

2. **M. Nowicki** (2006). "Characterization of the Cardiolipin Synthase from *Arabidopsis thaliana*".  
http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus/volltexte/2006/1629/.
3. **Teresa G Berg**; Antiphospholipid antibody syndrome and pregnancy; update: Jan 14, 2011.  
http://emedicine.medscape.com/article/261691-overview
4. **IBL international BMBH**. Cardiolipin IgG ELISA, RE 75011
5. **IBL international BMBH**, Cardiolipin IgG ELISA, RE 75021
6. **Silvia S. Pierangeli**<sup>1</sup>; Antiphospholipid Antibodies and the Antiphospholipid Syndrome: Pathogenic Mechanisms; Semin Thromb Hemost 2008; 34(3): 236-250 DOI: 10.1055/s-0028-1082267
7. **Zev M. Stoeber, Edna Mozes, and Boris Tartakovsky** (1993) Anticardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 90, pp. 6464-6467. July 1993 Medical Science

## BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NHỮNG BIẾN ĐỔI ĐA HÌNH GEN AS3MT Ở TRẺ SƠ SINH BỊ PHƠI NHIỄM ARSENIC TRƯỚC SINH

*Đỗ Thị Ngát\*, Trần Phương Thảo\*, Nguyễn Huy Hoàng\**

### TÓM TẮT:

Arsenic (+3 oxidation) methyltransferase (AS3MT) là enzyme chìa khóa trong con đường chuyển hóa sinh học của arsenic. Để bước đầu đánh giá những biến đổi đa hình nucleotide đơn gen AS3MT, kỹ thuật PCR-RFLP (đa hình độ dài đoạn hạn chế) đã được sử dụng. Trong nghiên cứu này, kiểu gen đồng hợp tử TT và dị hợp tử AG lần lượt của các SNP AS3MT14458 (rs11191439) và AS3MT 4602 (rs7085104) được tìm thấy ở tất cả các mẫu. Trong khi đó, AS3MT5913 (rs4917986) có dị hợp tử TC xuất hiện ở mẫu đối chứng và đồng hợp tử TT ở mẫu bệnh. Kết quả này là tiền đề cho nghiên cứu đa hình di truyền ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm Arsenic trước sinh.

*Từ khóa:* AS3MT, đa hình Nucleotide đơn, PCR-RFLP, phơi nhiễm arsenic

\* Viện Công nghệ Sinh học

### SUMMARY:

#### EARLY EVALUATION ON AS3MT POLYMORPHISMS OF PRE-BORN ARSENIC EXPOSURE INFANTS

Arsenic (+3 oxidation) methyltransferase (AS3MT) is the key enzyme in biotransformation pathway of inorganic arsenic. To early evaluate the variation of AS3MT polymorphisms, PCR-RFLP technology was utilized in this study, the homozygote for SNP 14458TT (rs11191439) and heterozygote for SNP 4602AG (rs7085104) were detected in all templates, whereas heterozygote TC and homozygote TT appeared in control and arsenic exposed templates in SNP 5913 (rs4917986), respectively. Altogether, our results are premise for further studies on genetic polymorphisms of pre-born arsenic exposed infants.

**Keyword:** Arsenic exposure, AS3MT, PCR-RFLP, polymorphism

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Trong những năm gần đây, ô nhiễm kim loại nặng, đặc biệt là ô nhiễm arsenic trong nước ngầm đang dành được mối quan tâm hàng đầu ở nhiều nước. Việt Nam cũng là một trong những nước nằm trong vùng có ô nhiễm arsenic nguồn nước ngầm trên bán đảo thế giới. Arsenic (+3 oxidation) methyltransferase (AS3MT) là enzyme chia khóa trong con đường chuyển hóa sinh học của arsenic. AS3MT xúc tác sự chuyển nhóm methyl từ S-adenosyl-L-methionine tới arsenic hóa trị 3, tạo thành các hợp chất methyl hóa arsenic monomethylarsonic acid và monomethylarsonous acid (MMAs), dimethylarsinic acid và dimethylarsinous (DMAs) (Agusa et al, 2011).

