

Nghiên cứu

Thiết lập quy trình PCR đặc hiệu allele để xác định đa hình -819T>C (rs1800871) của gene *IL10*

Hà Thị Minh Thi^{1,2,3,*}, Nguyễn Thị Mai Ngân^{1,3}, Đinh Hồng Kim Cương^{2,3}, Lê Thị Thanh Nhân⁴

¹Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

²Viện Y sinh học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

³Trung tâm Sàng lọc - Chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

⁴Sinh viên ngành Kỹ thuật xét nghiệm Y học, khóa 2021 - 2025, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: Hà Thị Minh Thi; Email: htmthi@huemed-univ.edu.vn, htmthi@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài (Received): 11/10/2025; Ngày duyệt đăng (Accepted): 01/04/2026; Ngày xuất bản (Published): 28/06/2026

DOI:10.34071/jmp.2026.3.736

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene *IL10* có liên quan đến nhiều bệnh lý khác nhau, bao gồm sẩy thai, ung thư, đột quỵ, loãng xương...

Mục tiêu: (1) Thiết lập quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele với cặp mồi tự thiết kế để xác định đa hình -819T>C của gene *IL10* (rs1800871); (2) Khảo sát sự phân bố các kiểu gene và allele của đa hình *IL10* rs1800871 ở nhóm người tình nguyện khỏe mạnh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Dựa vào trình tự đoạn gene *IL10* có chứa đa hình rs1800871, thiết kế mồi xuôi có nucleotide đầu 3' là T và C lần lượt tương ứng cho hai allele của đa hình rs1800871. Kết hợp phần mềm trực tuyến PrimerDigital để thiết kế mồi ngược. Các mẫu chứng dương được xác định dựa vào giải trình tự Sanger. Thiết lập các điều kiện PCR và áp dụng cho 100 người tình nguyện, có sức khỏe bình thường, gồm 33 nam và 67 nữ.

Kết quả: Thiết lập thành công quy trình PCR đặc hiệu allele để xác định đa hình -819T>C (rs1800871) của gene *IL10*. Tỷ lệ kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC lần lượt là 52%, 42% và 6%, tỷ lệ allele -819T và -819C lần lượt là 73% và 27%.

Kết luận: Đã thiết lập thành công kỹ thuật PCR đặc hiệu allele để xác định đa hình -819T>C trên gene *IL10*. Bước đầu xác định được tỷ lệ các kiểu gene và allele tại vị trí đa hình -819T>C ở nhóm người tình nguyện khỏe mạnh.

Từ khóa: rs1800871; gene *IL10*; đa hình -819T>C; PCR đặc hiệu allele, giải trình tự Sanger.

Development of an allele-specific PCR assay for identifying the *IL10* gene -819T>C (rs1800871) polymorphism

Ha Thi Minh Thi^{1,2,3,*}, Nguyen Thi Mai Ngan^{1,3}, Dinh Hong Kim Cuong^{2,3}, Le Thi Thanh Nhan⁴

¹Department of Medical Genetics, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Institute of Biomedicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

³Prenatal and Newborn Screening and Diagnosis Center, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

⁴Medical Laboratory Technology Student, Class of 2021 - 2025, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: The *IL10* gene -819T>C (rs1800871) polymorphism has been associated with various diseases, including miscarriage, cancer, stroke, and osteoporosis...

Objectives: (1) To develop an allele-specific PCR assay using a self-designed primer pair to identify the *IL10* gene -819T>C polymorphism (rs1800871), and (2) To investigate the genotype and allele distribution of *IL10* gene rs1800871 polymorphism in healthy volunteers.

Materials and Methods: Based on the *IL10* gene sequence containing the rs1800871 polymorphism, two forward primers were designed with the 3'-terminal nucleotides corresponding to either the T or C allele of the polymorphism. The reverse primer was designed using PrimerDigital, an online software. Positive control samples were identified using Sanger sequencing. PCR settings were optimized and applied to identify the *IL10* rs1800871 polymorphism in 100 healthy volunteers including 67 women and 33 men.

Results: An allele-specific PCR procedure was successfully developed to identify the *IL10* -819T>C (rs1800871) polymorphism. The genotype frequencies of -819TT, -819TC, and -819CC were 52%, 42%, and 6%, respectively. The -819T and -819C alleles had frequencies of 73% and 27%, respectively.

Conclusion: We successfully developed an allele-specific PCR approach for detecting the *IL10* -819T>C

polymorphism. We determined the genotype and allele frequencies of the -819T>C polymorphism in healthy volunteers.

