

## Thiết kế môi gene cho phản ứng Nested-MSP khuếch đại gene *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1*)

### Designing primers for Nested-MSP amplifying *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1*)

Thiều Hồng Huệ<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Toàn<sup>1</sup>, Trần Thị Quế Trân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Thảo<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thành Đạt<sup>1</sup>, Ngô Đông Kha<sup>2</sup>, Lao Đức Thuận<sup>1</sup>, Lê Huyền Ái Thúy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại Học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh, Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Cơ sở 2, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ, Email: thuy.lha@ou.edu.vn

#### THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.  
tech.vi.18.1.2023.2023

Ngày nhận: 05/08/2021

Ngày nhận lại: 09/06/2022

Duyệt đăng: 14/06/2022

#### TÓM TẮT

Tính chất methyl hóa các gene ức chế khối u là một trong những nguyên nhân gây nên ung thư vòm họng. *RASSF1A* là một gene ức chế khối u đóng vai trò quan trọng trong điều hòa chu kỳ tế bào, điều chỉnh sự ổn định của các vi ống và có khả năng kiểm soát sự xâm lấn và di căn. Trong nghiên cứu, các cặp môi sử dụng cho phương pháp Nested-MSP sẽ được thiết kế dựa trên các công cụ tin sinh học: Methprimer, IDT và Annhyb. Kết quả chúng tôi đã thiết kế thành công các cặp môi, bao gồm: môi ngoài, môi methyl và môi unmethyl sử dụng cho phản ứng Nested-MSP khuếch đại sản phẩm PCR với kích thước lần lượt là 392bp, 200bp và 173bp. Như vậy, từ nghiên cứu này cung cấp cặp môi cho phản ứng Nested-MSP hướng tới khảo sát tính chất methyl hóa của gene *RASSF1A* trên Ung Thư Vòm Họng (UTVH).

#### ABSTRACT

*Từ khóa:*

methyl hóa; nested-MSP;  
*RASSF1A*; ung thư vòm họng

*Keywords:*

methylation; nested-MSP;  
*RASSF1A* gene; nasopharyngeal  
carcinoma

Methylation of Tumor Suppressor Genes (TSGs) has been identified as the cause of nasopharyngeal tumorigenesis. Among TSGs, *RASSF1A* plays an important role in cell cycle regulation, microtubule stabilization, and control of metastasis. The methylation occurs on the gene of *RASSF1A*, which has been reported as the early event of nasopharyngeal carcinoma. Therefore, in this study, the primers for Nested-MSP method will be designed based on bioinformatics tools: Methprimer, IDT, and Annhyb. As the result, primer pairs, including sequence primers, methylation primers, and unmethylation primers, were successfully designed. The length of the PCR assay with these primers were 392bp, 200bp và 173bp, respectively. Thus, this study provides the primer pairs for the Nested-MSP method to further investigate the methylation of *RASSF1A* gene in nasopharyngeal carcinoma.

#### 1. Giới thiệu

*RASSF1A* là một gene ức chế khối u, là một trong tám đồng phân của RASSF1- là thành viên thuộc họ RASSF và mã hóa cho một domain RA (Ras Association) (Donninger, Vos, & Clark,

2007). *RASSF1A* định vị trên nhiễm sắc thể số 3 tại vị trí 3p21.3, mã hóa cho một protein có 340 amino acid với kích thước 39kDa (Donninger & ctg., 2007). *RASSF1A* ở người tương đồng với các loài động vật gặm nhấm, cá và giun tròn từ 38% đến 85% (Agathangelou, Cooper, & Latif, 2005). *RASSF1A* đóng vai trò quan trọng trong điều hòa chu kỳ tế bào: là một protein ức chế khối u trong nhiều tế bào có nguồn gốc biểu mô, gây ra ngừng chu kỳ tế bào thông qua điểm kiểm soát chu kỳ tế bào, điều hòa tăng sinh thông qua ức chế sự tiến triển chu kỳ tế bào ở pha G1/S (Pan & ctg., 2005, Shivakumar, Minna, Sakamaki, Pestell, & White, 2002); điều chỉnh sự ổn định của các vi ống (Dallol & ctg., 2007; Halpain, Dehmelt, 2006; Liu & ctg., 2003); có khả năng kiểm soát sự xâm lấn và di căn (Dallol & ctg., 2005). Tính chất methyl hóa trên gene *RASSF1A* được báo cáo là một trong các nguy cơ dẫn đến các loại bệnh ung thư ở người, bao gồm cả bệnh ung thư vòm họng.

