

ĐÁNH GIÁ PHƯƠNG PHÁP TETRA-PRIMER ARMS-PCR XÁC ĐỊNH KIỂU GEN SNP THỬ NGHIỆM TRÊN *rs456168 C>A* Ở BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

Lê Diệu Linh¹, Bùi Khắc Cường²
Nguyễn Thị Mai Ly^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR trong xác định kiểu gen của đa hình đơn nucleotide (SNP) *rs456168 C>A* trên bệnh nhân đái tháo đường.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm, sử dụng phương pháp PCR khuếch đại đoạn DNA chứa SNP *rs456168 C>A* trên 30 mẫu máu người từ 3 nhóm (người khỏe mạnh, bệnh nhân đái tháo đường có và không có rối loạn lipid máu), mỗi nhóm 10 người. Giải trình tự đoạn khuếch đại bằng phương pháp Sanger xác định kiểu gen của SNP, làm cơ sở đánh giá hiệu quả của phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR trong xác định kiểu gen.

Kết quả: Sản phẩm DNA dài 183 bp xuất hiện ở cả 23 mẫu có chứa alen C (100%), xác định 10/10 mẫu mang kiểu gen C/C. Sản phẩm DNA dài 166 bp, đặc hiệu với alen A xuất hiện ở 16/20 mẫu (80,0%), trong đó, 6 mẫu đồng hợp và 10 mẫu dị hợp. Có 1 mẫu A/A không xuất hiện band và 3 mẫu A/C chỉ xuất hiện band 183 bp. Nhận biết thành công alen C trên tất cả các mẫu thử nghiệm trong điều kiện thí nghiệm phản ứng PCR. Đồng thời, chỉ có 80% số mẫu khảo sát xác định chính xác alen A.

Kết luận: Tetra-primer ARMS-PCR là phương pháp đơn giản, kinh tế và hiệu quả trong xác định kiểu gen SNP, song quá trình tối ưu phản ứng có thể tốn thời gian và gặp một số khó khăn.

Từ khóa: ARMS-PCR, Tetra-primer, *rs456168 C>A*, giải trình tự gen.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the Tetra-primer ARMS-PCR method for genotyping the single nucleotide polymorphism (SNP) *rs456168 C>A* in diabetic patients.

Subjects and methods: This experimental study used PCR to amplify the DNA fragment containing SNP *rs456168 C>A* from 30 human blood samples divided into three groups (healthy individuals, diabetic patients with dyslipidemia, and diabetic patients without dyslipidemia), each group comprising 10 subjects. The amplified products were subjected to Sanger sequencing to define the SNP genotypes, providing a reference for assessing the accuracy and efficiency of the tetra-primer ARMS-PCR assay.

Results: A 183 bp DNA band corresponding to the C allele was detected in all 23 samples harboring that allele (100%), correctly identifying 10/10 samples as C/C homozygotes. The 166 bp band specific to the A allele appeared in 16/20 samples (80.0%), including 6 A/A homozygotes and 10 A/C heterozygotes. One A/A sample failed to yield any band, and three A/C samples showed only the 183 bp band. Thus, the C allele was consistently detected in all samples under the optimized PCR conditions, while accurate identification of the A allele was achieved in 80% of cases.

Conclusions: Tetra-primer ARMS-PCR is a simple, cost-effective, and reliable method for SNP genotyping, although reaction optimization can be time-consuming and may encounter technical challenges.

Keywords: ARMS-PCR, Tetra-primer, *rs456168 C>A*, sequencing.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Mai Ly, Email: dr.nguyenmaily@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/02/2025; mời phản biện khoa học: 3/2025 ; chấp nhận đăng: 25/8/2025.

¹Học viện Quân y.

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism - SNP) là biến thể với tỉ lệ lớn hơn 1% trong quần thể, xuất hiện do đột biến thay

thế tại một vị trí nucleotide trong hệ gen [1]. Dựa vào việc thu thập, xác định kiểu gen của các biến thể di truyền trên một số lượng lớn cá thể, các nghiên cứu này sẽ tìm ra các biến thể nhất định

có mối liên hệ chặt chẽ với các biểu hiện của một tình trạng hoặc bệnh lý [2]. Trong đó, SNP là một biến thể quan trọng bởi sự đơn giản và phổ biến của nó trong hệ gen. Bằng việc liên kết các tình trạng phức tạp với một hoặc vài SNP, việc chẩn đoán, nghiên cứu cơ chế sinh bệnh và cách điều trị được đơn giản hóa. Vì vậy, xác định kiểu gen của SNP nhanh chóng và chính xác với số lượng lớn rất quan trọng [3].

