

XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH rs10811661 GEN *CDKN2A* TRÊN QUẦN THỂ NGƯỜI VIỆT NAM SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP AS-PCR VÀ RFLP-PCR

Nguyễn Thị Trung Thu¹, Bùi Thị Nhung² và Trần Quang Bình³

¹*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

²*Khoa Dinh dưỡng học đường và Ngành nghề, Viện Dinh dưỡng Quốc gia*

³*Khoa Miễn Dịch và Sinh học phân tử, Viện sinh dịch tễ Trung ương*

Tóm tắt. Gen *CDKN2A* có liên quan đến bệnh tiền đái tháo đường và đái tháo đường tít 2 thông qua giảm khối lượng tế bào β và suy giảm tiết insulin. Phương pháp AS-PCR và RFLP-PCR được sử dụng để xác định kiểu gen của đa hình rs10811661 gen *CDKN2A* trên lượng mẫu lớn của quần thể người Việt Nam. Phương pháp AS-PCR sử dụng mồi ngược phát hiện alen C (Rc): 5'-GGTAATAGACTTACTGTGCATCG-3' và alen T (Rt): 5'-GGTAATAGACTTACTGTGCATCA-3' và mồi xuôi (F): 5'-TCAGTTAAGCAGATGAAATTC-3', nhiệt độ bắt mồi là 52 °C với sự có mặt của alen C hoặc T thì sản phẩm có kích thước 208 bp. Phương pháp RFLP-PCR sử dụng mồi xuôi (F): 5'-ACCTTCAGCCACCTCTCTGTCTTTC-3' và mồi ngược (R): 5'-CCCATCCTGGGTAGGAGGAGCC-3', nhiệt độ bắt mồi là 62 °C, sản phẩm có kích thước 350 bp. Sau khi sử dụng enzyme cắt giới hạn *PagI* thì kiểu gen CC có 1 sản phẩm (350 bp), kiểu gen TT có 2 sản phẩm (280 bp và 70 bp), kiểu gen CT 3 sản phẩm (350 bp, 280 bp và 70 bp).

Từ khóa: AS-PCR, RFLP-PCR, rs10811661, gen *CDKN2A*, xác định kiểu gen.

1. Mở đầu

Gen *CDKN2A* nằm trên cánh ngắn của NST số 9 tại vị trí 21 từ vị trí 21967751 bp đến vị trí 21994490 bp, với kích thước: 26739 kb [1]. Cấu trúc của *CDKN2A* gồm 3 exon (exon 1 α , exon 1 β , exon 2, exon 3) và 3 intron. Exon 2 và exon 3 được ghép vào với một trong 2 exon đầu tiên thay thế 1 α , 1 β tạo thành 2 khung đọc khác nhau. Điều này dẫn đến tạo ra 2 sản phẩm protein P16^{INKS} và P14^{ARF} - chất ức chế khối u ảnh hưởng đến tuyến tụy tăng sinh tế bào β [2].

Gen *CDKN2A* tăng tính nhạy cảm của tiền đái tháo đường và bệnh đái tháo đường tít 2 thông qua giảm khối lượng tế bào β và sau đó suy giảm tiết insulin cần thiết trong cơ thể với nhu cầu insulin tăng lên [3]. Một trong những chức năng quan trọng ảnh hưởng trực tiếp tới bệnh đái tháo đường tít 2 được nghiên cứu là gen *CDKN2A* có vai trò trong ung thư tuyến tụy [4]. xác định đột biến *CDKN2A* ở 6/28 người (chiếm 21%) trong các gia đình được xác định chắc chắn mắc bệnh ung thư tuyến tụy [5]. Vì vậy, việc xác định đặc điểm của đa hình *CDKN2A* có vai trò quan trọng trong nghiên cứu ảnh hưởng của gen đến các bệnh liên quan.

Ngày nhận bài: 22/3/2016. Ngày nhận đăng: 20/5/2016.