Nested-MSP là phương pháp cải tiến so với phương pháp PCR truyền thống. Nguyên tắc của phương pháp này là sử dụng hai cặp mồi riêng biệt thay vì chỉ sử dụng một cặp mồi như ở phương pháp PCR. Ưu điểm của phương pháp này là tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng khuếch đại DNA (Green & Sambrook, 2019). Hiện nay, trên thế giới và cả ở Việt Nam, các nghiên cứu về tính chất methyl hóa gene *RASSF1A* trên bệnh ung thư bằng phương pháp Nested-MSP còn rất hạn chế. Tại Việt Nam, việc thực hiện phương pháp Nested-MSP để đánh giá tình trạng methyl hóa vượt mức trên gene *RASSF1A* ở bệnh UTVH vẫn còn chưa được thực hiện. Điều cần nhấn mạnh ở đây, việc hoàn thiện quy trình Nested-PCR cần phải thiết kế thành công bộ mồi, từ đó hoàn thiện quy trình đánh giá. Hướng tới việc sử dụng tính chất methyl hóa trên gene *RASSF1A* như là một dấu chứng sinh học tiềm năng cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán sớm UTVH thì việc thiết kế mồi cho việc đánh giá tính chất methyl hóa trên gene này là rất cần thiết. Do đó, nghiên cứu này hướng tới việc thiết kế mồi nhằm phát hiện tính chất methyl hóa trên gene *RASSF1A*, từ đó các thực nghiệm được thực hiện sẽ cung cấp dữ liệu cho nghiên cứu liên quan đến tính chất methyl hóa của gene *RASSF1A* trên UTVH ở người bệnh ung thư vòm họng ở Việt Nam.

## **2. Vật liệu và phương pháp**

### **2.1. Thu thập cơ sở dữ liệu**

Tiến hành thu thập trình tự promoter của gene *RASSF1A* trên cơ sở dữ liệu Genecard (Genecard, n.d.). Tiến hành khảo sát các đảo CpG thuộc vùng promoter và biến đổi bisulfite trình tự vừa mới thu nhận được bằng phần mềm Methprimer (Urogen, n.d.).

### **2.2. Thiết kế mồi**

Các cặp mồi sử dụng để khảo sát tính chất methyl hóa gene *RASSF1A* sẽ được thiết kế dựa trên các công cụ tin sinh học: IDT (Integrated DNA Technologies, n.d.) kiểm tra và phân tích các thông số vật lý của mồi, Annyb nhằm kiểm tra vị trí bắt cặp và kích thước sản phẩm tạo thành của mồi.

## **3. Kết quả**

### **3.1. Kết quả thu nhận trình tự**

Thu nhận thành công trình tự gene *RASSF1A* từ ngân hàng dữ liệu Ensembl (Ensembl, n.d.) với mã số ENSG00000068028 (Chiều dài kích thước 12,399bps). Trình tự sau khi được thu nhận sẽ tiến hành khảo sát đảo CpG và biến đổi bisulfite bằng phần mềm Methprimer (Urogen, n.d.). Kết quả ghi nhận được trình tự promoter của gene *RASSF1A* có chiều dài là 1,025 nucleotide và có 2 đảo CpG: đảo CpG 1 có chiều dài là 133bp bắt đầu từ nu 439 và kết thúc ở nu 571; đảo CpG 2 có chiều dài là 392bp bắt đầu từ nu 579 và kết thúc ở nu 970 (Hình 1-A).



