



Original Article

Four Variations Detected in 3 Genes Related to Thrombophilia by Multiplex ARMS – PCR

Tran Thi Quynh Trang, Nguyen Thuy Ngan, Nguyen Thi Than,
Pham The Tung, Vo Thi Thuong Lan*

VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Received 03 May 2021

Revised 03 June 2021; Accepted 27 August 2021

Abstract: Thrombophilia is a condition that may cause venous obstruction, leading to serious illnesses such as stroke, respiratory failure, and even death. This condition is hereditary or related to the immune system. Inherited thrombophilia is screened by analysing genetic variants (allele). In this study, we analyse 4 variations in 3 genes, which occur at high variable frequency, namely *Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR C677T, MTHFR A1298C)*, *Factor V Leiden (FVL C1691T)* and *Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1 5G/4G)*, using allele-specific polymerase chain reaction (ARMS-PCR). The primers were designed using FastPCR program and PCR conditions were optimized to identify 8 alleles of 4 variants through 3 multiplex ARMS - PCR reactions. The accuracy of the ARMS - PCR results was confirmed by Sanger sequencing and the real time PCR commercial kit (SNP). Mastering the allele specific PCR technique contributes to the survey of genetic variations in the Vietnamese population in order to screen and treat thrombophilia-related diseases.

Keywords: Thrombophilia, allele-specific polymerase chain reaction (ARMS-PCR), variants *MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FVL C1691T, PAI-1 4G/5G*.

* Corresponding author.

E-mail address: vothithuonglan@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4317>

Phát hiện 4 biến thể trên 3 gen *PAI1*, *MTHFR*, *FVL* liên quan chứng tăng đông máu thrombophilia bằng kỹ thuật ARMS – PCR đa môi

Trần Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Thùy Ngân, Nguyễn Thị Thân,
Phạm Thê Tùng, Võ Thị Thương Lan*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 03 tháng 5 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 06 tháng 6 năm 2021 Chấp nhận đăng ngày 27 tháng 8 năm 2021

Tóm tắt: Chứng tăng đông máu thrombophilia là các rối loạn tạo huyết khối, có thể gây tắc tĩnh mạch dẫn tới bệnh nguy hiểm như tai biến, đột quỵ, thậm chí tử vong. Bên cạnh các nguyên nhân liên quan đến chuyển hóa, biến thể di truyền cũng có tác động đến biểu hiện của bệnh. Vì vậy, sàng lọc thrombophilia di truyền thông qua phân tích các biến thể của gen (cụ thể là *allen*) được quan tâm trong các xét nghiệm nhằm sàng lọc yếu tố có nguy cơ cao gây tăng đông máu. Hiện nay đã có ít nhất 12 biến thể ở 7 gen được xác định bởi các bộ kit thương mại. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu *allen* (ARMS – PCR) để phân tích 4 biến thể ở 3 gen có tần số biến đổi cao là *Methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR* C677T và *MTHFR* A1298C), *Factor V Leiden* (*FVL* C1691T) và *Plasminogen activator inhibitor-1* (*PAI-1* 4G/5G). Kết quả cho thấy cả 8 *allen* của 4 biến thể được phát hiện rõ ràng trong 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi. Kết quả giải trình tự và đối chiếu với bộ kit realtime Multiplex PCR thương mại cho 10 mẫu sinh phẩm đã khẳng định tính đặc hiệu, chính xác của các môi được thiết kế và tối ưu trong từng phản ứng ARMS-PCR.

Từ khóa: Biến thể *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *FVL* C1691T, *PAI-1* 4G/5G, tăng đông máu thrombophilia.

