

Tối ưu quy trình Tetra primer ARMS PCR xác định đa hình đơn nucleotide rs1799929 của gen *NAT2* ở người tại một số tỉnh, thành phố của Việt Nam

Triệu Tiên Sang^{1*}, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Văn Phong¹, Tạ Thị Bình², Phạm Xuân Thế Anh³

¹Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường, 57 Lê Quý Đôn, phường Phạm Đình Hổ, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/3/2025; ngày chuyển phân biện 10/3/2025; ngày nhận phân biện 20/3/2025; ngày chấp nhận đăng 26/3/2025

Tóm tắt:

Đa hình đơn nucleotide (SNP) rs1799929 trên gen *NAT2* được xác định có liên quan đến quá trình chuyển hóa thuốc và nguy cơ mắc một số bệnh lý nghiêm trọng. Nghiên cứu này đã xây dựng quy trình xác định SNP rs1799929 trên gen *NAT2* bằng kỹ thuật Tetra primer - Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (T-ARMS PCR). Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tối ưu hóa và ứng dụng kỹ thuật này để phát hiện SNP rs1799929 của gen *NAT2*. Chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật T-ARMS PCR để khuếch đại vùng gen chứa SNP và đối chiếu với phương pháp giải trình tự Sanger nhằm kiểm chứng kết quả. Kết quả cho thấy, quy trình đã được tối ưu hóa thành công, bao gồm việc điều chỉnh nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi để đảm bảo độ chính xác và đặc hiệu cao. Đặc biệt, phương pháp phát hiện SNP bằng T-ARMS PCR có độ tương đồng 100% với phương pháp giải trình tự Sanger, khẳng định độ tin cậy của phương pháp này. Kết quả của nghiên cứu là tiền đề áp dụng cho các nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn.

Từ khóa: chuyển hóa thuốc, đa hình đơn nucleotide rs1799929, *NAT2*, T-ARMS PCR.

Chỉ số phân loại: 2.6, 3.1, 3.3

Optimisation of the Tetra primer ARMS PCR protocol for detecting the single-nucleotide polymorphism rs1799929 of the *NAT2* gene in humans from some provinces, cities in Vietnam

Tien Sang Trieu^{1*}, Van Khoa Tran¹, Van Phong Nguyen¹, Thi Binh Ta², Xuan The Anh Pham³

¹Department of Biology and Medical Genetics, Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

²Institute of Occupational Health and Environment, 57 Le Quy Don Street, Pham Dinh Ho Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

³University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 7 March 2025; revised 20 March 2025; accepted 26 March 2025

Abstract:

The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs1799929 in the *NAT2* gene has been identified as being associated with drug metabolism and the risk of some serious diseases. This study developed a protocol to detect the SNP rs1799929 in the *NAT2* gene using the Tetra primer - Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (T-ARMS PCR) technique. The objective of the study was to optimise and apply this technique for the detection of the *NAT2* rs1799929 SNP. We employed the T-ARMS PCR technique to amplify the gene region containing the SNP and compared the results with the Sanger sequencing method for validation. The study demonstrated that the protocol was successfully optimised, including adjustments of annealing temperature and primer concentrations to ensure high accuracy and specificity. Notably, the SNP detection by T-ARMS PCR showed 100% concordance with the Sanger sequencing method, confirming the reliability of this technique. The results of this study provide a foundation for application in further studies with larger sample sizes.

Keywords: drug metabolism, *NAT2*, SNP rs1799929, T-ARMS PCR.

Classification numbers: 2.6, 3.1, 3.3

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

1. Đặt vấn đề

Enzyme chuyển hóa thuốc đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh hiệu quả điều trị và nguy cơ độc tính của thuốc. Trong đó, N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) là một enzyme chuyển hóa thuốc quan trọng thuộc nhóm pha II, tham gia vào quá trình acetyl hóa nhiều loại thuốc như: isoniazid, procainamide, hydralazine và các hợp chất ngoại sinh khác [1].