Tác giả liên hệ: Trần Quang Bình, email: binhnihe@yahoo.com

Trong các nghiên cứu trước đều sử dụng phương pháp RFLP-PCR để xác định đa hình rs10811661 gen CDKN2A [6, 7]. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về xác định kiểu gen đa hình rs10811661 gen CDKN2A. Để đáp ứng việc nghiên cứu đa hình rs10811661 gen CDKN2A trên quần thể người Việt Nam với các thiết bị hiện có và nhu cầu mẫu lớn, chúng tôi tiến hành phương pháp AS-PCR để xác định kiểu gen rs10811661 gen CDKN2A trên lượng mẫu lớn và sử dụng phương pháp RFLP-PCR để kiểm tra độ chính xác của phương pháp.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

* Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu sử dụng trong nghiên cứu lấy từ 141 đối tượng tại thành phố Phủ Lý, tỉnh Hà Nam. Mẫu ADN được tách chiết từ 300 μ L máu toàn phần lấy từ tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA với bộ kit Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega Cat.#A1125, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và nồng độ ADN được đo bằng máy NanoDrop. Nội dung nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương thông qua. Các đối tượng đều được giải thích về nghiên cứu và kí vào giấy đồng ý tham gia nghiên cứu.

* Thiết kế quy trình AS-PCR cho xác định kiểu gen rs10811661 gen CDKN2A

- Thiết kế mồi

+ Bước 1. Xác định trình tự trước và sau rs10811661 gen CDKN2A trên genbank từ NCBI [1].

+ Bước 2. Nhận biết trình tự nucleotide mismatch và thiết kế mồi xuôi (ngược) để xác định alen C hoặc T của rs10811661 gen CDKN2A dựa theo Wangkuhang và cộng sự [8].

+ Bước 3. Thiết kế mồi ngược sử dụng phần mềm Oligo 7 Primer Analyse [9] và UCSC In-Silico PCR trực tuyến [10] để chọn cặp mồi thích hợp đồng nhất về nhiệt độ bắt mồi (T_a) và hai mồi không bắt cặp nhau.

- Thiết kế quy trình PCR

Để thực hiện phản ứng AS-PCR phát hiện kiểu gen của đa hình rs10811661 gen CDKN2A, mỗi kiểu gen được xác định nhờ hai phản ứng độc lập phát hiện alen C và alen T. Mỗi phản ứng gồm các thành phần: 0,8 μ L nước (không nucleotide); 2,5 μ L PCR master mix; 0,35 μ L mồi xuôi, 0,35 μ L mồi ngược và 1,5 μ L ADN mẫu. Cần xác định chu trình nhiệt cho phản ứng PCR, đặc biệt là phản ứng bắt mồi dựa trên cặp mồi sử dụng.

Sản phẩm PCR được xác định bằng nhuộm với Redsafe, điện di trong gel agarose 30 phút ở 100 V, 0,5 X đệm TBE, so sánh với marker Φ X174 DNA HaeIII Digest. Băng ADN được phát hiện sử dụng máy ảnh Geldoc-It™ gel. Băng của ADN được kiểm tra liệu có phù hợp với ngân hàng gen.

* Thiết kế quy trình RFLP-PCR cho xác định kiểu gen rs10811661 gen CDKN2A

Phương pháp RFLP-PCR được thiết kế để kiểm tra độ chính xác của phương pháp AS-PCR.

- Thiết kế mồi:

+ Bước 1. Xác định trình tự trước và sau rs10811661 gen CDKN2A trên genbank từ NCBI [1].

+ Bước 2. Xác định enzyme cắt giới hạn phù hợp để nhận biết alen C và alen T sử dụng phần mềm: restrictionmapper.org [11].

+ Bước 3. Thiết kế mồi xuôi và mồi ngược cho phản ứng PCR.