### **3.2. Kết quả khảo sát môi sử dụng cho phản ứng Nested-MSP**

Nghiên cứu thiết kế thành công 03 cặp môi: môi ngoài, môi methyl và môi unmethyl. Kết quả thiết kế, cặp môi ngoài SF, SR sẽ có kích thước là 373bp (môi xuôi SF: từ nu 666 đến nu 688; môi ngược SR: từ nu 1016 đến nu 1038), cặp môi methyl MF, MR có kích thước là 200bp (môi xuôi MF: từ nu 816 đến nu 836; môi ngược MR: từ nu 996 đến nu 1015) và cặp môi unmethyl UF, UR có kích thước là 173bp (môi xuôi UF: từ nu 801 đến nu 822; môi ngược UR: từ nu 953 đến nu 973). Kết quả các vị trí CG của hai cặp môi methyl và unmethyl lần lượt là: trình tự môi xuôi F và môi ngược R đều có chứa 03 vị trí CG ở môi methyl; trình tự môi xuôi F có chứa 04 vị trí CG và trình tự môi ngược R có chứa 05 vị trí CG ở môi unmethyl (Bảng 1).

Sau đó, các cặp môi sẽ tiếp tục khảo sát các thông số vật lí của cặp môi bao gồm: chiều dài, nhiệt độ nóng chảy, %GC, sự hình thành các cấu trúc thứ cấp ( $\Delta G$ ) bằng chương trình trực tuyến IDT (Integrated DNA Technologies, n.d.). Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

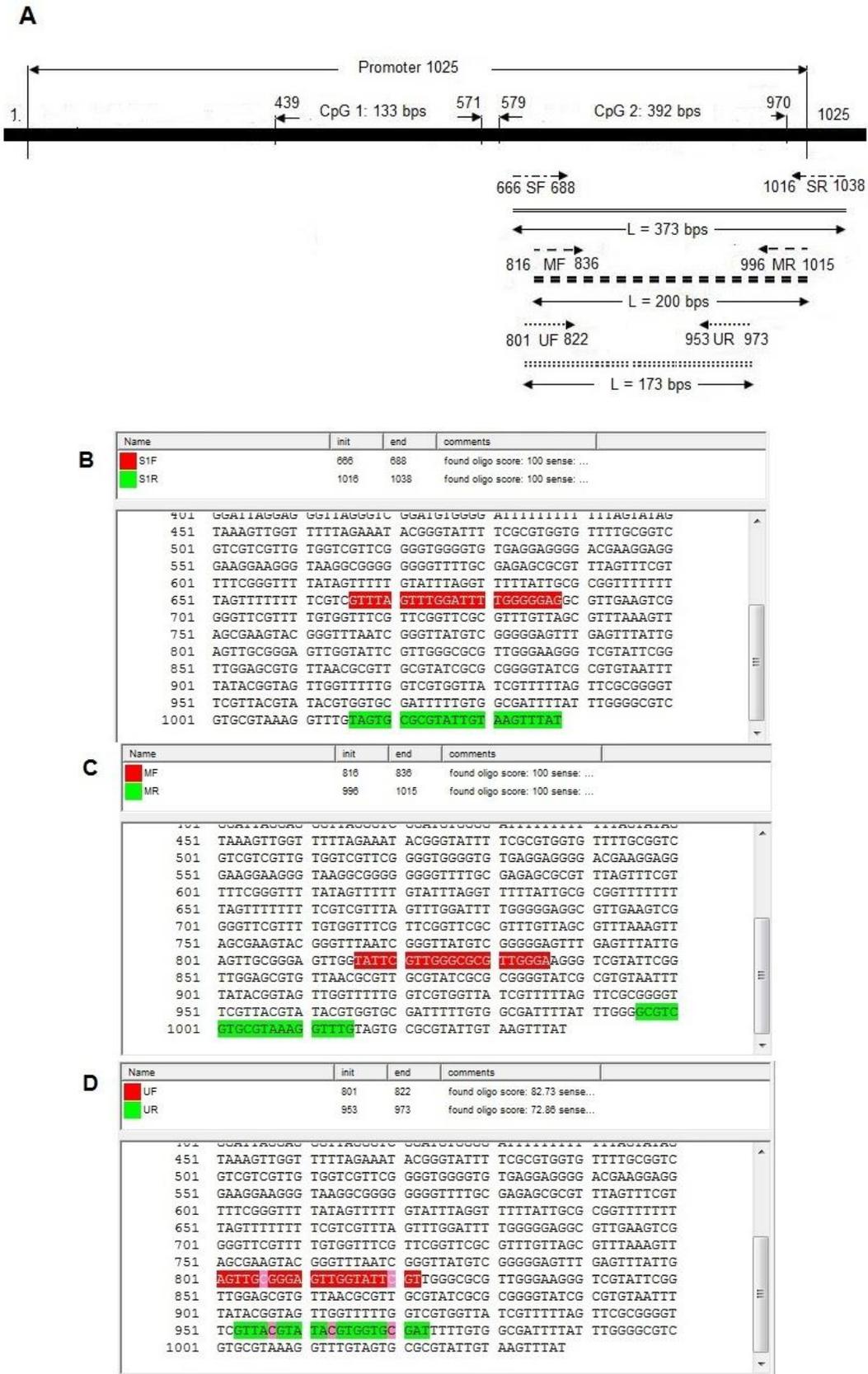
Đồng thời, kiểm tra độ đặc hiệu của môi bằng phần mềm Annhyb. Kết quả thể hiện ở Hình 2, kết quả ghi nhận môi ngoài và môi methyl bắt cặp 100% với trình tự gene *RASSF1A* với kích thước sản phẩm lần lượt là 373bp và 200bp. Kích thước sản phẩm của môi unmethyl là 173bp.

