

KHẢO SÁT ĐIỂM ĐA HÌNH ĐƠN rs757110 Ở BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TÍP 2 BẰNG KỸ THUẬT ARMS-PCR

Lê Gia Hoàng Linh¹, Đỗ Đức Minh¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Đái tháo đường típ 2 là một bệnh lý mạn tính có sự đóng góp của yếu tố di truyền. Một số nghiên cứu đã cho thấy sự liên quan giữa đái tháo đường típ 2 và các điểm đa hình đơn nucleotide, trong đó điểm đa hình đơn rs757110 của gen ABCC8. Giải trình tự Sanger là tiêu chuẩn vàng trong việc xác định điểm đa hình đơn, tuy nhiên lại tốn nhiều chi phí và thời gian. Chính vì vậy, việc tìm ra một phương pháp vừa cung cấp thông tin chính xác, vừa đủ đơn giản để áp dụng rộng rãi là thực sự cần thiết. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình xác định điểm đa hình đơn rs757110 trên bệnh nhân đái tháo đường típ 2 bằng kỹ thuật PCR. **Đối tượng – Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu xây dựng quy trình được thực hiện trên mẫu DNA tách từ máu ngoại vi của 50 bệnh nhân đái tháo đường típ 2 và 50 người bình thường. Biến thể rs757110 được xác định bằng phương pháp Tetra-ARMS PCR kết hợp với giải trình tự Sanger. **Kết quả:** Phương pháp tetra-ARMS PCR được ứng dụng thành công để xác định kiểu gen của điểm đa hình rs757110. Biến thể rs757110 trong dân số nghiên cứu đạt cân bằng Hardy-Weinberg với $p=0,83$. Tần suất alen G lần lượt là 0,44 và 0,27 ở mẫu bệnh và mẫu chứng. Dữ liệu phân tích của chúng tôi cho thấy kiểu gen G/G làm gia tăng nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ típ 2 so với kiểu gen T/T (OR=9,67, 95%CI=1,92-48,8, $p<0,05$). Kiểu gen T/G làm tăng nguy cơ mắc bệnh so với kiểu gen T/T (OR=3,23, 95%CI=1,11-9,39, $p<0,05$). **Kết luận:** Với trình tự môi và điều kiện phản ứng như đã thiết kế, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình xác định điểm đa hình đơn rs757110 bằng phương pháp tetra-ARMS PCR và cho thấy có mối liên hệ giữa biến thể này với bệnh lý đái tháo đường típ 2.

Từ khóa: đái tháo đường típ 2, rs757110, ABCC8, Tetra-ARMS PCR

SUMMARY

SURVEYING VARIANTS RS757110 IN TYPE 2 DIABETES PATIENTS BY ARMS-PCR

Background: Type 2 diabetes is a chronic disease with genetic predisposition. Several studies have shown the association between type 2 diabetes and certain single polymorphisms, including rs757110 of ABCC8 gene. Sanger sequencing, so far, is the gold standard for determining single nucleotide polymorphism, but it is costly and time consuming. Therefore, it is necessary to develop a method that provides accurate information and is simple enough to

be widely applied. **Objectives:** To develop a protocol to determine single nucleotide polymorphism variants rs757110 in patients with type 2 diabetes. **Methods:** The study was carried out on DNA samples isolated from the blood of 50 patients with type 2 diabetes and 50 controls. The rs757110 variant was identified by Tetra-ARMS PCR combined with Sanger sequencing. **Results:** Rs757110 was successfully identified by tetra-ARMS PCR. Rs757110 was in Hardy-Weinberg equilibrium with p -value = 0,83. The G allele frequencies were 0,44 and 0,27 in the patient and control samples, respectively. The G/G genotype increased the risk of type 2 diabetes compared with the T/T genotype (OR=9,67, 95%CI=1,92-48,8, $p<0,05$). The T/G genotype increased the risk of the disease compared with the T/T genotype (OR=3,23, 95%CI=1,11-9,39, $p<0,05$). **Conclusion:** We have successfully built a procedure to identify the single nucleotide polymorphism variants rs757110 with high sensitivity and specificity. This variant has been shown to be associated with type 2 diabetes.

