

Xây dựng quy trình xác định đa hình đơn nucleotide rs2062345 gen *SOCS6* bằng phương pháp Tetra-primer ARMS PCR trên bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B

Tetra-primer ARMS PCR optimization to detect single nucleotide polymorphism rs2062345 of *SOCS6* gene in patients with hepatitis B virus

Nguyễn Việt Phương*, Lê Văn Khánh**,
Hoàng Văn Tổng**, Nguyễn Thanh Tuấn***,
Vũ Duy Minh***, Trần Viết Tiến*

*Bệnh viện Quân y 103,
**Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự,
***Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phát hiện điểm đa hình đơn nucleotide (SNP) rs2062345 gen *SOCS6* trên bệnh nhân mang virus viêm gan B bằng phương pháp Tetra-primer ARMS PCR (T-ARMS PCR). **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu máu tĩnh mạch bệnh nhân mang virus viêm gan B (viêm gan, xơ gan, ung thư gan); sử dụng phương pháp T-ARMS PCR, có đối chiếu một số mẫu đại diện với phương pháp giải trình tự gen *Sanger*. **Kết quả:** Đã tối ưu được quy trình phản ứng T-ARMS PCR nhằm phát hiện SNP rs2062345 gen *SOCS6*; các kết quả điện di PCR đều rõ nét, không xuất hiện băng phụ phù hợp với kiểu gen của SNP rs2062345 gen *SOCS6*. Kết quả thí nghiệm T-ARMS PCR hoàn toàn tương đồng với phương pháp giải trình tự gen *Sanger*. **Kết luận:** Đã xây dựng thành công quy trình xác định SNP rs2062345 trên gen *SOCS6* bằng phương pháp T-ARMS PCR.

Từ khóa: Đa hình đơn nucleotide, gen *SOCS6*, Tetra-primer ARMS PCR.

Summary

Objective: To construct a protocol to detect single nucleotide polymorphism (SNP) rs2062345 of *SOCS6* gene in patients with hepatitis B virus using Tetra-primer ARMS PCR (T-ARMS PCR). **Subject and method:** Venous blood samples from patients with hepatitis B virus (chronic hepatitis B, cirrhosis, hepatocellular carcinoma), using the T-ARMS PCR method; compared some representative samples with *Sanger* gene sequencing method. **Result:** The T-ARMS PCR technique has been optimized to detect the SNP rs2062345 of *SOCS6* gene. The T-ARMS PCR technique was designed and optimized to detect the SNP rs2062345 of *SOCS6* gene. The PCR electrophoresis results were clearly visible, there were no extra band and matched the genotype of SNP rs2062345 of they *SOCS6* gene, completely similar to the *Sanger* sequencing method. **Conclusion:** T-ARMS PCR has been designed, and optimized to identify SNP rs2062345 of *SOCS6* gene in patients with hepatitis B virus.

Keywords: Single nucleotide polymorphism, suppressor of cytokine signaling 6 gene, Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain.

Ngày nhận bài: 4/5/2023, ngày chấp nhận đăng: 5/6/2023

Người phản hồi: Nguyễn Việt Phương, Email: vietchuongnt203@gmail.com - Bệnh viện Quân y 103

1. Đặt vấn đề

Nhiễm vi rút viêm gan B (HBV) là một bệnh lý truyền nhiễm phổ biến trên thế giới, với khoảng 1/3 dân số nhiễm bệnh. Đáp ứng qua trung gian miễn dịch, điều hòa các con đường tín hiệu cytokine đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh và kết cục lâm sàng của nhiễm vi rút viêm gan B [1].