Biến đổi kiểu gen cũng có thể làm ảnh hưởng đến con đường chuyển hóa arsenic, hoặc là nguyên nhân dẫn đến các triệu chứng ngộ độc hoặc các bệnh ung thư. Thực tế cho thấy, sự xuất hiện các sai khác về MMAs

trong nước tiểu giữa các cá thể có liên quan đến sự đa hình di truyền (Vahter, 2000). Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR-RFLP được sử dụng để đánh giá những biến đổi đa hình gen AS3MT, tạo cơ sở dữ liệu cho việc đánh giá mức độ tổn thương di truyền tế bào và gen gây ra do arsenic.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

### 2.1. Nguyên liệu:

DNA khuôn được sử dụng trong nghiên cứu là 2 mẫu máu đối chứng (DCH9 và MBPA) và 2 mẫu máu cuống rốn (VHCBD00 và VHCBD06) của trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm arsenic trước sinh, được thu thập từ Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Nam - vùng được đánh giá có mức độ ô nhiễm arsenic cao.

Ba điểm đa hình Nucleotide đơn được nghiên cứu và các cặp môi đặc hiệu cũng như enzyme hạn chế được chọn lọc theo nghiên cứu của Agusa và cộng sự (2009) (bảng 1).

**Bảng 1:** Điểm đa hình Nucleotide đơn, trình tự cặp môi, enzyme hạn chế và kích thước các đoạn cắt

SNP ID	Thay đổi nucleotit	Thay đổi acid amine	Trình tự môi	Enzym hạn chế	Kích thước các đoạn cắt(bp)
4602 Rs7085104	A/G		F 5'-CGAAGAAACTTGTGGGCCAGA-3' R 5'-TCGCTCCACTGCGATTTTCAC-3'	<i>MspI</i>	AA 261 AG 261, 200, 61 GG 200,61
5913 Rs4917989	T/C		F 5'-GTGCTGGAGATGAACCGTGAA-3' R 5'-GCAAGGGCAAGAGCAGAAAGA-3'	<i>BglI</i>	TT 251 TC 251, 151, 100 CC 151, 100
14458 Rs1119143 9	T/C	Met/Thr	F 5'-GGTCACTAGGGAATTAACCG-3' R 5'-TGGCTATGTTGACCAAGCTGG-3'	<i>HpyCH4IV</i>	TT 233 TC 233, 154, 79 CC 154, 79

Các hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử thuộc các hãng Sigma, Merck, Fermentas. Các cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi hãng Integrated DNA Technologies. Các enzyme *Msp*I, *Hpy*CH4IV, *Bgl*II được nhập của hãng New England Biolabs.

## 2.2. Phương pháp:

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu cuống rốn bằng kit GeneJET<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification của hãng Fermentas.

Nhân gen bằng phương pháp PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50  $\mu$ l, với các thành phần: ADN khuôn (100 ng), mỗi xuôi và mỗi ngược (20 pmol), dNTP (0,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), Taq polymerase (1 U/ $\mu$ l), buffer PCR (1X). Với mỗi mồi đều áp dụng thành phần tương tự như trên để thu được những đoạn DNA mong muốn.

Chu trình nhiệt trong kỹ thuật PCR cho mồi Up được thực hiện gồm 30 chu kỳ với gắn mồi ở 60°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Với cặp mồi I3 và E9, gắn mồi gắn mồi ở 55°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây.

Xác định biến đổi đa hình bằng kỹ thuật PCR-RFLP.

Phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme hạn chế cho 20  $\mu$ l gồm các thành phần sau: 2  $\mu$ l RE buffer (1X), 30  $\mu$ l sản phẩm PCR cô đặc thành 10  $\mu$ l bằng Speedvac, 0,5  $\mu$ l (5 U/ $\mu$ l) enzyme và 7,5  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O. Hỗn hợp được ủ qua đêm ở 37°C. Kết quả sản phẩm cắt enzyme hạn chế được kiểm tra trên gel agarose 2%, nhuộm bằng Ethidium bromide và phát hiện dưới ánh sáng UV.

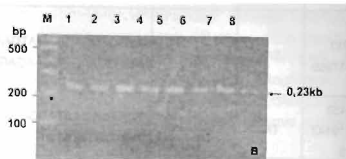
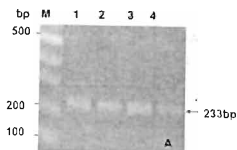
## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU:

DNA tổng số sau khi tách chiết có độ tinh sạch cao ( $A_{260}/A_{280} = 1.9 + 2$ ), có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

### Phân tích đa hình gen *AS3MT 14458* (*Rs11191439*)

Sản phẩm của phản ứng PCR nhân lên từ cặp mồi E9 có kích thước 233 bp có chứa điểm đa hình Nucleotide đơn ở vị trí 14458 của SNP rs11191439 (hình 1A). Hình ảnh điện di trên gel agarose 1,5% có một băng rõ nét, chứng tỏ đã được nhân đặc hiệu.

Gen *AS3MT* chứa điểm đa hình tại vị trí 14458 mà tại đó base T của của thể hoang dại bị thay thế bởi base C dẫn đến sự thay đổi amino acid Met thành Thr (Agusa et al. 2009). Trình tự cắt của enzyme hạn chế *Hpy*CH4IV phù hợp với trường hợp base C tại vị trí đa hình nên thể hoang dại không bị cắt bởi enzyme này, còn thể đột biến sẽ bị cắt. Sản phẩm PCR từ cặp mồi E9 của cả 2 mẫu máu đối chứng và 2 mẫu máu cuống rốn cắt bằng *Hpy*CH4IV sau khi điện di kiểm tra trên gel agarose 2% đều thu được 1 băng có kích thước khoảng 0,23 kb; tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử TT (hình 1B).

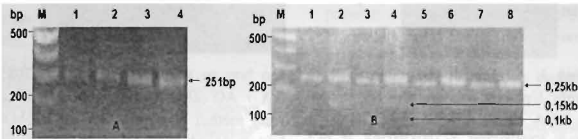


**Hình 1. A.** Điện di sản phẩm PCR sử dụng mỗi E9 trên gel agarose 1,5 %. M: Thang DNA chuẩn 100 bp, 1: DCH 9, 2: MBPA, 3: VHCBD00, 4: VHCBD06; **B.** Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp mỗi E9 được cắt bằng enzyme hạn chế *Hpy*CH4IV. M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Sản phẩm cắt mẫu DCH9, 2: Sản phẩm PCR mẫu DCH9, 3: Sản phẩm cắt mẫu MBPA, 4: Sản phẩm PCR mẫu MBPA, 5: Sản phẩm cắt mẫu VHCBD00, 6: Sản phẩm PCR mẫu VHCBD00, 7: Sản phẩm cắt mẫu VHCBD06, 8: Sản phẩm PCR mẫu VHCBD06.

Theo nhiều nghiên cứu trước đây, đa hình nucleotide đơn của AS3MT 14458 (rs11191439) liên quan mật thiết với sự methyl hóa. Theo Valenzuela ở Mexico thì tỷ

lệ IA [V] và MMA III + V] của 14458 (rs11191439) CT + CC cao hơn đáng kể so với những người có AS3MT 14458 (rs11191439) TT (Valenzuela et al. 2009). Theo phân tích ở Châu Âu thì AS3MT 14458 (rs11191439) là một trong những yếu tố chính có thể ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất arsenic. TC + CC có %MMA [V] cao và % DMA [V] thấp hơn so với các loại TT (Lindberg et al. 2007). xu hướng này rõ rệt ở nam hơn ở phụ nữ. Điều này cho thấy rằng AS3MT 14458 (rs11191439) CT + CC có khả năng chuyển hóa từ arsenic vô cơ thành MMA cao hơn AS3MT 14458 (rs11191439) TT (Agusa et al. 2011).

