

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH PCR ĐA MỒI PHÂN TÍCH KIỂU GEN CỦA ĐA HÌNH rs1501299 GEN *ADIPOQ* Ở NGƯỜI VIỆT NAM

Trần Quang Thuyên<sup>1,2</sup>, Đinh Hồng Dương<sup>2</sup>, Trần Quang Bình<sup>3</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình PCR đa mồi để phân tích kiểu gen của rs1501299 trên gen *ADIPOQ* ở người Việt Nam. **Đối tượng và phương pháp:** Các mẫu ADN người Việt Nam được sử dụng làm mẫu thử nghiệm. Sử dụng các phần mềm tin sinh thiết kế 4 mồi theo nguyên lý của kỹ thuật CTPP (contouring two-pair primers) để đưa vào trong một phản ứng PCR. Tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp để xác định chu trình nhiệt thích hợp. Sử dụng phương pháp giải trình tự gen Sanger để kiểm chứng kết quả của quy trình. **Kết quả:** Xây dựng thành công quy trình PCR với 4 mồi cho cùng một phản ứng để phát hiện kiểu gen của rs1501299 với kết quả nhanh và chính xác. **Kết luận:** Kết quả nghiên cứu này có thể sử dụng trên quy mô lớn hơn để xác định tỷ lệ kiểu gen và phân tích mối liên quan giữa đa hình rs1501299 trên gen *ADIPOQ* với hội chứng chuyển hóa ở người Việt Nam.

\* Từ khóa: rs1501299, gen *ADIPOQ*, CTPP-PCR.

### *A Multiplex PCR Assay for Genotyping *ADIPOQ* Rs1501299 Polymorphism in Vietnamese People*

#### **Summary**

**Objectives:** To develop a multiplex PCR assay for the detection of rs1501299 polymorphism in Vietnamese people. **Subjects and methods:** DNA samples from a group of Vietnamese people were used to evaluate this assay. Some bioinformatics software was used to design four primers for a multiplex PCR. The optimal melting temperature of primers was identified in proper thermal cycling. The Sanger sequencing method was used to confirm the results of this assay. **Results:** The multiplex PCR protocol with four primers successfully identified *ADIPOQ* rs1501299 polymorphism rapidly and accurately. **Conclusion:** The multiplex PCR protocol should be applied to genotyping rs1501299 polymorphism in a large population to investigate the association between this polymorphism and metabolic syndrome in the Vietnamese people.

\* Keywords: rs1501299; *ADIPOQ* gene; CTPP-PCR.

<sup>1</sup>Viện Y học Dự phòng Quân đội

<sup>2</sup>Học viện Quân y

<sup>3</sup>Viện Dinh dưỡng Quốc gia

Người phản hồi: Trần Quang Bình ([tranquangbinh@dinhduong.org.vn](mailto:tranquangbinh@dinhduong.org.vn))

Ngày nhận bài: 05/5/2021

Ngày bài báo được đăng: 27/5/2021

### **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Hội chứng chuyển hóa (HCCH) được hình thành do sự tương tác qua lại giữa yếu tố di truyền và các yếu tố môi trường [10]. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu về các yếu tố môi trường liên quan đến HCCH [1, 2, 3], tuy nhiên, còn thiếu các nghiên cứu về gen liên quan đến hội chứng này. Gen ADIPOQ mã hóa tổng hợp adiponectin, đây là hormone liên quan tới quá trình điều hòa chuyển hóa glucose, lipid và kiểm soát năng lượng, đồng thời nó được coi là hormone “chìa khóa” liên quan đến HCCH [9]. Đa hình đơn nucleotid (SNP - single nucleotid polymorphism) rs1501299 nằm trên đoạn intron 3 thuộc gen ADIPOQ, biến đổi alen G thành alen T. SNP này liên quan đến tình trạng giảm nồng độ hormone adiponectin trong máu, từ đó tác động lên cơ chế hình thành HCCH [8]. Nhiều nghiên cứu trên các quần thể khác nhau đã tìm ra mối liên quan giữa rs1501299 với HCCH [4, 6]. Tuy nhiên, tỷ lệ kiểu gen cũng như sự ảnh hưởng của SNP này đến HCCH là không giống nhau ở các quần thể.