**Bảng 1**

Các thông số vật lý của mồi

Gene	Kí hiệu	Trình tự mồi (5'-3')	L (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	%GC	1	2	3
<i>RASSF1A</i>	RASS_S1-F	GTTTAGTTTGGATTTTGGGGGAG	23	54.20	43.50	2.47	-1.47	-6.83
	RASS_S1-R	ATAAACTTACAATACGCGCACTA	23	52.30	34.80	1.33	-10.36	
	RASS-MF	TATTCGTTGGGCGCGTTGGGA	21	61.80	57.10	-0.65	-10.36	-8.09
	RASS-MR	CAAACCTTTACGCGACGACGC	20	55.00	57.30	-1.13	-3.89	
	RASS-UF	AGTTGTGGGAGTTGGTATTGT	22	54.40	40.90	1.98	-147	-8.32
	RASS-UR	ATCACACCACATATACATAAC	21	47.40	33.30	1.44	-3.91	

Chú thích: L: chiều dài mồi, T<sub>m</sub>: Nhiệt độ nóng chảy; 1: năng lượng cấu trúc kẹp tóc, 2: năng lượng cấu trúc tự bắt cặp, 3: năng lượng cấu trúc dị bắt cặp; in đậm: các vị trí CG.



**Hình 2.** Kết quả khảo sát các cặp mồi

Chú thích: Hình A: vị trí đảo CpG và vị trí bắt cặp của các cặp mồi trên trình tự promoter; Hình B, C, D: Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu mồi bằng phần mềm Annbyl lần lượt mồi ngoài, mồi methyl và unmethyl; Màu đỏ: trình tự mồi xuôi; Màu xanh lá cây: trình tự mồi ngược; Màu hồng: các vị trí bị mismatch.