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu khẳng định vai trò đa hình gen liên quan tới tiến triển ung thư gan trên nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B như các gen *LA-DQB2*, *HLA-DQA1*, *TCF19*, *HLA-C*, *UBE2L3*, *LTL*, *FDX1*, *MICA*, *UBE4B* và *PG*,...[2]. Ức chế tín hiệu cytokine (SOCS - Suppressors of cytokine signaling) là một họ protein gồm 8 thành viên (*CISH*, *SOCS1* đến *SOCS7*), được cảm ứng bởi các kích thích cytokine, nó không chỉ nhằm ngăn cản các tín hiệu từ các cytokine mà còn điều hòa tín hiệu ngược dòng của các cytokine [3], đã và đang được chứng minh có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của nhiễm HBV [4], [5].

Chất ức chế tín hiệu cytokine 6 (*SOCS6*), một thành viên quan trọng họ protein *SOCS*; biểu hiện gen *SOCS6* giảm có liên quan đến các quá trình hình thành lên khối u, bao gồm tăng sinh tế bào bất thường, trốn tránh quá trình apoptosis, di căn ung thư. *SOCS6* đã được xác định là chất điều biến chính tiềm năng trong một loạt bệnh ung thư ở người, chẳng hạn như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô thực quản, ung thư phổi và ung thư tuyến tiền liệt [6].

Hiện nay, có nhiều phương pháp dựa trên kỹ thuật PCR được sử dụng để xác định đa hình gen: *RFLP-PCR*, *ARMS-PCR*, *T-ARMS PCR*, *RT-PCR*, giải trình tự gen *Sanger*,... Trong đó, phương pháp *T-ARMS PCR* là kỹ thuật có nhiều ưu việt hơn do tính chính xác, độ đặc hiệu cao, ít tốn kém, không cần các trang thiết bị đắt tiền và thiết kế quy trình cũng không quá phức tạp [7].

Nghiên cứu này có mục tiêu tối ưu phương pháp *T-ARMS PCR* để phân tích SNP rs2062345 gen *SOCS6* trên đối tượng mang vi rút viêm gan B. Kết quả của nghiên cứu này sẽ giúp cho việc phân tích đa hình gen *SOCS6* trên quy mô lớn trong nghiên cứu tiếp theo.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Mẫu máu tĩnh mạch của bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B được thu thập tại Bệnh viện Quân y 103, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bệnh viện Đống Đa Hà Nội, Bệnh viện Đa khoa Thành phố Cần Thơ.

Lựa chọn cỡ mẫu: Nghiên cứu sử dụng lựa chọn cỡ mẫu thuận tiện, các đối tượng nhiễm vi rút viêm gan B đồng ý tham gia nghiên cứu.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng An toàn Sinh học - Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự - Học viện Quân y.

2.2. Phương pháp

Mẫu máu phân tích đa hình gen *SOCS6*: Khoảng 5ml máu tĩnh mạch được thu thập từ các đối tượng tham gia nghiên cứu bao gồm nhóm viêm gan, xơ gan, ung thư gan và nhóm chứng. Mẫu huyết tương và khối tế bào máu được lưu vào các ống ependorf 1,5ml và được lưu trữ ở tủ âm sâu (-20 hoặc -80°C) cho đến khi tiến hành phân tích mẫu.

Quy trình phương pháp *T-ARMS PCR*

Tách chiết DNA toàn phần từ máu ngoại vi: Tách chiết DNA toàn phần từ máu ngoại vi bằng bộ Kit Gen JET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), quy trình theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch DNA: Sản phẩm DNA toàn phần được đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang (OD: Optical Density) trên máy Nanodrop 2000. Kết quả OD_{260nm} của mẫu DNA được coi là đạt khi nồng độ từ 20ng/μl trở lên. Độ tinh sạch của DNA được đo bằng tỷ số A260/A280 và mẫu DNA tinh sạch khi tỷ số này từ 1,8-2,0.

Xác định đa hình gen *SOCS6*

Xác định trình tự gen *SOCS6* trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI: Suppressor of cytokine signaling 6; GRCh38.p14 (GCF_000001405.40); NC_000018.10 (70289045 - 70330199).