Xác định kiểu gen của SNP là bước quan trọng khi thực hiện nghiên cứu tìm hiểu vai trò yếu tố gen hay sự tương tác gen và môi trường trong cơ chế hình thành bệnh. Tuy nhiên, với những loại hình nghiên cứu này thường đòi hỏi cỡ mẫu lớn. Do đó, phương pháp phân tích kiểu gen của SNP được lựa chọn thường yêu cầu: nhanh, chính xác, giá thành phù hợp. Hai trong số các phương pháp đó là: AS-PCR (Allen specific polymerase chain reaction) và RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism - polymerase chain reaction). Tuy vậy, khi tiến hành 2 phương pháp vẫn cần nhiều thời gian và tốn kém vật tư tiêu hao do phải thực hiện

2 phản ứng PCR (AS-PCR) hoặc cần điện di 2 lần (RFLP-PCR). Do đó, chúng tôi tiến hành: *Xây dựng quy trình PCR đa môi để xác định kiểu gen của rs1501299 trên gen ADIPOQ thông qua thực hiện 1 phản ứng PCR và 1 lần điện di.*

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **1. Đối tượng nghiên cứu**

Mẫu ADN sử dụng trong nghiên cứu này được tách chiết từ máu toàn phần bằng bộ kit Wizard® Genomic ADN Purification (hãng Promega, Hoa Kỳ) từ 15 người, dân tộc Kinh, độ tuổi 40 - 64, sinh sống tại tỉnh Hà Nam. Nghiên cứu này là một phần của đề tài “Nghiên cứu thuần tập 5 năm về bệnh đái tháo đường và hội chứng chuyển hóa ở người Việt Nam: Vai trò yếu tố lối sống và di truyền”. Đề tài đã được Hội đồng Y đức Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương thông qua với Quyết định số IRB-VN01057-34/2016. Sau khi tách chiết, các mẫu ADN được bảo quản ở tủ âm 20°C tại trong phòng thí nghiệm trước khi được sử dụng vào nghiên cứu này.

#### **2. Phương pháp nghiên cứu**

*\* Thiết kế môi:*

Trình tự gen ADIPOQ và đa hình rs1501299 được lấy từ trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học của Hoa Kỳ (NCBI). Các môi được thiết kế dựa trên trình tự sợi dương (chiều 5'-3') theo nguyên lý kỹ thuật CTPP với 4 môi (cặp vòng ngoài: F và R, cặp vòng trong Ft và Rg) [5]. Để tăng tính đặc hiệu của cặp môi vòng trong, chúng tôi thiết kế 1 sai lệch nucleotit tại vị trí ngay sát nucleotit đầu tiên ở đầu 3' của 2 môi vòng trong (Ft và Rg) [7]. Các môi được kiểm tra tính đặc hiệu, và các đặc tính của môi bằng phần mềm thiết kế trực tuyến

Primer-BLAST, OligoAnalyzer trước khi gửi tổng hợp tại công ty IDT (Hoa Kỳ). Trình tự các mồi như sau:

F: 5'-CTGTTCTACTGCTATTAGCTC-3';

R: 5'-CTGTTCTACTGCTATTAGC TC-3';

Ft: 5'-TACACTGATATAAACTATATGAAAT-3';

Rg: 5'-AGGCCTTAGTTAATAAT GAATAC-3'.

Với các mồi trên, tùy vào kiểu gen của rs1501299, phản ứng PCR sẽ tạo ra các sản phẩm khuếch đại với kích thước: 463, 282 và 228 bp tương ứng với các cặp mồi: F-R, F-Rg và Ft-R.