- Thiết kế quy trình PCR

Mỗi phản ứng RFLP-PCR phát hiện kiểu gen của đa hình rs10811661 gen *CDKN2A* chứa 15 μ L gồm các thành phần: 4 μ L nước (không nucleotide); 7,5 μ L PCR master mix; 1 μ L mỗi xuôi; 1 μ L mỗi ngược và 1,5 μ L ADN mẫu. Cần xác định nhiệt độ thích hợp cho phản ứng gắn mỗi và chu trình nhiệt cho phản ứng. Sản phẩm PCR được xác định bằng nhuộm với Redsafe, điện di trong gel agarose 30 phút ở 100 V, 0,5 X đệm TBE, so sánh kết quả với marker Φ X174 DNA *Hae*III Digest. Băng ADN được phát hiện sử dụng máy ảnh Geldoc-It™ gel. Băng của ADN được kiểm tra liệu có phù hợp với ngân hàng gen.

- *Ủ enzyme cắt giới hạn và xác định kết quả*

Một phản ứng ủ enzyme gồm: 5 μ L sản phẩm PCR chất lượng tốt, 0,7 μ L 10X đệm, 0,15 μ L enzyme cắt giới hạn được lựa chọn, 6,0 μ L nước tinh sạch. Ủ sản phẩm PCR với enzyme cắt giới hạn ở nhiệt độ và thời gian thích hợp theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Điện di 11,85 μ L sản phẩm sau khi ủ trên thạch agarose 2,5% đệm TBE 0,5 X trong 30 phút ở 100 V nhuộm RedSafe, có marker Φ X174*Hae*III. Và chụp hình sản phẩm điện di sau khi ủ enzyme cắt giới hạn bằng máy GelDoc. Băng sản phẩm được kiểm tra liệu có phù hợp với ngân hàng gen.

2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

2.1.1. Xác định quy trình AS-PCR

* *Thiết kế môi*

- *Bước 1. Xác định trình tự môi trước và sau rs10811661 gen CDKN2A*

Từ dữ liệu NCBI, trình tự đoạn gen chứa SNP rs10811661 gen *CDKN2A* nhận được là [1]:

```
AATAATCCTGTTAACAGACTTGAAAGCACTTATCAGTTCTGTCTAATGAAGACAT
TAGAACACCATAACCTTTCCGGCCCATTTTCTTTGTCAATAAGCGTTCTTGCCCTGTCA
GCAGCTCACCTCCAGCTTTAGTTTTTC(C/T)CATGACAGTAAGTCTATTACCCTCTGAT
CTGTCTTCTGGCTCCTCCTACCCAGGATGGGGAAGGTTTTTACTTTACTGATATTCTC
AGAACAAATTTTGGGAAGTAAATATAAGGTTT
```

Dựa vào trình tự đoạn gen chứa SNP, tiến hành chọn 20 - 25 nucleotide trước và sau SNP để thiết kế môi phù hợp cho phương pháp AS-PCR.

- *Bước 2. Chọn trình tự nucleotide để thiết kế môi*

Dựa theo nguyên tắc chiều dài của môi, tỷ lệ GC của môi, sự không bắt cặp của các nucleotide của môi, nghiên cứu chọn trình tự sau SNP là 5'-AGGGTAATAGACTTACTGTCATG-3' để thiết kế môi. Nhiệt độ bắt mỗi của mỗi xuôi là 52,3 °C và mỗi ngược là 51°C theo khuyến cáo của phần mềm Oligo 7 [9].

Mức nhiệt độ này khá phù hợp cho phản ứng bắt cặp của môi với trình tự nucleotide trên mạch.

- *Bước 3. Xác định nucleotide mismatch và thiết kế môi nhận biết alen C/T*

Nucleotide thứ 2 tính từ đầu 3' của môi được sử dụng để thiết kế 1 mismatch theo Wangkumhang và cộng sự [8]. Kết quả 2 môi ngược để phát hiện SNP là:

Môi phát hiện alen C (Rc): 5'- GGTAATAGACTTACTGTCATCG - 3'.

