XÁC ĐỊNH KIỂU GENE*ACTN3* R577X CỦA CÁC VẬN ĐỘNG VIÊN ĐIỀN KINH VÀ BƠI LỘI Ở VIỆT NAM

PGS.TS Lê Đức Chương[1], TS.Luyện Quốc Hải[2]
[1]Trường Đại học Thể dục thể thao Đà Nẵng
[2]Công ty Cổ phần Công nghệ Sinh học Bionet Việt Nam

Tóm tắt: Vai trò của đa hình *ACTN3* R577X được chứng minh có ảnh hưởng đến thành tích thể thao của các VĐV. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tách chiết DNA tổng số từ tế bào niêm mạc miệng và đánh giá chất lượng sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau đó được xử lý bằng enzyme giới hạn *Dde*I để xác định kiểu gene *ACTN3* R577X và tần số allele của 88 vân động viên (VĐV) thuộc các đội tuyển trẻ và đội tuyển Quốc gia. Chúng tôi đã xác định tần số kiểu gene *ACTN3* R577X, tần số allele R/X của 54 VĐV điền kinh và 34 VĐV bơi lội. Kết quả nghiên cứu này sẽ được sử dụng kết hợp với các thông tin về đặc điểm thể lực và thành tích thể thao của các VĐV đã thu thập được để phân tích và đánh giá ảnh hưởng của gene *ACTN3* đến thành tích của VĐV Việt Nam. Mục đích tiếp theo của chúng tôi là tập trung nghiên cứu ứng dụng công nghệ gene trong tuyển chọn VĐV nhằm góp phần giảm thiểu chi phí trong tuyển chọn, đào tạo và nâng cao thành tích của thể thao Việt Nam.

Từ khóa: *α-actinin-3, ACTN3 R577X, allele, thành tích thể thao.*

Abstract: Functional *ACTN3*R577X polymorphism has been associated with athletic performance. In the present study, we was performed to determine the quality and the quantity of DNA extracted from buccal swabs and to estimate PCR products. The amplified fragment subsequently underwent digestion by *Dde*I to determine *ACTN3* R577X genotype and allelic frequencies of 88 Vietnamese athletes belong to young and national teams. We obtained genotype and allelic frequencies of *ACTN3* R577X from 54 running athletes and from 34 swimming athletes. Together with physical characteristics and the obtained performance, these results are used in order to analyze and evaluate the effect of *ACTN3* gene on the performance of Vietnamese athletes. Further, our target is focusing to study gene technology on selecting athletes, that aims to reduce costs of athlete selection, coaching, and enhance Vietnamese athletes's performance.

Keywords: *α-actinin-3, ACTN3 R577X, allele, athletic performance.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ gene người đã được giải mã thành công nhưng ảnh hưởng của đa hình gene đến tố chất thể thao vẫn còn nhiều điều chưa biết. Nhiều nghiên cứu có đồng quan điểm cho rằng đa hình gene α-actinin-3 (*ACTN3*) có liên quan đến thành tích thể thao đỉnh cao. α-actinin-3 chủ yếu có ở các sợi cơ co nhanh loại II, tham gia vào cấu tạo của đoạn α-actinin (thành phần chính của Z-line) (Squire, 1997). Z-line là một cấu trúc quan trọng của cơ-xương, có vai trò liên kết các sợi actin và giúp nâng đỡ, sắp xếp các sợi myosin, hỗ trợ quá trình co-duỗi của cơ (Yang *et al*., 2007). Các nhà nghiên cứu nhận thấy α-actinin-3 có thể giúp làm giảm sự tổn thương cơ bằng cơ chế co lệch tâm (Yang *et al*., 2007). Vai trò này đặc biệt quan trọng trong quá trình co-duỗi cơ nhanh.

Biến đổi C→T(rs.1815739 C/T) ở exon 16 của gene *ACTN3* làm thay đổi bộ ba mã hóa thứ 577 **C**GA (mã hóa cho Arginine, ký hiệu là allele R) thành **T**GA (mã kết thúc, ký hiệu là allele X) dẫn đến tạo ra một protein α-actinin-3 không hoàn chỉnh (North *et al*., 1999). Allele R có lợi đối với các vận động viên cần tốc độ nhờ vào cấu tạo sợi cơ co nhanh loại II trong quá trình thực hiện các động tác với cường độ cao như là chạy nước rút (Cieszczyk *et al*., 2011). Allele X có lợi cho các vận động viên cần sức bền (Roth *et al*., 2008; Chiu *et al*., 2011).

