

TÓI ƯU HOÁ QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH KIỂU GEN CỦA ĐA HÌNH *APOA5* rs662799 Ở TRẺ EM NAM 6 - 11 TUỔI TẠI HÀ NỘI

Nguyễn Thị Hồng Hạnh¹, Phạm Trần Phương² và Trần Quang Bình²

¹*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

²*Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, 1 Yecxanh, Hai Bà Trưng, Hà Nội*

Tóm tắt: Đa hình đơn nucleotid rs662799 thuộc gen *APOA5* được quan tâm nghiên cứu ở nhiều quần thể do có liên quan đến tăng nguy cơ mắc rối loạn chuyển hoá lipid máu, cao huyết áp, hội chứng chuyển hoá, nhồi máu cơ tim và bệnh động mạch vành. Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng phương pháp đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn để phân tích đa hình gen *APOA5* rs662799 ở quần thể người Việt Nam. Nghiên cứu này đã tối ưu hoá phương pháp phân tích đa hình *APOA5* rs662799 với enzyme *MseI* và xác định được sự phân bố tỉ lệ kiểu gen và alen ở 405 trẻ em tiểu học nam tại Hà Nội. Kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (46,3%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (14,2%). Sự phân bố kiểu gen ở quần thể nghiên cứu tuân theo quy luật cân bằng Hardy - Weinberg. Phương pháp phân tích kiểu gen và tần số gen của nghiên cứu này có thể áp dụng để phân tích mối liên quan với các bệnh trên quy mô lớn ở người Việt Nam.

Từ khóa: Gen *APOA5*, rs662799, kiểu gen, trẻ em.

1. Mở đầu

Gen *APOA5* mã hoá cho apolipoprotein A5, là thành phần cấu tạo của các lipoprotein giàu triglyceride (TG) là chylomicron, lipoprotein tỉ trọng rất thấp (VLDL) và lipoprotein tỉ trọng cao (HDL) Ở người, gen *APOA5* nằm trên nhiễm sắc thể số 11 ở vị trí 11q23 tạo thành một cụm gen cùng với gen *APOA1-C3-A4* [1, 2]. Gen *APOA5* gồm 4 exon và 3 intron, mã hóa cho phân tử protein dài 366 acid amin, được biểu hiện gần như chủ yếu ở mô gan [3]. Apoprotein A5 có vai trò trong đẩy nhanh việc loại bỏ các lipoprotein giàu TG đồng thời ảnh hưởng đến quá trình sản xuất TG ở gan hoặc ở ruột [2].

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng các biến thể trên gen *APOA5* có ảnh hưởng đến nồng độ lipid huyết tương [4], tăng nguy cơ mắc nhồi máu cơ tim [5], bệnh động mạch vành [6, 7], cao huyết áp [7] và tương tác với những thay đổi của môi trường làm tăng nguy cơ mắc bệnh các bệnh như béo phì, hội chứng chuyển hóa, đái tháo đường type 2, đột quỵ [8].

Hiện nay đã phát hiện hơn 160 đa hình đơn nucleotid (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) trên gen *APOA5* (theo www.genecards.org). Trong đó, SNP rs662799 (-1131T>C) là đa hình phổ biến nhất trên gen *APOA5*. Đây là một biến thể đa alen, nằm ở vùng promoter của gen *APOA5* có chức năng điều chỉnh dịch mã mRNA của *APOA5*. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng rs662799 có liên quan đến nồng độ TG, HDL-C [9]. Một nghiên cứu được thực hiện bởi Chunxiao Xu và cộng sự từ năm 2010 - 2011 [10] trên 1840 người Trung Quốc đã chỉ ra rằng các đối tượng mang alen C có nồng độ cholesterol tổng số và TG cao hơn đáng kể nhưng lại có nồng độ HDL-C thấp hơn so với những người mang kiểu gen đồng hợp tử T/T. Đồng thời, tác giả cũng chỉ ra rằng alen C làm tăng nguy cơ của hội chứng chuyển hóa (OR = 1,4; 95%CI = 1,15 - 1,69) [10]. Đặc biệt, rs662799 còn có liên quan đến béo phì, đến rối loạn chuyển hoá lipid máu và hội chứng chuyển hoá ở trẻ em tại một số dân tộc trên thế giới [11-14]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của SNP rs662799 đến bệnh tật ở các dân tộc, các độ

