

4. Trần Thị Ngọc Uyên, Nguyễn Khắc Nam, Trần Hữu Dũng (2018), “Điều chế và xác định các đặc tính lý hóa của tinh bột mì acetate định hướng dùng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường”, *Tạp chí Y Dược học*, Trường Đại học Y Dược Huế, số 5 (8), tr. 78-84

5. Hariri N., Thibault L., (2010), ‘High-fat diet-induced obesity in animal models’, *Nutrition Research Reviews*, 23 (02), pp. 270–299.

6. Furman, B. L. (2015), “Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats”, *Current Protocols in Pharmacology*, 47, pp. 1-20.

7. Bray G. A. & Popkin B. M. (1998), “Dietary fat intake does affect obesity”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 68 (6), pp. 1157–1173.

8. Frederich R. C., Hamann A., Anderson S., et al. (1995), “Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action”, *Nat. Med.*, 1 (12), pp. 1311–1314.

9. Chattopadhyay S., Ramanathan M., Das J. & Bhattacharya S. K. (1997), “Animal models in experimental diabetes mellitus”, *Indian J. Experimental Biology*, 35 (11), pp. 1141-1145.

10. Sachin Arora, Shreesh Kumar Ojha & Divya Vohora (2009), “Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice”, *Global Journal of Pharmacology*, 3 (2), pp. 81-84.

11. Cichoke, A. J. (1998), “The complete book of enzyme therapy”, *New York: Penguin Putnam Inc*, pp. 10–16

12. Shimotoyodome A, Fukuoka D (2009), “RS4-type resistant starch prevents high-fat diet-induced obesity via increased hepatic fatty acid oxidation and decreased postprandial GIP in C57BL/6J mice”, *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*, 298, pp. E652–E662.

(Ngày nhận bài: 09/7/2020 - Ngày phản biện: 19/8/2020 - Ngày duyệt đăng: 23/9/2020)

## Quy trình giải trình tự gen HLA-A bằng phương pháp Sanger

Phạm Trần Thu Hà<sup>1</sup>, Trần Quang Bình<sup>2</sup>  
Nguyễn Hải Hà<sup>3</sup>, Phùng Thanh Hương<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Dược Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Dinh dưỡng Quốc gia

<sup>3</sup> Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\* Email: huongpt@hup.edu.vn

### Summary

*The HLA-A gene belongs to the superfamily of HLA (Human Leukocyte Antigen) genes, coding the Major histocompatibility complex which plays an important role in human immune system. There have been various reports on the associations of HLA-A polymorphic alleles and the danger of severe adverse drug reactions (ADRs). Genetic testing of HLA genes has been used as pharmacogenetic markers for ADR minimization. This study aimed to establish a simple sequencing protocol for genotyping the HLA-A locus. The protocol with a PCR reaction using 2 primers and a sequencing reaction using 2 primers could identify effectively the genotypes of control samples. This newly established sequencing protocol required less primers, less template DNA than those published previously. The protocol can be applied in Vietnam for genotyping HLA-A gene in personalized medicines.*

**Key words:** HLA-A, sequencing, Sanger.

### Đặt vấn đề

HLA (Human Leukocyte Antigen) là một siêu họ gen nằm trên nhiễm sắc thể số 6 của người, mã hóa cho phức hợp hòa hợp tổ chức, đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của hệ miễn dịch. Gen HLA được chia thành 3 lớp, trong đó, HLA lớp I (gồm 3 type A, B, C) liên quan nhiều nhất đến các phản ứng thuốc trong cơ thể. Nhiều alen biến thể khác nhau của gen HLA lớp I đã được phát hiện có liên quan

tới phản ứng có hại (ADR) của nhiều thuốc khác nhau. Trong số đó, alen HLA-A\*3303 được báo cáo có liên quan tới ADR của nhiều thuốc, thể hiện ở chỉ số odd ratios (OR) rất cao, cho thấy những cá thể mang alen này có nguy cơ gặp phản ứng có hại với một vài thuốc cụ thể cao gấp nhiều lần so với những cá thể không mang alen này. Ví dụ như phản ứng có hại nghiêm trọng trên da (SCAR) khi dùng allopurinol điều trị tăng acid uric máu ở người Hàn Quốc,

(OR = 20,5, p = 3,31×10<sup>-6</sup>) [8], người Đài Loan (OR = 7,3, p = 4,7×10<sup>-2</sup>) [6] và người Trung Quốc (OR = 12,0, p < 0,001) [13]; SCAR khi dùng strontium ranelat để điều trị loãng xương ở người Hàn Quốc (OR = 19,4, p = 0,006) [10].