Keywords: *rs1800871; IL10 gene; -819T>C polymorphism; allele-specific PCR; Sanger sequencing.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Interleukin 10 (IL-10) là một cytokine kháng viêm, có tính điều hoà giúp bảo vệ cơ thể tránh những đáp ứng quá mức với tác nhân gây bệnh và vi sinh vật, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong các trường hợp khác như chữa lành vết thương vô trùng, tự miễn, ung thư và cân bằng nội môi. IL-10 được tạo ra bởi các tế bào Th2, tế bào T CD4 và CD8 và các tế bào miễn dịch khác như đại thực bào, tế bào đơn nhân... [1]. IL-10 được mã hoá bởi gene *IL10* nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể 1 (1q32.2). Các đa hình đơn nucleotide (Single nucleotide polymorphism: SNP) thuộc vùng khởi động của gene *IL10*, bao gồm -1082A>G, -819T>C, -592C>A, cũng được cho rằng có ảnh hưởng mức độ sản xuất cytokine và liên quan với cơ chế bệnh sinh của nhiều bệnh lý khác nhau [9]. Nhiều nghiên cứu cho thấy đa hình -819T>C (rs1800871) có liên quan đến một số bệnh lý, đặc biệt là ở người châu Á, như sẩy thai [2], ung thư đại trực tràng [3], đột quỵ [4], loãng xương [5]...

Về phương diện di truyền, tần suất allele tại các vị trí đa hình thay đổi rất lớn giữa các quần thể và chủng tộc khác nhau. Hiện nay, theo cơ sở dữ liệu về SNP (dbSNP) của Trung tâm quốc gia Hoa Kỳ về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI), tần suất các allele chính của đa hình rs1800871 là A và G (tương ứng với T và C nếu sử dụng tên gọi -819T>C, do gene *IL10* là gene ngược chiều trên genome) ở người châu Âu lần lượt là 26,3% và 73,7%; trong khi đó tần suất này ở châu Phi là 40,6% và 59,4%; ở châu Mỹ là 37,5% và 62,5%. Đáng lưu ý, tần suất các allele ở châu Á có sự đảo ngược, cụ thể là 68,2% và 31,8%, tần suất này tính riêng ở nhóm Đông Á là 70,6% và 29,4%.

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào ở Việt Nam về tần suất đa hình -819T>C của gene *IL10* cũng như mối liên quan của đa hình này với các bệnh lý. Hiện nay, để xác định các đa hình đơn nucleotide có thể sử dụng các kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) như PCR đặc hiệu allele (allele-specific PCR), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), real-time PCR, hoặc kỹ thuật giải trình tự Sanger. Trong đó, các kỹ thuật PCR đặc hiệu allele là tương đối đơn giản, giá thành thấp, dễ thực hiện thường quy cho các phòng xét nghiệm sinh học phân tử cơ bản. Để tạo cơ sở cho các nghiên cứu về mối liên quan của đa hình *IL10* -819T>C (rs1800871) với một số bệnh lý, việc thiết lập một quy trình PCR

đặc hiệu allele để xác định đa hình này là hết sức cần thiết. Đề tài này nhằm hai mục tiêu sau:

1. Thiết lập quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele với các mẫu tự thiết kế để xác định đa hình -819T>C của gene *IL10* (rs1800871).

2. Khảo sát sự phân bố các kiểu gene và allele của đa hình *IL10* rs1800871 ở nhóm người tình nguyện khoẻ mạnh.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 100 mẫu DNA được tách chiết từ 100 người tình nguyện được khám sức khoẻ tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế trong thời gian từ tháng 6/2024 đến tháng 3/2025.

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn mẫu

- Là những người Việt Nam, dân tộc Kinh, đến khám sức khoẻ hoặc khám thai định kỳ tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế.

- Đồng ý xét nghiệm xác định đa hình từ DNA được tách chiết từ máu ngoại vi.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Có bệnh lý kèm theo như tăng huyết áp, đái tháo đường, loãng xương, ung thư...

- Có tiền sử bản thân và/hoặc gia đình có bất thường di truyền.

- Đối với phụ nữ:

+ Có con dị tật bẩm sinh, hoặc chậm phát triển tâm thần, hoặc bệnh lý di truyền khác và/hoặc đang mang thai có kết quả siêu âm thai bất thường.

+ Có tiền sử sản khoa bất thường.

- DNA tách chiết từ mẫu máu không đảm bảo về nồng độ và độ tinh sạch để thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1: Thực hiện thí nghiệm tại labo.