**Phân tích đa hình gen AS3MT5913 (rs4917986)**



Sản phẩm của phản ứng PCR nhân lên từ cặp mỗi I3 có kích thước 251 bp chứa diềm đa hình Nucleotide đơn 5913 của SNP

rs4917986 (hình 2A). Hình ảnh điện di trên gel agarose 1,5% có một băng rõ nét, chứng tỏ đã được nhân đặc hiệu.

Gen AS3MT chứa diềm đa hình tại vị trí 5913 thuộc Intron 3 mà tại đó base T của của thể hoang dại bị thay thế bởi base C (Agusa et al. 2009). Dựa vào trình tự cắt của enzyme hạn chế, kết quả 3 băng thu được từ sản phẩm cắt của hai mẫu máu đối chứng với kích thước các băng lần lượt khoảng 0,25 kb, 0,15 kb và 0,1 kb sẽ tương ứng với kiểu gen dị hợp tử TC, trong khi hai mẫu máu cuồng rón thu được 1 băng có kích thước khoảng 0,25 kb tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử TT (hình 2B).

AS3MT 5913 (rs4917986) có một mối tương quan với %MMA[V]. Theo nghiên

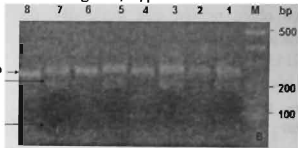
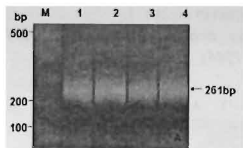
cứu với AS3MT 5913 (rs4917986), dị hợp tử TC có MMA[V]/IAS cao hơn đồng hợp tử TT, cho thấy rằng SNP này có thể liên quan đến quá trình methyl hóa của arsenic. Sự gia tăng %MMA trong nước tiểu liên quan đến nguy cơ ung thư đã được đề xuất trong nghiên cứu ở Mehico (Valenzuela et al. 2005), Acentina và Mỹ (Steinmaus et al. 2006), Đài Loan (Tseng 2007).

**Phân tích đa hình gen AS3MT4602 (rs7085104)**

Sản phẩm của phản ứng PCR nhân lên từ cặp môi Up có kích thước 261 bp chứa điểm đa hình Nucleotide đơn 4602 của SNP

rs7085104 (hình 3A). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% có một băng rõ nét, chứng tỏ đã được nhân đặc hiệu.

Tại vị trí 4602 trên gen AS3MT, base A của thể hoang dại có thể bị thay thế bởi base G. Tương tự như ở hai điểm đa hình trên, trình tự cắt của *MspI* phù hợp với trường hợp base G ở vị trí đa hình. Sản phẩm PCR từ cặp môi Up của cá mẫu máu đối chứng và mẫu máu cuồng rôn khi cắt bằng *MspI* thu được 3 băng có kích thước khoảng 0,26 kb, 0,2 kb và 0,61 kb sau khi điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 2% (hình 3B). Kết quả này tương ứng với kiểu gen dị hợp tử AG ở tất cả 4 mẫu.



**Hình 3.** A. Điện di sản phẩm PCR sử dụng môi Up trên gel agarose 1,5 %. M: Thang DNA chuẩn 100 bp, 1: DCH 9, 2: MBPA, 3: VHCBD00, 4: VHCBD06; B. Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp môi Up được cắt bằng enzyme hạn chế *MspI*. M: Thang DNA chuẩn 100bp. 1: Sản phẩm PCR mẫu DCH 9, 2: Sản phẩm cắt mẫu DCH 9, 3: Sản phẩm PCR mẫu MBPA, 4: Sản phẩm cắt mẫu MBPA. 5: Sản phẩm PCR mẫu VHCBD00, 6: Sản phẩm cắt mẫu VHCBD00, 7: Sản phẩm PCR mẫu VHCBD06, 8: Sản phẩm cắt mẫu VHCBD06.