Một phân tích meta cũng cho thấy mối liên quan giữa alen HLA-A\*3303 với nguy cơ các phản ứng đặc biệt nghiêm trọng như hội chứng Steven Johnson (SJS), hội chứng hoại tử biểu bì nhiễm độc (TEN) khi dùng các thuốc cảm cúm thông thường như những thuốc chống viêm phi steroid (NSAIDs) và những thuốc phối hợp nhiều thành phần để điều trị triệu chứng cảm cúm (OR = 2,28; 95% CI = 1,31–3,97) [12]. Ngoài ra, đã có báo cáo về mối liên quan giữa alen HLA-A\*3303 với độc tính trên gan mật khi dùng ticlopidine chống kết tập tiểu cầu (OR = 36,50, p = 7,32×10<sup>-7</sup>) [6]. Bên cạnh đó, một số alen HLA-A khác cũng đã được báo cáo là mối nguy cơ gây SCAR khi dùng thuốc. Ví dụ như HLA-A\*3101, liên quan đến nguy cơ SCAR khi dùng carbamazepin.

Do vậy, việc làm xét nghiệm các gen HLA nói chung và xét nghiệm gen HLA-A nói riêng, nhằm giúp phát hiện những người có nguy cơ có phản ứng không mong muốn khi dùng thuốc để có những điều chỉnh phù hợp trong phác đồ điều trị đã và đang trở thành một mối quan tâm của không chỉ các nhà nghiên cứu mà cả các cán bộ y tế. Tiêu chuẩn vàng trong xét nghiệm gen hiện nay vẫn là các phương pháp giải trình tự gen, bao gồm giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) với nhiều ưu điểm về hiệu suất, độ chính xác nhưng chi phí rất cao và khó sử dụng trong các dự án nghiên cứu lớn. Cho đến nay, trên thế giới có rất ít công bố về quy trình giải trình tự gen HLA-A do gen này có tính đa hình cao, với 2803 đa hình đơn nucleotid (SNP) đã được phát hiện theo số liệu cập nhật đến tháng 8 năm 2020 của cơ sở dữ liệu Genecards (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-A#snp>). Một số quy trình giải trình tự gen HLA-A theo phương pháp Sanger đã công bố đều sử dụng nhiều mẫu, đi kèm với quy trình thao tác phức tạp, đòi hỏi nhiều thời gian và chi phí vật tư, hóa chất. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm mục tiêu xây dựng một quy trình giải trình tự gen HLA-A đơn giản, chỉ sử dụng 2 mẫu PCR và 2 mẫu cho phản ứng giải trình tự.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### **Mẫu nghiên cứu**

Các mẫu sử dụng trong nghiên cứu là máu toàn phần của người Việt Nam khỏe mạnh trong cộng đồng được thu thập tại 3 miền Bắc, Trung, Nam.

Các đối tượng nghiên cứu được lựa chọn dựa trên tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ trong đề tài KHCN cấp Bộ của Bộ Y tế số 4694/QĐ-BYT [1]. Thu 03 ml máu toàn phần tĩnh mạch vào ống nghiệm tráng EDTA. Mẫu máu được bảo quản ở -20°C.

Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng Đạo đức Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (QĐ số IRB-VN01057-6/2018).

### **Phương pháp nghiên cứu**

#### **Phương pháp tách chiết ADN**

ADN tổng số được tách từ máu toàn phần bằng bộ kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek, Atlanta, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. Số lượng và chất lượng ADN được kiểm tra bằng phương pháp đo quang phổ với thiết bị Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, USA).