Tetra-primer ARMS-PCR là phương pháp đơn giản, không yêu cầu các thiết bị và hóa chất đắt tiền, có thể tiến hành với số lượng mẫu lớn. Đây là phương pháp đơn giản nhằm phân biệt hai alen của một SNP qua một phản ứng PCR. Nguyên lý dựa trên việc sử dụng bốn mồi trong cùng một phản ứng; trong đó, hai mồi ngoài (xuôi và ngược) sẽ nhận biết 2 trình tự đặc hiệu để khuếch đại một đoạn DNA chứa SNP. Đoạn DNA này là đoạn chung và có kích thước lớn nhất, xuất hiện ở tất cả mẫu nếu phản ứng PCR thành công. Hai mồi còn lại đặc hiệu với từng alen, vì mỗi mồi có nucleotide cuối cùng bổ sung với một alen khác nhau của SNP. Mỗi mồi sẽ bắt cặp với một mồi ngoài, giúp khuếch đại các đoạn DNA chứa alen tương ứng và tạo ra các đoạn DNA có kích thước khác nhau. Sau đó, sản phẩm của phản ứng PCR được phân tách trên gel Agarose, phân tích các đoạn DNA được tạo ra trong phản ứng của mỗi mẫu có thể nhận biết được hai alen khác nhau của một SNP [4]. Với nguyên lý này, thực hiện tetra-primer ARMS-PCR với các bước và vật tư như một phản ứng PCR thông thường. Do đó, việc phát triển và hoàn thiện quy trình sử dụng phương pháp này có thể giảm chi phí, thời gian xác định kiểu gen của SNP đó trên một số lượng mẫu lớn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả của phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR trong phân biệt hai alen A và C của SNP *rs456168* trên gen *Fat-specific protein 27 (Fsp27)*. Protein này có vai trò quan trọng trong việc dự trữ chất béo tại các mô mỡ và có liên quan đến tình trạng đái tháo đường (ĐTĐ) [5]. Việc xác định mối liên hệ giữa kiểu gen của SNP *rs456168* có thể góp phần phát triển marker cho bệnh nhân ĐTĐ. Bên cạnh đó, việc phát triển phương pháp xác định kiểu gen của SNP nhanh chóng và đơn giản sẽ giúp chẩn đoán nhanh và tiện lợi hơn. Nghiên cứu này sử dụng giải trình tự Sanger để xác nhận kiểu gen của bệnh nhân ĐTĐ và đánh giá bằng cách so sánh với kết quả giải trình tự Sanger.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 mẫu máu người từ 3 nhóm, mỗi nhóm 10 người, gồm: nhóm người khỏe mạnh, nhóm bệnh nhân ĐTĐ có rối loạn lipid máu và nhóm không rối loạn lipid máu. Thu các tế bào máu và tách DNA

bằng bộ kit E.Z.N.A. Blood DNA Mini (Omega, Bio-Tek, USA).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tetra-primer ARMS-PCR: nguyên tắc thiết kế mồi nhờ vào nucleotide cuối cùng ở đầu 3' (nhằm phân biệt hai alen của SNP). Để tăng tính đặc hiệu của quá trình gắn mồi, một nucleotide ở vị trí -2 từ đầu 3' được chủ đích thiết kế sai làm giảm độ bám của mồi. Nguyên tắc lựa chọn nucleotide bắt cặp sai: nếu cặp nucleotide ở đầu 3' lệch nhau mạnh (G/A hoặc C/T) sẽ cần một cặp sai yếu hơn (C/A hoặc G/T) hoặc ngược lại [6]. Một cặp bắt sai trung bình (A/A, C/C, G/G hoặc T/T) ở đầu 3' sẽ cần một cặp sai trung bình thứ hai. Do đó, cấu trúc của mồi trong như sau: 5'-(N)nMNS-3', trong đó, N là nucleotide đặc hiệu với trình tự nằm ở đầu 3' của SNP; n thường khoảng 23-27; M là nucleotide bắt cặp sai theo nguyên tắc nêu trên để tăng tính đặc hiệu của mồi; S là nucleotide nhận biết đặc hiệu với mỗi alen của SNP. Trong thí nghiệm này, thiết kế bộ mồi cho phản ứng tetra-primer ARMS-PCR phát triển bởi Ye [7] (theo website <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>). Trình tự mồi cho SNP *rs456168* tại bảng 1.