Mục tiêu 2: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.2.2. Các bước thực hiện

Bước 1: Chọn mẫu nghiên cứu

- Thu thập thông tin: Tuổi, giới

- Lấy mẫu bệnh phẩm: Lấy 2 ml máu tĩnh mạch ngoại vi cho vào ống chống đông EDTA và bảo quản ở 4 - 8°C.

Bước 2: Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA từ mẫu máu ngoại vi theo protocol của bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification (ThermoScientific, Lithuania).

- Đo nồng độ DNA và kiểm tra chất lượng tinh sạch bằng máy quang phổ kế DS-11 (DeNovix Inc, Hoa Kỳ). Mẫu DNA đạt yêu cầu khi có độ tinh sạch cao (tỷ số A260/280 đạt 1,8 - 2,0). Pha loãng DNA đến nồng độ 50 ng/μl. Bảo quản mẫu DNA ở -20°C.

Bước 3: Tạo các mẫu chứng dương có kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC

- Một số mẫu được chọn ngẫu nhiên để khuếch đại với cặp mồi của Wang (2012) có trình tự như sau [6]:

DT20-F: 5'-CTCGCCGCAACCACTGGC-3'

DT20-R: 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT-3'

- Thành phần phản ứng 50 μl, gồm 25 μl GoTaq Green Master Mix (2X), 2 μl mỗi mồi (10 pmol/μl), 2 μl DNA khuôn mẫu (50 ng/μl), 19 μl nước cất.

- Điều kiện nhiệt độ:

+ Biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút;

+ Sau đó thực hiện 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm:

biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi 60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

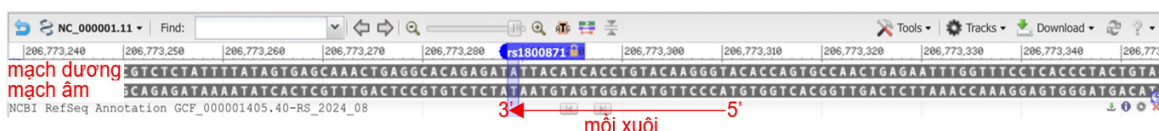
+ Kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút.

- Điện di 10 μl sản phẩm để kiểm tra sản phẩm, sau đó gửi giải trình tự Sanger ở Công ty Apical Scientific (Malaysia).

- Dựa vào kết quả giải trình tự, chọn các mẫu có kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC để làm mẫu chứng cho quá trình chuẩn hoá quy trình PCR đặc hiệu allele.

Bước 4: Thiết kế mồi cho phản ứng PCR đặc hiệu allele

- Xác định vị trí đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene *IL10*: Truy cập vào cơ sở dữ liệu dbSNP của NCBI, xác định được đa hình rs1800871 là nucleotide ở vị trí thứ 206.773.289 trên genome theo phiên bản GRCh38.p14 (NC_000001.11). Vị trí đa hình là nucleotide A trên mạch dương, tương ứng nucleotide T trên mạch âm (Hình 1).



Hình 1. Trình tự gene *IL10* chứa đa hình rs1800871 (-819T>C) theo cơ sở dữ liệu dbSNP

- Mồi xuôi 1 (đặc hiệu allele T): được thiết kế là trình tự 22 nucleotide trên mạch âm với đầu 3' là vị trí đa hình (T), đảm bảo tỷ lệ % của (G + C) nằm trong giới hạn 40 - 60%, các nucleotide lặp lại liên tiếp không quá 4. Ngoài ra, chúng tôi đổi nucleotide A ở vị trí thứ ba tính từ đầu 3' -> 5' thành G để tăng khả năng phân biệt hai allele T và C của đa hình -819T>C trong quá trình khuếch đại, theo khuyến cáo của Liu [7]. Trình tự mồi xuôi 1 là:

F-819T: 5'-ACCCTTGATACAGGTGATGTGAT-3'

- Mồi xuôi 2 (đặc hiệu allele C): được thiết kế từ mồi xuôi 1, trong đó thay T ở đầu 3' thành C. Trình tự mồi xuôi 2 là:

F-819C: 5'-ACCCTTGATACAGGTGATGTGAC-3'

- Mồi ngược: được thiết kế bằng cách sử dụng công cụ thiết kế mồi trực tuyến PrimerDigital (<https://primerdigital.com/tools/pcr.html>).

+ Nhập trình tự đoạn gene *IL10* từ vùng mồi xuôi về phía 3' (trên mạch âm) dài 700 bp vào ô trình tự đích (Target sequence) trên giao diện của phần mềm.

+ Đánh dấu vùng mồi xuôi đã thiết kế bằng các dấu ngoặc vuông [].

