

# Xây dựng quy trình phân type đa hình đơn nucleotide trên gen *IFNL4* có liên quan đến sự thanh thải virus viêm gan C

- Nguyễn Trung Hiếu
- Trần Thị Nhật Linh
- Nguyễn Hữu Hùng

Trường Đại học Nguyễn Tất thành

- Nguyễn Hoàng Chương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 19 tháng 9 năm 2016, nhận đăng ngày 10 tháng 04 năm 2017)

## TÓM TẮT

Chúng tôi xây dựng một quy trình phân tử để xác định đa hình đơn nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) trên gen *IFNL4* bằng kỹ thuật *real-time PCR* với hai *Taqman probe* đặc hiệu cho mỗi dạng đa hình của *ss469415590*. Quy trình xây dựng gồm các bước: 1) Tách chiết DNA người từ máu toàn phần; 2) Nhân bản DNA người đã tách chiết trong phản ứng *real-time PCR* (Polymerase chain reaction) với cặp mồi *ss469415590\_IFNL4\_F* và *ss469415590\_IFNL4\_R* và hai *Taqman probe* đặc

hiệu cho mỗi dạng đa hình là *ss469415590\_IFNL4\_FAM* cho đa hình  $\Delta G$  và *ss469415590\_IFNL4\_VIC* cho đa hình TT. Quy trình đã xây dựng được đánh giá trên 95 mẫu DNA người và tính được tần số allele TT là 93 % trong khi  $\Delta G$  là 7 %. Kết quả so sánh giữa hai phương pháp trên 10 mẫu lâm sàng cho thấy quy trình phân type *ss469415590* bằng *real-time PCR* có độ chính xác là 100 %.

**Từ khóa:** *ss469415590*, *real-time PCR*, SNP, interferon, *Taqman probe*

## MỞ ĐẦU

Các nghiên cứu liên kết toàn bộ gene (Genome Wide Association Study-GWAS) đã phát hiện được sự liên quan giữa các đa hình đơn nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) và sự thanh thải virus viêm gan C (Hepatitis C Virus-HCV) ở các bệnh nhân khi điều trị bằng interferon (IFN) kết hợp ribavirin. Cụ thể là ở SNP rs12979860, người mang genotype C/C có tỷ lệ đáp ứng siêu vi bền vững (Stable Viral Response-SVR) cao hơn các genotype khác như C/T hoặc T/T. Tương tự ở SNP rs8099917, người mang genotype T/T có tỷ lệ SVR cao hơn người mang genotype T/G và G/G [1, 2]. Với lý do này, việc phân biệt genotype có liên quan đến các SNP này là cần thiết để tiên lượng khả năng đáp ứng

điều trị ở bệnh nhân nhiễm HCV. Trên thực tế, các nhóm nghiên cứu trong và ngoài nước đã phát triển nhiều phương pháp phân tử nhằm phân biệt genotype có liên quan đến 2 SNP trên như phương pháp *real-time PCR* với các *Taqman probe* đặc hiệu cho từng alen, phương pháp PCR-RFLP phân biệt các genotype dựa vào chiều dài của các sản phẩm cắt giới hạn và phương pháp giải trình tự nucleotide. Các phương pháp này đã có các ứng dụng trong thực tế lâm sàng.

Gần đây, một SNP khác được phát hiện có liên quan đến sự thanh thải HCV ở người bệnh điều trị với IFN-ribavirin, đó là *ss469415590*. SNP này gồm hai allele là  $\Delta G$  và TT, trong đó allele  $\Delta G$  là allele bất lợi