Việc lựa chọn các SNP dựa theo tỷ lệ gặp SNP ở người Việt Nam hoặc người châu Á đã được công bố trên trang NCBI. Cụ thể SNP rs2062345, nằm trên

vùng intron gen SOCS6. Các đột biến xảy ra trên vùng intron có liên quan chặt chẽ tới sự thay đổi khả năng biểu hiện của gen.

Bảng 1. SNP rs2062345 gen SOCS6 trên người Việt Nam

SNP	Alen	SPDI	Trình tự	Đoạn gen	Tần suất
rs2062345	G>A	70301817	AGAGTGTGGTGTGCTGAGCAA	Intron	G=0,292453/62

Thiết kế primer cho điểm SNP trên gen SOCS6.

Chương trình thiết kế primer cho phương pháp T-ARMS PCR được xây dựng bởi Ye (2001) [8], truy cập trực tuyến theo tại trang web: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>.

Bảng 2. Primer SNP rs2062345 gen SOCS6 và các thông số

SNP	Primer	Trình tự primer 5' - 3'
rs2062345	Inner Primer F	GAGGGACCGTGAGAGTGTGTTA
	Inner Primer R	CATATCATTTTACCTCTTTGCTCAGAAC
	Outer Primer F	ATATCTGCAAGACATCAAAGTGGC
	Outer Primer R	TTCCTCTCCAATCTTCTCTGACAC
	A allele	188bp
	G allele	265bp
	Outer - Inner primer	403bp
	Tm	61°C

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Toàn bộ DNA tổng số sau khi được tách chiết sẽ được tiến hành đo nồng độ DNA cũng như kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260nm (OD_{260nm}).

Kết quả cho thấy tất cả các mẫu bệnh phẩm nhóm nghiên cứu, đều có nồng độ DNA tương đối tốt đều > 20ng/μl. Ngoài ra các chỉ số A_{260}/A_{280} các mẫu đều nằm trong khoảng 1,7-2,0; cho thấy các mẫu DNA sau khi tách chiết khá sạch để được sử dụng trong các bước thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Xây dựng quy trình T-ARMS PCR xác định SNP rs2062345 gen SOCS6

3.2.1. Tối ưu điều kiện PCR cho đơn môi

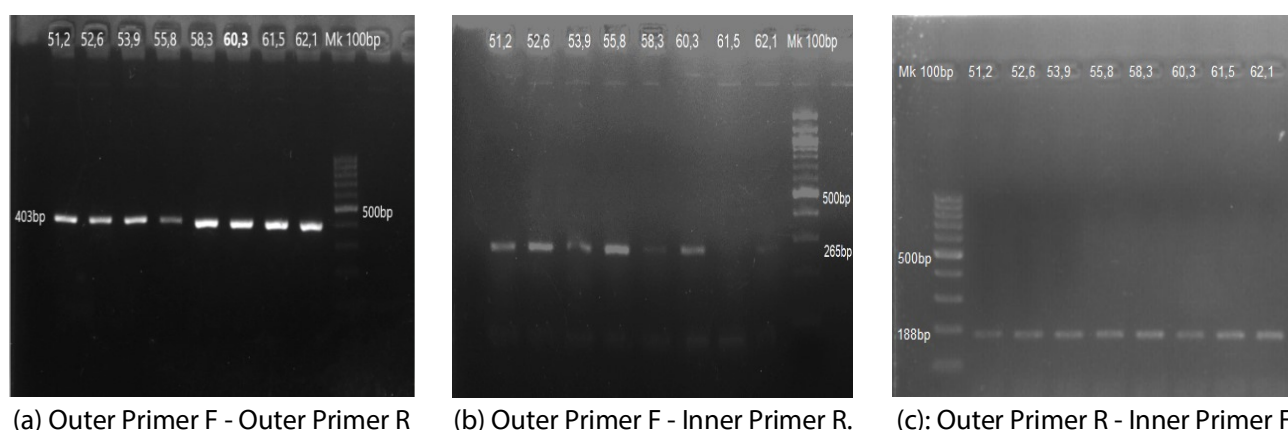
Trước khi chuẩn hóa quy trình cho phản ứng T-ARMS PCR cần chuẩn hóa điều kiện PCR cho từng cặp môi đồng thời để kiểm tra mỗi cặp môi thiết kế có khuếch đại đặc hiệu bằng lên đúng kích thước như tính toán. Chúng tôi sử dụng các mẫu DNA

nhóm nghiên cứu để tiến hành chạy gradient nhiệt độ gần mỗi cho từng cặp môi với dải nhiệt độ từ 52,1°C-62,1°C. Thành phần và điều kiện phản ứng được thực hiện như trong Bảng 1.

Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm RedSafe, quan sát và chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel để phân tích kết quả.

Bảng 3. Thành phần và điều kiện phản ứng PCR đơn môi

Thành phần	Thể tích (μl)	Nồng độ
Gotaq Green Mastermix (2X)	5	
Mỗi xuôi (5μM)	0,5	0,25μM
Mỗi ngược (5μM)	0,5	0,25μM
H ₂ O	3	
DNA (30ng/μl)	1	3ng/μl
Tổng	10	
Chu trình: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây, gradient-45 giây, 72°C-35 giây) × 40, 72°C-5 phút.		



Hình 1. Tối ưu nhiệt độ gắn mỗi cho từng cặp primer của phương pháp T-ARMS PCR

*Nguồn: Chụp từ hệ thống máy điện di BIO-DOC-IT, Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

Trong phản ứng gradient nhiệt độ gắn mỗi cho phản ứng PCR với cặp mỗi "Outer Primer F - Outer Primer R": Kết quả điện di trên gel cho thấy gradient nhiệt độ từ 52,1°C đến 62,1°C đều xuất hiện 1 băng duy nhất, kích thước 403bp, riêng chỉ có tại nhiệt độ 55,8°C thì băng mờ hơn so với các nhiệt độ gắn mỗi khác. Với phản ứng "Outer Primer F - Inner Primer R": Kết quả điện di trên gel cho thấy gradient nhiệt độ từ 52,1°C đến 62,1°C đều xuất hiện 1 băng duy nhất, kích thước 265bp, riêng chỉ có tại nhiệt độ 55,8°C, 61,5°C và 62,1°C thì băng mờ hơn so với các nhiệt độ gắn mỗi khác. Với phản ứng "Outer Primer R - Inner Primer F": Kết quả điện di trên gel cho thấy gradient nhiệt độ từ 52,1°C đến 62,1°C đều xuất hiện 1 băng duy nhất, kích thước 188bp và các băng đều sáng rõ.

Như vậy chúng tôi đã xác định được dải nhiệt độ gắn mỗi cho từng cặp mỗi để có thể chọn được một nhiệt độ phù hợp cho cả 3 băng đều được khuếch đại đặc hiệu trong phản ứng T-ARMS PCR với nhiệt độ gắn mỗi là 60,3°C.

3.2.2. Tối ưu điều kiện phản ứng Tetra-primer ARMS PCR

Phản ứng T-ARMS PCR sử dụng cả 4 mỗi chạy cùng một phản ứng cho phép xác định nhanh kiểu gen một cách thuận tiện và chính xác. Tuy nhiên, khi sử dụng nhiều mỗi trong một phản ứng, các mỗi

khác nhau có khả năng bám vào DNA khác nhau dẫn đến tình trạng cạnh tranh mỗi. Chính vì vậy, việc xác định tỷ lệ nồng độ các mỗi, điều chỉnh các thông số trong phản ứng PCR là điều vô cùng quan trọng.

Chúng tôi tiến hành phản ứng tối ưu nồng độ mỗi trong phản ứng T-ARMS PCR tại nhiệt độ gắn mỗi đã chọn là 60,3°C.