Bảng 1. Trình tự primer trong phản ứng Tetra-primer ARMS-PCR phân biệt SNP *rs456168* C>A

Primer	Trình tự	Sản phẩm
Mồi xuôi ngoài	5'-CCCAGCTC ACAGCTGGGC TGTGCAACG-3'	- Sản phẩm chung 292 bp - Đoạn chứa alen A: 166 bp - Đoạn chứa alen C: 183 bp
Mồi ngược ngoài	5'-GAGCCCAG TCAGGAGGGG TGGGGAGGTG-3'	
Mồi xuôi trong (alen A)	5'-CTGGGGGC CTTGGGGCTG GGCTCCAAA-3'	
Mồi ngược trong (alen C)	5'-CGTACCTCTG TGGTGACCCAG CAGCTGTTG-3'	

- Phản ứng PCR: sản phẩm DNA tách từ mẫu máu được nhân lên bằng phản ứng PCR chứa Taq 2X PCR master mix (Phusa Genomics), 3% DMSO, 1-2 µL DNA hệ gen và bốn loại primer với nồng độ cuối cùng trong phản ứng lần lượt là mồi ngoài xuôi: ngoài ngược: trong xuôi: trong ngược = 0,15:0,15:0,25:0,25 µM. Chu trình nhiệt sử dụng cho phản ứng tách mạch ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 40 vòng nhiệt, bao gồm: 95°C trong 30 giây để tách mạch; 70°C trong 30 giây để gắn mồi và kéo dài trong 30 giây 72°C; cuối cùng là 5 phút ở 72°C để hoàn thành bước kéo dài. Phân tách sản phẩm PCR trên gel Agarose 2,5%, nhuộm với RedSafe Nucleic Acid staining và điện di ở 70V trong 2 giờ.

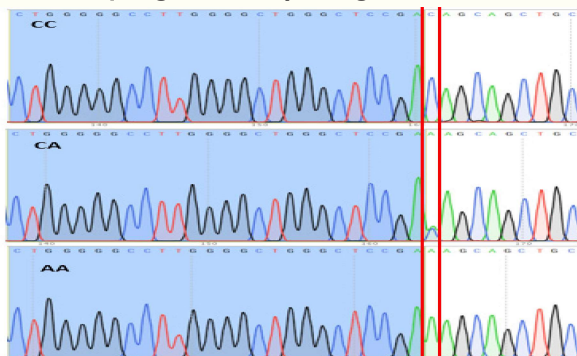
- Giải trình tự Sanger: xác nhận tính chính xác của phương pháp tetra-primer ARMS-PCR bằng giải trình tự Sanger. Khuếch đại đoạn DNA chứa SNP bằng phản ứng PCR chứa cặp mồi đặc hiệu (với trình tự mồi bằng 2). Mỗi phản ứng bao gồm Taq 2X Master Mix (Phusa Genomics), 3% DMSO, 0,4 μ M của mỗi mồi, 2 μ L DNA hệ gen và nước để đạt được thể tích 25 μ L. Tối ưu quy trình nhiệt nhằm thu sản phẩm đặc hiệu dài 947 bp (5 phút ở 94°C để tách mạch, sau đó, 40 vòng, mỗi vòng 60 giây tách mạch ở 94°C, 60 giây gắn mồi ở 61°C và 60 giây kéo dài ở 72°C; cuối cùng là 5 phút kéo dài ở 72°C). Giải trình tự sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger tại Apical Scientific Sdn. Bhd, Malaysia.

Bảng 2. Trình tự mồi của phản ứng PCR để khuếch đại đoạn DNA chứa *rs456168 C>A*

Mồi	Trình tự	Sản phẩm
Xuôi	5'-ACTGTGCCAC CTTCTAAGCC- 3'	947 bp
Ngược	5'-GTGAGGAGAG TGAGGCCAAG- 3'	

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả giải trình tự Sanger



Hình 1. Kết quả Sanger đại diện cho 3 kiểu gen khác nhau của SNP *rs456168 C>A*.