Mỗi cá thể người đều có hai bản sao của gene *ACTN3*, do vậy có 3 kiểu tổ hợp kiểu gene khác nhau: (1) XX: sự kết hợp giữa hai allele X gây ra thiếu hụt hoàn toàn α - actinin - 3, tạo ra nhiều sợi co chậm và sẽ phát huy tối đa lợi thế ở các môn thể thao đòi hỏi sức bền như marathon (Yang *et al*., 2003); (2) RX: tạo ra lượng sợi co nhanh và sợi co chậm bằng nhau; (3) RR: sự kết hợp giữa hai allele R tạo ra nhiều sợi co nhanh, phù hợp với các môn thể thao đòi hỏi sức mạnh hay tốc độ (Clarkson *et al*., 2005; Delmonico *et al*., 2007; Vincent *et al*., 2007).

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là xác định đa hình kiểu gene *ACTN3* R577X trong nhóm vận động viên điền kinh và bơi lội ở Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ mở ra một hướng mới trong việc ứng dụng công nghệ gene nhằm hỗ trợ công tác tuyển chọn vận động viên, giúp góp phần giảm thiểu chi phí trong tuyển chọn, đào tạo và nâng cao thành tích của thể thao Việt Nam.

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu tế bào niêm mạc miệng của 54 vận động viên điền kinh và 34 vận động viên bơi lội thuộc đội tuyển quốc gia và đội tuyển trẻ đang tập trung tập luyện tại ba Trung tâm Huấn luyện Thể thao Quốc gia ở thành phố Hà Nội, thành phố Đà Nẵng và thành phố Hồ Chí Minh. Tất cả các đối tượng nghiên cứu đều đã được xác minh không có quan hệ huyết thống. Bảng thành tích thể thao của các đối tượng nghiên cứu cũng được thu thập để phục vụ cho việc phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA

DNA tổng số của các đối tượng nghiên cứu được tách chiết từ mẫu tế bào niêm mạc miệng bằng bộ Kit Buccal Swab DNA Extraction (GeneShun, Trung Quốc) và các hướng dẫn đi kèm.

Phản ứng PCR

Đoạn exon 16 của gene *ACTN3* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 2ACTN3-F và 2ACTN3-R. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: 95^{o}C trong 5 phút, 95^{o}C trong 60 giây, 62^{o}C trong 90 giây, 72^{o}C trong 45 giây, lặp lại 35 lần từ bước 2, 72^{o}C trong 10 phút, giữ ở 4^{o}C. Sản phẩm PCR được giữ ở -20^{o}C đến khi sử dụng.

Phân tích đa hình gene

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR and DNA Fragment Purification Kit (GeneShun, Trung Quốc). Kiểu gene *ACTN3* R577X được xác định bằng phương pháp phân tích RFLP, sử dụng enzyme cắt giới hạn *Dde*I (BioLabs, Mỹ), các điều kiện của phản ứng cắt enzyme giới hạn được tiến hành theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Sản phẩm cắt giới hạn sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 3% (Code: V3841, Promega). Xác định kiểu gene của từng đối tượng dựa vào kết quả điện di.