#### 4. Biện luận

Kết quả trình tự sau khi biến đổi thì các nucleotide C không thuộc CG sẽ không bị methyl hóa chuyển thành nucleotide T, các nucleotide C thuộc CG bị methyl hóa gắn thêm nhóm  $-CH_3$  vẫn giữ nguyên là C (Hình 1-B).

Cặp môi sử dụng cho phản ứng Nested-MSP sẽ được tiến hành thiết kế dựa trên trình tự promoter của gene *RASSF1A* sau khi đã được biến đổi bisulfite. Trong nghiên cứu này các cặp môi được thiết kế dựa trên đảo CpG 2 vì lí do: (1) kích thước của đảo lớn 392bp điều này sẽ góp phần vào việc cho kích thước sản phẩm lớn để dễ dàng cho việc đọc kết quả sau khi khuếch đại và kích thước sản phẩm lớn cũng dễ dàng cho việc giải trình tự gene về sau, (2) chứa nhiều vị trí CG-vị trí xảy ra hiện tượng methyl hóa. Kết quả chọn đảo CpG 2 cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đó của Chang và cộng sự (2003), Kwong và cộng sự (2002), Wang và cộng sự (2009), Fendri và cộng sự (2015); Qiu và cộng sự (2004), Tian và cộng sự (2013).

Đối với cặp môi ngoài là cặp môi được sử dụng cho bước khuếch đại đầu tiên vì vậy, nó sẽ là trình tự bên ngoài bao phủ cả môi methyl và unmethyl và không thể phân biệt được sự methyl hóa ở bước này. Đối với hai cặp môi methyl và unmethyl dùng cho bước khuếch đại thứ hai của gene *RASSF1A* phải chứa các vị trí CG (Bảng 1) để phân biệt được trình tự gene bị methyl hóa hay không bị methyl hóa (Hình 2). Kết quả khảo sát cặp môi thiết kế cho thấy đều thỏa mãn các điều kiện cơ bản như chiều dài nằm trong khoảng 18 - 25bp, nhiệt độ nóng chảy là 52 - 65°C. Tuy nhiên, trình tự *RASSF1A* sử dụng để khảo sát đã được biến đổi bisulfite các nucleotide C không thuộc CpG sẽ bị biến đổi thành nucleotide T nên %GC sẽ thấp hơn 50 - 60%; các giá trị của các mức năng lượng hình thành cấu trúc thứ cấp như cấu trúc kẹp tóc, tự bắt cặp và dị bắt cặp đều có giá trị lớn -9 kcal/mole. Khi tiến hành kiểm tra độ đặc hiệu của môi bằng phần mềm Annyhyb thì đối với cặp môi unmethyl không bắt cặp hoàn toàn mà có các vị trí mismatch tại các nucleotide C thuộc CpG do trình tự đã được biến đổi mà các nu C thuộc CpG vẫn giữ nguyên. Vì vậy, trình tự gene không xảy ra sự methyl hóa thì C thuộc CpG sẽ biến đổi thành T, môi unmethyl sẽ bắt cặp tốt, không làm ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của môi.

#### 5. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế thành công các cặp môi sử dụng cho phản ứng Nested-MSP. Cụ thể là 03 cặp môi: môi ngoài, môi methyl và môi unmethyl với kích thước sản phẩm khuếch đại lần lượt là 392bp, 200bp và 173bp. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp dữ liệu cho thực nghiệm khảo sát tính chất methyl hóa của gene *RASSF1A* bằng phương pháp Nested-MSP trong UTVH.

#### LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự tài trợ của Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh với mã số đề tài E2019.07.03

#### Tài liệu tham khảo

- Agathangelou, A., Cooper, W. N., & Latif, F. (2005). Role of the ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research*, 65(9), 3497-3508.
- Challouf, S., Ziadi, S., Zaghdoudi, R., Ksaa, F., Gacem, R. B., & Trimeche, M. (2012). Patterns of aberrant DNA hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma in Tunisian patients. *Clinica Chimica Acta*, 413(7/8), 795-802.
- Chang, H. W., Chan, A., Kwong, D. L. W., Wei, W. I., Suam, J. S. T., & Yuen, A. P. W. (2003). Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and

- throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patient. *International Journal of Cancer*, 105(6), 851-855.
- Dallol, A., Cooper, W. N., Al-Mulla, F., Agathangelou, A., Maher, E. R., & Latif, F. (2007). Depletion of the Ras association domain family 1, isoform A-associated novel microtubule-associated protein, C19ORF5/MAP1S, causes mitotic abnormalities. *Cancer Research*, 67(2), 492-500.
- Dallol, A., Agathangelou, A., Tommasi, S., Pfeifer, G. P., Maher, E. R., & Latif, F. (2005). Involvement of the *RASSF1A* tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Research*, 65(17), 7653-7659.
- Donninger, H., Vos, M. D., & Clark, G. J. (2007). The *RASSF1A* tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, 120(18), 3163-3172.
- Ensembl. (n.d.). Truy cập ngày 10/02/2021 tại <http://asia.ensembl.org/>
- Fendri, A., Masmoudi, A., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., Daoud, J., Frikha, M., ... Mokdad-Gargouri, R. (2015). Inactivation of *RASSF1A*, *RARβ2* and *DAP-kinase* by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 8(5), 1-8.
- Frappier, L. (2012). Role of *EBNA1* in NPC tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), 154-161.
- Genecard. (n.d.). Truy cập ngày 10/02/2021 tại <https://www.genecards.org>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), 175-178.
- Halpain, S., & Dehmelt, L. (2006). The *MAP1* family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*, 7(6), 1-7.
- Integrated DNA Technologies. (n.d.). *OligoAnalyzer™ Tool*. Truy cập ngày 10/02/2021 tại <https://sg.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>
- Kwong, J., Lo, K. W., To, K. F., Teo, P. M. L., Johnson, P. J., & Huang, D. P. (2002). Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8(1), 131-137.
- Liu, X. Q., Chen, H. K., Zhang, X. S., Pan, Z. G., Li, A., Feng, Q. S., ... Zeng, Y. X. (2003). Alterations of *BLU*, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p32.3, in human nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 106(1), 60-65.
- Lo, K. W., To, K. F., & Huang, D. P. (2004). Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell*, 5(5), 423-428.
- Pan, Z. X., Kashuba, V. I., Liu, X. Q., Shao, J. Y., Zhang, R. H., Jiang, J. H., ... Zeng, Y. X. (2005). High frequency somatic mutations in *RASSF1A* in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 4(10), 1116-1122.
- Qiu, G. H., Tan, L. K. S., Loh, K. S., Lim, C. Y., Srivastava, G., Tsai, S. T., ... Tao, Q. (2004). The candidate tumor suppressor gene *BLU*, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 23(27), 4793-4806.

- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., & White, M. A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4309-4318.
- Tao, Q., & Chan, A. T. (2007). Nasopharyngeal carcinoma: Molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(12), 1-24.
- Tian, F., Yip, S. P., Kwong, D. L. W., Lin, Z., Yang, Z., & Wu, V. W. C. (2013). Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum as potential biomarker for the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology*, 37(5), 708-713.
- Urogen. (n.d.). Truy cập ngày 10/02/2021 tại <http://www.urogen.org/methprimer>
- Wang, T., Liu, H., Chen, Y., Liu, W., Yu, J., & Wu, G. (2009). Methylation associated inactivation of RASSF1A and its synergistic effect with activated K-Ras in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(160), 1-11.
- Wong, T. S., Tang, K. C., Kwong, D. L. W., Sham, J. S. T., Wei, W. I., Kwong, Y. L., & Yuen, A. P. W. (2003). Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Oncology*, 22(4), 869-874.