Môi phát hiện alen T (Rt): 5'-GGTAATAGACTTACTGTCATCA - 3'.

Điểm mismatch là nucleotide khác với nucleotide trên mạch gốc, có tác dụng làm tăng bắt cặp môi và tính đặc hiệu của enzyme trong phản ứng [12].

- *Bước 4. Thiết kế môi xuôi*

Sử dụng phần mềm Oligo 7 [9] và UCSC In-Silico PCR (trực tuyến) [10] để thiết kế môi xuôi sao cho mỗi xuôi và mỗi ngược có sự tương đồng về nhiệt độ bắt mỗi và không bắt cặp và kích thước của sản phẩm PCR trong khoảng 200 bp. Kết quả mỗi xuôi chúng tôi chọn là:

Môi xuôi là: F: 5'-TCAGTTAAGCAGATGAAATTC-3'

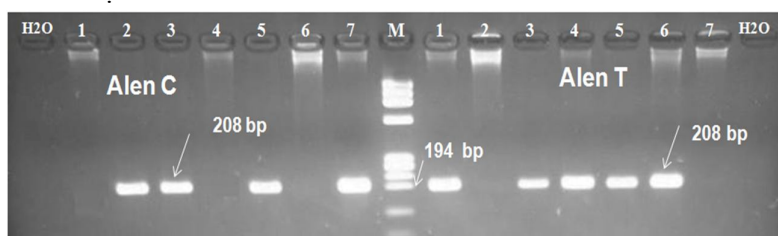
Xác định đa hình rs10811661 gen CDKN2A trên quần thể người Việt nam sử dụng phương pháp...

Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi xuôi và mồi ngược ở trên có kích thước là 208 bp theo dữ liệu NCBI [1]:

```
TCAGTTAAGCAGATGAAATTCTAAGAGTTAAGCTGGGATTTTCCAAAATAATCCT
GTTAACAGACTTGAAAGCACTTATCAGTTCTGTCTAATGAAGACATTAGAACCACCAT
AACCTTTCCGGCCCATTTTCTTTGTCAATAAGCGTTCTTGCCCTGTCAGCAGCTCACCT
CCAGCTTTAGTTTTT(C/T)GATGACAGTAAGTCTATTAC
```

*** Thiết kế chu trình PCR**

Với cặp mồi sử dụng, chúng tôi sử dụng phần mềm Oligo 7 [9] và UCSC In-Silicon PCR (trực tuyến) [10] để xác định nhiệt độ của mồi xuôi là 52,3 °C và mồi ngược là 51,0 °C và. Vì vậy, để chọn nhiệt độ gắn mồi (Ta) thích hợp cho phản ứng PCR, chúng tôi thực hiện kiểm tra nhiệt độ bắt mồi ở 4 nhiệt độ: 48 °C, 50 °C, 52°C và 54 °C trong 31 chu kỳ (kết quả không hiển thị). Trong đó, nhiệt độ 52 °C cho kết quả rõ nét nhất. Kết quả điện di các sản phẩm theo phương pháp AS-PCR ở nhiệt độ gắn mồi 52 °C được thể hiện ở Hình 1. Các mẫu có alen C hoặc T cho băng 208 bp phù hợp với dữ liệu từ NCBI.



Hình 1. Kết quả xác định kiểu gen của SNP rs10811661 trên gen CDKN2A bằng phương pháp AS-PCR

M: Marker Φ X174 HAE III, 1 (TT), 2 (CC), 3 (CT), 4 (TT), 5 (CT), 6 (TT), 7 (CC)

Vì vậy, chu trình phản ứng gồm biến tính ADN ở 94 °C trong 3 phút, tiếp theo 32 chu kỳ gồm biến tính ở 94 °C trong 30 giây, gắn mồi ở 52 °C trong 30 giây, kéo dài mồi ở 72 °C trong 30 giây và kéo dài ở 72 °C trong 8 phút, cuối cùng là giữ hỗn hợp ở 15 °C sử dụng máy PCR mastercycle egradient (hãng Eppendorf). Sử dụng phương pháp AS-PCR để xác định kiểu gen của 100 mẫu nghiên cứu cho thấy tỷ lệ đọc rất cao 99% (99/100).