+ Thiết lập các thông số cơ bản, bao gồm:

. Kích thước mồi: 20 - 25 bp

. Nhiệt độ nóng chảy (Tm) của mồi: 58 - 62°C.

. Kích thước sản phẩm PCR: 300 - 500 bp.

+ Sau khi chạy chương trình, chúng tôi chọn được mồi ngược là:

R-819: 5'-GGGATGAATACCAAGACTTC-3'

+ BLAST các trình tự mồi bằng công cụ Primer-BLAST để kiểm tra tính đặc hiệu và sản phẩm PCR dự kiến. Kết quả cho thấy các cặp mồi cho sản phẩm đặc hiệu và kích thước dự kiến của sản phẩm là 406 bp.

- Các trình tự mồi này được gửi đến công ty Phù Sa Genomics (Cần Thơ, Việt Nam) để đặt hàng tổng hợp.

Bước 5: Thiết lập quy trình PCR đặc hiệu allele xác định đa hình -819T>C gene *IL10*

- Chọn nhiệt độ gắn mồi: Nhiệt độ nóng chảy của các mồi F-819T, F-819C và R-819 được đơn vị tổng hợp cung cấp lần lượt là 60,3°C, 62,1°C và 59,4°C. Vì vậy, chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi trong điều kiện nhiệt độ của phản ứng PCR là 60°C.

- Chọn chứng nội: Sử dụng cặp mồi chứng nội đã được ứng dụng thường quy tại Bộ môn Di truyền Y học với trình tự như sau:

+ Mồi xuôi chứng nội: ZFX-Y-F:

5'-ACCRCCTGTACTGACTGTGATTACAC-3'

+ Mồi ngược chứng nội: ZFX-Y-R:

5'-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT-3'

Cặp mồi này được chọn vì có nhiệt độ gắn mồi 60°C, ngoài ra kích thước sản phẩm là 495 bp, có thể phân tách với sản phẩm đa hình (406 bp) khi điện di.

- Mỗi mẫu nghiệm phẩm được thực hiện hai phản ứng PCR có chứng nội (chỉ khác nhau mồi xuôi đặc hiệu allele T hay C) thành phần mỗi phản ứng gồm:

- + GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Hoa Kỳ): 12,5 μ l
- + Mồi xuôi đặc hiệu allele (10 pmol/ μ l): 1 μ l (mồi F-819T cho phản ứng 1 hoặc 1 μ l mồi F-819C cho phản ứng 2)
- + Mồi ngược R-819 (10 pmol/ μ l): 1 μ l
- + Mồi xuôi chứng nội ZFX-Y-F (10 pmol/ μ l): 1 μ l
- + Mồi ngược chứng nội ZFX-Y-R (10 pmol/ μ l): 1 μ l
- + DNA khuôn mẫu (50 ng/ μ l): 1 μ l
- + Nước cất: 7,5 μ l
- Điều kiện nhiệt độ:
- + Biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút;
- + Sau đó thực hiện 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm:

biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi 60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

- + Kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút.

Bước 6: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR đặc hiệu allele

- Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%, có bổ sung thuốc nhuộm DNA SafeView™ Classic (abm, Canada).

- Phản ứng PCR đạt yêu cầu khi sản phẩm 495 bp tương ứng chứng nội đều xuất hiện trong cả hai phản ứng của mỗi mẫu, không có sản phẩm không đặc hiệu. Các sản phẩm tương ứng cặp mồi đặc hiệu allele xuất hiện trong từng phản ứng hoặc không tùy kiểu gene.

Bảng 1. Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu allele có chứng nội

Kiểu gene	Kích thước sản phẩm phản ứng 1 (mồi F-819T)	Kích thước sản phẩm phản ứng 2 (mồi F-819C)
-819TT	406 bp và 495 bp	495 bp
-819TC	406 bp và 495 bp	406 bp và 495 bp
-819CC	495 bp	406 bp và 495 bp

Bước 7: Áp dụng quy trình cho các mẫu nghiên cứu

- Mỗi mẫu DNA được thực hiện với hai phản ứng PCR đa mồi như đã mô tả trên.
- Xác định sự phân bố kiểu gene và tần suất allele.
- Xác định cân bằng Hardy - Weinberg.
- So sánh sự phân bố kiểu gene và allele với các quần thể khác.

2.2.3. Xử lý số liệu

Thông tin thu thập được sẽ nhập vào Excel 2019 sau đó mã hóa và xử lý theo các thuật toán thống kê y học trong phần mềm SPSS 20.

Tính tỷ lệ % các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC; tỷ lệ % các allele T và C.