tuổi và giới tính khác nhau là khác nhau. Do đó, việc phân tích gen và xác định phân bố kiểu gen của đa hình rs662799 đặc trưng ở mỗi quần thể là cần thiết. Đã có nhiều phương pháp phân tích kiểu gen của đa hình rs662799 được ứng dụng, trong đó phương pháp chủ yếu là phương pháp đa hình chiều dài đoạn cắt PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) [6, 15-17].

Cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu về xác định kiểu gen APOA5 rs662799 tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm áp dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định kiểu gen APOA5 rs662799 trong điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam và xác định tỉ lệ kiểu gen và tỉ lệ alen của SNP này ở trẻ em tiểu học nam tại Hà Nội

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

* Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 405 học sinh từ 6 - 11 tuổi được lựa chọn ngẫu nhiên từ 29 trường tiểu học trên địa bàn Hà Nội. Trẻ được lựa chọn vào nghiên cứu không mắc các bệnh cấp tính hoặc các bệnh mãn tính như lao, HIV/AIDS... Các đối tượng chỉ được lấy máu khi có sự đồng ý của cha mẹ hoặc người giám hộ. Đề tài đã được Hội đồng Y đức của Viện dinh dưỡng thông qua

* Phương pháp tách chiết ADN

Các mẫu máu được đựng trong ống chống đông bằng EDTA. ADN được tách từ bạch cầu máu ngoại vi bằng bộ kit Wizard® Genomic ADN Purification (Promega Corporation, USA).

* Phản ứng PCR

Phản ứng PCR dùng để khuếch đại đoạn gen chứa SNP rs662799 sử dụng đoạn mồi oligonucleotide được thiết kế bởi nhóm nghiên cứu của chúng tôi Trình tự mồi xuôi và mồi ngược lần lượt là: APOA5-rs662799F: 5'-GATTGATTCAAGATGCATTTAGGAC-3' và APOA5-rs662799R: 5'-CCCCAGGAAGCTGGAGCGAAAATT-3'

Thành phần của phản ứng PCR gồm 3,5 μ L nước tinh sạch; 7,5 μ L master mix Dream Taq Green (thành phần chứa: 0,4 mM Dream Taq ADN polymerase; 0,4 mM 2X Dream Taq Green buffer; 0,4 mM dATP; 0,4 mM dCTP; 0,4 mM dGTP; 0,4 mM dTTP và 4 mM $MgCl_2$); 10 pmol mồi mỗi loại; 2 μ L ADN trong tổng thể tích là 15 μ L. Hỗn hợp phản ứng được biến tính ở nhiệt độ 94 °C trong 3 phút; tiếp theo 34 chu kỳ ở 95 °C trong 30 giây; giai đoạn bắt mồi trong 30 giây được thực hiện ở 4 nhiệt độ khác nhau: 53 °C, 56 °C, 59 °C, 62 °C; giai đoạn kéo dài ở 72 °C trong 30 giây, giai đoạn ủ ở nhiệt độ 72 °C trong 8 phút. 5 μ L sản phẩm PCR 188bp được điện di trên gel agarose 2,5% ở 100V trong 25 phút, nhuộm với Redsafe để kiểm tra.