Keywords: type 2 diabetes, rs757110, ABCC8, Tetra-ARMS PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một rối loạn chuyển hóa mạn tính, đặc trưng bởi sự giảm tiết insulin và đề kháng insulin ngoại vi dẫn đến tình trạng tăng glucose máu. Đái tháo đường thường được chia ra làm 3 nhóm chính: típ 1, típ 2 và đái tháo đường thai kỳ; trong đó ĐTĐ típ 2 chiếm 90-95% trong tổng số ca mắc (1). Tỷ lệ mắc bệnh ĐTĐ trên toàn cầu đang gia tăng nhanh chóng, và năm 2019 Liên Đoàn Đái Tháo Đường Quốc Tế (IDF) đã ước tính có khoảng 463 triệu người trên thế giới mắc ĐTĐ ở độ tuổi từ 20 trở lên, tạo ra gánh nặng về sức khỏe và kinh tế cho xã hội (2).

Các nghiên cứu đã cho thấy nguy cơ mắc ĐTĐ típ 2 được quyết định bởi nhiều gen, trong đó có ABCC8 (3). Gen ABCC8 là một gen cấu tạo nên kênh vận chuyển kali phụ thuộc ATP của tế bào β tụy, đóng vai trò quan trọng trong việc phóng thích insulin. Tính đa hình của gen ABCC8 về sự liên quan với khả năng mắc ĐTĐ típ 2 đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu, do làm giảm độ nhạy của kênh Kali đối với ATP, từ đó ức chế việc bài tiết insulin từ tế bào β tụy (4). Trong số các biến thể đã được nghiên cứu của gen ABCC8, rs757110 đã được nghiên cứu rộng rãi ở các nước châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản và ghi nhận rằng có sự tương quan

¹Đại học Y Dược TPHCM

Chịu trách nhiệm chính: Đỗ Đức Minh

Email: ducminh@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 2.6.2023

Ngày phản biện khoa học: 19.7.2023

Ngày duyệt bài: 4.8.2023

giữa điểm đa hình đơn này với nguy cơ mắc ĐTD típ 2. Cho đến nay, có nhiều phương pháp để phát hiện biến thể, trong đó, giải trình tự chuỗi DNA vẫn là tiêu chuẩn vàng. Tuy nhiên phương pháp này có nhiều điểm hạn chế là chi phí cao và thời gian trả kết quả chậm. Để khắc phục các nhược điểm này, nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp Tetra-ARMS PCR để phát hiện biến thể rs757110 với chi phí thấp hơn, thời gian trả kết quả nhanh hơn nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình xác định điểm đa hình đơn rs757110 trên bệnh nhân ĐTD típ 2, từ đó ứng dụng phân tích mối liên hệ giữa rs757110 và nguy cơ mắc ĐTD típ 2 tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Đối tượng nghiên cứu: Thu thập 50 mẫu máu của bệnh nhân mắc đái tháo đường típ 2 và 50 người không mắc đái tháo đường đến khám tại bệnh viện Đại học Y Dược từ tháng 04/2020 đến 04/2021 để xác định biến thể rs757110 trên gen ABCC8 bằng phương pháp Tetra-ARMS PCR. Đối tượng được chọn vào nghiên cứu chia thành 2 nhóm: nhóm bệnh và nhóm chứng. Nhóm bệnh bao gồm các bệnh nhân được chẩn đoán xác định ĐTD típ 2 theo tiêu chuẩn của Hiệp Hội Đái Tháo Đường Hoa Kỳ 2019; nhóm chứng là những người khám sức khỏe định kỳ và không mắc ĐTD type 2. Tiêu chuẩn loại trừ của cả 2 nhóm là những người không đồng ý tham gia nghiên cứu. Tất cả đối tượng nghiên cứu được lấy 2ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA và vận chuyển đảm bảo an toàn sinh học đến Trung tâm Y Sinh học phân tử - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu máu được lưu trữ ở 4°C không quá 24h, DNA được tách chiết bằng bộ Thermo Scientific GeneJET Whole Blood Genomic DNA purification Mini kit (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng máy Nanodrop™ (Thermo Scientific) để xác định nồng độ và độ tinh sạch.

Khuếch đại phân đoạn gen mang rs757110: 20 mẫu được chọn ngẫu nhiên để xác định trình tự biến thể bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Phân đoạn gen mục tiêu sẽ được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi gồm mồi xuôi F: 5'-AACTGGATGGTGAGGAACCT-3'; mồi ngược R: 5'-AGGAGACTGCGATGTCTGAA-3'. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn biến tính 98°C 3 phút, lặp lại 30 chu kỳ (biến tính 98°C 15 giây,

gắn mồi 60°C, 20 giây, kéo dài 72°C, 40 giây), đảm bảo sản phẩm được kéo dài 72°C trong 2 phút. Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2% và kích thước band mong muốn là 522bp.

Tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR bằng Exo-Alp PCR Cleanup Mix. Sản phẩm PCR tinh khiết có thể được sử dụng trực tiếp để giải trình tự Sanger. Sản phẩm sau khi được tủa và biến tính được nạp vào đĩa 96 giếng để chạy giải trình tự gen điện di mao quản bằng hệ thống ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Scientific).

Tetra-ARMS PCR xác định kiểu gen

Các mẫu đã biết kiểu gen từ kết quả giải trình tự Sanger được dùng làm chứng dương cho quy trình Tetra-ARMS PCR. Các mồi được thiết kế có trình tự như bảng 1, nhiệt độ bắt cặp và tỉ lệ 4 mồi F/T-R/WT-F/R được điều chỉnh nhằm đạt được sản phẩm khuếch đại đặc hiệu và các band điện di tương ứng từng kiểu gen có độ sáng đều nhau. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng Tetra-ARMS PCR như sau: giai đoạn biến tính 98°C 3 phút, lặp lại 30 chu kỳ (biến tính 98°C 15 giây, gắn mồi 60°C, 20 giây, kéo dài 72°C, 40 giây), ổn định ở 72°C trong 2 phút.

Bảng 1: Trình tự mồi thiết kế cho phản ứng Tetra-ARMS PCR

Tên mồi	Trình tự mồi	Tỉ lệ mồi
rs7110-F	5'-AACTGGATGGTGAGGAACCT-3'	1
rs7110-T-R	5'-CTGACCTTCTGTCCAGGAGA-3'	3
rs7110-WT-F	5'-GCACGTCAATGCCCTCATCG-3'	1
rs7110-R	5'-AGGAGACTGCGATGTCTGAA-3'	0,5

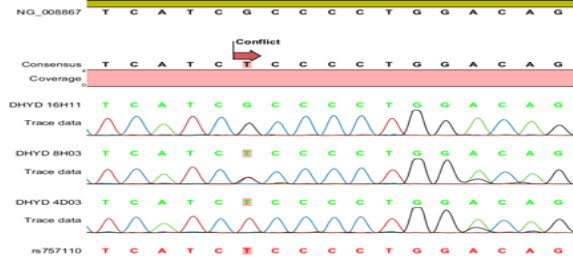
Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 2%. Chiều dài sản phẩm PCR cho mồi F/R là 522 bp, F/T-R là 390 bp, WT-F/R là 172 bp. Mẫu có kiểu gen G/G sẽ xuất hiện band 522 + 172 bp; mẫu T/T là 522 + 390 bp; mẫu T/G là 522 + 390 + 172 bp trên kết quả điện di.

Y đức của nghiên cứu: Nghiên cứu đã được được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (số 350/HĐĐĐ-ĐHYD).

Phân tích thống kê. Tần số kiểu gen được đánh giá cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) bằng cách sử dụng phép kiểm Chi bình phương về mức độ phù hợp và so sánh sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Công cụ web SNPstats được sử dụng để kiểm tra mối tương quan giữa rs757110 trên gen ABCC8 và bệnh đái tháo đường típ 2. Tất cả các phân tích cho kết quả có ý nghĩa thống kê khi trị số $p \leq 0,05$.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả giải trình tự Sanger. Các mẫu dùng làm chứng dương sau khi đã xác định được kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Trong 20 mẫu ngẫu nhiên được giải xác định được 3 kiểu gen G/G, T/G và T/T; trong đó có 2/20 mẫu có kiểu gen G/G, 7/20 mẫu có kiểu gen T/G và 11/20 mẫu T/T (Hình 1)