1. Mở đầu

Thrombophilia là nhóm các rối loạn làm máu có xu hướng đông lại [1]. Sự hình thành huyết khối dẫn đến nguy cơ thuyên tắc tĩnh mạch có trong các bệnh nguy hiểm như tai biến, đột quỵ. Tại Mỹ, mỗi năm thuyên tắc tĩnh mạch do huyết khối ảnh hưởng đến 900.000 người và có khoảng 100.000 ca tử vong sớm [2, 3]. Dựa vào những trường hợp được xác định và dữ liệu khám nghiệm tử thi, các nghiên cứu ước tính rằng 10%

-30% tổng số bệnh nhân bị tử vong trong vòng 30 ngày; phần lớn các trường hợp tử vong xảy ra ở những người bị thuyên tắc mạch máu phổi với khoảng 20%-25% là đột tử [4-7]. Thrombophilia có thể do di truyền hoặc các nguyên nhân khác trong suốt quá trình sống [8]. Vấn đề di truyền được quan tâm nhiều bởi biến đổi trên gen có thể liên quan tới các con đường chuyển hóa khác ngoài quá trình đông máu, ảnh hưởng nhiều thế hệ trong gia đình và đặc biệt là có thể tầm soát. Việc sàng lọc thrombophilia di truyền được thực

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: vothithuonglan@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4317>

hiện nhờ phân tích các biến thể của gen (cụ thể là allen). Hiện đã có ít nhất 12 biến thể di truyền của thrombophilia được phát hiện bằng các kit thương mại real time PCR [9]. Trong số này, 4 biến thể trên 3 gen *Methylenetetrahydrofolate Reductase* (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C), *Factor V Leiden* (*FVL* C1691T) và *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (*PAI-1* 4G/5G) được báo cáo có tần số biến đổi cao. Thực vậy, biến thể *MTHFR* C677T và *MTHFR* A1298C đã được khảo sát trên 406 người Kinh (Việt Nam) với tỉ lệ allen đột biến lần lượt là 17,49% và 25,43% [10]. Hai biến thể còn lại chưa có số liệu thống kê trên người Việt nhưng khảo sát từ các quần thể người trên thế giới thì có tỉ lệ chung là 48,51% (*PAI-1* 4G) và 2,26% (*FVL* C1691T) [11]. Đặc biệt, allen đột biến của *FVL* 1691T có tỉ lệ alen khác biệt rõ rệt giữa các lục địa (với 2,54% ở châu Âu trong khi 0.51% ở châu Phi) và khác biệt giữa các khu vực với nhau nên việc khảo sát ở nước ta cần được tiến hành [11, 12].

Bên cạnh kỹ thuật real time PCR, khuếch đại đặc hiệu allen (ARMS - PCR) là kỹ thuật phổ biến có độ nhạy cao trong phân tích biến thể SNP

(đa hình đơn nucleotide) [13, 14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt mục tiêu thiết kế và tối ưu được các môi ARMS - PCR để phân tích 8 allen của 4 biến thể có tần suất cao *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *FVL* C1691T và *PAI-1* 4G/5G trong phản ứng đa môi. Làm chủ được kỹ thuật ARMS - PCR đa môi sẽ góp phần hỗ trợ việc khảo sát các loại biến thể trong quần thể người Việt để sàng lọc và điều trị những bệnh liên quan thrombophilia.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu bao gồm 10 mẫu máu (kí hiệu QY) cung cấp bởi phòng xét nghiệm GenLab đã có kết quả kiểu gen phân tích bằng kit thương mại “Thrombophilia Multiplex Real time PCR” (SNP BioTechnology, code: 10R-20-12B). Hai ml máu chống đông bằng EDTA được bảo quản ở 4 °C và được dùng để tách DNA tổng số ngay sau khi thu mẫu.

Bảng 1. Kiểu gen (allen) của 4 biến thể nghiên cứu trong các mẫu QY

Mẫu	Kiểu gen				Mẫu	Kiểu gen			
	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>FVL</i> C1691T	<i>PAI-1</i> 4G/5G		<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>FVL</i> C1691T	<i>PAI-1</i> 4G/5G
QY1	C/T	A/C	C/C	4G/5G	QY6	C/C	A/C	C/C	5G/5G
QY2	T/T	A/A	C/T	4G/5G	QY7	T/T	A/A	C/C	4G/5G
QY3	C/C	A/C	C/C	4G/5G	QY8	C/T	A/C	C/C	4G/5G
QY4	C/T	A/A	C/C	4G/5G	QY9	C/C	A/C	C/C	4G/5G
QY5	C/C	A/C	C/C	4G/5G	QY10	C/C	A/C	C/C	4G/5G