Sử dụng công cụ trực tuyến <https://www.had2know.org>

được thiết kế bởi E. Emerson để phân tích cân bằng Hardy - Weinberg nhằm đánh giá sự phân bố ngẫu nhiên của các kiểu gene trong nhóm nghiên cứu. Nếu $p > 0,05$ thì sự phân bố được đánh giá là phù hợp với cân bằng Hardy - Weinberg.

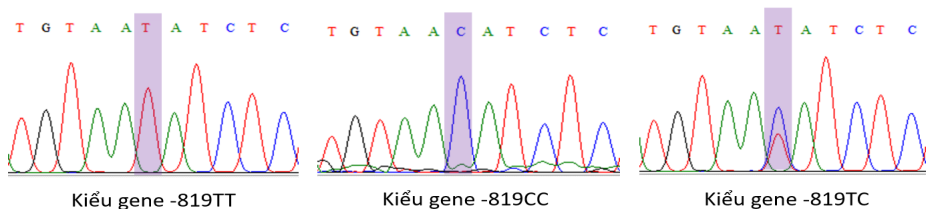
So sánh các tỷ lệ dùng phép kiểm định Chi bình phương, nếu có trên 20% tần số nhỏ hơn 5, kiểm định bằng Fisher's exact. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.2.4. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài này được thực hiện với sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức nghiên cứu y sinh học của Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế, mã số H2024/060, cấp ngày 03/06/2024.

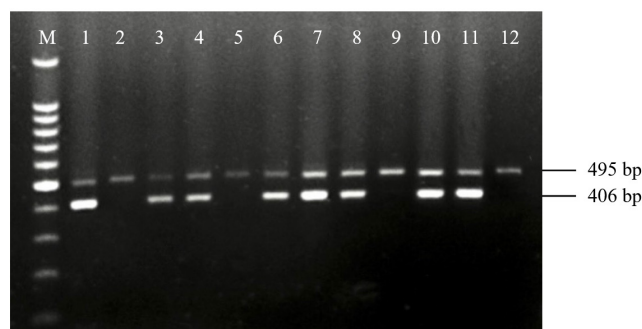
3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả hoàn thiện kỹ thuật PCR đặc hiệu allele



Hình 2. Kết quả giải trình tự các mẫu chứng với các kiểu gene -819TT, CC và TC

Kết quả giải trình tự cho thấy các tín hiệu đỉnh huỳnh quang rõ, cho phép nhận diện đa hình rs1800871 với các kiểu gene -819TT (xuất hiện một đỉnh T tại vị trí -819), -819CC (xuất hiện một đỉnh C tại vị trí -819) và -819TC (xuất hiện đồng thời một đỉnh T và một đỉnh C tại vị trí -819).



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm phản ứng PCR đặc hiệu allele

Chú thích: Sản phẩm chứng nội có kích thước 495 bp, sản phẩm đặc hiệu allele có kích thước 406 bp. Mỗi mẫu chứng và mẫu xét nghiệm đều được thực hiện hai phản ứng PCR, sản phẩm hai phản ứng của cùng một mẫu được chạy điện di ở hai lần liên tiếp nhau.

Làn M: thang chuẩn 100 bp.

Các làn 1, 3, 5, 7, 9, 11 là phản ứng với mồi đặc hiệu allele -819T (phản ứng 1)

Các làn 2, 4, 6, 8, 10, 12 là phản ứng với mồi đặc hiệu allele -819C (phản ứng 2)

Các làn 1 và 2: mẫu chứng có kiểu gene -819TT, làn 1 có sản phẩm đặc hiệu allele T, làn 2 không có sản phẩm đặc hiệu allele C (chứng âm của allele C).

Các làn 3 và 4: mẫu chứng có kiểu gene -819TC, làn 3 có sản phẩm đặc hiệu allele T và làn 4 có sản phẩm đặc hiệu allele C.

Các làn 5 và 6: mẫu chứng có kiểu gene -819CC, làn 5 không có sản phẩm đặc hiệu allele T (chứng âm của allele T), làn 6 có sản phẩm đặc hiệu allele C.

Các làn 7 và 8: mẫu xét nghiệm, kiểu gene -819TC

Các làn 9 và 10: mẫu xét nghiệm, kiểu gene -819CC

Các làn 11 và 12: mẫu xét nghiệm, kiểu gene -819TT

Nhận xét: Các mẫu đều có sản phẩm chứng nội, các băng DNA chứng nội và sản phẩm với cặp mồi đặc hiệu allele đều rõ, kích thước phù hợp dự kiến, không có băng không đặc hiệu.

