI taq polymerase chạy điện di trên gel agarose 2,5% thu được vạch rõ sáng nhất, xem mẫu 4 hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di gel agarose 2,5% tối ưu hóa phản ứng PCR [16]

5.4. Kiểm tra quy trình tách chiết DNA

Thực hiện phản ứng PCR với các thành phần đã tối ưu hóa với cặp mồi đặc hiệu C1A/B để khuếch đại gene nội kiểm tra, ở đây là gene β -globin có sẵn trong bộ gene người để kiểm tra quy trình tách chiết DNA từ mẫu máu có tốt hay không.



Hình 4. Điện di kiểm tra quy trình tách chiết DNA [16]

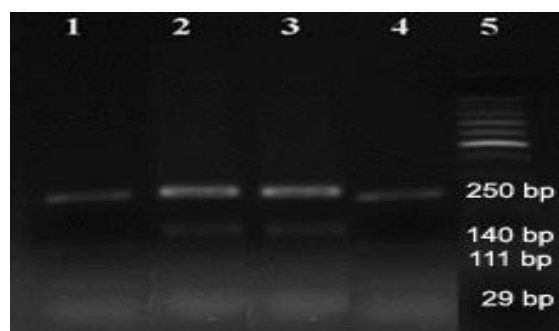
Dựa vào hình 4, cho thấy mẫu 1 và mẫu 3 là chứng dương và chứng âm, đều có gene β -globin, sản phẩm điện di xuất hiện vạch 250bp. Mẫu 2 không xuất hiện vạch nào trên bản điện di là mẫu máu tách chiết DNA tổng số không tốt, không có DNA và gene β -globin. Trong

hình 4, mẫu 1 là chứng dương để kiểm tra, mẫu 2 là mẫu máu tách chiết DNA không tốt, mẫu 3 là mẫu máu âm tính, mẫu 4 là mẫu nước cất, mẫu 5 là thang đo 100bp.

5.5. Điện di chẩn đoán bệnh thừa sắt

Trong hình 5, mẫu 1 là chứng dương để kiểm tra trùng với mẫu 4 là mẫu bệnh phẩm dương tính có đột biến thể đồng hợp C282Y thể hiện qua ba vạch 250bp, 111bp và 29bp. Mẫu 3 là chứng âm để kiểm tra trùng với mẫu 2 là mẫu bệnh phẩm âm tính thể hiện qua hai vạch 250bp và 140bp, mẫu 5 là thang đo 100bp.

Chẩn đoán bệnh nhân cho mẫu 4 bị bệnh thừa sắt đột biến thể đồng hợp C282Y, bệnh nhân cho mẫu 2 không bị bệnh thừa sắt.



Hình 5. Điện di chẩn đoán bệnh thừa sắt [16]

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

6.1. Kết luận

Tách chiết DNA theo quy trình chuẩn của Bộ môn Hóa sinh và Sinh học phân tử, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh từ máu người đạt kết quả tốt.

Tối ưu hóa thành công phản ứng PCR khuếch đại trình tự gene HFE với độ chính xác 5 ng/ μ l.

Xác định điểm đột biến C282Y tại vị trí nucleotide 845 trên trình tự gene HFE bằng kỹ thuật RFLP với enzyme cắt giới hạn RsaI.

Xây dựng quy trình xét nghiệm chẩn đoán bệnh thừa sắt đột biến thể đồng hợp C282Y.

Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học trong nghiên cứu dịch tễ học và chẩn đoán bệnh thừa sắt ở người Việt Nam.

6.2. Kiến nghị

Khảo sát phản ứng RFLP với số lượng mẫu lớn hơn để tăng sự ổn định, tính chính xác và độ tin cậy.

Cần nghiên cứu xây dựng quy trình lấy máu, tách chiết DNA đúng kỹ thuật để đảm

bảo chất lượng và độ tinh sạch của DNA, cũng như tránh nhiễm chéo trong quá trình PCR và điện di.