2.2. Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu: hai ml máu chống đông được sử dụng để tách chiết DNA theo đúng hướng dẫn của bộ kit Genomic DNA Miniprep Kit Sk8253 (BioBasic). Nồng độ và chất lượng DNA được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm trên hệ thống NanoDrop (Invitrogen) và được điện di trên gel agarose 1%.

Thiết kế môi đặc hiệu allen: bốn biến thể trong nghiên cứu đều là biến đổi nucleotide đơn (SNPs). Vì vậy, môi đặc hiệu cho 2 allen được thiết kế theo nguyên tắc chỉ sai khác nhau ở nucleotide cuối cùng đầu 3' [15]. Để tăng tính đặc hiệu của môi (không bắt cặp nhầm), 1 trong 3 nucleotide tính từ đầu 3' sẽ được thay đổi để không tạo cặp với khuôn (tạo thêm 1 mismatch) [15]. Các thông số của môi được lựa chọn theo phần mềm FastPCR6.0 dựa vào các trình tự gen

có mã truy cập từ NCBI như sau: *Plasminogen activator inhibitor-1* (Gene ID 5054). Trình tự các môi ARMS-PCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự nucleotide của các môi đặc hiệu allen thiết kế cho kỹ thuật ARMS-PCR. Nucleotide đặc hiệu cho biến thể ở đầu tận cùng 3' của môi (in đậm), nucleotide thiết kế không bắt cặp được gạch chân. Các môi sử dụng cho giải trình tự Sanger được kí hiệu (*)

Gen ID	Biến thể	Trình tự nucleotide (5'-3')	Kích thước (bp)
4524	MTHFR C677T	MTH677-Ft: CTG AGG TGT CTG CGG GAG T MTH677-Rt: TCA CCT GGA TGG GAA ACA T (*)	146
		MTH677-Fc: TCA GAA GCA TAT CAG TCATG (*) MTH677-Rc: TGC GTG ATG ATG AAA TCA G	293
	MTHFR A1298C	MTH1298-Fa: GGC CTC CTG GGC ATG TAG T (*) MTH1298-Ra: TTG AAG ACT TCA AAG ACA CCT T	214
		MTH1298-Fc: AGT AGC TGA CCA GTG ATC C MTH1298-Rc: TCT CCC TTT GCC ATG TCC ACA (*)	214
2153	FVL C1691T	FVL-Ft: AAG GAC AAA ATA CCT GTA TTC TTT FVL-Rt: AAG ACC ATA CTA CAG TGA CCT G (*)	125
		FVL-Fc: TGG TAA AGA GCT TTA TAC TTT TAC (*) FVL-Rc: CGT AGA TCC CTG GAC AGC CG	435
5054	PAI-1 4G/5G	PAI-4G-F: AGA GTC TGG ACA CGT GGA GA PAI-4G-R: TTC CCC CAG GGC TGT CCA (*)	233
		PAI-5G-F: CTC AGC CAC CAC CAC CCC A (*) PAI-5G-R: ACG ATG ATA CAC GGC TGA CC	125

Phản ứng ARMS-PCR đa môi: phản ứng ARMS-PCR sử dụng GoTaq G2 Hot Start Master Mix 2X (Promega, Code No: M7422). Tám cặp môi đặc hiệu cho 8 allen của 4 biến thể được phối trộn với nhau sao cho đảm bảo nhìn thấy các băng DNA rõ nét trên gel điện di. Kết

quả tối ưu 8 cặp môi trong 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi ở cùng chu trình nhiệt được thể hiện trong Bảng 3. Sản phẩm PCR được điện di trên gel acrylamide 8%, nhuộm EtBr và chụp bằng Hệ thống chụp hình ảnh Gel điện di Model: DigiDoc It (Analytik Jena – Đức).