* Cắt với enzyme giới hạn

Enzyme giới hạn *MseI* để phân biệt các kiểu gen được xác định bằng phần mềm online tại <http://www.restrictionmapper.org>. 5 μ L sản phẩm PCR được sử dụng để ủ với enzyme *MseI* (Thermo Corporation, USA) ở 2 nồng độ khác nhau: 0,04 μ L và 0,05 μ L enzyme ở 65 °C trong 120 phút. Mỗi phản ứng cắt enzyme chứa 9,0 μ L nước tinh sạch; 1,0 μ L 10X Buffer, 0,05 μ L (hoặc 0,04 μ L) *MseI* và 5,0 μ L sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau ủ enzyme được điện di trên gel agarose 2,5% ở 100V trong 45 phút, nhuộm với RedSafe, marker Φ X174 HAE III và được chụp hình để kiểm tra sản phẩm.

* Nhận định kết quả

Enzyme *MseI* nhận biết và cắt tại vị trí sau: 5'...T|T A A...3'
3'...A A T|T...5'

Sau khi ủ với enzyme giới hạn, dựa vào kích thước các đoạn ADN để xác định kiểu gen của đa hình APOA5 rs662799. Kiểu gen C/C chứa đoạn ADN có kích thước 188bp, kiểu gen T/T chứa các đoạn ADN có kích thước 168 bp và 20 bp, kiểu gen T/C chứa các đoạn ADN có kích thước 188 bp, 168 bp và 20 bp. Băng sản phẩm 20 bp không xuất hiện do kích thước nhỏ đã chạy ra khỏi bản thạch trong quá trình điện di.

* Phương pháp kiểm chứng kết quả

3 mẫu với 3 kiểu gen khác nhau được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự gen trên máy giải trình tự ABI 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystem, Mỹ) thực hiện tại Công ty Axil Scientific Pte Ltd., Singapore Kết quả giải trình tự được đưa vào phần mềm Bioedit để phân tích trình tự nucleotid dựa trên số gốc, trình tự nucleotid sau khi được chuẩn hoá được lưu dưới định dạng fasta. Chuỗi trình tự này được so sánh với

trình tự chuẩn của gen *APOA5* chứa SNP rs662799 tham khảo trên ngân hàng NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) bằng phần mềm MEGA4

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Lựa chọn nhiệt độ bắt mỗi phù hợp

Kết quả điện di sản phẩm PCR 188bp của 3 mẫu nghiên cứu ở 4 nhiệt độ bắt mỗi khác nhau được thể hiện ở Hình 1. Từ hình ảnh điện di kết quả PCR, chúng tôi thấy rằng, ở cả 4 nhiệt độ bắt mỗi, các băng điện di sản phẩm PCR đều lên đậm và rõ nét. Nhiệt độ bắt mỗi 56 °C được chọn để sử dụng để xây dựng quy trình phân tích gen.



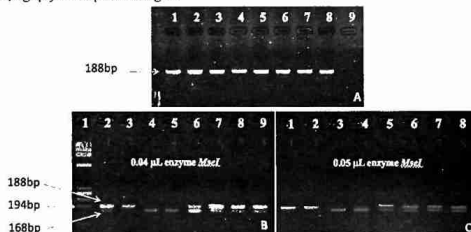
Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của một số mẫu nghiên cứu ở 4 mức nhiệt độ bắt mỗi khác nhau

Giếng 1, 2, 3, 4: nhiệt độ bắt mỗi là 53°C; giếng 5, 6, 7, 8: nhiệt độ bắt mỗi là 56°C; giếng 10, 11, 12, 13: nhiệt độ bắt mỗi là 59°C; giếng 14, 15, 16, 17: nhiệt độ bắt mỗi là 62°C, các giếng 4, 8, 13, 17 là mẫu chứng âm (nước); giếng 9 là marker $\Phi X174$ HAE III

2.2.2. Lựa chọn nồng độ enzyme thích hợp

Kết quả điện di sản phẩm PCR trước và sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *MseI* ở hai nồng độ khác nhau của một số mẫu nghiên cứu được thể hiện ở Hình 2