Theo Valenzuela và cộng sự (2009), biến thể AS3MT 4602 (rs7085104) không liên quan tới nguy cơ tổn thương da. Tuy nhiên, đa hình AS3MT 4602 (rs7085104) có liên quan tới sự khác biệt tỷ lệ DMAs/MAs trong nước tiểu. AS3MT 4602 (rs7085104) GG (alen G) có tỷ lệ % MMA[III+V] thấp hơn, nhưng % DMA[III+V] và DMA[III+V]/MMA[III+V]

cao hơn so với AS3MT 4602 (rs7085104) AA + AG (alen A). Cho nên alen G có khả năng methyl hóa từ MMA sang DMA cao hơn so với alen A (AA + AG) và có sự liên quan giữa AS3MT 4602 (rs7085104) với quá trình trao đổi chất của arsenic vô cơ (Valenzuela et al. 2009).

**IV. KẾT LUẬN:**

Các đoạn gen chứa 3 SNP 4602, 5913 và 14458 của AS3MT đã được khuếch đại một cách đặc hiệu với các độ dài tương ứng là 261, 251, và 233 bp. Sự đa hình gen AS3MT của các SNP trên cũng đã được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP nhờ các enzyme hạn chế. Không có sự khác biệt về kiểu gen giữa các mẫu đối chứng và các mẫu bệnh ở SNP 14458 và 4602 trong nghiên cứu này. Đồng hợp tử TT được tìm thấy ở SNP 14458 và dị hợp tử AG được tìm thấy ở SNP 4602.

Đối với SNP 5913, kiểu gen dị hợp tử TC xuất hiện ở mẫu đối chứng và đồng hợp tử TT xuất hiện ở mẫu bệnh. Quy trình phân tích kiểu gen của các SNP đã được hoàn thiện và là bước đầu cho những nghiên cứu biến đổi đa hình gen AS3MT để xác định tần suất xuất hiện của các alen.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Agusa T, Fujihara J, Takeshita H, Iwata H. 2011. Individual Variations in Inorganic Arsenic Metabolism Associated with AS3MT Genetic Polymorphisms. *Int J Mol Sci* 12: 2351-2382.
2. Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Tanabe S. 2009. Genetic polymorphisms in AS3MT and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol* 236: 131-141.
3. Lindberg AL, Kumar R, Goessler W, Thirumaran R, Gurzau E, Koppova K, Rudnai P, Leonardi G, Fletcher T, Vahter M. 2007. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ Health Perspect* 115: 1081-1086.
4. Steinmaus C, et al. 2006. Arsenic methylation and bladder cancer risk in case-control studies in Argentina and the United States. *J Occup Environ Med* 48: 478-488.
5. Tseng CH. 2007. Metabolism of inorganic arsenic and non-cancerous health hazards associated with chronic exposure in humans. *J Environ Biol* 28: 349-357.
6. Vahter M. 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol Lett* 112-113: 209-217.
7. Valenzuela OL, Borja-Aburto VH, Garcia-Vargas GG, Cruz-Gonzalez MB, Garcia-Montalvo EA, Calderon-Aranda ES, Del Razo LM. 2005. Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 113: 250-254.
8. Valenzuela OL, Drobna Z, Hernandez-Castellanos E, Sanchez-Pena LC, Garcia-Vargas GG, Borja-Aburto VH, Styblo M, Del Razo LM. 2009. Association of AS3MT polymorphisms and the risk of premalignant arsenic skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol* 239: 200-207.