\* *Tối ưu hóa phản ứng PCR đa mồi:*

Các mẫu ADN được đo nồng độ và xác định độ tinh sạch trên máy ND2000 (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Nồng độ các mẫu ADN đưa vào phản ứng được pha loãng ở nồng độ 16-20 ng/ $\mu$ l, tỷ lệ nồng độ ở bước sóng 260 và 280 các mẫu ADN đều đạt từ 1,8 - 2,0. Tổng thể tích phản ứng PCR là 6,5 $\mu$ l gồm 1,3 $\mu$ l nước tinh khiết (UltraPure Distilled Water, Invitrogen); 2,5 $\mu$ l GoTaq Green master Mix 2x (hãng Promega, Hoa Kỳ); 1,75 $\mu$ l cho mỗi mồi: R, F, Ft, Rg và 2 $\mu$ l ADN

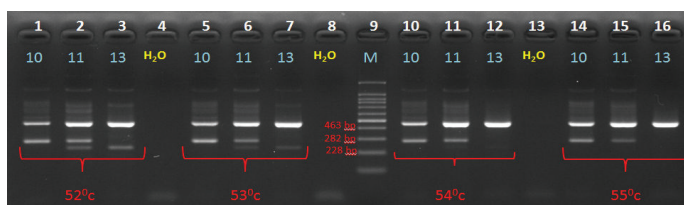
mẫu. Chọn 3 mẫu ADN để thực hiện tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (hãng Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Chu trình nhiệt: giai đoạn biến tính ở 94<sup>o</sup>C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ với 94<sup>o</sup>C trong 30 giây; nhiệt độ bắt cặp được cài đặt ở 4 dải nhiệt độ: 52, 53, 54, 55<sup>o</sup>C trong 40 giây; 72<sup>o</sup>C trong 40 giây, giai đoạn kéo dài ở nhiệt độ 72<sup>o</sup>C trong 8 phút. Thời gian giai đoạn bắt cặp được cài đặt là 30 và 40 giây với chu trình nhiệt như trên để tối ưu thời gian bắt cặp của phản ứng. Đánh giá kết quả phản bằng điện di sản phẩm khuếch đại trên thạch agarose 2,0% ở 100 volt trong 30 phút, đệm TBE 0,5X.

\* *Giải trình tự gen theo phương pháp Sanger:*

Lựa chọn 3 mẫu ADN có 3 kiểu gen khác nhau: GG, GT và TT được xác định bằng quy trình PCR đa mồi trên gửi Công ty Genlab, Việt Nam để giải trình tự gen theo phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được so sánh với kết quả của quy trình theo phương pháp PCR-CTPP.

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

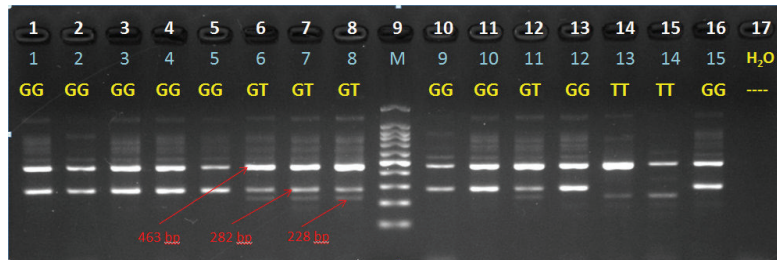
15 mẫu ADN người sử dụng trong nghiên cứu này được đánh số từ 1 - 15. 3 mẫu số 10, 11, 13 được chọn để thực hiện tối ưu tìm nhiệt độ và thời gian bắt cặp thích hợp cho phản ứng PCR đa mồi. Kết quả cho thấy phản ứng có thời gian bắt cặp thích hợp là 40 giây.



Hình 1: Kết quả tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp của phản ứng PCR đa mồi.

Ghi chú: Hàng trên là số thứ tự giếng. Hàng dưới là kí hiệu tên mẫu: 10,11,13, chứng âm là H<sub>2</sub>O, M là thang Maker 100 bp. Giếng 1,2,3 có nhiệt độ bắt cặp 52<sup>o</sup>C; giếng 5,6,7 có nhiệt độ bắt cặp 53<sup>o</sup>C; giếng 10,11,12 có nhiệt độ bắt cặp 54<sup>o</sup>C; giếng 14,15,16, có nhiệt độ bắt cặp 55<sup>o</sup>C

Hình 2 cho thấy với chu trình nhiệt như mô tả ở trên tại nhiệt độ bắt cặp 52<sup>o</sup>C phản ứng PCR đa mồi cho kết quả 3 băng 463bp, 282bp và 228bp rõ nhất. Sử dụng chu trình nhiệt và nhiệt độ bắt cặp này tiến hành xác định kiểu gen rs1501299 cho 15 mẫu ADN.