Từ hình ảnh điện di sản phẩm enzyme, chúng tôi thấy rằng, khi ở các mẫu nghiên cứu ở nồng độ enzyme 0,04 μL thì lượng enzyme không đủ để cắt hết sản phẩm PCR dẫn đến tất cả các mẫu đều có băng 188bp làm ảnh hưởng đến việc nhận định kết quả. Ở nồng độ enzyme 0,05 μL , không còn sản phẩm PCR dư và có thể nhận định được chính xác kiểu gen. Do đó, nồng độ enzyme 0,05 μL được chọn để xây dựng quy trình phân tích gen.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR (A) và sau khi cắt với enzyme giới hạn *MseI* ở 2 nồng độ 0,04 μL (B) và 0,05 μL (C) của một số mẫu nghiên cứu

A: Giếng 1-8: mẫu ADN từ 1-8, giếng 9: H_2O

B: Giếng 1: marker $\Phi X174$ HAE III, giếng 2-9 là các mẫu ADN được ủ với 0,04 μL enzyme *MseI*

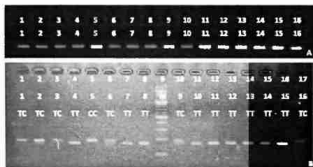
C: giếng 1-8: các mẫu ADN được ủ với 0,05 μL enzyme *MseI*

Với nồng độ enzyme này chúng tôi đã tiết kiệm hơn so với nồng độ khuyến cáo của nhà sản xuất (nồng độ enzyme tối thiểu là 0,1 μL). Từ hình ảnh điện di kết quả PCR, phụ thuộc vào độ đậm của băng sản phẩm để chúng tôi điều chỉnh nồng độ enzyme cho phù hợp.

2.2.3. Kết quả xác định kiểu gen

Sau khi lựa chọn được nhiệt độ bắt mỗi và nồng độ enzyme thích hợp, chúng tôi tiến hành xác định kiểu gen của tất cả các mẫu nghiên cứu. Kết quả điện di sản phẩm PCR và sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *MseI* của một số mẫu nghiên cứu được thể hiện trong Hình 3.

Theo kết quả điện di, tỉ lệ xác định kiểu gen của các mẫu nghiên cứu là 100%. Căn cứ vào các băng sản phẩm sau khi ủ với enzyme giới hạn để xác định kiểu gen. Các mẫu 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 mang kiểu gen T/T do có băng 168bp. Các mẫu 1, 2, 3, 6, 9, 16 mang kiểu gen T/C do có các băng 188bp và 168bp. Mẫu 5 mang kiểu gen C/C do chỉ có băng 188bp.

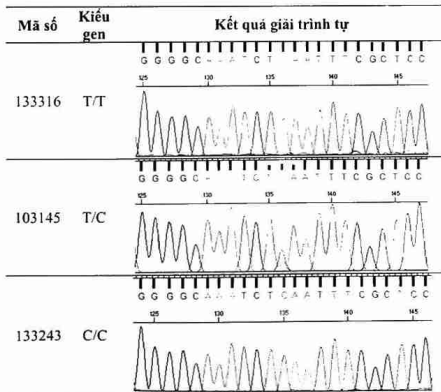


Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR (A) và sau khi cắt với enzyme giới hạn (B) của một số mẫu nghiên cứu

A. Kết quả điện di 16 sản phẩm PCR 188bp; B. Kết quả điện di 16 sản phẩm PCR sau khi ủ với enzyme *MseI*, giếng 1-8 và 10-16. các mẫu nghiên cứu, giếng 9- marker $\Phi X174HAE III$

2.2.4. Phương pháp kiểm tra độ chính xác của phương pháp

Để kiểm tra độ chính xác của phương pháp PCR-RFLP, chúng tôi tiến hành giải trình tự 3 mẫu nghiên cứu đại diện cho 3 kiểu gen đã được xác định bao gồm kiểu gen T/T (mã 114206), T/C (mã 114415) và C/C (mã 113537) Hình 4 thể hiện kết quả giải trình tự của các kiểu gen tương ứng. Kết quả xác định kiểu gen thực hiện bằng phương pháp RFLP hoàn toàn trùng khớp với kết quả giải trình tự.