Phương pháp AS-PCR được tiến hành dựa trên hai phản ứng khuếch đại PCR song song riêng biệt, mỗi phản ứng sử dụng một cặp mồi đặc hiệu tại đầu 3' để nhận biết một ADN [8]. Điều này dựa trên sự kéo dài của mồi chỉ khi đầu 3' của mồi bắt cặp được với alen của mẫu. Như vậy, nếu có đa hình đơn nucleotide xảy ra, kết quả có thể xác định bằng cách nhận biết chiều dài của các sản phẩm PCR. Đây là pháp đơn giản, nhanh chóng và đáng tin cậy, mà không đòi hỏi nhiều thiết bị máy móc đắt tiền nên khả năng áp dụng tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam là cao. Đặc biệt, nghiên cứu có thể ứng dụng khi xác định kiểu gen trên một số lượng lớn mẫu.

2.1.2. Xác định quy trình RFLP-PCR

Để kiểm tra độ chính xác của phương pháp AS-PCR, chúng tôi tiến hành sử dụng phương pháp RFLP-PCR thông qua enzyme cắt giới hạn.

*** Thiết kế mồi**

- Bước 1. Xác định trình tự mồi trước và sau rs10811661 gen CDKN2A

Kết quả đã được trình bày ở mục 2.1.1.

- Bước 2. Xác định enzyme cắt giới hạn đặc hiệu

Sử dụng phần mềm restrictionmapper.org [11] nhận thấy, enzyme *BspHI* và *Eam1105I* có khả năng cắt tại vị trí alen T, còn enzyme *Eam1105I* có khả năng cắt tại vị trí C. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn enzyme cắt giới hạn *PagI* để phân biệt alen C và alen T.

- Bước 3. Chọn trình tự nucleotide để thiết kế môi

Thiết kế môi xuôi và môi ngược sử dụng phần mềm Oligo 7 [9] và UCSC In-Silico PCR (trực tuyến) [10] để chọn cặp môi thích hợp đồng nhất về nhiệt độ nóng chảy (T_m), không bắt cặp, chiều dài môi khoảng 20 nucleotide, tỉ lệ GC không quá 60%. Chúng tôi lựa chọn cặp môi là:

Môi xuôi: 5'-ACCTTCAGCCACCTCTCTGTCTTTC-3'

Môi ngược: 5'-CCCATCCTGGGTAGGAGGAGCC-3'

Sản phẩm PCR từ dữ liệu UCSC In-Silicon PCR (trực tuyến) [10] gồm 350 bp:

ACCTTCAGCCACCTCTCTGTCTTTCATATTACTTATTGGCAGGGTTTCAAAAGGTT
TTAGTCCTTACTTAATATAAAACAAAAATGTACAATATTGACAAAGTTTCAGTTAAGCA
GATGAAATTCTAAGAGTTAAGCTGGGATTTTCCAAAATAATCCTGTTAACAGACTTGA
AAGCACTTATCAGTTCTGTCTAATGAAGACATTAGAACCATAACCTTTCCGGCCCA
TTTTCTTTGTCAATAAGCGTTCTTGCCCTGTCAGCAGCTCACCTCCAGCTTTAGTTTTTC
(C/T)CATGACAGTAAGTCTATTACCCTCCTGATCTGTCTTCTGGCTCCTCCTACCCAGGA
TGGG