và allele TT là alen có lợi đối với sự thanh thải HCV khi điều trị [3]. Cụ thể Franco và cộng sự [4] cho thấy tỷ lệ thất bại khi điều trị là 77 % ở những người mang alen  $\Delta G$  trong khi tỷ lệ này thấp hơn (48 %) ở những người không mang allele  $\Delta G$ . Cơ chế phân tử của sự đáp ứng kém ở người mang genotype  $\Delta G$  là do SNP này nằm trong vùng mã hóa của gene *IFNL4* tạo ra interferon lambda 4. Alen  $\Delta G$  tạo vùng mã hóa hoàn chỉnh của gene này để tổng hợp IFNL4 trong khi allele TT làm lệch vùng mã hóa nên không tổng hợp được IFNL4. Sự tiền kích hoạt truyền tín hiệu nội bào do IFNL4 làm ức chế sự kích hoạt truyền tín hiệu nội bào của các interferon (IFN) type I (là các interferon điều trị) và type III. Vì thế ở người mang allele  $\Delta G$  sẽ có sự cạnh tranh giữa IFNL4 với các IFN điều trị type I và làm giảm hiệu quả điều trị của các thuốc protein này. Theo các tác giả, SNP này liên quan chặt chẽ hơn các SNP như rs12979860 và rs8099917 trong việc thanh thải HCV. Với lý do này chúng tôi xây dựng một phương pháp phân tử dựa trên kỹ thuật real-time PCR nhằm phân type SNP ss469415590. Phương pháp phân type trong nghiên cứu này có thể được sử dụng để nghiên cứu sự phân bố tần số allele của các SNP có liên quan trong điều trị bệnh viêm gan siêu vi C hoặc có thể được ứng dụng để tiên lượng đáp ứng điều trị ở những bệnh nhân viêm gan siêu vi C.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chúng tôi sử dụng các primer và Taqman probe cho phản ứng real-time PCR từ nghiên cứu của Prokunika-Olsson và cộng sự [3] bao gồm ss469415590\_IFNL4\_F(GCCTGCTGCAGAAGCAGAGAT) và ss469415590\_IFNL4\_R(GCTCCAGCGAGCGGTAGTG). Các Taqman probe có gắn cấu tử MGB để tăng tính đặc hiệu bao gồm ss469415590\_IFNL4\_VIC(ATCGCAGAAGGCC) và ss469415590\_IFNL4\_FAM(ATCGCA GCGGCC).

Các primer được tổng hợp và cung cấp bởi công ty IDT DNA (Mỹ). Các Taqman probe chứa MGB

được tổng hợp và cung cấp bởi công ty Invitrogen (Mỹ). Các mẫu máu toàn phần, các hóa chất thực hiện phản ứng tách chiết DNA từ máu toàn phần, các hóa chất thực hiện phản ứng real-time duplex PCR, các hóa chất dòng hóa sản phẩm PCR được cung cấp bởi Công ty TNHH Nam Khoa (Việt Nam).

#### Tách chiết DNA từ máu toàn phần

500  $\mu$ L máu toàn phần được huyền phù với 500  $\mu$ L dung dịch SSC 1X. Ly tâm 10.000 v/p trong 30 giây loại dịch nổi để thu nhận phân đoạn bạch cầu. Rửa phân đoạn bạch cầu với dung dịch SSC 1X 2 lần để thu nhận phân đoạn bạch cầu sạch hemoglobin. Thực hiện bước phá tế bào, biến tính protein bằng dung dịch guanidine-phenol-chloroform. Ly tâm thu nhận dịch nổi chứa DNA bộ gen. Tủa DNA bộ gene với isopropanol và rửa tủa DNA với ethanol 70 %. DNA được giữ trong dung dịch TE 1X.

#### Thực hiện phản ứng real-time duplex PCR

Thành phần phản ứng real-time có thể tích 25  $\mu$ L bao gồm PCR buffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R với nồng độ cuối là 10 pmole, Taqman MGB probe ss469415590\_IFNL4\_VIC và ss469415590\_IFNL4\_FAM với nồng độ cuối là 5 pmole. Chương trình luân nhiệt như sau: 95 °C–5 phút (1 chu kỳ), 95 °C–15 giây, 60 °C–1 phút (40 chu kỳ). Tiến hành phản ứng real-time PCR và phân tích kết quả real-time được thực hiện trên máy luân nhiệt Rotor-Gene Q (Qiagen).