#### **Phương pháp giải trình tự gen HLA-A**

*Bước 1: PCR vùng exon 2 – exon 3 của gen HLA-A [11]*

Từ cặp mồi APCRF và APCRR đã được Peterson và CS. công bố [11], chúng tôi kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi bằng phần mềm Blast primer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kết hợp với kết quả so sánh trình tự của 21 alen HLA-A đã được phát hiện trong cộng đồng người Kinh Việt Nam [4]. Kết quả Blast primer cho thấy cặp mồi APCRF/APCRR không đặc hiệu với gen HLA-A, và có thể khuếch đại cả gen HLA-C, HLA-G. Vì vậy, chúng tôi biến đổi mồi xuôi APCRF và thiết kế mồi ngược mới nhằm tăng tính đặc hiệu của cặp mồi khuếch đại vùng exon 2 -3. Cặp mồi mới thiết kế được ký hiệu là HLAAB1F/ HLAAB1R. Kết quả Blast primer của cặp mồi HLAAB1F/ HLAAB1R đặc hiệu với gen HLA-A. Sau đó, chúng tôi tiến hành khảo sát các thông số chu trình nhiệt cho cặp mồi HLAAB1F/ HLAAB1R và thu được chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 3 phút; tiếp theo là 40 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 63°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút. Thành phần phản ứng PCR gồm có: Nước không nuclease 7,5 µl, PCR Master mix (2x) (10,0 µl), mồi HLAAB1F (0,75 µl), mồi HLAAB1R (0,75 µl), ADN khuôn nồng độ 20 ng/ µl (1,0 µl).

*Bước 2: Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng cho phản ứng giải trình tự*

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) trước khi tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Sử dụng 2 mồi ngược HLAAB1R/ HLAAB2R để giải trình tự vùng exon 2 – 3 của gen HLA-A. Trong đó mồi

HLAAB1R là mồi ngược đã sử dụng để PCR ở bước 1; mỗi HLAIn2R được biến đổi từ mỗi ASEQ3R do Peterson đã công bố [11]. Sử dụng BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) với máy giải trình tự ABI™ 3500 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA).

### Phân tích dữ liệu

Dữ liệu giải trình tự thu được xử lý bằng phần mềm Bioedit 7.0.5.3. Cơ sở dữ liệu tải từ cơ sở dữ liệu IMTG/HLA Database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>).

Sử dụng công cụ Clustal W Multialign của phần mềm Bioedit để so sánh trình tự thu được với trình tự của các alen HLA-A chuẩn từ cơ sở dữ liệu <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>

### Kết quả và bàn luận

#### Thiết kế mồi và xây dựng quy trình khuếch đại vùng exon 2 – exon 3 của gen HLA-A

Cho đến nay, trên thế giới mới chỉ có 3 công bố về quy trình giải trình tự gen HLA-A. Ở bước 1, các tác giả đều sử dụng 2 mồi để khuếch đại vùng exon 2 – exon 3 của gen HLA-A [3, 7, 11]. Peterson và CS.

đã sử dụng 2 mồi để khuếch đại gen HLA-A bao gồm mỗi APCRF thuộc vùng intron 1, mỗi APCRR thuộc vùng intron 3 [11]. Tuy nhiên, sau khi kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mồi bằng phần mềm Blast primer cho thấy, các mồi này đều có Tm cao và có khả năng khuếch đại không đặc hiệu với các gen HLA-C, HLA-G. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành chỉnh sửa và thiết kế mồi như sau:

- Mồi HLAAB1F được biến đổi từ mồi APCRF bằng cách bỏ 4 nucleotid ở đầu 5' (GAAA) và bỏ 1 nucleotid A đầu 3' để giảm nhiệt độ Tm của mồi, đồng thời tăng độ đặc hiệu với gen HLA-A bằng cách thêm 1 mismatch tại vị trí nucleotid thứ 3 từ dưới lên kể từ đầu 3' (sử dụng phần mềm Batch primer3 v1.0 <https://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3/>)

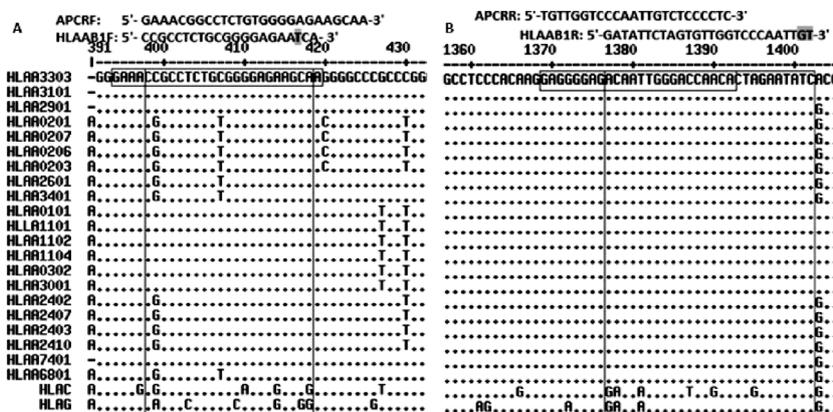
- Mồi HLAAB1R được thiết kế mới với đầu 3' gắn bổ sung với 2 SNP liên tiếp tại vị trí nucleotid 1377-1378 (AC) trên ADN của gen HLA-A để tăng tính đặc hiệu, phân biệt với các gen HLA-C, HLA-G.