Xác định trình tự gene ACTN3 R577X

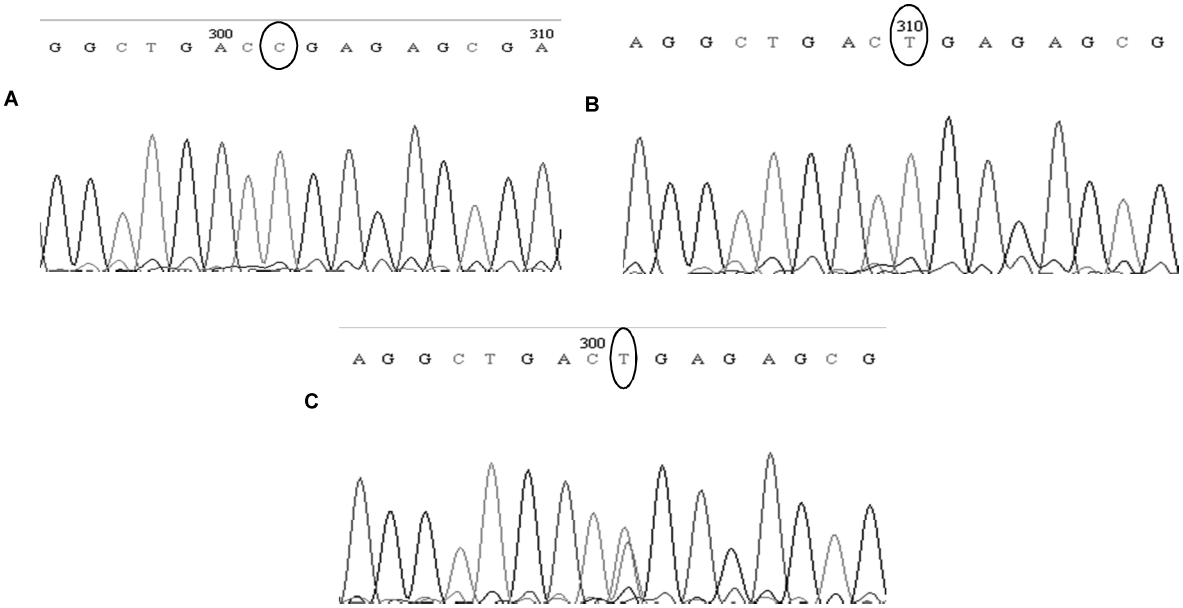
Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự tại MCLAB (Mỹ) nhằm kiểm tra lại đa hình R577X sau khi được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP. Phân tích trình tự thu được bằng phần mềm BioEdit V7.0.9.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Xác định đa hình kiểu gene *ACTN3* R577X bằng giải trình tự

Để kiểm chứng lại đa hình *ACTN3* R577X của từng mẫu, chúng tôi tiến hành tinh sạch lượng lớn sản phẩm PCR và xác định trình tự gene tại công ty MCLAB (Mỹ). Kết quả được minh họa đại diện (Hình 1A, 1B, 1C).

Từ kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu B11 cho 2 băng với kích thước: 429 bp và 200 bp. Phân tích trình tự của mẫu B11 cho thấy xuất hiện một đỉnh nucleotide C rất rõ ràng (Hình 3A). Như vậy, không có biến đổi C→T ở vị trí này. Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gene *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu B11 được xác định là RR.



Hình 1. Kết quả giải trình tự DNA: *A. mẫu B11; B. mẫu B9; C. mẫu K19*

Khi có biến đổi C→T, enzyme *DdeI* sẽ nhận biết thêm 1 vị trí cắt và cắt đoạn gene tại 2 vị trí, trong trường hợp xảy ra ở cả hai bản sao của gene thì sẽ có 3 đoạn DNA có kích thước: 332 bp, 200 bp và 97 bp. Từ kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu B9 cho 3 băng với kích thước: 332 bp, 200 bp và 97 bp. Khi phân tích trình tự của mẫu B9 cho thấy một đỉnh nucleotide T rất rõ ràng (Hình 1B). Như vậy, biến đổi C→T xuất hiện ở cả 2 bản sao. Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gene *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu B9 được xác định là XX.

Khi biến đổi C→T xảy ra ở một trong hai bản sao của gene, enzyme *Dde*I sẽ nhận biết thêm 1 vị trí cắt tại bản sao xảy ra đột biến và cắt đoạn gene này tại 2 vị trí nên ta thu được 4 đoạn DNA có kích thước: 429 bp, 332 bp, 200 bp và 97 bp. Từ kết quả điện di sản phẩm sau khi cắt enzyme cho thấy mẫu K19 cho 4 băng với kích thước: 429 bp, 332 bp, 200 bp và 97 bp. Khi phân tích trình tự của mẫu K19 cho thấy một kiểu dị hợp nucleotide C/T rất rõ ràng (Hình 1C). Như vậy, biến đổi C→T xuất hiện ở một bản sao (bản sao mang biến dị X). Hai kết quả này hoàn toàn tương đồng. Kiểu gene *ACTN3* R577X tại exon 16 của mẫu K19 được xác định là RX.

Phân tích tần số kiểu gene và tần số allele

Kết quả phân tích tần số kiểu gene/allele của *ACTN3* R577X ở 54 vận động viên điền kinh; 34 vận động viên bơi lội được trình bày ở Bảng 1.

Dựa trên việc xác định và thống kê tần số kiểu gene và tần số allele của đa hình gene *ACTN3* R577X trên các nhóm vận động viên, chúng tôi sẽ tiến hành chia nhóm, phân tích ảnh hưởng của đa hình gene *ACTN3* R577X đến thành tích thể thao của vận động viên.