*** Thiết kế quy trình PCR**

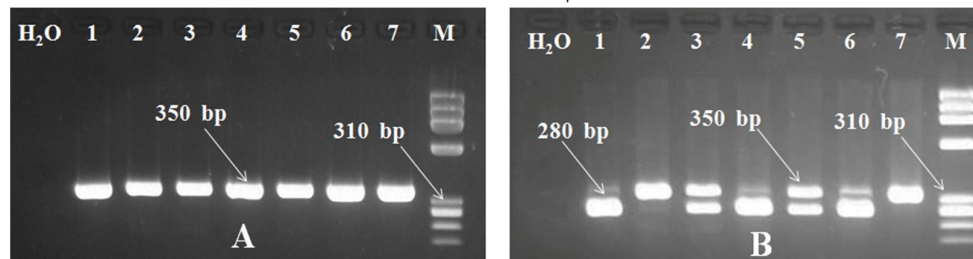
Nhiệt độ nóng chảy của môi xuôi là 65,4 °C và môi ngược là 69,2 °C theo UCSC In-Silicon PCR (trực tuyến) [10]. Vì nhiệt độ bắt môi khá cao, để đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu của nhiệt độ bắt môi, chúng tôi kiểm tra ở các nhiệt độ bắt môi: 58 °C, 60 °C, 62 °C và 64 °C (kết quả không hiệu thị). Kết quả cho thấy, nhiệt độ bắt môi thích hợp là 62 °C (Hình 2A). Vì vậy, chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm biến tính ADN ở 94 °C trong 3 phút; tiếp theo 32 chu kì gồm biến tính ở 94 °C trong 30 giây, gắn môi ở 62 °C trong 30 giây, kéo dài môi ở 72 °C trong 30 giây; và kéo dài ở 72 °C trong 10 phút; cuối cùng là giữ hỗn hợp ở 15 °C sử dụng máy PCR mastercycle egradient (hãng Eppendorf).

*** Ủ enzyme cắt giới hạn và điện di**

Sau đó, 5 - 10 µL mẫu có kết quả PCR tốt sẽ được sử dụng để tiến hành ủ với enzyme cắt giới hạn *PagI* ở 37 °C trong 16 giờ theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Vị trí cắt của enzyme:

5' ...T↓CATGA...3'

3' ...AGTAC↑T...5'



Hình 2. Kết quả xác định kiểu gen của SNP rs10811661 trên gen CDKN2A bằng phương pháp RFLP-PCR trên một số mẫu

A. Kết quả điện di lần 1 sau phản ứng PCR. B: Kết quả điện di lần 2 sau ủ enzyme *BspHI*.

M: Marker Φ X174 HAE III, 1 (TT), 2 (CC), 3 (CT), 4 (TT), 5 (CT), 6 (TT), 7 (CC)

Do đó, enzyme có khả năng cắt tại vị trí SNP có alen T. Nhận định kiểu gen từ sản phẩm: kiểu gen CC (350 bp), kiểu gen TT (280 bp và 70 bp) và kiểu gen CT (350 bp, 280 bp và 70 bp). Băng sản phẩm 70 bp không xuất hiện do có kích thước nhỏ đã chạy ra khỏi bản thạch trong quá trình chạy điện di. Kết quả điện di hình 2B cho thấy các băng sản phẩm hoàn toàn phù hợp và có thể xác định được kiểu gen của các mẫu nghiên cứu.

Như vậy, kết quả điện di theo phương pháp RFLP hoàn toàn trùng lặp với phương pháp AS-PCR. Sử dụng phương pháp AS-PCR để xác định kiểu gen của 100 mẫu nghiên cứu cho thấy tỉ lệ đọc rất cao 99% (99/100). Kết quả điện di trên số lượng lớn mẫu chứng tỏ kết quả phương pháp RFLP-PCR chính xác trong việc xác định kiểu gen.