#### Giải trình tự nucleotide

DNA người được nhân bản trong phản ứng PCR với cặp mồi ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự nucleotide tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự DNA giải mã được phân tích bằng chương trình Chromas (Technelysium Ply Ltd).

#### Xử lý thống kê

Các kết quả real-time PCR được xử lý bằng công cụ Excel. Phân phối Hardy-Weinberg và tần số alen

được tính toán bằng phần mềm SNP Stats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nguyên nhân chọn SNP ss469415590

Ngoài các đa hình đơn nucleotide (SNP) như rs12979860 và rs8099917, gần đây một SNP mới được phát hiện có liên quan đến sự thanh thải HCV khi điều trị bệnh nhiễm virus này với IFN. SNP này có hai allele là  $\Delta G$  và TT, trong đó  $\Delta G$  là allele bất lợi còn TT là allele có lợi. Việc xác định đa hình đơn nucleotide tại SNP này giúp tiên lượng cho việc điều trị bệnh viêm gan siêu vi C bằng các thuốc IFN, vốn vẫn là một trong những phương thức điều trị HCV hiện nay trên thế giới [5]. Ngoài ra, ở Việt Nam tại thời điểm thực hiện nghiên cứu này, chúng tôi chưa thấy có nghiên cứu nào nhằm phân type ss469415590 được tiến hành. Với những lý do này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu xây dựng một quy trình phân tử dựa trên kỹ thuật real-time nhằm phân type ss469415590.

### Thiết kế và kiểm tra mẫu chứng amplicon deltaG

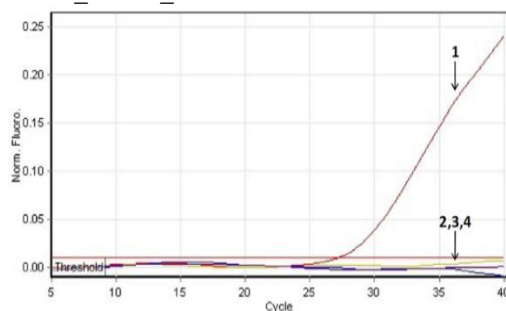
Theo Prokunika-Olsson [3] thì tần số allele TT đạt tới 93 % ở người châu Á, điều này có nghĩa là genotype  $\Delta G/\Delta G$  sẽ khó phát hiện trong đề tài này. Vì vậy, chúng tôi cần thiết kế một amplicon DNA mang alen  $\Delta G$  để làm mẫu chứng xây dựng quy trình phân type SNP. Chúng tôi sử dụng đoạn trình tự nucleotide nằm giữa hai primer ss469415590\_IFNL4\_F và

ss469415590\_IFNL4\_R trên gene *IFNL4* và kéo dài đầu 5' cũng như 3' của đoạn trình tự này để tạo điều kiện thuận lợi cho sự bắt cặp của cặp primer vào mạch khuôn. Trình tự nucleotide của amplicon deltaG được trình bày như sau:

5'CCCTCTCTTTGGCTTCCCTGACGTCTCTCGG  
CCTGCTGCAGAAGCAGAGATGCGGCCGAGTG  
TCTGGGCCGAGTGGCCGCCGGGCTGTGGGT  
CCTGTGCACGGTGATCGCAGCGGCCCGCCGCGG  
GCTGCCTGCTCTCGCACTACCGCTCGCTGGAG  
CCCGGACGCTGGCGGCTGCCAAGGCGCTGAG  
GGACCGCTACGT-3'

Vùng gạch dưới ở đầu 5' và 3' của amplicon là vị trí bắt cặp của cặp primer, vùng gạch dưới in nghiêng ở giữa trình tự là vị trí bắt cặp của Taqman probe  $\Delta G$ , chữ in đậm là vị trí SNP ss469415590. Sau đó, đoạn trình tự này được gửi tổng hợp hóa học tại công ty IDT DNA dưới dạng đoạn DNA mạch đôi (gBlock® gene fragment). Đoạn DNA mạch đôi này được tinh sạch bằng HPLC và được kiểm tra trình tự nucleotide bởi công ty IDT DNA.