Gen *NAT2* có nhiều đa hình đơn nucleotide (SNPs), trong đó rs1799929 là một trong những biến thể quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động enzyme. Sự thay đổi trình tự nucleotide tại vị trí này có thể làm thay đổi tốc độ acetyl hóa của *NAT2*, dẫn đến nhóm cá thể được phân thành 3 nhóm: (i) nhóm chuyển hóa nhanh (rapid acetylators), (ii) nhóm chuyển hóa trung bình (intermediate acetylators) và (iii) nhóm chuyển hóa chậm (slow acetylators) [2]. Kiểu gen chuyển hóa chậm có thể gây ra hiện tượng tích lũy thuốc, làm tăng nguy cơ tác dụng phụ và độc tính của thuốc; trong khi kiểu gen chuyển hóa nhanh lại làm giảm hiệu quả điều trị do thuốc bị thải trừ quá nhanh [3]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các đa hình gen *NAT2*, bao gồm rs1799929, có liên quan đến nguy cơ mắc một số bệnh lý nghiêm trọng. Chẳng hạn, các biến thể *NAT2* làm giảm hoạt động enzyme có thể liên quan đến nguy cơ nhiễm độc gan khi sử dụng thuốc điều trị lao, do sự chậm trễ trong quá trình chuyển hóa và đào thải thuốc chống lao [4]. Ngoài ra, sự thay đổi trong quá trình acetyl hóa còn được báo cáo có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư bàng quang, ung thư phổi, đặc biệt ở những người tiếp xúc với amin thơm từ khói thuốc lá [5].

Dữ liệu từ Ngân hàng Gen NCBI (dbSNP) cho thấy, trong quần thể châu Á, tần suất alen T của SNP rs1799929 khoảng 0,4028 và alen C khoảng 0,5972 [6]. Theo cân bằng Hardy-Weinberg, tần suất xuất hiện các kiểu gen TT:TC:CC được ước tính xấp xỉ 0,0009:0,0569:0,9422. Sự khác biệt về tần suất alen giữa các quần thể cho thấy ý nghĩa của việc nghiên cứu SNP rs1799929 trong từng quần thể cụ thể, nhằm phục vụ cho y học và dự báo nguy cơ bệnh lý.

SNP có thể được phát hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, trong đó T-ARMS PCR là phương pháp được đánh giá cao bởi tính đơn giản, nhanh chóng và chi phí thấp. Phương pháp này giúp phát hiện chính xác kiểu gen dựa trên trình tự mỗi đặc hiệu, cho phép phân biệt alen đột biến và alen bình thường trong cùng một phản ứng polymerase chain reaction (PCR) [7]. Tuy nhiên, cho đến nay phương pháp này vẫn chưa được nghiên cứu ứng dụng để xác định SNP rs1799929 trên quần thể người Việt Nam.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố quan trọng đến quy trình T-ARMS PCR xác định SNP rs1799929 trên gen *NAT2* ở người tại

một số tỉnh, thành phố của Việt Nam, đồng thời xác định độ chính xác của phương pháp này thông qua đối chiếu với phương pháp chuẩn (giải trình tự gen). Kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở để ứng dụng trong dược lý di truyền, hỗ trợ điều trị thuốc và giúp tối ưu hóa phác đồ điều trị cho các bệnh nhân trong tương lai.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

20 mẫu máu toàn phần được thu thập ngẫu nhiên từ các cá nhân (độ tuổi 18-60 và không phân biệt giới tính) trong cộng đồng tại các tỉnh Lạng Sơn, Nghệ An, Hòa Bình. Mẫu máu được bảo quản trong ống chứa chất chống đông EDTA nồng độ 1,5 mg/ml máu và trữ đông ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Do tần suất kiểu gen TT tại vị trí đa hình rs1799929 rất thấp (khoảng 0,0009). Việc lựa chọn cỡ mẫu nghiên cứu là 20 mẫu ở đây nhằm đảm bảo có sự xuất hiện của các mẫu với kiểu gen CT và CC tại vị trí đa hình rs1799929.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA từ mô máu: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu toàn phần bằng bộ kit TopPURE® Serum Viral DNA/RNA Co-Extraction (Công ty ABT - Việt Nam). Độ tinh sạch và nồng độ DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp đo độ hấp thụ ánh sáng (OD), sử dụng hệ thống SpectraMax QuickDrop. Mẫu DNA sau đó được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Thiết kế trình tự mỗi: Các oligonucleotide sử dụng cho T-ARMS PCR được thiết kế bằng phần mềm Primer-BLAST (bảng 1) dựa trên trình tự gen *NAT2* tham chiếu trên NCBI: NC_000008.11:18400294-18400646, Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p14.