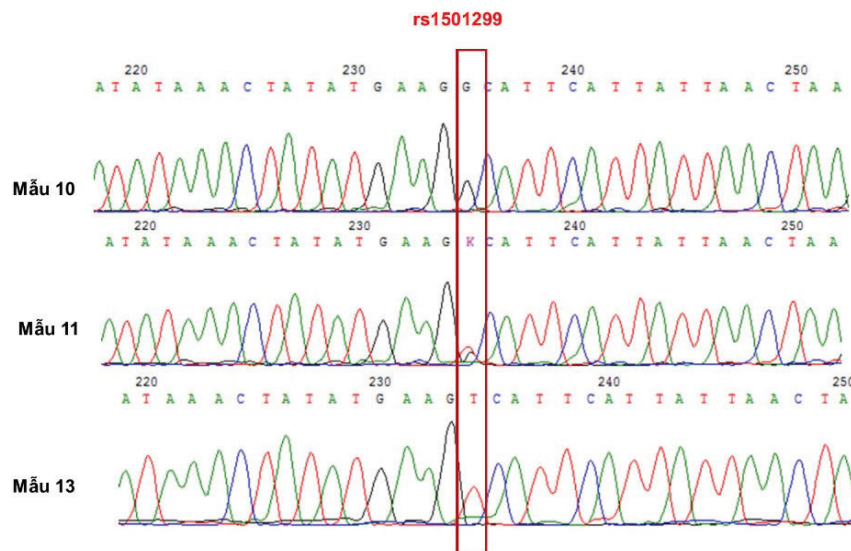


Hình 2: Kết quả kiểu gen rs 1501299 bằng phương pháp PCR đa mồi.

Ghi chú: Hàng trên là số thứ tự giếng. Hàng dưới là kí hiệu tên mẫu từ 1 - 15; M là thang Maker 100 bp; chứng âm là H<sub>2</sub>O. Kiểu gen GG có 2 băng 463bp và 282bp; kiểu gen GT có 3 băng: 463bp, 282bp và 228bp; Kiểu gen TT có 2 băng 463bp và 228bp.

Hình 3 cho thấy kết quả kiểu gen đa hình rs1501299 của 15 mẫu ADN, có 9 mẫu có kiểu gen GG (1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 15), 4 mẫu có kiểu gen GT (6, 7, 8, 11) 2 mẫu có kiểu gen TT (13, 14). Chứng âm nước không có sản phẩm khuếch đại.

Để kiểm chứng kết quả của quy trình này, chúng tôi chọn các mẫu 10, 11 và 13 để thực hiện giải trình tự gen theo phương pháp Sanger.



Hình 3: Kết quả giải trình tự gen 3 mẫu 10, 11 và 13.

Mẫu 10: kiểu gen GG, mẫu 11: kiểu gen GT, mẫu 13: kiểu gen TT

Kết quả giải trình tự gen cho thấy kiểu gen của đa hình rs1501299 3 mẫu 10, 11 và 13 trùng với kết quả phân tích kiểu gen bằng quy trình PCR đa mồi của chúng tôi.

Trong thời gian gần đây, có nhiều phương pháp kỹ thuật để xác định kiểu gen của SNP như: AS-PCR, RFLP-PCR, phương pháp Taqman, gen chip và giải trình tự gen. Mỗi phương pháp đều có những ưu nhược điểm. Trong khi AS-PCR và RFLP-PCR là những phương pháp xác định kiểu gen thường được áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm vì chúng cho kết quả chính xác và không đòi hỏi nhiều thiết bị đắt tiền. Tuy nhiên, cả 2 phương pháp này đều tốn nhiều thời gian và sử dụng nhiều vật tư tiêu hao vì với AS-PCR thì cần phải thực hiện song song 2 phản ứng PCR, RFLP-PCR cần phải thực hiện 2 lần điện di. Phương pháp Taqman đòi hỏi cần 2 probes để xác định số lượng sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình thực hiện phản ứng, có độ chính xác cao nhưng cần có vật liệu và thiết bị đắt tiền. Phương pháp gen chip có giá thành cao, hơn nữa thường được áp dụng khi tiến hành thực hiện xác định kiểu gen với số lượng lớn SNP. Phương pháp giải trình tự gen được coi là tiêu chuẩn vàng cho việc xác định kiểu gen vì chúng có độ tin cậy và chính xác cao, tuy nhiên, kỹ thuật này cũng tốn nhiều thời gian. Ngoài ra, để thực hiện được kỹ thuật này đòi hỏi có nhân viên có kinh nghiệm và được huấn luyện, hơn nữa trang thiết bị và vật tư tiêu hao thường có giá thành cao. Do vậy, sẽ rất khó khăn khi áp dụng kỹ thuật này rộng rãi ở các phòng thí nghiệm.