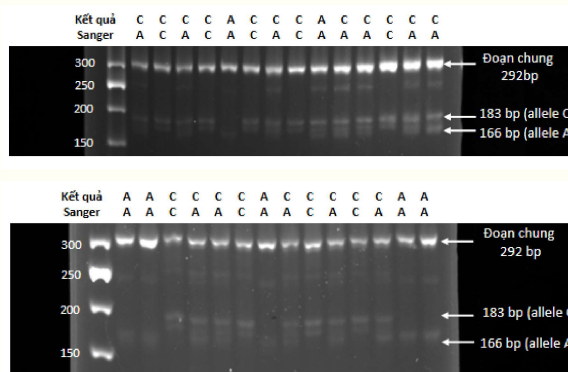
Bảng 3. Kết quả giải trình tự Sanger của SNP *rs456168 C>A* trên các nhóm nghiên cứu

Kiểu gen	CC	CA	AA
Nhóm chứng khỏe mạnh	3	5	2
Nhóm ĐTĐ không rối loạn chuyển hóa lipid	4	5	1
Nhóm ĐTĐ có rối loạn chuyển hóa lipid	3	3	4

Sau khi kiểm tra kích thước, độ đặc hiệu, lượng DNA trên gel của sản phẩm PCR và giải trình tự Sanger, sử dụng mồi xuôi (bảng 2) trong phản ứng tổng hợp DNA để giải trình tự. Kết quả Sanger trong 30 mẫu thử nghiệm đại diện cho 3 kiểu gen (hình 1), gồm: 10 mẫu có kiểu gen C/C, 7 mẫu A/A và 13 mẫu dị hợp tử C/A (bảng 3).

3.2. Tetra-primer ARMS-PCR

Kết quả phản ứng khuếch đại tetra-primer ARMS-PCR sau khi tách trên gel (hình 2). Xác định các mẫu trên mỗi giếng (kiểu gen tương ứng) bằng giải trình tự Sanger. Khuếch đại thành công đoạn DNA chung giữa các mẫu dài 292 bp ở cả 30 mẫu. Đoạn DNA dài 183 bp và 166 bp lần lượt đặc hiệu cho alen C và alen A.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại các alen của SNP *rs456168 C>A* bằng phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR.

Bảng 4. Thống kê kết quả của 2 phương pháp Sanger và Tetra-primer ARMS-PCR

Phương pháp	Kiểu gen		
	CA	CC	AA
Sanger	13	10	7
Tetra-primer ARMS-PCR	10	10	6
Ghi chú	Không xuất hiện band đặc hiệu với allele A		Xuất hiện band nhận biết allele C

Từ hình ảnh gel, kiểu gen của các mẫu thống kê tại bảng 4. Kết quả nghiên cứu cho thấy đoạn 183 bp xuất hiện ở cả 23 mẫu có chứa alen C (100%), trong đó, nhận biết 10/10 mẫu mang kiểu gen C/C. Tuy nhiên, mỗi nhận biết alen C chưa đặc hiệu ở điều kiện thí nghiệm và tạo ra band phụ nhỏ hơn nằm giữa 2 band. Đoạn DNA dài 166 bp, đặc hiệu với alen A xuất hiện ở 16/20 mẫu (80,0%), 6 mẫu đồng hợp và 10 mẫu dị hợp. Có 1 mẫu A/A không xuất hiện band nào và có 3 mẫu A/C chỉ xuất hiện band 183 bp.

4. BÀN LUẬN

Tetra-primer ARMS-PCR là phương pháp đơn giản, biến đổi từ phương pháp PCR thông thường để nhận biết 2 alen của một SNP trong 1 phản ứng PCR [4]. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp này để kiểm tra kiểu gene SNP *rs456168 C>A* trên các nhóm nghiên cứu. *Rs456168 C>A* nằm trên gen *FSP27*, biểu hiện mạnh tại các mô mỡ trắng và nâu trong quá trình tạo mỡ và có liên quan đến sự

tích tụ mỡ sai vị trí ở bệnh nhân béo phì và ĐTĐ. Nghiên cứu mối liên hệ giữa *rs456168* C>A và ĐTĐ có ý nghĩa trong việc chẩn đoán và tiên lượng bệnh ĐTĐ. Các bước thực hiện của phương pháp tetra-primer ARMS-PCR đơn giản, tuy nhiên, quá trình tối ưu hóa điều kiện phản ứng có thể gặp khó khăn. Việc sử dụng nhiều mồi trong một phản ứng PCR thường gặp vấn đề các mồi cạnh tranh trong phản ứng, đồng thời, nhiệt độ gắn mồi của các mồi cũng có khác biệt [6]. Vì vậy, trong quá trình tối ưu hóa, cần chú ý tới những yếu tố có thể ảnh hưởng đến phản ứng, như nhiệt độ nóng chảy của mồi, chất lượng của DNA, sự cân bằng giữa các thành phần phản ứng, đặc biệt là tỉ lệ mồi. Ye và cộng sự đề xuất tỉ lệ mồi ngoài : trong = 1 : 10 để đạt được độ đặc hiệu. Khi bắt đầu quá trình tối ưu có thể bắt đầu với tỉ lệ này [6]. Trong thí nghiệm này, tuy đã tối ưu tỉ lệ mồi, nhưng vẫn chưa thể đạt được sự đặc hiệu cho sản phẩm của mồi trong nhận biết alen C. Việc tạo sản phẩm không đặc hiệu có thể gây nhầm lẫn trong việc đánh giá kết quả khi làm số lượng mẫu lớn.