Để xem xét ảnh hưởng của tần số kiểu gene ACTN3 R577X tới khả năng thể thao của các VĐV, chúng tôi tiến hành chia nhóm các đối tượng nghiên cứu thành 2 nhóm chính: (i) Nhóm 1 - nhóm VĐV thi đấu ở các môn thể thao cần lợi thế sức mạnh/sức nhanh (bao gồm các môn thi đấu: chạy <400m; bơi <200m; nhảy cao; nhảy xa; nhảy 3 bước, chạy tiếp sức 4×100m ...). (ii) Nhóm 2 - nhóm VĐV thi đấu ở các môn thể thao cần lợi thế sức bền (bao gồm các môn thi đấu: chạy >3000m; bơi >200m). Tần số kiểu gene ACTN3 R577X và tần số alen R; X giữa các nhóm nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 2:

Bảng 1. Tần số kiểu gene/allele của *ACTN3* R577X ở các vận động viên

Nhóm	Tần số kiểu gene (%)			Tần số allele (%)	
	RR	RX	XX	R	X
VĐV điền kinh (n=54)	44	43	13	66	34
VĐV bơi lội (n=34)	29	53	18	56	44

Bảng 2. Phân bố tần số kiểu gene ACTN3 R577X và tần số alen R; X trong nhóm vận động viên nghiên cứu

Nhóm	Tần số kiểu gene (%)			Tần số allele (%)	
	RR	RX	XX	R	X
Nhóm 1 (n=60)	42	15	43	63	37
Nhóm 2 (n=28)	26	53	21	53	47

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được tần số kiểu gene ACTN3 R577X, tần số allele R/X ở 88 đối tượng nghiên cứu, bao gồm 54 vận động viên điền kinh (44% RR; 43% RX; 13% XX; tần số allele R: 66%; allele X: 34%) và 34 vận động viên bơi lội (29% RR; 53% RX; 18% XX; tần số allele R: 56%; allele X: 44%).

Kết quả nghiên cứu này đã được sử dụng kết hợp với các thông tin về đặc điểm thể lực và thành tích thể thao của các vận động viên đã thu thập chia thành 2 nhóm: Nhóm VĐV thi đấu ở các môn thể thao cần lợi thế sức mạnh/sức nhanh bao gồm 60 người (tần số kiểu gene: RR42%; RX15%; XX43%; tần số allele: R 62%; allele X 38%); Nhóm 2 - nhóm VĐV thi đấu ở các môn thể thao cần lợi thế sức bền bao gồm 28 người (tần số kiểu gene: RR 26%; RX 53%; XX 21%; tần số allele R: 53%; allele X: 47%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cieszczyk P, Eider J, Ostanek M, Arczewska A, Leońska-Duniec A, Sawczyn S, Ficek K, Krupecki K (2011) Association of the ACTN3 R577X Polymorphism in Polish Power-Orientated Athletes. *J Hum Kinet 28*: 55-61.
2. Chiu LL, Wu YF, Tang MT, Yu HC, Hsieh LL, Hsieh SS (2011) ACTN3 genotype and swimming performance in Taiwan. *Int J Sports Med 32* : 476-480.
3. Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H etal (2005) ACTN3genotype is associated with increases in muscle strength and response to resistance training in women. *J Appl Physiol 99:*154-163.
4. Delmonico MJ, Kostek MC, Doldo NA etal (2007) Alpha-actinin-3(ACTN3) R577X polymorphism influences knee extensor peakpower response to strength training in older men and women. *JGerontol A Biol Sci Med Sci 62(2):*206-212.

5. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D etal (1999) A commonnonsense mutation results in alpha-actinin-3 deWciency in thegeneral population. *Nat Genet 21*:353-354
6. Roth SM, Walsh S, Liu D, Metter EJ, Ferrucci L, Hurley BF (2008) The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur J Hum Genet 16* : 391 - 394.
7. Squire JM (1997) Architecture and function in the muscle sarcomere.*Curr Opin Struct Biol 7*:247-257
8. Vincent B, De Bock K, Ramaekers M etal (2007) ACTN3 (R577X)genotype is associated with fiber type distribution. *PhysiolGenomics 32(1):*58–63
9. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP etal (2003) ACTN3 genotype isassociated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet 73*: 627–631
10. Yang N, MacArthur DG, Wolde B, Onywera VO, Boit MK, Lau SY, Wilson RH, Scott RA, Pitsiladis YP, North K (2007) The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med Sci Sports Exerc 39:* 1985 - 1988.

Bài nộp ngày 16/8/2017, phản biện ngày 23/8/2017, duyệt in ngày 24/8/2017.