Chúng tôi khảo sát khả năng hoạt động của amplicon này trong phản ứng real-time PCR với hệ primer và Taqman probe và kết quả được trình bày trong Hình 1.



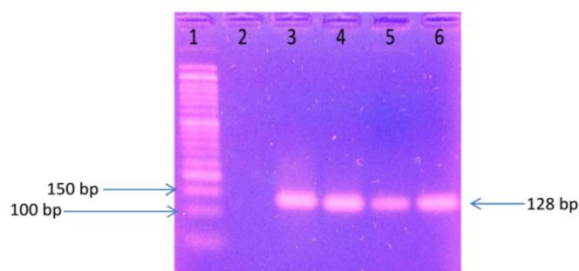
**Hình 1.** Kết quả khảo sát hoạt động của amplicon delta G với hệ primer-Taqman probe. Các đường huỳnh quang được ghi chú như sau: (1) và (2) mẫu amplicon delta G và mẫu chứng âm với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F-ss469415590\_IFNL4\_R và Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_FAM, (3) và (4) mẫu amplicon delta G và mẫu chứng âm với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F- ss469415590\_IFNL4\_R và Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_VIC

Kết quả khảo sát cho thấy mẫu amplicon  $\Delta G$  hoạt động tốt trong phản ứng real-time PCR thể hiện qua tín hiệu huỳnh quang ở mẫu (1) và không có tín hiệu huỳnh quang ở các mẫu (2), (3), (4). Sản phẩm PCR từ amplicon  $\Delta G$  được dòng hóa vào vector pJET1.2 (Fermentas) để tạo thành pIFNL4-dG. Ngoài ra, mẫu chứng DNA mang genotype TT thu nhận bằng phương pháp giải trình tự cũng được nhân bản bằng PCR với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R. Sản phẩm PCR thu nhận được cũng được dòng hóa vào vector pJET1.2 để tạo thành pIFNL4-TT. Các plasmid này được sử dụng làm mẫu chứng cho các thí nghiệm về sau.

#### Khảo sát quy trình tách chiết DNA người từ máu toàn phần

Máu toàn phần thường chứa các chất có khả năng ức chế phản ứng PCR, trong đó nổi bật là haemoglobin, protein IgG và heparin [6-8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chất chống đông là

EDTA và trong quy trình tách chiết có sử dụng những chất biến tính protein mạnh là phenol và guanidine thiocyanate giúp loại bỏ hiệu quả protein nên chất ức chế chủ yếu còn lại là haemoglobin nằm trong phân đoạn hồng cầu. Do đó, điểm quan trọng trong quy trình tách chiết DNA từ máu toàn phần của nghiên cứu này là phải loại bỏ phân đoạn hồng cầu trong máu toàn phần và thu nhận phân đoạn bạch cầu để tách chiết DNA. Chúng tôi loại bỏ hồng cầu trong máu toàn phần bằng cách ly giải hồng cầu với dung dịch SSC 1X. Sau đó, thực hiện tách chiết DNA tổng số từ phân đoạn bạch cầu bằng phương pháp phenol-chloroform. Chất lượng DNA tách chiết được đánh giá thông qua phương pháp đo quang phổ kế và phương pháp PCR. Kết quả đo quang phổ cho thấy các mẫu DNA có độ tinh sạch cao (kết quả không trình bày). Kết quả PCR với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F- ss469415590\_IFNL4\_R được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Kết quả nhân bản bằng PCR trên DNA tách chiết từ máu toàn phần của người. Giếng 1: thang DNA; giếng 2: mẫu chứng âm; giếng 3 đến 6: 4 mẫu DNA từ máu toàn phần của người

Kết quả ở Hình 2 cho thấy các sản phẩm PCR có kích thước như mong đợi là 128 bp khi so sánh với thang DNA 100 bp. Điều này cho thấy DNA tách chiết từ máu toàn phần người không chứa các chất ức chế PCR. Tóm lại quy trình tách chiết DNA được sử dụng cho DNA có khả năng được nhân bản trong phản ứng PCR.