Sự khác biệt giữa các mồi và hiệu quả gắn mồi vào trình tự gen mục tiêu được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

**Bảng 1.** So sánh trình tự các mồi biến đổi và mồi do Peterson đã công bố

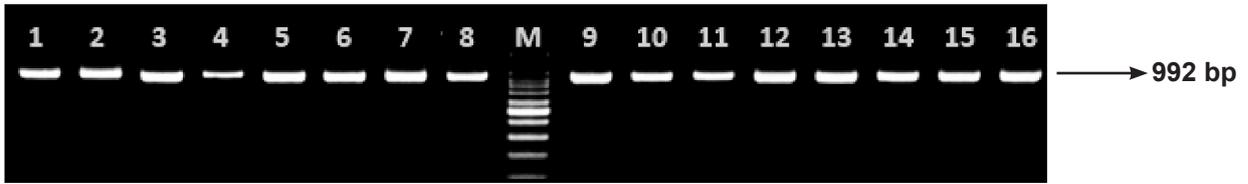
STT	Ký hiệu mồi	Trình tự mồi (chiều 5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR	Vị trí mồi	Tm
<i>Cặp mồi Peterson và cộng sự đã công bố</i>					
1	APCRF	GAAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCAA	984bp	Intron 1	82
2	APCRR	TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCTC		Intron 3	74
3	ASEQ3R	ATCTCGGACCCGAGACTGTG		Intron 2	68
4	ASEQ3F	GGTTTCATTTTCAGTTAGGCCA		Intron 2	64
<i>Cặp mồi biến đổi để tăng độ đặc hiệu với các alen HLA-A</i>					
5	HLAAB1F	CCGCCTCTGCGGGAGAATCA	992 bp	Intron 1	70
6	HLAAB1R	GATATTCTAGTGTGGTCCCAATTGT		Intron 3	72
7	HLAIn2R	ATCTCGGACCCGAGACTGT		Intron 2	64

(Phần trình tự giống nhau giữa các mồi được thay bằng chữ in đậm)



**Hình 1.** So sánh cặp mồi APCRF/APCRR và HLAAB1F/HLAAB1R

A. So sánh mồi xuôi APCRF và HLAAB1F. So với mồi APCRF, mồi HLAAB1F lược bỏ 4 nucleotid đầu 5', 1 nucleotid cuối cùng đầu 3' và bổ sung thêm 1 mismatch (thay G bằng T - tô đậm màu xám); B. So sánh mồi ngược APCRR và HLAAB1R. So với mồi APCRR, mồi HLAAB1R được thiết kế mới, có hai nucleotid liên tiếp tại đầu 3' (GT - tô đậm màu xám) không bắt cặp bổ sung với trình tự ADN của gen HLA-C và HLA-G.



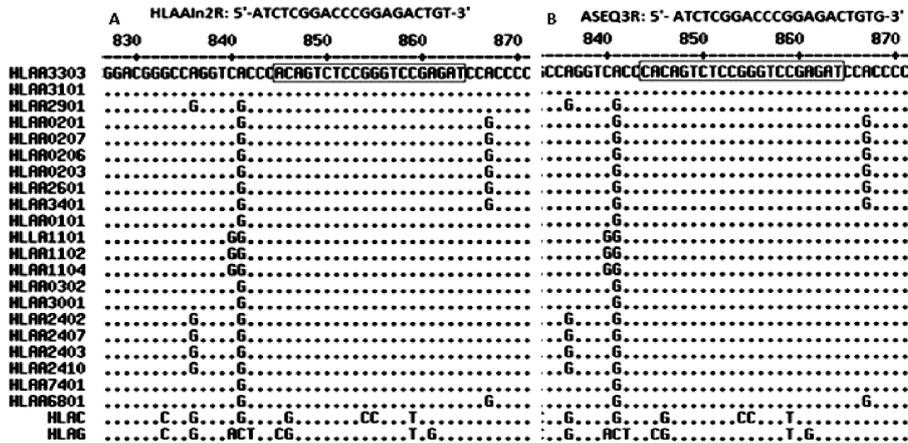
Hình 2. Kết quả điện di của 16 mẫu với cặp mồi HLAAB1F và HLAAB1R