Phương pháp RFLP-PCR cứu tính đa hình chiều dài của các phân đoạn ADN dựa trên điểm cắt của các enzyme giới hạn. Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của các enzyme cắt giới hạn đối với vị trí nhận biết của chúng trên ADN bộ gen. Khi ủ với enzyme giới hạn ở dung dịch đệm, pH, nhiệt độ và thời gian thích hợp, đoạn ADN sẽ bị enzyme giới hạn cắt ở vị trí đặc hiệu để tạo ra những phân đoạn ADN với kích thước khác nhau. Dựa vào kích thước các đoạn cắt để xác định alen và kiểu gen. Trong các nghiên cứu trước đều sử dụng enzyme *PagI* để nhận biết alen C và T. Tuy nhiên, cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR khác nhau. Theo nghiên cứu của Hubáček và cs năm 2013 thì cặp mồi sử dụng cho RFLP-PCR là 5'-GAAGACATTAGAACCATAACCTTTCC-3' và 5'-AGGAGGAGCCAGAAGACAGATCAGG-3', sản phẩm tạo ra có kích thước 143 bp, tạo ra các đoạn cắt enzyme là 94 bp và 49 bp [6]. Và nghiên cứu của Singh và cs năm 2012 sử dụng cặp mồi: 5'-ATAAGCGTTCTTGCCCTGTC-3' và mồi ngược: 5'-GTCAAAAACCTTCCCCATCC-3', sản phẩm tạo ra có kích thước 121 bp, tạo ra các đoạn cắt enzyme là 85 bp và 36 bp [7]. Sản phẩm PCR trong nghiên cứu của chúng tôi có kích thước 350 bp (khá lớn). Khi sử dụng enzyme cắt giới hạn *PagI* tạo ra các đoạn cắt 280 bp và 70 bp, dễ dàng nhận biết bằng sử dụng gel agarose.

3. Kết luận

Phương pháp AS-PCR sử dụng mồi ngược phát hiện alen C (Rc): 5'-GGTAATAGACTTACTGTCATCG-3' và alen T (Rt): 5'-GGTAATAGACTTACTGTCATCA-3' và mồi xuôi (F): 5'-TCAGTTAAGCAGATGAAATTC-3', nhiệt độ bắt mồi là 52 °C với sự có mặt của mỗi alen C hoặc T thì sản phẩm có kích thước 208 bp. Phương pháp RFLP-PCR sử dụng mồi xuôi (F): 5'-ACCTTCAGCCACCTCTCTGTCTTTC-3' và mồi ngược (R): 5'-CCCATCC TGGTAGGAGGAGCC-3', nhiệt độ bắt mồi là 62 °C, sản phẩm có kích thước 350 bp. Sử dụng enzyme cắt giới hạn *PagI* ở 37 °C trong 16 giờ để cắt mẫu có kiểu gen TT hoặc CT. Kết quả sản phẩm PCR của kiểu gen CC (350 bp), kiểu gen TT (280 bp và 70 bp), kiểu gen CT (350 bp, 280 bp và 70 bp). Các kết quả nghiên cứu xác nhận, phương pháp AS-PCR và RFLP-PCR có thể sử dụng để xác định kiểu gen của đa hình rs10811661 gen *CDKN2A* trên quần thể người Việt Nam.

Lời cảm ơn. Đề tài được sự tài trợ của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho *Nghiên cứu thuần tập 5 năm về bệnh đái tháo đường týp 2 và hội chứng chuyển hoá ở người Việt Nam: vai trò yếu tố di truyền và lối sống*, mã số 106-YS.01-2015.10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10811661 tra cứu ngày 1/4/2014.
- [2] <http://atlasgeneticsoncology.org/>. Tra cứu ngày 1/4/2014.
- [3] A. Stančáková, T. Kuulasmaa, J. Paananen, A.U. Jackson, L.L. Bonnycastle, F. S. Collins, M. Boehnke, J. Kuusisto, M. Laakso, 2009. *Association of 18 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes with indices of insulin release, proinsulin conversion, and insulin sensitivity in 5,327 nondiabetic Finnish men*. *Diabetes*, 58, No 9, pp. 2129-2136.