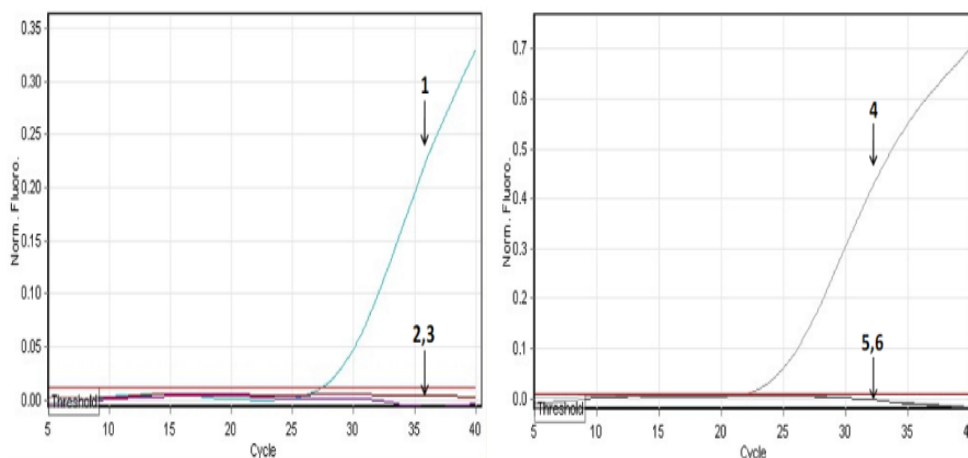
#### Khảo sát độ đặc hiệu của primer-probe

Độ đặc hiệu của cặp primer được định nghĩa là khả năng nhân bản chọn lọc bản sao đích. Vì vậy

chúng tôi khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của cặp primer trên nhiều loại vật liệu di truyền khác nhau, bao gồm các loại virus, vi khuẩn, nấm bệnh. Các tác nhân này có thể xuất hiện cùng lúc trong cơ thể người và có khả năng được nhân bản với cặp primer nếu cặp primer sử dụng không đặc hiệu. Ngoài ra, độ đặc hiệu Taqman probe cho từng alen cũng được khảo sát trong các phản ứng real-time PCR với bản mẫu là amplicon. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 1 và Hình 3.

**Bảng 1.** Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của cặp primer IFNL4F và IFNL4R

Tác nhân	Nhân bản với cặp primer	Nhân bản với primer đặc hiệu loài
Hepatitis C Virus	+	
Hepatitis B Virus	-	+
DNA người	-	+
Dengue Virus	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+