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu.

Primer	Trình tự	Tm (°C)	Sản phẩm
N2.481 Fo	5'-AGTTAACAAATACAGCACTGGCATGTT-3'	65,7	
N2.481 Ro	5'-ATGTTGGAGACGCTGCAGGTATGTAT-3'	67,2	Fo-Ro: 353 bp
N2.481 Fi	5'-GACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTCCC-3'	69,4	Fo-Ri (Alen C): 188 bp Fi-Ro (Alen T): 220 bp
N2.481 Ri	5'-AATATACTGCTCTCTCTGATTGGTCAAA-3'	66,6	

Xác định nhiệt độ gắn mỗi và thể tích mỗi tối ưu: Đối với thí nghiệm tối ưu nhiệt độ gắn mỗi, dải nhiệt độ từ 52,0-61,9°C đã được thiết lập cho chu trình PCR (bảng 2). Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát nhiệt độ gắn mỗi cho từng cặp mỗi đơn N2.481 Fo - N2.481 Ro, N2.481 Fo - N2.481 Ri và N2.481 Fi - N2.481 Ro. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm RedSafe và chụp bằng hệ thống chụp ảnh gel để phân tích kết quả.

Bảng 2. Thành phần và điều kiện phản ứng polymerase chain reaction đơn môi.

Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ
GoTaq Green Master mix 2X	6,25	
Nước deion	2,75	
Môi xuôi	0,5	10 pmol/µl
Môi ngược	0,5	10 pmol/µl
DNA khuôn	2,5	20 ng/µl
Tổng	12,5	

Chu trình: 95°C - 5 phút, (95°C-45 giây, gradient-45 giây, 72°C-35 giây)×40, 72°C-5 phút.

Trong thí nghiệm tối ưu thể tích môi, chúng tôi đã đồng hóa nồng độ của 4 môi về mức 10 pmol/µl. Sau khi tìm được nhiệt độ gắn môi thích hợp, chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu quả phản ứng với các thể tích môi khác nhau. Cụ thể, chúng tôi đã tiến hành khảo sát tại các thể tích môi N2.481 Fi - N2.481 Ri gấp đôi thể tích môi N2.481 Fo - N2.481 Ro (với 2i=0=1 µl), thể tích môi N2.481 Fi - N2.481 Ri bằng với thể tích môi N2.481 Fo - N2.481 Ro (với i=0=1 µl) để tìm ra lượng tối ưu cho phản ứng.

Nhân bản đoạn gen NAT2 bằng PCR: Phản ứng nhân bản đoạn gen NAT2 được thực hiện trên hệ thống máy PCR của Hãng Eppendorf (Đức). Các thành phần trong phản ứng PCR gồm: 6,25 µl Master Mix 2X, 0,75 µl nước deion, các môi N2.481 Fo, N2.481 Ro, N2.481 Fi và N2.481 Ri, 2,5 µl DNA khuôn trong tổng thể tích 12,5 µl. Chu trình nhiệt cho PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút; 40 chu kỳ: 95°C trong 30 giây, gắn môi trong 30 giây, 72°C trong 35 giây; thời gian kéo dài chuỗi 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5% để kiểm tra kết quả.

Giải trình tự Sanger: Đoạn gen NAT2 chứa SNP được khuếch đại bằng cặp môi N2.481 Fo - N2.481 Ro được sử dụng để giải trình tự trên máy SeqStudio bằng bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing của Hãng Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ).

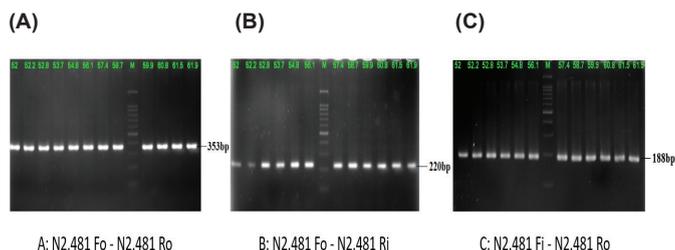
Thành phần mỗi phản ứng Sanger gồm 50 ng DNA; 1,5 µl BigDye; 2 µl Buffer; 10 pM môi N2.481 Fo và nước deion trong tổng thể tích 10 µl với chu trình nhiệt như sau: 96°C-1 phút; 25 chu kỳ (96°C-10 giây, 50°C-5 phút, 60°C-4 phút); giữ ở 4°C. Sản phẩm được tinh sạch bằng phương pháp tủa EtOH/EDTA. DNA sau đó được đem đi điện di mao quản. Trình tự nucleotide của mỗi đoạn gen sau khi giải trình tự được xác định cả 2 chiều (xuôi và ngược) bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor.

Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học, Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường thông qua ngày 29/03/2024 (Số Giấy chứng nhận: 01/GCN-HĐĐĐ). Việc lấy mẫu được thực hiện theo đúng quy định và chỉ với mục đích phục vụ cho nghiên cứu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ gắn môi đến hiệu suất polymerase chain reaction nhân bản đoạn gen NAT2

Chúng tôi đã thực hiện PCR với 12 nhiệt độ gắn môi để xác định nhiệt độ gắn môi tối ưu cho PCR nhân bản đoạn gen NAT2 chứa SNP rs1799929 với từng cặp môi đặc hiệu (hình 1).

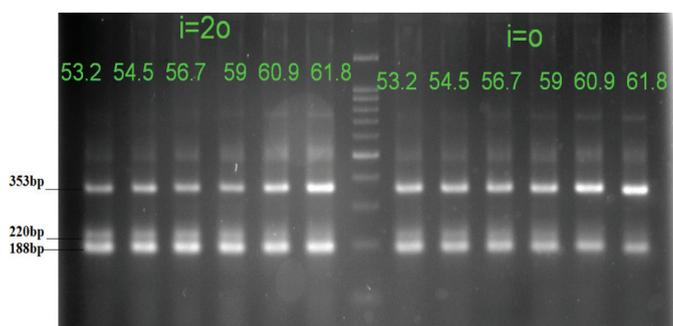


Hình 1. Tối ưu nhiệt độ gắn môi cho PCR nhân bản đoạn gen NAT2 chứa đa hình đơn nucleotide rs1799929. (A) Phản ứng PCR thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau cho cặp môi N2.481Fo-N2.481Ro nhân bản đoạn gen chứa nội kích thước 353bp; (B) Phản ứng PCR thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau cho cặp môi N2.481Fo-N2.481Ri nhân bản đoạn gen chứa alen T đa hình rs1799929 kích thước 220bp; (C) Phản ứng PCR thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau cho cặp môi N2.481Fi-N2.481Ro nhân bản đoạn gen chứa alen C đa hình rs1799929 kích thước 188bp.

Kết quả điện di ở hình 1A cho thấy, PCR với cặp môi N2.481 Fo - N2.481 Ro ở dải nhiệt độ 52-61,9°C cho các băng điện di có kích thước 353 bp sắc nét, sáng rõ và đồng đều ở tất cả các băng, chứng tỏ nhiệt độ khảo sát không ảnh hưởng tới hiệu suất PCR. Với cặp môi N2.481 Fo - N2.481 Ri (hình 1B), trong dải nhiệt 52-61,9°C đều xuất hiện 1 băng duy nhất kích thước 220 bp, riêng ở khoảng nhiệt 52-52,2°C xuất hiện các băng điện di mờ. Khi tăng dần nhiệt độ 52,8-61,9°C, các băng điện di sáng và sắc nét hơn. Đối với cặp môi N2.481 Fi - N2.481 Ro (hình 1C) trong dải nhiệt 52-61,9°C, đều cho các băng điện di duy nhất với kích thước 188 bp rõ nét và tương đồng tại tất cả các băng. Như vậy, kết hợp kết quả 3 thí nghiệm cho thấy, có thể lựa chọn nhiệt độ gắn môi phù hợp cho T-ARMS PCR nhân bản đoạn gen NAT2 chứa SNP rs1799929 trong khoảng 52,8-61,9°C.