Bảng 3. Thành phần và điều kiện tối ưu của 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi nhằm phát hiện 8 allen của 4 biến thể. Các allen liên quan thrombophilia được in đậm

	Allen	Cặp môi	Nồng độ môi (µM)	Kích thước (bp)
Multi 1	PAI 5G	PAI-5G-F/PAI-5G-R	0,22	125
	MTHFR 677C	MTH677-Fc/MTH677-Rc	0,17	293
	MTHFR 1298C	MTH1298-Fc/ MTH1298-Rc	0,23	214
	FVL 1691C	FVL-Fc/ FVL-Rc	0,13	435
Multi 2	Allen	Cặp môi	Nồng độ môi (µM)	Kích thước (bp)
	MTHFR 1298A	MTH1298-Fa/ MTH1298-Ra	0,24	214
	FVL 1691 T	FVL-Ft/ FVL-Rt	0,28	125
Multi 3	Allen	Cặp môi	Nồng độ môi (µM)	Kích thước (bp)

	PAI 4G	PAI-4G-F/PAI-4G-R	0,18	233
	MTHFR 677T	MTH677-Ft/ MTH677-Rt	0,15	146

Sử dụng GoTaq G2 Hot Start Master Mix (1X), 10 ng DNA, tổng thể tích phản ứng 15 μ L. Điều kiện: 95 $^{\circ}$ C-2 phút, (95 $^{\circ}$ C 30 giây 63 $^{\circ}$ C 3 giây, 72 $^{\circ}$ C 30 giây) x 45, 72 $^{\circ}$ C-5 phút.

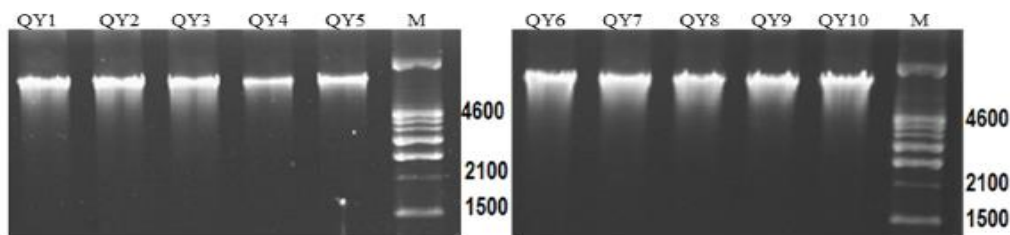
Giải trình tự Sanger: các trình tự khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng các cặp mồi có vị trí nằm xung quanh biến thể SNP (Bảng 1, các mồi kí hiệu (*)) được gửi giải trình tự trên máy tự động ABI3500. Kết quả được phân tích bằng chương trình BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

kit Genomic DNA Miniprep Kit Sk8253 (BioBasic). Nồng độ DNA được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (A260) trên máy đo NanoDrop (Invitrogen). Mười mẫu DNA có nồng độ trong khoảng 98 ng/ μ l đến 203 ng/ μ l. Độ sạch của DNA được đánh giá thông qua tỷ số độ hấp thụ ở 2 bước sóng 260 nm và 280 nm (A280). Tất cả các mẫu DNA đều có tỷ lệ A260/A280 nằm trong khoảng 1,7 đến 1,9 đảm bảo độ sạch cần có. Hình ảnh điện di DNA tổng số trên gel agarose 1% được minh họa trên Hình 1.