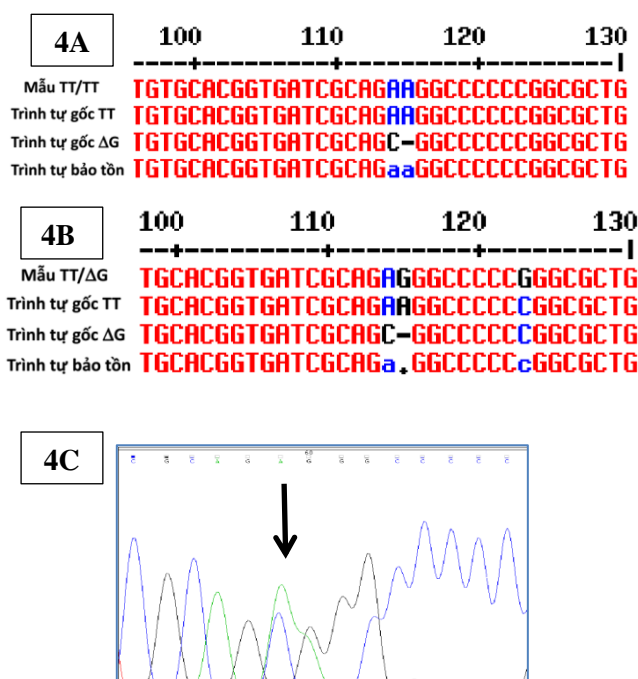


**Hình 3.** Kết quả khảo sát độ đặc hiệu allele của Taqman probe. Chú thích các đường tín hiệu huỳnh quang: (1),(2),(3) plasmid pIFNL4-dG, plasmid pIFNL4-TT, mẫu chứng âm với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F-ss469415590\_IFNL4\_R và Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_FAM, (4),(5),(6) plasmid pIFNL4-TT, plasmid pIFNL4-dG, mẫu chứng âm với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F - ss469415590\_IFNL4\_R và Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_VIC

Kết quả khảo sát khả năng nhân bản chọn lọc của cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R cho thấy cặp primer này chỉ nhân bản chọn lọc DNA từ người và cho sản phẩm PCR với kích thước như mong đợi là 128 bp.

Để khẳng định sản phẩm PCR có kích thước 128 bp thu nhận từ cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R là đặc hiệu cho gene *IFNL4*, chúng tôi giải trình tự hai sản phẩm PCR với cặp primer này, trong đó một sản

phẩm là đồng hợp tử TT/TT, sản phẩm còn lại là dị hợp tử TT/ $\Delta$ G. Trạng thái đồng hợp tử và dị hợp tử của sản phẩm PCR với cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R được xác định bằng phản ứng real-time PCR với hai Taqman probe đặc hiệu ss469415590\_IFNL4\_FAM và ss469415590\_IFNL4\_VIC. Kết quả giải và phân tích trình tự nucleotide của hai sản phẩm PCR được trình bày ở Hình 4A, 4B, 4C.



**Hình 4** A, B, C. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR đồng hợp từ TT/TT và dị hợp từ TT/ΔG

Kết quả ở Hình 4A và 4B cho thấy sản phẩm PCR chính là vùng trình tự nucleotide trên gene *IFNL4*. Mẫu dị hợp từ TT/ΔG cho thấy có bước sóng đôi tại vị trí SNP tại vị trí mũi tên trên Hình 4C. Như vậy, cặp primer sử dụng là hoàn toàn đặc hiệu cho gen *IFNL4*, cụ thể là đoạn DNA chứa SNP ss469415590.

Ngoài ra, các Taqman probe cũng cho thấy tính đặc hiệu allele cao: Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_FAM chỉ cho kết quả dương tính trên pIFNL4-dG và ngược lại Taqman probe ss469415590\_IFNL4\_VIC chỉ cho kết quả dương tính

trên pIFNL4-TT. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của hệ primer và Taqman probe cho thấy tính đặc hiệu cao của phương pháp real-time duplex PCR trong việc phân type SNP ss469415590.

**Khảo sát độ nhạy**

Chúng tôi khảo sát độ nhạy của phương pháp real-time duplex PCR trên các nồng độ pha loãng của hai plasmid pIFNL4-dG và pIFNL4-TT đi từ  $5 \times 10^4$  đến  $5 \times 10^0$  bản sao trong phản ứng PCR. Tiến hành phản ứng PCR lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ plasmid. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát độ nhạy của phương pháp real-time duplex PCR

Nồng độ pIFNL4-dG	Chu kỳ ngưỡng	Nồng độ pIFNL4-TT	Chu kỳ ngưỡng
$5 \times 10^4$ copy/phản ứng	$21,5 \pm 0,2$	$5 \times 10^4$ copy/phản ứng	$21,8 \pm 0,2$
$5 \times 10^3$ copy/phản ứng	$25,8 \pm 0,4$	$5 \times 10^3$ copy/phản ứng	$25,2 \pm 0,5$
$5 \times 10^2$ copy/phản ứng	$29,5 \pm 0,5$	$5 \times 10^2$ copy/phản ứng	$28,8 \pm 0,6$
$5 \times 10^1$ copy/phản ứng	$33,2 \pm 0,7$	$5 \times 10^1$ copy/phản ứng	$32,9 \pm 0,7$
$5 \times 10^0$ copy/phản ứng	$37,6 \pm 0,8$	$5 \times 10^0$ copy/phản ứng	$36,5 \pm 0,9$