3.2. Ảnh hưởng kết hợp của việc lựa chọn tỷ lệ thể tích môi và nhiệt độ gắn môi đến hiệu suất T-ARMS PCR nhân bản đoạn gen NAT2

Ở hình 2, trong khoảng nhiệt độ gắn môi từ 53,2-61,8°C, chúng tôi đã khảo sát tỷ lệ thể tích môi cho T-ARMS PCR xác định SNP rs1799929. Kết quả cho thấy, trong dải nhiệt độ 53,2-56,7°C, khi sử dụng cặp môi N2.481 Fi - N2.481 Ri với thể tích gấp đôi so với cặp môi N2.481 Fo - N2.481 Ro, các băng DNA điện di sản phẩm PCR thu được 3 band rõ ràng nhất và phù hợp với kích thước dự kiến. Dựa trên các kết quả này, nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ gắn môi tối ưu là 54,5°C và tỷ lệ cặp môi N2.481 Fi - N2.481 Ri gấp đôi thể tích so với với cặp môi N2.481 Fo - N2.481 Ro cho phản ứng ARMS-PCR xác định đa hình rs1799929.



Hình 2. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi và thể tích mồi cho T-ARMS PCR nhân bản đoạn gen *NAT2* chứa đa hình đơn nucleotide rs1799929.
o=i=1μl: Tỷ lệ thể tích cặp mồi N2.481 Fi, N2.481 Ri bằng cặp mồi N2.481 Fo, N2.481 Ro; 2o=i=1μl: Tỷ lệ thể tích cặp mồi N2.481 Fi, N2.481 Ri gấp đôi so với cặp mồi N2.481 Fo, N2.481 Ro.

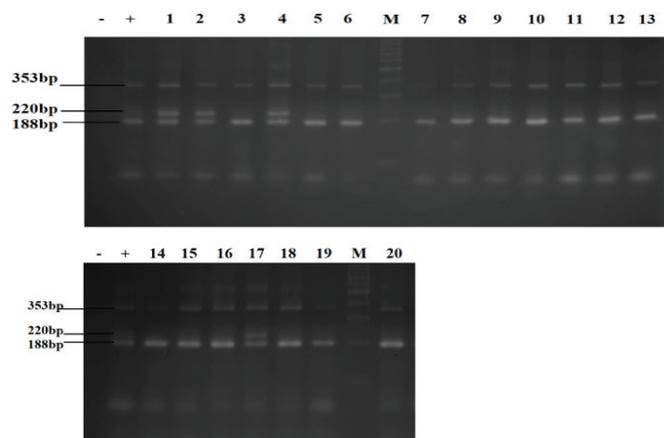
Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt tối ưu cho T-ARMS PCR xác định đa hình rs1799929 được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Quy trình Tetra primer - Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction xác định đa hình đơn nucleotide rs1799929 trên gen *NAT2*.

Thành phần	Thể tích (μl)	Nồng độ (pmol/μl)	Chu trình nhiệt
GoTaq Green Master mix 2X	6,25		
Nước deion	0,75		
N2.481 Fo	0,5	10	95°C-5 phút, (95°C-30 giây; 54,5°C-30 giây; 72°C-35 giây) x40, 72°C -10 phút
N2.481 Ro	0,5	10	
N2.481 Fi	1	10	
N2.481 Ri	1	10	
DNA khuôn 2,5 20 ng/μl			
Tổng	12,5		

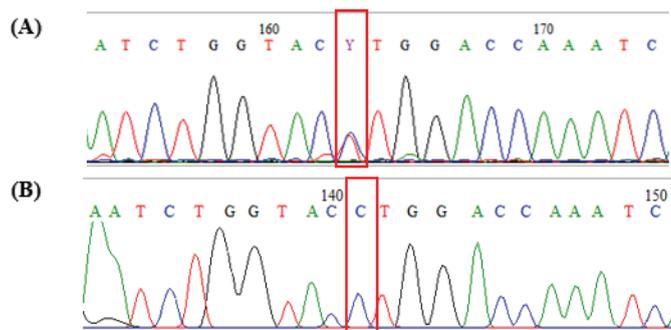
3.3. Xác định độ chính xác của phương pháp phát hiện đa hình đơn nucleotide rs1799929 trên *NAT2* bằng T-ARMS PCR

Để đánh giá độ chính xác của quy trình T-ARMS PCR, chúng tôi đã thử nghiệm trên 20 mẫu đại diện và so sánh với phương pháp chuẩn (giải trình tự gen). Kết quả T-ARMS PCR xác định SNP rs1799929 (hình 3) cho thấy, các mẫu 3, 5 - 16, 18, 19 và 20 xuất hiện hai băng DNA kích thước 188 và 353 bp, chứng tỏ các mẫu này mang kiểu gen C/C. Trong khi đó, mẫu 1, 2, 4 và 17 xuất hiện cả ba băng DNA 188, 220 và 353 bp chứng tỏ các mẫu mang kiểu gen C/T. Tất cả các mẫu đại diện không mang kiểu gen T/T (đặc trưng bởi hai băng DNA 220 và 353 bp).