3.2. Kiểu gene và allele của đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene IL10 ở nhóm nghiên cứu

Bảng 2. Phân bố kiểu gene tại vị trí đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene IL10 ở người bình thường

Kiểu gene	Chung n = 100, (%)	Nam n = 33, (%)	Nữ n = 67, (%)	p
-819TT	52 (52)	15 (45,45)	37 (55,22)	0,335
-819TC	42 (42)	17 (51,52)	25 (37,31)	
-819CC	6 (6)	1 (3,03)	5 (7,47)	
p-HWE	0,513	0,141	0,786	

Tỷ lệ của các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC lần lượt là 52%, 42% và 6%. Không có sự khác biệt về sự phân bố kiểu gene theo giới. Sự phân bố kiểu gene đạt cân bằng Hardy - Weinberg (HWE), p-HWE trong các nhóm nam, nữ và chung đều lớn hơn 0,05.

Bảng 3. Phân bố các allele T và C tại vị trí đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene IL10 ở người bình thường

Allele	Chung (%)	Nam (%)	Nữ (%)	p
-819T	146 (73)	47 (71,21)	99 (73,88)	0,689
-819C	54 (27)	19 (28,79)	35 (26,12)	
Tổng	200	66	134	

Tỷ lệ các allele T và C lần lượt là 73% và 27%. Không có sự khác biệt về sự phân bố allele theo giới.

4. BÀN LUẬN

4.1. Hoàn thiện quy trình PCR đặc hiệu allele với các mồi tự thiết kế để xác định đa hình -819T>C (rs1800871) của gene *IL10*

Đa hình đơn nucleotide (SNP) là đa hình phổ biến nhất trong genome người. Trong đó, nhiều SNP trên gene được xem là yếu tố nguy cơ của nhiều bệnh lý khác nhau [8]. Vì vậy, các nghiên cứu về mối liên quan của một SNP với một bệnh lý cụ thể nào đó đóng vai trò quan trọng trong y học, góp phần hiểu thêm về cơ chế bệnh sinh cũng như có kế hoạch dự phòng bệnh tật. Để xác định các SNP này, có thể thực hiện các kỹ thuật PCR như PCR đặc hiệu allele, PCR-RFLP, Real-time PCR..., trong đó kỹ thuật PCR đặc hiệu allele tương đối dễ thực hiện tại các phòng thí nghiệm sinh học phân tử cơ bản và chi phí phù hợp. Hơn nữa, kỹ thuật này đã được nhiều nghiên cứu xác nhận tính chính xác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tự thiết kế các mồi và chuẩn hoá quy trình PCR đặc hiệu allele để xác định đa hình -819T>C (rs1800871) gene *IL10*. Để có các mẫu chứng tương ứng các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC, chúng tôi đã giải trình tự một số mẫu theo phương pháp Sanger, kết quả giải trình tự này được minh hoạ ở Hình 2. Hiện nay, giải trình tự Sanger vẫn là tiêu chuẩn vàng trong việc xác định các đa hình đơn nucleotide [9].

Như đã trình bày chi tiết ở phần phương pháp nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng trình tự cập nhật mới nhất của gene *IL10* theo phiên bản GRCh38.p14 (NC_000001.11) với vị trí đa hình ở nucleotide thứ 206.773.289. Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR đặc hiệu allele là sự kéo dài mồi chỉ xảy ra khi đầu 3' của nó bổ sung hoàn hảo với khuôn mẫu, chúng tôi đã thiết kế hai mồi xuôi có đầu 3' là T và C để lần lượt đặc hiệu với hai allele T và C. Theo Hayashi, một sự bắt cặp sai T-G hoặc C-A tại nucleotide thứ ba tính từ đầu 3' của mồi có thể làm tăng tính đặc hiệu của mồi với allele [10]. Đáng lưu ý, Liu (2012) đã công bố phương pháp cải thiện mồi PCR đặc hiệu allele để xác định SNP sau khi khảo sát tính hiệu quả của 2.071 cặp mồi khác nhau [7]. Dựa trên khuyến cáo của Hayashi và Liu, chúng tôi thay thế nucleotide thứ ba tính từ đầu 3' đến 5' của mồi từ A thành G để tạo khả năng phân biệt hai allele cao nhất. Đối với mồi ngược chúng tôi đã sử dụng công cụ trực tuyến PrimerDigital để thiết kế. Dựa vào các nhiệt độ nóng chảy của ba mồi F-819T, F-819C và R-819 lần lượt là 60,3°C, 62,1°C và 59,4°C, chúng tôi đã chọn nhiệt độ gắn mồi cho quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele này là 60°C. Kết quả trình bày ở Hình 3 cho thấy các sản phẩm đặc hiệu allele đều xuất hiện rõ, không có sản phẩm không đặc hiệu.