Mở rộng nghiên cứu về bệnh thừa sắt do đột biến C282Y đồng thời với các đột biến khác H63D, S65C, G93R, I105T, Q127H, E168X và W169X trên gene HFE.

Quy trình xét nghiệm chẩn đoán bệnh thừa sắt bằng kỹ thuật RFLP cần phải được tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện dần qua quá trình ứng dụng thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Andrews N. C. (2005), *Molecular control of iron metabolism*, Hematol 18 (2).
- [2] Bacon B. R., Olynyk J. K., Brunt E. M., Britton R. S., Wolff R. K. (1999), *HFE genotype in patients with Hemochromatosis and other liver diseases*, Ann Intern Med 15.
- [3] Barton J. C., Sawada-Hirai R., Rothenberd B. E., Action T. R. (1999), *Two novel missense mutation of the HFE gene (I105T and G93T) and identification of the S65C mutation in Alabama population*, BMC Med Genet 5:29.
- [4] Bruce R. Bacon, Paul C. Adams, Kris V. Kowdley, Lawrie W. Powell, and Anthony S. Tavill (2011), *Diagnosis and management of Hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American association for the Study of liver diseases*.
- [5] De Villiers J. N., Hillermann R., Loubser L., Kotze M. J. (1999), *Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in Hemochromatosis and porphyria*, Hum Mol Genet 8.
- [6] Fadwah Booley (2007), *Analysis of genes implicated in iron regulation in individuals presenting with primary iron overload in the South African population*, 3.
- [7] Hoffbrand A. V. (2006), *Hypochromic anemia and iron overload*, Essential Hematology.
- [8] Merryweather-Clarke A. T., Pointon J. J., Shearman J. D., Robsin K. J. (1997), *Global prevalence of putative Hemochromatosis mutations*, Med Genet Journal 34.
- [9] Piperno A., Arosio C., Fossati L., Vigano M., Trombini P., Vergani A., Mancina G. (2000), *Two novel nonsense mutations of HFE gene in give unrelated Italian patients with Hemochromatosis*, Gastroenterology 119.
- [10] Pointon J. J., et. al. (2000), *Uncommon mutations in the Hemochromatosis gene*, Genet Test 4.
- [11] Press R. D. (2002), *Hemochromatosis: A Simple Genetic Trait*, Hospital Practice (1999, accessed February 2002).

- [12] Spriggs E. L., Harris P. E., Best L. G. (1999), *Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in "cis" phase*, Am J Hum Genet 65 (supplement): A492.
- [13] Ngọc Anh (2018), *Ung thư gan: 17 nghìn người chết mỗi năm và 6 nguyên nhân cần nhớ*, <http://soha.vn/ung-thu-gan-17-nghin-nguoi-chet-moi-nam-va-6-nguyen-nhan-can-nho-20180428100647087.htm>.
- [14] Genetrack Biolabs (2017), *Just 3 simple steps*, <http://www.hemochromatosisdna.com/dna-testing/mutations-in-the-hfe-gene>.
- [15] Hemochromatosis.org (2016), *What is hemochromatosis?*, <http://www.hemochromatosis.org/hemochromatosis>.
- [16] Trương Thế Quang, Nguyễn Kim Thạch, Nguyễn Thu Hà (2012), *Xây dựng quy trình chẩn đoán Hemochromatosis nguyên phát bằng kỹ thuật RFLP*, Trường Đại học Văn Lang.
- [17] Trương Hồng Sơn (2018), *Thừa sắt (Hemochromatosis)*, <http://vienyhocungdung.vn/thua-sat-hemochromatosis-20160809143746244.htm>.
- [18] Phạm Hùng Vân (2016), *PCR và real-time PCR: Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp*, <http://www.vsmmb.com/?Bcat=31&lg=vn&start=0>.
- [19] Wikipedia (2018), *Kỹ thuật RFLP*, https://vi.wikipedia.org/wiki/K%E1%BB%B9_thu%E1%BA%ADt_RFLP.

Ngày nhận bài: 17-06-2018. Ngày biên tập xong: 05-11-2018. Duyệt đăng: 28-11-2018.