Hình 1: Kết quả giải trình tự Sanger cho 3 kiểu gen G/G, T/G, T/T

Kết quả tối ưu quy trình tetra-ARMS PCR. Phản ứng tetra-ARMS PCR dùng 4 mỗi trong cùng một phản ứng PCR nên sẽ có sự cạnh tranh giữa các môi. Vì vậy, việc xác định nhiệt độ bắt cặp môi và tỷ lệ môi trong phản ứng này là điều vô cùng quan trọng. Đầu tiên các cặp môi đơn của tổ hợp 4 mỗi sẽ được chạy PCR để xác định nhiệt độ bắt cặp môi phù hợp cho tổ hợp, ở đây nhiệt độ bắt cặp tối ưu được chọn là 60°C. Tiếp theo, phản ứng tetra-ARMS PCR được tiến hành tối ưu nồng độ môi tại nhiệt độ gần mỗi 60°C. Sau khi khảo sát các tỉ lệ môi cho kết quả tỉ lệ mỗi rs7110F/T-R/WT-R/R với tỉ lệ tương ứng

theo thứ tự 1/3/1/0,5 cho kết quả các band đúng theo kích thước đã thiết kế ban đầu với mẫu dương mang kiểu gen G/G có 2 band 552 + 172 bp, chứng dương có kiểu gen T/G chứa 3 band 522 + 390 + 172 bp và chứng dương có kiểu gen T/T chứa 2 band 522 + 390 bp (Hình 2).



Hình 2: Kết quả tối ưu phản ứng tetra-ARMS PCR với tỉ lệ mỗi rs7110F/T-R/WT-R/R với tỉ lệ tương ứng theo thứ tự 1/3/1/0.5 trên 3 mẫu chứng dương đã được xác định bằng giải trình tự Sanger

Kết quả khảo sát tỷ lệ kiểu gen rs757110 trên mẫu bệnh và mẫu chứng. Sau khi đã tối ưu quy trình tetra-ARMS xác định điểm đa hình đơn rs757110, chúng tôi áp dụng cho 80 mẫu còn lại. Kết quả cụ thể thu được như trong Bảng 2:

Bảng 2: Kết quả khảo sát kiểu gen/alen trên 100 mẫu

		Tần suất kiểu gen			
rs757110		Tổng số	Nhóm bệnh	Nhóm chứng	p-value
Kiểu alen	T	129 (64%)	56 (56%)	73 (73%)	P<0,02
	G	71 (36%)	44 (44%)	27 (27%)	
Kiểu gen	G/G	13 (13%)	10 (20%)	3 (6%)	P<0,05
	T/G	45 (45%)	24 (48%)	21 (42%)	
	T/T	42 (42%)	16 (32%)	26 (52%)	

Kiểm định HWE cho biến thể này ở dân số nghiên cứu có tần suất alen G lần lượt là 0,44 và 0,27, tần suất alen T là 0,56 và 0,73 ở mẫu bệnh và mẫu chứng (p=0,83). Tỷ lệ kiểu gen T/T chiếm ưu thế với 42%, tiếp đến kiểu gen T/G là 45% và kiểu gen G/G chiếm 13% trong 100 mẫu bệnh và chứng được khảo sát. Ở mỗi nhóm bệnh và nhóm chứng, tỉ lệ kiểu gen T/G như nhau nhưng tỉ lệ 2 kiểu gen đồng hợp G/G và T/T có

sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ alen T trội hơn ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng, tỉ lệ alen G ở nhóm bệnh (44%) cao hơn ở nhóm chứng (27%). Dữ liệu phân tích của chúng tôi cho thấy kiểu gen G/G làm gia tăng nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ típ 2 so với kiểu gen T/T (OR=9,67, 95%CI=1,92-48,8, p<0,05). Kiểu gen T/G làm tăng nguy cơ mắc bệnh so với kiểu gen T/T (OR=3,23, 95%CI=1,11-9,39, p<0,05) (Bảng 3)

Bảng 3: Tỷ lệ kiểu gen của rs757110 và mối liên quan với nguy cơ mắc đái tháo đường típ 2

Mô hình	Kiểu gen	Nhóm bệnh	Nhóm chứng	OR (95% CI)	P-value
Đồng trội	T/T	16 (32%)	26 (52%)	1	p<0,02

	T/G	24 (48%)	21 (42%)	3,23 (1,11-9,39)	
	G/G	10 (20%)	3 (6%)	9,67 (1,92-48,8)	
Trội	T/T	16 (32%)	26 (52%)	1	p<0,01
	T/G-G/G	34 (68%)	24 (48%)	4,07 (1,46-11,32)	
Lặn	T/T-T/G	40 (80%)	47 (94%)	1	p<0,03
	G/G	10 (20%)	3 (6%)	4,93 (1,15-21,16)	
Cộng hợp	T/T-G/G	26 (52%)	29 (58%)	1	0,22
	T/G	24 (48%)	21 (42%)	1,76 (0,70-4,40)	

IV. BÀN LUẬN

Đái tháo đường là một trong những nguyên nhân phổ biến gây tàn tật và tử vong sớm ở hầu hết các quốc gia và là nguyên nhân hàng đầu gây mù loà, bệnh tim mạch, suy thận và loét chân dẫn đến đoạn chi.