**Bảng 3.** Kết quả ứng dụng quy trình phân type ss469115590 trên 95 mẫu lâm sàng

	Tần số
Genotype	
TT/TT	86,3 % (82/95)
TT/ $\Delta$ G	13,7 % (13/95)
$\Delta$ G/ $\Delta$ G	0 % (0/95)
Alen	
TT	93 %
$\Delta$ G	7 %

Kết quả cho thấy phản ứng real-time duplex PCR có khả năng phát hiện  $5 \times 10^0$  bản sao của mỗi plasmid trong phản ứng thể hiện độ nhạy cao.

#### Ứng dụng quy trình trên 95 mẫu DNA lâm sàng

Chúng tôi ứng dụng quy trình đã xây dựng trên 95 mẫu máu toàn phần thu được từ lâm sàng. Kết quả phân type ss469415590 trên 95 mẫu lâm sàng và tần số allele được trình bày trong Bảng 3.

Kết quả cho thấy có 82 mẫu mang genotype TT/TT và 13 mẫu mang genotype  $\Delta$ G/TT. Không có mẫu nào mang genotype  $\Delta$ G/ $\Delta$ G. Các allele của ss469415590 phân bố theo định luật Hardy-Weinberg ( $P=0,47$ ). Tần số allele TT và  $\Delta$ G lần lượt là 93 % và 7 %. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả trong công trình của Prokunika-Olsson [3] trong đó, tần số allele TT chiếm tới 93 % ở quần thể người châu Á, trong khi tần số allele này là 68 % ở người châu Âu

và 23 % ở quần thể người châu Phi. Điều này có thể giải thích không có mẫu nào mang genotype  $\Delta$ G/ $\Delta$ G trong 95 mẫu lâm sàng ở nghiên cứu này.

#### So sánh phương pháp real-time duplex PCR với kỹ thuật giải trình tự nucleotide trong việc phân type ss469415590

Kỹ thuật giải trình tự nucleotide hiện là tiêu chuẩn vàng trong các phương pháp xác định genotype của sinh vật. Vì vậy chúng tôi so sánh phương pháp real-time duplex PCR trong nghiên cứu này với kỹ thuật giải trình tự nucleotide để đánh giá tính chính xác của phương pháp này. Vùng gene giải trình tự nucleotide là vùng genE nằm giữa cặp primer ss469415590\_IFNL4\_F và ss469415590\_IFNL4\_R. So sánh hai phương pháp trên 10 mẫu lâm sàng. Kết quả so sánh được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả so sánh real-time duplex PCR và giải trình tự nucleotide trong việc phân type ss469415590 trên 10 mẫu lâm sàng

Mẫu máu	Kết quả giải trình tự nucleotide	Kết quả real-time duplex PCR
1	TT/TT	TT/TT
2	TT/ $\Delta$ G	TT/ $\Delta$ G
3	TT/TT	TT/TT
4	TT/TT	TT/TT
5	TT/TT	TT/TT
6	TT/TT	TT/TT
7	TT/TT	TT/TT
8	TT/TT	TT/TT
9	TT/TT	TT/TT
10	TT/TT	TT/TT

Kết quả so sánh cho thấy phương pháp real-time duplex PCR cho kết quả phân type ss469415590 tương đồng hoàn toàn với kỹ thuật giải trình tự nucleotide vùng gene *IFNL4* chứa SNP này.

#### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã bước đầu xây dựng thành công quy trình real-time duplex PCR nhằm phân type ss469415590. Kết quả khảo sát cho thấy quy trình có độ đặc hiệu cao trong việc phân biệt các allele  $\Delta G$  và TT của ss469415590, quy trình có khả năng phát hiện và phân type với nồng độ DNA là  $5 \times 10^0$  bản sao/phần ứng. Độ chính xác là 100 % khi so sánh với phương pháp chuẩn là kỹ thuật giải trình tự nucleotide. Quy

trình được đánh giá trên 95 mẫu DNA lâm sàng và kết quả tần số allele TT và  $\Delta G$  ở người Việt Nam là 93 % và 7 %. Từ các kết quả này, trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ đánh giá các chỉ tiêu chất lượng như độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng, độ ổn định, độ lặp lại, so sánh với phương pháp giải trình tự nucleotide trên số lượng mẫu lớn hơn để có thể đưa quy trình phân type ứng dụng trong thực tế lâm sàng nhằm tiên lượng điều trị bệnh viêm gan siêu vi C bằng các thuốc IFN.

*Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2016.01.21.*

## Molecular typing protocol of ss469415590 in *IFNL4* gene in relation to the clearance of hepatitis C virus

- Nguyen Trung Hieu
- Tran Thi Nhut Linh
- Nguyen Huu Hung

University Nguyen Tat Thanh

- Nguyen Hoang Chuong

University of Science, VNU-HCM

#### ABSTRACT

*We built a molecular typing protocol of the ss469415590 SNP in the IFNL4 gene based on the real-time PCR technique with two Taqman probes which are specific for each allele of ss469415590. The protocol includes: (1) DNA extraction from whole blood; (2) DNA amplification in real-time PCR reactions with the primer pair of ss469415590\_IFNL4\_F - ss469415590\_IFNL4\_R*

*and two specific Taqman probes ss469415590\_IFNL4\_FAM for the  $\Delta G$  allele and ss469415590\_IFNL4\_VIC for the TT allele. The typing protocol was evaluated on 95 clinical DNA samples. The allele frequencies were calculated as 93 % for the TT allele and 7 % for the  $\Delta G$  allele. The comparison of the typing protocol to the sequencing method revealed 100 % identical results.*

**Keywords:** *ss465415590, real-time PCR, SNP, interferon, Taqman probe*



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D. Ge, J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, J.G. McHutchison, D.B. Goldstein, Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance, *Nature*, 461, 399–401 (2009).
- [2]. V. Suppiah, M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Müller, M. Bahlo, G.J. Stewart, D.R. Booth, J. George, IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy, *Nature Genetics*, 41, 1100–1104 (2009).
- [3]. L.O. Prokunina, B. Muchmore, W. Tang, R.M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P. Porter-Gill, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H.L. Bonkovsky, B.R. Edlin, C.D. Howell, T.R. Morgan, D.L. Thomas, B. Rehermann, R.P. Donnelly, T.R. O'Brien, A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene *IFNL4* is associated with impaired clearance of hepatitis C virus, *Nature Genetics*, 45, 164–171 (2013).
- [4]. S. Franco, E. Aparicio, M. Parera, B. Clotet, C. Tural, M.A. Martinez, IFNL4 rs469415590 variant is a better predictor than ILF3 (IL28B) rs12979860 of pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy failure in hepatitis C virus/HIV-1 coinfecting patients, *AIDS*, 28, 133–136 (2013).
- [5]. European Association for Study of the Liver, EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection, *Journal of Hepatology*, 57, 167–185 (2015).
- [6]. A. Akane, K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, K. Kimura., Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification, *Journal of Forensic Sciences*, 39, 362–372 (1994).
- [7]. J. Satsangi, D.P. Jewell, K. Welsh, M. Bunce, J.I. Bell, Effect of heparin on polymerase chain reaction, *Lancet*, 343, 1509–1510 (1994).
- [8]. W.A. Al-Soud, L.J. Jönsson, P. Rådström, Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 345–350 (2000).