Phương pháp kỹ thuật PCR đa mồi theo nguyên lý CTPP không đòi hỏi trang thiết bị phức tạp nên có thể triển khai được tại nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử. Ngoài ra, kỹ thuật này chỉ cần sử dụng 1 phản ứng PCR và 1 lần điện di

tương tự như kỹ thuật PCR thường quy giúp giảm thời gian và giá thành khi thực hiện. Mặt khác, trong quá trình thực điện di luôn xuất hiện băng vòng ngoài (463 bp), băng này có vai trò như như chứng nội chắn của phản ứng. Khi nhận định kết quả, nếu một phản ứng không có băng vòng ngoài thì cần được xem xét lại.

Kết quả giải trình tự gen 3 mẫu ADN trùng với kết quả xác định kiểu gen rs1501299 theo phương pháp của chúng tôi, điều đó chứng tỏ quy trình PCR đa mồi này cho kết quả đáng tin cậy.

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thiết kế thành công quy trình PCR đa mồi để xác định kiểu gen của đa hình rs1501299 trên gen *ADIPOQ*. Quy trình thực hiện đơn giản, không yêu cầu thiết bị đắt tiền, cho kết quả nhanh và chính xác. Kết quả của nghiên cứu có thể áp dụng trên quy mô cỡ mẫu lớn hơn để phân tích kiểu gen và đánh giá mối quan hệ giữa rs1501299 với HCCH.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thế Hoàng, Nguyễn Ngọc Quang. Thực trạng hội chứng chuyển hóa và yếu tố liên quan ở bệnh nhân tăng huyết áp được quản lý tại huyện Gio Linh, tỉnh Quảng Trị năm 2016. Tạp chí Y học Dự phòng 2017; 27:47-52.
2. Trần Quang Thuyên, Đinh Hồng Dương, Trần Quang Bình. Hội chứng chuyển hóa và các yếu tố liên quan ở phụ nữ thừa cân vùng nông thôn năm 2011. Tạp chí Y học Dự phòng 2020; 30:35-41.
3. Binh TQ, Phuong PT, Nhung BT. Metabolic syndrome among a middle-aged population in the Red River Delta region of Vietnam. BMC Endocrine Disorders 2014; 14:77.

4. Gao M, Ding D, Huang J, Qu Y, Wang Y, Huang Q. Association of genetic variants in the adiponectin gene with metabolic syndrome: A case-control study and a systematic meta-analysis in the chinese population. *PLOS ONE* 2013; 8:e58412.
5. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Kozaki K, Takahashi T, Tajima K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism Genotyping. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:865-868.
6. Kaur H, Badaruddoza B, Bains V, Kaur A. Genetic association of ADIPOQ gene variants (-3971A>G and +276G>T) with obesity and metabolic syndrome in North Indian Punjabi population. *PLOS ONE* 2018; 13:e0204502.
7. Little S. Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) analysis of point mutations. *Current Protocols in Human Genetic* 1995; 7:9.8.1-9.8.12.
8. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Takefuji S, et al. Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:871-876
9. Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: A key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science* 2006; 110:267-278.
10. Taylor JY, Kraja AT, Fuentes L de las, Stanfill AG, Clark A, Cashion A. An overview of the genomics of metabolic syndrome. *Journal of Nursing Scholarship* 2013; 45:52-59.