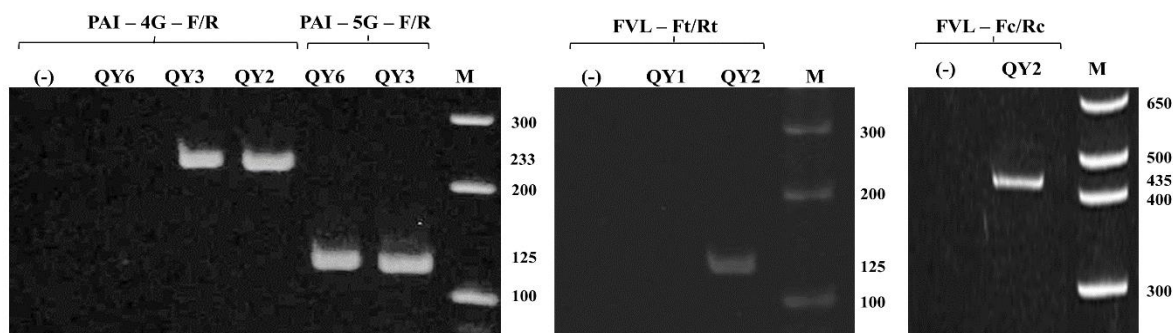
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách chiết DNA tổng số

Hai ml máu chống đông được sử dụng để tách chiết DNA tổng số theo hướng dẫn của bộ



Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số trên gel agarose 1%. Các mẫu DNA tách từ máu cung cấp bởi phòng xét nghiệm GenLab cung cấp (QY). M: thang chuẩn DNA 4.6Kb (Phòng Thí nghiệm Sinh Y, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm ARMS-PCR với các cặp mồi đặc hiệu allen trên gel acrylamide 8%. Cặp mồi PAI-4G chỉ phát hiện mẫu dị hợp có 1 allen 4G (QY2, QY3) mà không cho sản phẩm với mẫu đồng hợp 5G (QY6). Cặp mồi PAI-5G chỉ phát hiện mẫu dị hợp có 1 allen 5G hoặc mẫu đồng hợp 5G. Cặp mồi FVL-Ft/Rt chỉ phát hiện mẫu dị hợp có allen T (QY2) mà không cho sản phẩm với mẫu đồng hợp CC (QY1). Cặp mồi FVL-Fc/Rc phát hiện đặc hiệu allen C ở mẫu dị hợp CT (QY2). M: thang chuẩn 100 bp (Invitrogen).

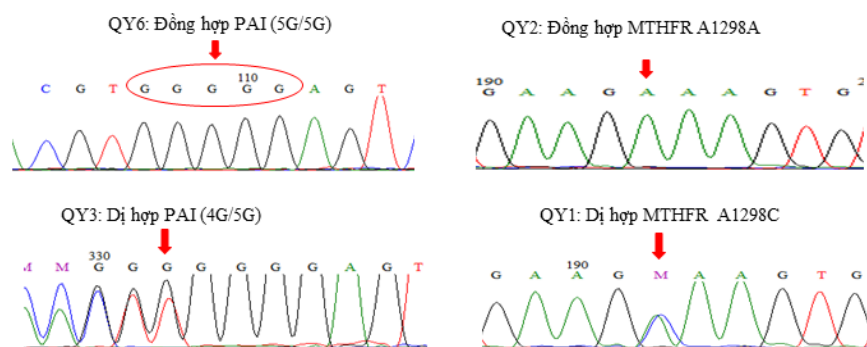
3.2. Tối ưu điều kiện phản ứng ARMS-PCR đơn môi

Sử dụng 10 ng DNA của các mẫu QY đã biết kiểu allen để tối ưu nồng độ môi và điều kiện phản ứng ARMS-PCR đơn môi với GoTaq G2 Hot Start Master Mix và tổng thể tích phản ứng là 15 μ l. Kết quả thu nhận được đều cho 1 băng DNA sắc nét có kích thước như tính toán. Tiếp đến, các cặp môi được sử dụng với DNA dị hợp và DNA đồng hợp của từng biến thể nhằm khẳng định tính đặc hiệu của cặp môi. Kết quả cho thấy không có hiện tượng cặp môi đặc hiệu cho allen này bắt cặp nhầm với allen kia và ngược lại. Kết quả tối ưu điều kiện ARMS-PCR đơn môi và xác

định tính đặc hiệu của từng cặp môi được minh họa trên Hình 2.