Ngoài các chứng dương đã được xác nhận bằng

giải trình tự Sanger, chúng tôi còn sử dụng một cặp mồi chứng nội đã được sử dụng thường quy tại Bộ môn Di truyền Y học, là ZFX-Y-F và ZFX-Y-R với nhiệt độ gắn mồi phù hợp 60°C. Như vậy, mỗi phản ứng PCR đặc hiệu allele gồm có hai cặp mồi, trong đó một cặp là mồi đặc hiệu allele (T hoặc C) và một cặp mồi chứng nội. Điều này làm tăng tính chính xác của kỹ thuật, giúp loại trừ những trường hợp âm tính giả. Đó là những ưu điểm trong quy trình kỹ thuật của chúng tôi. Các tác giả Silva (2015) và Stanford (2005) cũng thực hiện kỹ thuật PCR đặc hiệu allele để xác định đa hình -819T>C với mồi xuôi tương tự chúng tôi nhưng không có thay đổi nucleotide thứ ba từ đầu 3', mồi ngược của các tác giả này khác chúng tôi [11,12]. Ngoài ra, chúng tôi có sử dụng chứng nội trong khi các tác giả này không sử dụng. Việc sử dụng thêm cặp mồi chứng nội hầu như không tăng thêm chi phí vì không tăng số lượng phản ứng, nhưng ưu điểm nổi bật là loại trừ âm tính giả. Như vậy, chúng tôi đã thiết lập thành công quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele có kèm chứng nội để xác định đa hình -819T>C gene *IL10*.

4.2. Kiểu gene và allele của đa hình -819T>C (rs1800871) trên gene *IL10* ở người bình thường

Trong nghiên cứu này, bước đầu chúng tôi đã xác định được tần suất các kiểu gene *IL10* tại vị trí đa hình -819T>C trong nhóm 100 người bình thường, bao gồm 33 nam và 67 nữ. Tỷ lệ các kiểu gene -819TT (rs1800871 AA), -819TC (rs1800871 AG) và -819CC (rs1800871 GG) lần lượt là 52%, 42% và 6%, sự khác biệt giữa hai nhóm nam và nữ bình thường không có ý nghĩa thống kê (Bảng 2). Sự phân bố các kiểu gene đạt cân bằng Hardy - Weinberg, cho thấy tính ổn định của kiểu gene trong quần thể. Kết quả của chúng tôi khá tương đồng với một số nghiên cứu ở các quốc gia châu Á, như nghiên cứu của Rong (2023) trên 719 người Hán (Trung Quốc) cũng có tỷ lệ các kiểu gene này lần lượt là 45,5%; 45,1% và 9,5% [5], nghiên cứu của Trần Thị Táo (2024) và cộng sự đã ghi nhận tỷ lệ kiểu gene -819TT (tương ứng rs1800871 AA) trên 1.774 người Hàn Quốc khoẻ mạnh là 50,6% [3]. Tần suất các allele -819T và -819C trong nghiên cứu của chúng tôi lần lượt là 73% và 27% (Bảng 3). Sự phân bố này tương tự nghiên cứu của Rong, lần lượt là 68% và 32% [5]. Ngoài ra, theo cơ sở dữ liệu dbSNP, một tần suất được tính trong nhóm nhỏ người Việt Nam (n = 216) được tách ra từ quần thể toàn cầu cũng cho thấy tần suất các allele -819T và -819C là 72,2% và 27,8% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800871>). Như vậy, có thể thấy ở các nhóm người Việt Nam dù ở trên thế giới hay trong nước, đều có allele C là allele thiểu số (minor allele), tương tự với các quần thể người châu Á.

Đáng lưu ý, nghiên cứu ở các châu lục khác như

của Rybicka (2020, Ba Lan) trên 100 người da trắng khỏe mạnh đến hiến máu, tỷ lệ các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC lần lượt là 5%, 41% và 54%, tỷ lệ các allele -819T và -819C lần lượt là 25,5% và 74,5% [13], nghiên cứu của Lopez (2020, Argentina) trên 80 người khỏe mạnh có tỷ lệ các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC lần lượt là 7,5%; 27,5% và 65%; tỷ lệ các allele -819T và -819C lần lượt là 21,25% và 78,75% [14]. Có thể thấy, nghiên cứu của các tác giả Rybicka ở châu Âu và Lopez ở châu Mỹ có sự phân bố kiểu gene và allele đảo ngược so với nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả ở châu Á. Cụ thể, kiểu gene -819CC và allele -819C là thiểu số trong nghiên cứu của chúng tôi và châu Á, nhưng lại chiếm đa số trong các châu lục khác. Như vậy, đa hình -819T>C gene *IL10* có sự khác biệt rất lớn về phân bố kiểu gene và allele giữa các chủng tộc. Điều này, một lần nữa, càng khẳng định tầm quan trọng của việc khảo sát đa hình này trong các quần thể dân cư và chủng tộc khác nhau.