Hình 4. Kết quả giải trình tự của 3 kiểu gen APOA5

Quy trình xác định kiểu gen của đa hình rs662799 do chúng tôi xây dựng có độ chính xác cao. Bên cạnh đó, quy trình này còn phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam, giúp tiết kiệm chi phí so với phương pháp Taqman hiện đang được sử dụng ở những phòng thí nghiệm có trang thiết bị hiện đại [16, 17].

2.2.5. Đa hình APOA5 rs662799 ở học sinh tiểu học Hà Nội

Sự phân bố tỉ lệ alen và kiểu gen của đa hình APOA5 rs662799 ở học sinh nam 6 - 11 tuổi tại một số trường tiểu học Hà Nội thể hiện qua Bảng 1.

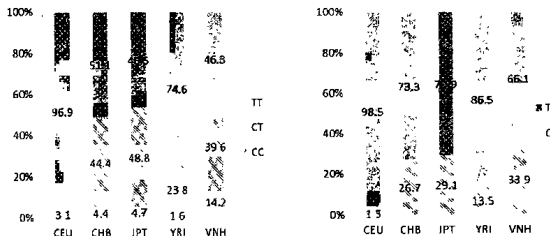
Bảng 1. Phân bố alen và kiểu gen của SNP rs662799 ở học sinh nam tiểu học Hà Nội

| | | n | % | Cân bằng Hardy-Weinberg (P) |
|----------|-----|-----|------|-----------------------------|
| Kiểu gen | T/T | 186 | 46,3 | |
| | T/C | 159 | 39,6 | |
| | C/C | 57 | 14,2 | |
| Alen | T | 531 | 66,1 | |
| | C | 273 | 33,9 | |

Giá trị P thu được từ phân tích χ^2 test

Trong toàn mẫu, kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (46,3%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (14,2%). Tỉ lệ alen T và C lần lượt là 66,1% và 33,9%. Sự phân bố kiểu gen trong mẫu nghiên cứu tuân theo quy luật cân bằng Hardy - Weinberg (P = 0,081).

Chúng tôi tiến hành so sánh tần số alen của SNP này với các quần thể khác trên thế giới theo cơ sở dữ liệu Hapmap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Kết quả so sánh được thể hiện trong Hình 5.



Hình 5. Tỉ lệ kiểu gen (trái) và tỉ lệ alen (phải) APOA5 rs662799 của một số quần thể trên thế giới

Chú thích. CEU: Người sống ở bang Utah có nguồn gốc từ Bắc và Tây châu Âu;

CHB: Người Hán ở Bắc Kinh, Trung Quốc, JPT: Người Nhật ở Tokyo, Nhật bản;

YRI: Người Yoruban ở Inbada, Nigeria; VNH: Trẻ em tiểu học ở Hà Nội, Việt Nam thuộc nghiên cứu này (Nguồn: International Hapmap Project)

Khi so sánh tần số alen trong nghiên cứu của chúng tôi (33,9%) với một số quần thể trên thế giới chỉ ra rằng tần số alen C trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương với các quần thể người châu Á như người Hán ở Bắc Kinh, Trung Quốc và người Nhật ở Tokyo, Nhật Bản nhưng cao hơn rất nhiều so với các nghiên cứu ở người châu Âu và người Nigeria (1,5% ở người châu Âu và 13,5% ở người Nigeria) (Hình 5). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu khác như nghiên cứu của H. Meng-Chuan và cộng sự [18], T. Nabika (2002) [19].