3.3. Giải trình tự Sanger khẳng định tính chính xác của các cặp môi ARMS-PCR

DNA của các mẫu có kiểu gen đồng hợp và dị hợp được khuếch đại với cặp môi có vị trí liền kề với biến thể (SNP) (cặp môi nêu trong Bảng 2). Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự Sanger và được so sánh với dữ liệu trong NCBI thông qua phân tích BLAST. Kết quả cho thấy các trình tự đều đúng với các gen có mã số truy cập khi thiết kế môi và đúng với kết quả phát hiện bằng kỹ thuật ARMS-PCR. Một số kết quả giải trình tự được minh họa trên Hình 3.

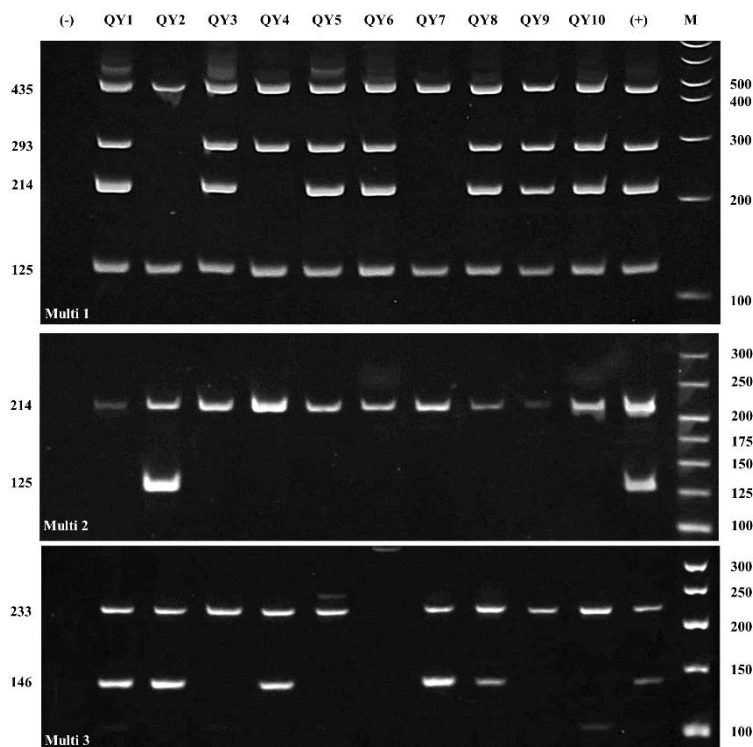


Hình 3. Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác của môi đặc hiệu allen. Mẫu có kiểu gen đồng hợp PAI 5G/5G (QY6), dị hợp PAI 4G/5G (QY3) [A]; mẫu có kiểu gen đồng hợp MTHFR A1298A (QY2) và mẫu có kiểu gen dị hợp MTHFR A1298C (QY1). Mũi tên chỉ vị trí biến thể.

3.4. Tối ưu điều kiện phản ứng ARMS-PCR đa môi

Dựa vào nồng độ các môi tối ưu trong phản ứng đơn môi, các cặp môi được phối trộn với nhau để tìm điều kiện cho các băng đặc hiệu rõ nét. Kết quả cho thấy 8 môi phối trộn trong 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi cho phép phát hiện 8 băng DNA đặc hiệu cho 8 allen của 4 biến thể. Kết quả này trùng khớp với kết quả phân tích bằng kit thương mại real time PCR (SNP, Code 10R-20-12B). Điều kiện tối ưu được trình bày trong Bảng 3. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng đa môi cho 10 mẫu DNA được trình bày trong Hình 4.