Điểm lưu ý là tối ưu phản ứng và thiết kế mồi cần cân nhắc đến kích thước của đoạn DNA khuếch đại để thuận tiện trong phân tích kết quả. Khi 2 đoạn DNA đặc hiệu cho từng alen có kích thước gần bằng nhau (166 và 184 bp) và có xuất hiện band không đặc hiệu, kết quả sẽ rất khó xác định, nhất là khi làm trên số lượng mẫu lớn. Như tất cả các kĩ thuật khác, tetra-primer ARMS-PCR cũng có những điểm tốt và hạn chế. Dù đơn giản và tiết kiệm chi phí, nhưng một vài nghiên cứu đã chỉ ra, phương pháp này không thể áp dụng với vùng DNA chứa nhiều cặp nucleotide GC [8], [9] a novel single nucleotide polymorphism (SNP. Vì vậy, cần cân nhắc đến tính chất của đoạn DNA chứa SNP và các đoạn mồi để tăng tính khả thi cho phương pháp. So với Sanger, phương pháp này đơn giản và tiết kiệm chi phí hơn, song, độ chính xác phụ thuộc nhiều vào khả năng tối ưu phản ứng PCR.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá tính hiệu quả của phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR trong việc phân biệt hai alen của SNP *rs456168* C>A. Dưới điều kiện phản ứng PCR trong thí nghiệm, đã nhận biết thành công tất cả alen C trên các mẫu thử nghiệm, trong khi chỉ có 80% số mẫu khảo sát xác định chính xác alen A. Tuy nhiên, quá trình tối ưu phản ứng cần được tiếp tục thực hiện và có thể gặp khó khăn. Tetra-primer ARMS-PCR là một phương pháp đơn giản, giá thành rẻ và tiện lợi để xác định kiểu gen của các SNP.

Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội, đề tài 01C-08/04-2020-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A Vignal, D Milan, M SanCristobal, A Eggen (2002), "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics," *Genet. Sel. Evol.*, vol. 34, no. 3, pp. 275-305, May 2002, doi: 10.1051/gse:2002009.
2. T.T Nguyen, J.Z Huang, Q Wu, T.T Nguyen, M.J Li (2015), "Genome-wide association data classification and SNPs selection using two-stage quality-based Random Forests," *BMC Genomics*, vol. 16, no. Suppl 2, p. S5, Jan. 2015, doi: 10.1186/1471-2164-16-S2-S5.
3. J Defo, D Awany, R Ramesar (2023), "From SNP to pathway-based GWAS meta-analysis: do current meta-analysis approaches resolve power and replication in genetic association studies?," *Brief Bioinform*, vol. 24, no. 1, p. bbac600, Jan. 2023, doi: 10.1093/bib/bbac600.
4. J Chen, X Xu, P Dalhaimer, L Zhao (2022), "Tetra-Primer ARMS-PCR for Genotyping Mouse Leptin Gene Mutation", *Animals (Basel)*, vol. 12, no. 19, p. 2680, Oct. 2022, doi: 10.3390/ani12192680.
5. *FSP27 and Links to Obesity and Diabetes Mellitus | Current Obesity Reports*, Accessed: Mar. 15, 2025. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13679-019-00343-3>
6. R.F.V Medrano, C.A de Oliveira (2014), "Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development", *Mol Biotechnol*, vol. 56, no. 7, pp. 599-608, Jul. 2014, doi: 10.1007/s12033-014-9734-4.
7. S Ye, S Dhillon, X Ke, A.R Collins (2024), "An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms", Accessed: Dec. 13, 2024. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>.
8. J Chai et al (2010), "Evidence for a new allele at the SERCA1 locus affecting pork meat quality in part through the imbalance of Ca²⁺ homeostasis," *Mol Biol Rep*, vol. 37, no.1, pp.613-619, Jan. 2010, doi: 10.1007/s11033-009-9872-0.
9. I Baris, O Etlik, V Koksai, S.T Arican-Baris (2010), "Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using tetra-primer ARMS PCR assay: Simultaneous detection of SMN1 and SMN2 deletion", *Molecular and Cellular Probes*, vol. 24, no. 3, pp. 138-141, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.mcp.2009.12.001. □