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định phân bố tần số alen và tần số kiểu gen của đa hình rs662799 trên gen APOA5 ở trẻ em tiểu học Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới tập trung nghiên cứu ở trẻ em lứa tuổi tiểu học người Kinh tại Hà Nội và chưa phân tích được các yếu tố ảnh hưởng đến sự phân bố tần số kiểu gen và tần số alen ở quần thể này. Cần mở rộng nghiên cứu phân bố các kiểu gen của đa hình APOA5 rs662799 ở nhiều nhóm tuổi và giới của các dân tộc tại Việt Nam.

3. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi đã tối ưu hóa được quy trình xác định kiểu gen APOA5 rs662799 bằng phương pháp PCR-RFLP ở quần thể người Việt Nam. Cụ thể, quy trình gồm 3 bước sau: (1) gen APOA5 trong hệ gen được khuếch đại trong phản ứng PCR bằng cặp mồi xác định với nhiệt độ bắt đầu là 56 °C; (2) sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn MseI ở nồng độ 0,05 µL; (3) điện di sản phẩm sau khi u enzyme trên gel agarose 2,5% trong 45 phút ở 100V.

Ở trẻ em nam 6 - 11 tuổi tại Hà Nội, kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (46,3%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (14,2%). Tần số alen T và C lần lượt là 66,1% và 33,9%.

Phương pháp xác định kiểu gen ở nghiên cứu này đã được thiết kế và tối ưu, đảm bảo được tính chính xác, có chi phí phù hợp, có thể áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử tại Việt Nam để xác định kiểu gen APOA5 rs662799 ở người Việt Nam với số mẫu lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Heidelberg, N. Maxime, A. Hellebois-Chapman, J. Fruchart - Najib, F. Jean-Charles, 2006. *Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride - rich lipoproteins*. Annals of Medicine, 38, pp. 2-10.
- [2] M. Kluger, J. Heeren, M. Merkel, 2008. *Apolipoprotein A-1' An important regulator of triglyceride metabolism* J Inherit Metab Dis., 31, pp. 281-288.
- [3] L. A. Pennacchio, M. Olivier, J. A. Hubacek, J. C. Cohen, D. R. Cox, J. C. Fruchart, et al., 2001. *An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing*. Science, 294, pp. 169-73.
- [4] L. A. Pennacchio and E. M. Rubin, 2003. *Apolipoprotein A5, a Newly Identified Gene That Affects Plasma Triglyceride Levels in Humans and Mice* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 23, pp. 529-534
- [5] J. A. Hubáček, V. Adámková, M. Vrablík, M. Kadlecová, J. Zicha, J. Kuneš, et al., 2009. *Apolipoprotein A5 in Health and Disease*. Physiol. Res., 58 (2), pp. S101-S109.
- [6] M. Zaki, K. Amr, 2014. *Apolipoprotein A5 T-1131C variant and risk for metabolic syndrome in obese adolescents*. Gene, 534(1), pp. 44-47.
- [7] S. Ouatou, M. Ajjemami, H. Charoute, H. Sefri, N. Ghalim, H. Rhaisi, et al., 2014. *Association of APOA5 rs662799 and rs135506 polymorphisms with arterial hypertension in Moroccan patients*. Lipids in health and disease, 13(1), pp. 1.
- [8] V. Havasi, Z. Szolnoki, G. Talián, J. Bene, K. Komlósi, A. Maász, et al., 2006. *Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke* Journal of Molecular neuroscience. 29(2), pp. 177-183.
- [9] A. Hořinec, M. Vrablík M, R. Češka R, V. Adámková, R. Polednc, J. A. Hubáček, 2003. *T-1131 → C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals*. Atherosclerosis, 167, pp. 369-370.
- [10] X. Chunxiao, B. Rongpan, Z. Dandan, L. Zhenli, Z. Honghong, L. Maode, Z. Yimin, 2012. *Effects of APOA5 1131T C (rs662799) on Fasting Plasma Lipids and Risk of Metabolic Syndrome: Evidence from a Case - Control Study in China and a Meta. Analysis* PLoS One, 8(2), pp. e56216.
- [11] D. D. V. Brito, A. P. Fernandes, K. B. Gomes, F. F. Coelho, N. G. Cruz, A. P. Sabino, et al., 2011. *Apolipoprotein A5-1131T > C polymorphism, but not APOE genotypes, increases susceptibility for dyslipidemia in children and adolescents*. Molecular biology reports, 38(7), pp. 4381-4388.