- [4] D.K. Bartsch, M. Sina-Frey, S. Lang, A. Wild, B. Gerdes, P. Bart, R. Kress, R. Grutzmann, M. Colombo-Benkmann, A. Ziegler, S.A. Hahn, M. Rothmund, H. Rieder, 2002. *CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer.*, Annals of surgery, 236, No. 6, pp. 730-737.
- [5] F. Harinck, L. Kluijt, N. Van Der Stoep, R.A. Oldenburg, A. Wagner, C.M. Aalfs, R.H. Sijmons, J. Poley, E.J. Kuipers, P. Fockén, T.A.M Os, 2012. *Indication for CDKN2A-mutation analysis in familial pancreatic cancer families without melanomas.* Journal of medical genetics, 49, No 6, pp. 362-365.
- [6] J.Hubáček, T.Neskudla, M. Klementová, V. Adámková, T. Pelikánová, 2013. *Tagging rs10811661 variant at CDKN2A locus is not associated with type 2 diabetes mellitus in Czech population.* Folia Biologica, 59, No. 4, pp. 168-171.
- [7] S. Singh, S.B. Prasad, S.S. Yadav, N.K. Agrawal, G. Narayan, 2012. Association of common variants of CDKN2A rs10811661 (C/T) and WFS1 rs6446482 (C/G) to type 2 diabetes mellitus in the Indian population of eastern Uttar Pradesh. Journal of Diabetes and Metabolism, 3, pp. 9-13.
- [8] P. Wangkumhang, K. Chaichoompu, C. Ngamphiw, U. Ruangrit, J. Chanprasert, A. Assawamakin, S. Tongsima, 2007. *WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations.* BMC genomics, 8, No. 1, pp. 275.
- [9] <http://oligo.net/>. Tra cứu ngày 1/8/2014.
- [10] <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>. Tra cứu ngày 1/8/2014.
- [11] <http://www.restrictionmapper.org/>. Tra cứu ngày 1/8/2014.
- [12] S. Little, 1995. Amplification-Refractory mutation system (ARMS): analysis of point mutations. Curr Prot Hum Genet, 9, No 8, pp. 1-12.

ABSTRACT

Determination of rs10811661 gene *CDKN2A* polymorphism in Vietnamese population using AS-PCR and RFLP-PCR methods

Nguyen Thi Trung Thu¹, Bui Thi Nhung² and Tran Quang Binh³

¹Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

²Department of School and Occupational Nutrition, National Institute of Nutrition

³Department of Immune and Molecular Biology, National Institute of Hygiene and Epidemiology

CDKN2A gene is associated with prediabetes and type 2 diabetes by reducing β cell mass and insulin secretion. In the current study, AS-PCR and RFLP-PCR methods were adopted to determine the genotype of rs10811661 gene *CDKN2A* polymorphism in the samples in Vietnamese population. AS-PCR used reverse primers to detect C allele (Rc): 5'-GGTAA TAGACTTACTGTCATCG-3' and T allele (Rt): 5'-GGTAATAGACTTACTGTCATCA-3' and forward primer (F): 5'-TCAGTTAAGCAGATGAAATTC-3', the annealing temperature is 52°C, with presence of allele C or T, the PCR product size is 208 bp. RFLP method - PCR used forward primer (F): 5'-ACCTTCAGCCACCTCTCTGTCTTTC-3' and reverse primer (R): 5'-CCCATCC TGGGTAGGAGGAGCC-3', the annealing temperature is 62 °C and PCR product size is 350 bp. After using *PagI* restriction enzymes, CC genotype has one product (350 bp), TT genotype has two products (280 bp and 70 bp) and CT genotype has three products (350 bp, 280 bp and 70 bp).

Keywords: AS-PCR, RFLP-PCR, genotype, rs10811661, gen *CDKN2A*.