Chúng tôi khảo sát kết quả một số mẫu nhóm viêm gan để đánh giá kết quả phân tích đa hình gen khi cho 4 mỗi chạy cùng một phản ứng. Với thông số ban đầu:

4 Primer đều pha cùng thể tích và nồng độ.

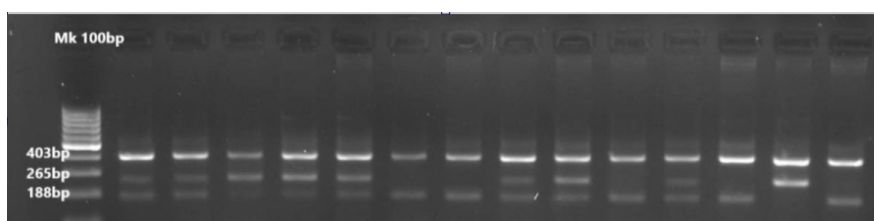
Chu trình PCR: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây; 60,3-45s, 72°C-35 giây) × 35, 72°C-5 phút.

Trong phản ứng T-AMR PCR, thường bằng đích của phản ứng giữa các cặp Outer Primer (F - R) với vai trò xem như tham chiếu chuẩn, sẽ xuất hiện rõ nét, cạnh tranh DNA với các phản ứng với các cặp Inner primer (băng đích alen thường và đột biến). Do vậy, khi tối ưu quy trình, cần chú trọng quan tâm tới điều chỉnh các nồng độ của cặp mỗi Inner Primer để cho các sản phẩm PCR đều xuất hiện rõ nét trong cùng một phản ứng.

Qua nhiều lần thí nghiệm và điều chỉnh nồng độ primer, chúng tôi xây dựng quy trình phân tích điểm SNP rs2062345 như đã trình bày Bảng 4.

Bảng 4. Thành phần phản ứng T-AMRS PCR phát hiện SNP rs2062345

Thành phần	Thể tích (μl)	Chu trình
Gotaq Green Mastermix (2X)	10	Chu trình: (95°C-5 phút, (95°C-45 giây; 60,3-45s, 72°C-25 giây) × 40, 72°C-5 phút. Cách pha Outer Primer và Inner Primer: 2,5μl primer - 97,5μl H ₂ O
Outer Primer (5μM) - F	0,5	
Outer Primer (5μM) - R	0,5	
Inner Primer (5μM): F	1	
Inner Primer (5μM) - R	1	
H ₂ O	8	
DNA (30 ng/μl)	2	
Tổng	23	

**Hình 2.** Kết quả phân tích điểm SNP rs2062345 một số mẫu bệnh sau khi tối ưu phản ứng T-ARMS PCR

*Nguồn: Chụp từ hệ thống máy điện di BIO-DOC-IT, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

Các băng đích 403bp, 265bp, 188bp đều sáng rõ, không xuất hiện băng phụ, phù hợp với kiểu di hợp tử GA, đồng hợp tử GG, AA mục tiêu phân tích.

3.2.3. Kiểm tra kết quả thu được của phản ứng T-ARMS PCR đã xây dựng

Để kiểm tra kết quả của phản ứng T-ARMS PCR, chúng tôi đối chiếu một số mẫu đại diện với kết quả phương pháp giải trình tự gen Sanger. Kết quả cho thấy, hai phương pháp có độ tương đồng 100%. Một số hình ảnh minh họa kiểu gen GG, AA, GA giải trình tự gen Sanger.

**Hình 2.** Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác của phản ứng tetra-primer ARMS PCR

*Nguồn: Chụp từ phần mềm Bioedit

Kiểu gen đồng hợp tử GG có một đỉnh G duy nhất; đồng hợp tử AA có một đỉnh A duy nhất. Kiểu gen dị hợp tử GA có hai đỉnh nucleotide G và nucleotide A lồng vào nhau.

Như vậy, chúng tôi đã tối ưu và xây dựng được quy trình phân tích SNP rs2062345 gen *SOCS6*; kết quả đảm bảo độ tin cậy với mục tiêu phân tích các kết quả trên đối tượng nghiên cứu và tham khảo xây dựng quy trình phân tích các điểm SNP không chỉ trên riêng gen *SOCS6*, mà có thể áp dụng trên các gen và trên các bệnh lý khác nhau.