- [12] M. Guardiola, J. Ribalta, D. Gómez-Coronado, M. A. Lasunción, M. de Oya and C. Garcés, 2010. *The apolipoprotein A5 (APOA5) gene predisposes Caucasian children to elevated triglycerides and vitamin E (Four Provinces Study)*. *Atherosclerosis*, 212(2), pp. 543-547.
- [13] K. Endo, H. Yanagi, J. Araki, C. Hirano, K. Yamakawa-Kobayashi and S. Tomura, 2002. *Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein AV gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren*. *Human genetics*, 111(6), pp. 570-572.
- [14] Z. Wei-fen, W. Chun-lin, L. Li, S. Zheng, F. Jun-fen, L. Pei-ning, L. Lan-qiu, Z. Yi-min, 2014. *Triglyceride - raising APOA5 genetic variants are associated with obesity and non-HDL-C in Chinese children and adolescents*. *Lipids Health Dis.*, 13, p. 93.
- [15] L. Baum, B. Tomlinson and G. N. Thomas, 2003. *APOA5-1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men*. *Clin Genet.*, 63, pp. 377-379.
- [16] C. Xu, R. Bai, D. Zhang, Z. Li, H. Zhu *et al.*, 2013. *Effects of APOA5 2113T.C (rs662799) on Fasting Plasma Lipids and Risk of Metabolic Syndrome: Evidence from a Case-Control Study in China and a Meta-Analysis*. *PLoS one*, 8(2), p. e56216.
- [17] S. Cha, H. Yu, A. Y. Park, K. H. Song, 2014. *Effects of apolipoprotein A5 haplotypes on the ratio of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol and the risk for metabolic syndrome in Koreans*. *Lipids Health Dis*, 13, p. 45.
- [18] H. Meng-Chuan, W. Tsu-Nai, W. Huan-Sen, S. Yi-Ching, K. Ying-Chin, C. Hung-Che, 2008. *The -1131t > c polymorphism in the Apolipoprotein a5 gene is related to hypertriglyceridemia in Taiwanese aborigines*. *Kaohsiung J Med Sci.* 24, pp. 171-9.
- [19] T. Nabika, S. Nasreen, S. Kobayashi, J. Masuda, 2002. *The genetic effect of the apolipoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese*. *Atherosclerosis*, 165(2), pp. 201-204.

ABSTRACT

Optimal protocol for genotyping *APOA5* rs662799 polymorphism in boys aged 6 - 11 years in Hanoi

APOA5 rs662799 polymorphism is of great interest because it is associated with an increased risk of dyslipidemia, hypertension, metabolic syndrome, myocardial infarction and coronary artery disease. This association has led to an increased interest in rapid genotyping of *APOA5* polymorphism for population studies. Our study applied the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method to identify *APOA5* rs662799 polymorphism in the Vietnamese population. This study optimized the genotyping method for *APOA5* rs662799 polymorphism by examining the enzyme *MseI* and it was found that of 405 male primary school children in Hanoi, the T/T genotype was most common at 46.3% and the C/C genotype was least common at 14.2%. T and C allele frequency was 66.1% and 33.9%, respectively. This study found the optimal protocol for genotyping the *APOE* gene using the restriction fragment length polymorphism method in Vietnamese samples. It is necessary to apply this method to genotype for *APOA5* rs662799 polymorphism in large-scale studies in Vietnam.

Keywords: *APOE*, rs662799, genotyping, children.