Tại Việt Nam, năm 2021, tỷ lệ hiện mắc đái tháo đường ở người trưởng thành khoảng gần 5 triệu người. Trong đó, số đã được chẩn đoán chỉ chiếm khoảng 35% và số đang được quản lý, điều trị tại các cơ sở y tế chiếm 23,3%. Theo dự báo, số mắc đái tháo đường của Việt Nam cũng như toàn thế giới sẽ tiếp tục tăng nhanh trong những năm tới. Nhiều nghiên cứu về khuynh hướng di truyền ghi nhận rằng một số gen và điểm đa hình đơn (SNP) có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường típ 2 ở người châu Á, mà cụ thể là người Kinh Việt Nam (5).

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng phương pháp Tetra-ARMS PCR giúp phát hiện biến thể với độ chính xác cao, chi phí thấp, và thời gian ít hơn rất nhiều so với phương pháp giải trình tự Sanger. Trong nghiên cứu của tác giả Ehnert S và cộng sự, độ chính xác của phương pháp Tetra-ARMS PCR trong việc xác định biến thể là 100% (6). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi những nghiên cứu khác (7, 8) dù các nghiên cứu này áp dụng không cùng đối tượng với chúng tôi. Trong nghiên cứu trên 100 mẫu bệnh và chứng của chúng tôi đã xác định có mối liên hệ giữa tính đa hình rs757110 trên gen ABCC8 và nguy cơ với bệnh đái tháo đường típ 2. Tuy nhiên, vẫn cần có các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để xác định chính xác mối liên quan này và vai trò của biến thể rs757110 như là một yếu tố nguy cơ di truyền của bệnh ĐTĐ típ 2 ở quần thể người Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Qua thực nghiệm trên 100 mẫu DNA, nhóm nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình xác định điểm đa hình đơn rs757110 với chi phí thấp hơn, tiết kiệm thời gian hơn nhưng vẫn nhận

được kết quả chính xác tương ứng từng kiểu gen. Chúng tôi mong rằng kết quả nghiên cứu này sẽ là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu tìm mối liên quan giữa rs757110 và đái tháo đường típ 2 với cỡ mẫu lớn tại Việt Nam, từ đó giúp xác định cụ thể hơn vai trò của yếu tố di truyền trong bệnh lý này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Prevention CfDca.** What is Diabetes? [updated July 7, 2022; cited 2022 September 12]. Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html>.
- 2. Saedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al.** Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. Diabetes research and clinical practice. 2019;157:107843.
- 3. Gonen MS, Arikoglu H, Erkoç Kaya D, Ozdemir H, Ipekci SH, Arslan A, et al.** Effects of single nucleotide polymorphisms in K(ATP) channel genes on type 2 diabetes in a Turkish population. Archives of medical research. 2012;43(4):317-23.
- 4. Remedi MS, Koster JC.** K(ATP) channelopathies in the pancreas. Pflugers Archiv: European journal of physiology. 2010;460(2):307-20.
- 5. Trương S, Trần NQ, Mã PT, Hoàng CK, Lê BH, Đinh T, et al.** Association of ADIPOQ Single-Nucleotide Polymorphisms with the Two Clinical Phenotypes Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome in a Kinh Vietnamese Population. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 2022;15:307-19.
- 6. Ehnert S, Linnemann C, Braun B, Botsch J, Leibiger K, Hemmann P, et al.** One-Step ARMS-PCR for the Detection of SNPs-Using the Example of the PADI4 Gene. Methods and protocols. 2019;2(3).
- 7. Jin C, Li Z, Zheng X, Shen K, Chao J, Dong Y, et al.** Development and validation of T-ARMS-PCR to detect CYP2C19*17 allele. Journal of clinical laboratory analysis. 2020;34(1):e23005.
- 8. Zhang S, Dang Y, Zhang Q, Qin Q, Lei C, Chen H, et al.** Tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR) rapidly identified a critical missense mutation (P236T) of bovine ACADVL gene affecting growth traits. Gene. 2015;559(2):184-8.