Hình 3. Kết quả xác định đa hình đơn nucleotide rs1799929 trên *NAT2* bằng T-ARMS PCR trên 20 mẫu nghiên cứu. (-): Đối chứng âm; (+): Đối chứng dương; M: 100 bp DNA Ladder Hãng Vazyme (Trung Quốc); Làn 1-20: Sản phẩm T-ARMS PCR của 20 mẫu nghiên cứu.

Để kiểm chứng kết quả của phản ứng ARMS-PCR, chúng tôi đã đối chiếu một số mẫu đại diện với phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả cho thấy, mẫu đại diện số 1 xuất hiện 2 peak mang kiểu gen CT và mẫu đại diện số 3 xuất hiện 1 peak mang kiểu gen CC (hình 4). Qua đó, khẳng định sự đồng nhất về kết quả giữa hai phương pháp trên các mẫu đại diện.



Hình 4. Kết quả giải trình tự đoạn gen *NAT2* chứa đa hình đơn nucleotide rs1799929. (A) Mẫu đại diện số 1 mang kiểu gen CT; (B) Mẫu đại diện số 3 mang kiểu gen CC.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tối ưu hóa phản ứng T-ARMS PCR nhằm xác định SNP rs1799929 của gen *NAT2* ở người tại một số tỉnh thành của Việt Nam. Kết quả thu được từ phương pháp ARMS-PCR trong nghiên cứu đã được kiểm chứng bằng phương pháp giải trình tự Sanger trên một số mẫu đại diện. Độ tương đồng 100% giữa hai phương pháp khẳng định tính chính xác và khả năng ứng dụng của quy trình. Phương pháp T-ARMS PCR là một công cụ hiệu quả trong xác định SNP nhờ tính đặc hiệu cao [8], so với các phương pháp truyền thống như giải trình tự

Sanger hoặc PCR-RFLP, T-ARMS PCR cho phép phát hiện SNP nhanh chóng mà không cần bước xử lý enzyme cắt giới hạn hay phân tích trình tự, giúp đơn giản hóa quy trình, tiết kiệm thời gian, giảm thiểu sai sót và tiết kiệm chi phí nghiên cứu. Ngoài ra, phương pháp này có thể được triển khai trên các hệ thống PCR tiêu chuẩn, không yêu cầu trang thiết bị phức tạp như giải trình tự gen.

Tuy nhiên, T-ARMS PCR cũng có một số hạn chế. Một trong những hạn chế lớn nhất của T-ARMS PCR là tính nhạy cảm cao với điều kiện phản ứng, đặc biệt là nồng độ muối và nhiệt độ gắn muối. Chỉ cần sự khác biệt nhỏ trong nồng độ muối hoặc nhiệt độ annealing cũng có thể gây ra kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả, do mỗi bắt cặp không đặc hiệu hoặc không đủ khả năng khuếch đại trình tự đích [9]. Việc tối ưu hóa điều kiện phản ứng là bắt buộc nhưng lại tốn thời gian và đòi hỏi kỹ thuật cao, đặc biệt khi áp dụng cho các mẫu có trình tự giàu GC hoặc chứa các cấu trúc bậc hai phức tạp.

Bên cạnh đó, việc thiết kế mỗi phức tạp cũng là một nhược điểm của T-ARMS PCR. Phải thiết kế 4 muối cho mỗi phản ứng, trong đó mỗi đặc hiệu đột biến cần có điểm gắn chính xác tại nucleotide 3' để phân biệt mẫu đột biến và mẫu bình thường. Nếu mỗi không được thiết kế tốt, sẽ dẫn tới hiện tượng cross-amplification hoặc nền không đặc hiệu cao, làm giảm độ đặc hiệu của phản ứng [7].