Kết quả Blast primer cặp mồi HLAAB1F/HLAAB1R do chúng tôi thiết kế đặc hiệu với gen *HLA-A* và được kiểm chứng trên thực nghiệm là kết quả điện di sản phẩm PCR kích thước 992 bp như dự đoán khi thiết kế mồi (hình 2). Sản phẩm PCR kích thước 992 bp có thể được dùng cho phản ứng giải trình tự sau khi tinh sạch.

**Thiết kế mồi và xây dựng quy trình cho phản ứng giải trình tự**

Để giải trình tự vùng exon 3, mồi ngược HLAAB1R

đặt tại vùng intron 3 tiếp tục được sử dụng cho bước giải trình tự động bằng hệ thống ABI™ 3500 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA). Mặt khác, để giải trình tự của vùng exon 2, chúng tôi sử dụng thêm mồi ngược HLAAln2R đặt tại vùng intron 2. Mồi ngược HLAAln2R được thiết kế trên cơ sở chỉnh sửa mồi ASEQ3R do Peterson và cs. đã công bố bằng cách bỏ 1 nucleotid G đầu 3'. Sự khác biệt giữa hai mồi và hiệu quả gắn mồi vào trình tự gen mục tiêu được thể hiện ở bảng 1 và hình 3.

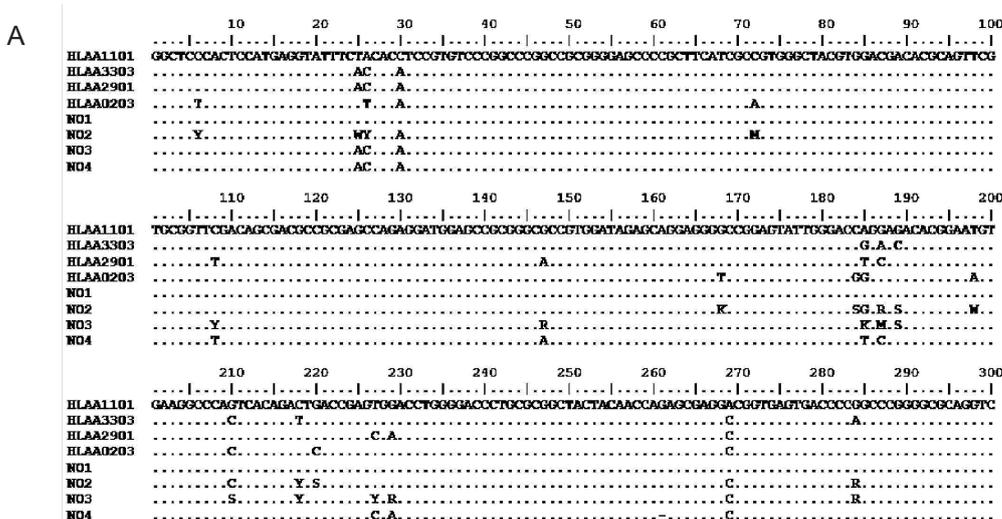


Hình 3. So sánh trình tự và vị trí gắn vào trình tự mục tiêu của 2 mồi HLAAln2R và ASEQ3R

Mồi HLAAln2R biến đổi từ mồi ASEQ3R bằng cách bỏ 1 nucleotid G cuối cùng đầu 3' để giảm Tm và tăng tính đặc hiệu với các alen HLA-A

Chúng tôi đã áp dụng quy trình giải trình tự mới chỉ gồm 2 mồi HLAB1R và HLAAln2R để giải trình tự 4 mẫu ngẫu nhiên được thu theo phương pháp mô

tả ở phần Mẫu nghiên cứu (N01, N02, N03, N04). Kết quả thể hiện ở hình 4.