Như vậy, bằng việc thiết kế môi đặc hiệu allen dùng trong 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi, chúng tôi đã phát hiện được 8 allen của 4 biến thể *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *FVL* C1691T và *PAI-1* 4G/5G liên quan đến chứng tăng đông máu thrombophilia. Tính đặc hiệu của các môi đảm bảo xác định chính xác kiểu gen đồng hợp hay dị hợp được chứng minh bằng kết quả PCR sử dụng các kiểu gen đồng hợp thường cho môi đặc hiệu đột biến và ngược lại (Hình 2) cũng như bằng kết quả giải trình tự (Hình 3). Các kết quả phân tích ARMS-PCR đa môi cho 10 mẫu DNA (Hình 4) hoàn toàn trùng khớp với kiểu gen xác định bằng kit thương mại realtime PCR (kết quả không hiển thị).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm ARMS-PCR đa môi trên gel acrylamide 8%. Bốn biến thể được phân tích cho 10 mẫu DNA trong 3 phản ứng đa môi cho phép xác định chính xác kiểu allen. Mẫu (-): đối chứng âm (không có DNA khuôn), mẫu (+): đối chứng dương chứa đầy đủ các allen của 4 biến thể. M: thang chuẩn lần lượt là 100 bp (Invitrogen) (Multi 1), 25bp (Bioline) (Multi 2) và 50 bp (Fermentas) (Multi 3).

Kỹ thuật ARMS-PCR đã được chứng minh có độ đặc hiệu cao trong phát hiện đa hình, đột biến nucleotide đơn (SNP) [13, 14]. Các môi sử dụng trong phản ứng PCR định tính hoặc định lượng (realtime PCR) để phát hiện đa hình SNP đều tuân thủ nguyên tắc thiết kế có 2 nucleotide đặc biệt: nucleotide ở đầu tận cùng 3' (trùng ứng với SNP) và nucleotide không bắt cặp (nằm trong số 5 nucleotide ở đầu 3' của môi) [15]. Các nguyên tắc này được áp dụng để thiết kế 8 cặp môi đặc hiệu cho 8 allen của 4 biến thể có liên quan đến chứng tăng đông máu thrombophilia. Tám allen được phát hiện trong 3 phản ứng ARMS-PCR đa môi. Do sử dụng điện di nên số phản ứng ít hơn so với phản ứng real time PCR cần có để phát hiện cùng số biến thể. Ví dụ như bộ kit real time multiplex PCR (SNP, Code 10R-20-04B) yêu cầu thực hiện 4 phản ứng để phát hiện 4 biến thể [9]. Tuy nhiên, khi sử dụng môi đánh dấu huỳnh quang và điện di mao quản

(phản ứng QF-PCR, Quantitative Fluorescence PCR) thì số phản ứng cần ít hơn mà vẫn cho phép phát hiện đồng thời nhiều allen. Ví dụ như bộ kit thương mại Devyser, sử dụng QF-PCR để phát hiện 6 biến thể liên quan thrombophilia trong 1 phản ứng (<https://www.devyser.com/products/devyser-thrombophilia>). Trong nghiên cứu của chúng tôi, các băng đặc hiệu phân tách rõ ràng trên gel điện di acrylamide là cơ sở để đánh dấu các môi đặc hiệu allen với tín hiệu huỳnh quang và thực hiện phản ứng QF-PCR. Trong thời gian tới, chúng tôi mong muốn phát hiện các biến thể khác dựa vào kỹ thuật khuếch đại allen đặc hiệu sử dụng môi ARMS-PCR đánh dấu huỳnh quang nhằm xây dựng bộ sinh phẩm QF-PCR phối hợp cùng bộ sinh phẩm real time PCR trong việc phát hiện các biến thể đa hình SNP liên quan đến thrombophilia nói riêng và đến tính kháng thuốc trong nghiên cứu dược học di truyền (pharmacogenomics) nói chung [16].