Để khắc phục nhược điểm phương pháp phân tích SNP cổ điển như ARMS-PCR hay RFLP-PCR, kỹ thuật Tetra-primer ARMS PCR sử dụng 2 cặp primer đặc hiệu đều thực hiện trên 1 phản ứng PCR duy nhất, trên cùng 1 ống PCR. Bên cạnh đó, bước quan trọng nhất trong đảm bảo độ tin cậy của thí nghiệm chính là công đoạn thiết kế primer. Để tăng tính đặc hiệu của phản ứng, bên cạnh vị trí nucleotide tại đầu 3' để phát hiện alen đột biến và alen thường, các cặp primer còn được bổ sung thêm một nucleotide không liên kết - vị trí mismatch tại nucleotide số 2 ở đầu 3' [7]. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định tính ưu việt kỹ thuật T-ARMS PCR so với các kỹ thuật PCR truyền thống, tương đồng cao với

các kết quả giải trình tự gen. Nghiên cứu của Honardoost MA (2014) và cộng sự, độ đặc hiệu, độ nhạy và độ chính xác đều đạt 100% đối với phương pháp T-ARMS PCR, trong khi đó kỹ thuật ARMS PCR thông thường chỉ cho kết quả 47,1% [9]. Nghiên cứu Linjawi, Sabah (2019) cũng ghi nhận độ nhạy độ đặc hiệu phương pháp Tetra-primer ARMS PCR cao hơn rõ rệt so với các phương pháp phân tích SNP truyền thống như ARMS-PCR và RFLP-PCR [10].

4. Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình xác định đa hình đơn nucleotide rs2062345 gen *SOCS6* bằng phương pháp T-ARMS PCR trên bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B. Đây là một phương pháp có nhiều ưu điểm, thiết kế thực hiện không phức tạp, kết quả chính xác, độ tin cậy cao, ít tốn kém, không cần các trang thiết bị đắt tiền.

Tài liệu tham khảo

1. Li X, Liu X, Tian L et al (2016) *Cytokine-mediated immunopathogenesis of hepatitis B virus infections*. Clinical reviews in allergy immunology 50(1): 41-54.
2. Mathew S, Abdel-Hafiz H, Raza A et al (2016) *Host nucleotide polymorphism in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma*. World J Hepatol 8(10): 485-498.
3. Linossi EM, Babon JJ, Hilton DJ et al (2013) *Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective*. Cytokine and growth factor reviews 24(3): 241-248.
4. Hoan NX, Van Tong H, Giang DP et al (2017) *SOCS3 genetic variants and promoter hypermethylation in patients with chronic hepatitis B*. Oncotarget 8(10): 17127-17139.
5. Zhang P, Li F, Li N et al (2014) *Genetic variations of SOCS1 are associated with chronic hepatitis B virus infection*. Human Immunology 75(8): 709-714.
6. Yuan D, Wang W, Su J et al (2018) *SOCS6 functions as a tumor suppressor by inducing apoptosis and inhibiting angiogenesis in human prostate cancer*. Curr Cancer Drug Targets 18(9): 894-904.
7. Medrano RF, de Oliveira CA (2014) *Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development*. Mol Biotechnol 56(7): 599-608.
8. Ye S, Dhillon S, Ke X et al (2001) *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms*. Nucleic Acids Res 29(17): 88-88.
9. Honardoost MA, Tabatabaeian H, Akbari M et al (2014) *Investigation of sensitivity, specificity and accuracy of Tetra primer ARMS PCR method in comparison with conventional ARMS PCR, based on sequencing technique outcomes in IVS-II-I genotyping of beta thalassemia patients*. Gene 549(1): 1-6.
10. Linjawi S, Alsharef Z, Sindi S et al (2019) *Tetra-primer ARMS-PCR as an efficient alternative for SNPs detection in molecular diagnostic: A comparison study*. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research 6(11): 91-96.