Bên cạnh phương pháp T-ARMS PCR, một số kỹ thuật khác cũng được ứng dụng để xác định các biến thể của gen *NAT2* tại Việt Nam. Một nghiên cứu khi so sánh giữa RFLP và giải trình tự gen, hai phương pháp này đều có thể xác định chính xác các biến thể gen *NAT2* trên đối tượng bệnh nhân lao ở Việt Nam [10]. Tuy nhiên, điểm hạn chế của RFLP là cần nhiều bước thao tác và phụ thuộc vào việc lựa chọn enzyme cắt giới hạn, trong khi T-ARMS PCR khắc phục được những hạn chế đó, rút ngắn thời gian, tiết kiệm chi phí mà vẫn đảm bảo độ chính xác cao. Do đó, ứng dụng T-ARMS PCR vào nghiên cứu SNP rs1799929 trên gen *NAT2* là hoàn toàn hợp lý và khả thi.

Từ những kết quả này, chúng tôi đề xuất áp dụng quy trình để phân tích đa hình trên cỡ mẫu lớn hơn nhằm thu thập thông tin về tần suất kiểu gen, tạo tiền đề cho các nghiên cứu về dịch tễ học và di truyền học nhằm sàng lọc và phân loại kiểu gen liên quan đến chuyển hóa trong quần thể người Việt Nam.

Quy trình T-ARMS PCR xác định SNP rs1799929 trên gen *NAT2* đã được tối ưu hóa thành công với nhiệt độ gắn muối 54,5°C và tỷ lệ thể tích cặp muối N2.481 Fi - N2.481

Ri gấp đôi so với cặp muối N2.481 Fo - N2.481 Ro. Quy trình cho kết quả khuếch đại đặc hiệu, các băng DNA rõ nét, kích thước đúng như dự kiến. Đặc biệt, phương pháp đạt độ chính xác 100% khi so sánh với giải trình tự Sanger trên các mẫu đại diện, khẳng định độ tin cậy và khả năng ứng dụng thực tiễn cao.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài nhánh thuộc đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp nhà nước: “Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ số hóa sinh cơ bản về độc chất học môi trường trên người Việt Nam tuổi lao động”, mã số: ĐTDL.CN.39/21. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường, Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện Quân y đã tạo điều kiện hỗ trợ thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.W. Nebert, R.A. McKinnon, A. Puga (1996), “Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: Effects on risk of toxicity and cancer”, *DNA and Cell Biology*, **15**(4), pp.273-280, DOI: 10.1089/dna.1996.15.273.
- [2] D.W. Hein (2002), “Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: Role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis”, *Mutation Research*, **506**, pp.65-77, DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00153-7.
- [3] T. Surarak, S. Chumnumwat, W. Nosoongnoen, et al. (2024), “Efficacy, safety, and pharmacokinetics of isoniazid affected by *NAT2* polymorphisms in patients with tuberculosis: A systematic review”, *Clinical and Translational Science*, **17**(4), DOI: 10.1111/cts.13795.
- [4] A. Headriawan, A.A. Pramono, A. Sukadi, et al. (2021), “*NAT2* gene rs1041983 is associated with anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity among pediatric tuberculosis in Bandung, Indonesia”, *The Application of Clinical Genetics*, **14**, pp.297-303, DOI: 10.2147/TACG.S303668.
- [5] K. Zhu, A. Xu, W. Xia, et al. (2021), “Association between *NAT2* polymorphism and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis”, *Frontiers in Oncology*, **11**, DOI: 10.3389/fonc.2021.567762.
- [6] National Center for Biotechnology Information (2024), *Reference SNP (rs) Report*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799929>, accessed 31 December 2024.
- [7] R.F. Medrano, C.A.D. Oliveira (2014), “Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development”, *Molecular Biotechnology*, **56**(7), pp.599-608, DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- [8] Y.M. Lo (1998), “The amplification refractory mutation system”, *Methods in Molecular Medicine*, **16**, pp.61-69, DOI: 10.1385/0-89603-499-2:61.
- [9] S. Ye, S. Dhillon, X. Ke, et al. (2001), “An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms”, *Nucleic Acids Research*, **29**(17), DOI: 10.1093/nar/29.17.e88.
- [10] T.H.N. Pham, H.N. Kieu, T.T. Nguyen, et al. (2019), “Establishing the genotyping method for *NAT2* polymorphism in Vietnamese tuberculoma patients”, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, **35**(1), pp.96-103, DOI: 10.25073/2588-1132/vnumps.4137 (in Vietnamese).