4. Kết luận

Trên cơ sở những kết quả bước đầu thu được, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

i) Thiết kế thành công các môi đặc hiệu allen cho kỹ thuật ARMS-PCR phát hiện chính xác 8 allen của 4 biến thể *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *FVL C1691T* và *PAI-1 4G/5G* liên quan chứng tăng đông máu thrombophilia;

ii) Chuẩn hóa thành công điều kiện 3 phản ứng ARMS – PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 allen của 4 biến thể trên.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Viện Công nghệ DNA và phân tích di truyền cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Dautaj, G. Krasi, V. Bushati et al., Hereditary Thrombophilia, *Acta Biomedica*, Vol. 90, No. 10S, 2019, pp. 44-46, <https://doi.org/10.23750/abm.v90i10-S.8758>.
- [2] M. G. Beckman, W. C. Hooper, S. E. Critchley, T. L. Ortel, Venous Thromboembolism: A Public Health Concern, *American Journal of Preventive Medicine*, Vol. 38, No. 4S, 2010, pp. S495-S501, <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2009.12.017>.
- [3] G. E. Raskob, R. Silverstein, D. W. Bratzler et al., Surveillance for Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Recommendations from A National Workshop, *American Journal Preventive Medicine*, Vol. 38, No. 4S, 2010, pp. S502-S509, <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2010.01.010>.
- [4] J. A. Heit, M. D. Silverstein, D. N. Mohr et al., The Epidemiology of Venous Thromboembolism in the Community, *Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 86, No. 1, 2001, pp. 452-463, <https://doi.org/10.1055/s-0037-1616243>.
- [5] M. Cushman, A. W. Tsai, R. H. White et al., Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism in Two Cohorts: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology, *The American Journal of Medicine*, Vol. 117, No. 1, 2004, pp. 19-25, <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.01.018>.
- [6] J. A. Heit, The Epidemiology of Venous Thromboembolism in the Community: Implications for Prevention and Management, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, Vol. 21, No. 1, 2006, pp. 23-29, <https://doi.org/10.1007/s11239-006-5572-y>.
- [7] R. H. White, The Epidemiology of Venous Thromboembolism, *Circulation*, Vol. 107, No. 23 S1, 2003, pp. I4-I8, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000078468.11849.66>.
- [8] A. Wahed, A. Dasgupta, Thrombophilias and Their Detection, *Hematology and Coagulation: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*, Elsevier, United States of America, 2015, pp. 263-275.
- [9] SNP Biotechnology, SNP Detection Real-Time PCR Kits, <http://www.snp.com.tr/EN,37/snp-detection-real-time-pcr-kits.html/>, 2021 (accessed on: May 1st, 2021).
- [10] V. S. Le, K. T. Tran, H. T. P. Bui et al., A Vietnamese Human Genetic Variation Database, *Human Mutation*, Vol. 40, No. 10, 2019, pp. 1664-1675, <https://doi.org/10.1002/humu.23835>.
- [11] dbSNP – NCBI, Reference SNP (rs) Report (rs6025, rs1799762), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, 2021 (accessed on: May 1st, 2021).
- [12] D. C. Rees, M. Cox, J. B. Clegg, World Distribution of Factor V Leiden, *The Lancet*, Vol. 346, No. 8983, 1995, pp. 1133-1134, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)91803-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)91803-5). A. Fateh, M. Aghasadeghi, S. D. Siadat et al., Comparison of Three Different Methods for Detection of IL28 rs12979860 Polymorphisms as A Predictor of Treatment Outcome in Patients with Hepatitis C Virus, *Osong Public Health and Research Perspectives*, Vol. 7, No. 2, 2016, pp. 83-89, <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.004>.
- [13] T. Huang, J. Zhuge, W. W. Zhang, Sensitive Detection of BRAF V600E Mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR, *Biomarker Research*, Vol. 1, No. 3, 2013, <https://doi.org/10.1186/2050-7771-1-3>.
- [14] R. F. V. Medrano, C. A. D. Oliveira, Guidelines for the Tetra-primer ARMS-PCR Technique Development, *Molecular Biotechnology*, Vol. 56, 2014, pp. 599-608, <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9734-4>.
- [15] C. Runcharoen, K. Fukunaga, I. Sensorn et al., Prevalence of Pharmacogenomic Variants in 100 Pharmacogenes Among Southeast Asian Populations under Pharmacogenomics Research Network (SEAPharm), *Human Genome Variation*, Vol. 8, No. 7, 2021, <https://doi.org/10.1038/s41439-021-00135-z>.