3. Dunn P. P. et al. (2003), "Sequencing protocols for detection of HLA class I polymorphism", *Methods Mol. Biol.*, 210: 191-222
4. Hoa B. K. et al. (2007), "HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam", *Tissue Antigens*, 71, 127-134.
5. Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, et al. (2008), "Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study", *The Pharmacogenomics Journal*, 8(1): 29-33.
6. Hung S-I, Chung W-H, Liou L-B, Chu C-C, Lin M, Huang H-P, et al. (2005), "HLA-B\*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(11): 4134-4139.
7. Ka, S., Lee, S., Hong, J. et al. (2017), "HLAScan: genotyping of the HLA region using next-generation sequencing data", *BMC Bioinformatics*, 18, 258
8. Kang H. R., Jee Y. K., Kim Y. S., et al. (2011), "Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans", *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(5): 303-307.
9. Lazaro A. et al. (2013), "Human leukocyte antigen (HLA) typing by dna sequencing", *Methods Mol. Biol.*, 1034: 161-195
10. Lee H. Y., Shen M. X., Lim Y. L., Tay Y. K., Chan M. M., Pang S. M., et al. (2016), *Increased risk of strontium ranelate-related SJS/TEN is associated with HLA. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 27(8) : 2577-2583.
11. Peterson T. A. et al (2014), "Diversity and frequencies of hla class i and class ii genes of an east african population", *Open Journal of Genetics*, Volume 4, Issue 2, pp. 99-124.
12. Tangamornsuksan W., Chanprasert S., Nadee P., Rungruang S., Meesilsat N., Ueta M., et al. (2020), "HLA genotypes and cold medicine-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis with severe ocular complications: a systematic review and meta-analysis", *Sci. Rep.*, 10(1): 10589.
13. Wu X., Yang F., Chen S., Xiong H., Zhu Q., Gao X., et al. (2018), "Clinical, viral and genetic characteristics of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (dress) in Shanghai, China", *Acta Dermato-venereologica*, 98(4): 401-405.

(Ngày nhận bài: 16/8/2020 - Ngày phản biện: 07/9/2020 - Ngày duyệt đăng: 23/9/2020)

# Nghiên cứu ứng dụng phương pháp LC- MS/MS phân tích đồng thời dư lượng một số hóa chất bảo vệ thực vật nhóm cúc tổng hợp sử dụng phổ biến trong rau ăn lá, quả

**Khuru Hồng Giang, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ\***

*LBM. HPT-KNT-ĐC, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ*

*\*E-mail: dcmvtho@ctump.edu.vn*

## Summary

A high specificity, sensitivity and reliable reversed-phase LC-MS-MS method was successfully developed for simultaneous determination of cyhalothrin (CYHA), cypermethrin (CYPER), permethrin (PER), deltamethrin (DELTA), cyfluthrin (CYFLU) in real vegetable samples with the following optimized conditions: column Agilent Poroshell 120 Phenyl - Hexyl (150 mm x 4.6 mm x 2.7  $\mu$ m), the isocratic mode of mobile phases including MeOH - CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 5 mM in water (99 : 1); the flow rate 0.7 ml/min; sample injection volume 10  $\mu$ l; Electrospray ionization source was operated in positive mode and multi reaction monitoring (MRM) mode using the transition of m/z 523.02  $\rightarrow$  281, m/z 467.3  $\rightarrow$  225, m/z 435.2  $\rightarrow$  193, m/z 416  $\rightarrow$  191, m/z 393.3  $\rightarrow$  281 were used to quantify CYHA, CYPER, PER, DELTA and CYFLU, respectively. This method was validated basing on EC-657/2002 guideline to meet all the requirements of wide linearity range of 0.5-150 ppb, high correlation coefficients ( $R^2 > 0.997$ ), very good accuracy (recovery rate 85-105.1%) and intermediate precision (RSD% < 8%), typical LOD, LOQ values of 0.005-0.5 ppb and 0.015- 0.15 ppb for five pyrethroid pesticides. The validated method was used in a 54 real samples survey. The results revealed that 36 vegetable samples (66.67%) contain target pesticide residues below MRLs. Particularly, M.07, M.14 and M.23 samples found permethrin in high levels 1.97, 2.76, 3.6 ppm, respectively, higher the Vietnam Ministry of Health s MRLs.

**Keywords:** Cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, QuEChERS, recovery.