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam thực hiện việc khảo sát đa hình -819T>C gene *IL10*. Với việc thiết lập thành công quy trình PCR đặc hiệu allele đơn giản, chi phí thấp, dễ triển khai với cỡ mẫu lớn, chúng tôi hy vọng trong tương lai sẽ có những nghiên cứu sâu rộng hơn để tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình này và một số bệnh lý, góp phần làm sáng tỏ các cơ chế bệnh sinh và phát hiện những người có nguy cơ cao mắc bệnh liên quan.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đa hình -819T>C (rs1800871) gene *IL10* trên 100 người tình nguyện, sức khỏe bình thường, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

Chúng tôi đã thiết kế mồi và thiết lập thành công quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele có kèm chứng nội để xác định đa hình -819T>C (rs1800871) gene *IL10*. Đây là cơ sở cho việc thực hiện các nghiên cứu liên quan.

Tỷ lệ các kiểu gene -819TT, -819TC và -819CC lần lượt là 52%, 42% và 6%, tỷ lệ allele -819T và -819C lần lượt là 73% và 27%.

Lời cảm ơn: Đề tài này được hỗ trợ một phần kinh phí từ Quỹ nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Y - Dược Huế, mã số đề tài 96/24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418.
2. Gu C, Zhao L, Huang K, Fan W, Li L, Ye M, et al. Association between IL-10 gene polymorphisms and unexplained recurrent spontaneous abortion risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2018;(6):5480–5491.

3. Tran TT, Gunathilake M, Lee J, Oh JH, Chang HJ, Sohn DK, et al. The interaction effect of dietary selenium intake and the IL10 rs1800871 polymorphism on the risk of colorectal cancer: a case-control study in Korea. *British Journal of Nutrition*. 2024 Jun 28;131(12):2039–2048.
4. Tong Y, Jiang S, Cai L, Guan X, Hou S, Wang Z, et al. Identification of Functional Genetic Polymorphisms at IL-10 Promoter Region and their Association with Risk of Ischemic Stroke in Chinese Han Population. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. 2018 Jul 1;22(7):779–784.
5. Rong K, Lang Y, Zhou Y, Ni L, Wang L, Wang L, et al. Risk Genetic Variants (IL-10) for Osteoporosis in Han Population from Northwest China. *J Inflamm Res*. 2023;16:1091–1102.
6. Wang YC, Sung WW, Wu TC, Wang L, Chien WP, Cheng YW, et al. Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012 Jul 27;7(7):e39525.
7. Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*. 2012 Aug 24;8(1):34.
8. Nussbaum Robert L., McInnes Roderick R., Willard Huntington F. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. 8th ed. Elsevier Inc.; 2016.
9. Cheng C, Fei Z, Xiao P. Methods to improve the accuracy of next-generation sequencing. Vol. 11, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Front. Bioeng. Biotechnol. 2023 Jan 20;11.
10. Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004 May;108(7):1212–1220.
11. Stanford MR, Vaughan RW, Kondeatis E, Chen Y, Edelsten CE, Graham EM, et al. Are cytokine gene polymorphisms associated with outcome in patients with idiopathic intermediate uveitis in the United Kingdom? *British Journal of Ophthalmology*. 2005 Aug;89(8):1013–1016.
12. da Silva NMO, Germano FN, Vidales-Braz BM, dos Santos DM, Lobato R, de Martinez AMB, et al. Polymorphisms of IL-10 gene in patients infected with HCV under antiviral treatment in southern Brazil. *Cytokine*. 2015 Jun 1;73(2):253–257.
13. Rybicka M, Wozniowicz A, Sznarkowska A, Romanowski T, Stalke P, Dręzewski M, et al. Genetic variation in IL-10 influences the progression of hepatitis B infection. *Int. J. Infect. Dis*. 2020 Jul 1;96:260–265.
14. López MS, Tiscornia MM, Dicarlos MB, Zapata PD. IL-10 gene promoter region polymorphisms and their association with celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2020 Dec 1;112(12):915–920.