

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE RS7498665 TRÊN GEN *SH2B1* LIÊN QUAN ĐẾN NGUY CƠ THỪA CÂN, BÉO PHÌ Ở NGƯỜI TRƯỞNG THÀNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP ALLELE - SPECIFIC PCR

Bùi Thị Thuý Nga¹, Phùng Thị Hương Giang², Nguyễn Ánh Ngọc¹,
Trần Quang Bình^{1,✉}

¹ Viện Dinh dưỡng, Hà Nội

² Trường Đại học Thành Đông

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phân tích kiểu gen của đa hình đơn nucleotide rs7498665 trên gen *SH2B1* bằng phương pháp cặp mồi đặc hiệu alen (AS-PCR) trên các mẫu ADN tổng số của người trưởng thành.

Phương pháp: Các cặp mồi đặc hiệu dùng cho phương pháp AS-PCR được thiết kế trên phần mềm tin sinh học Primer3 và điều kiện của phản ứng PCR được tối ưu hóa với các dải nhiệt độ bắt cặp khác nhau. Độ tin cậy của phương pháp AS-PCR được khẳng định lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Kết quả: Đã xây dựng và tối ưu hóa được quy trình phân tích kiểu gen của rs7498665 trên gen *SH2B1* bằng phương pháp AS-PCR với kết quả chính xác.

Kết luận: Quy trình AS-PCR để phân tích kiểu gen của *SH2B1* rs7498665 có độ chính xác cao, đưa ra kết quả nhanh và có thể thực hiện với cỡ mẫu lớn hơn cũng như trên các quần thể khác nhau hướng tới nghiên cứu mối liên quan của đa hình này đối với bệnh thừa cân, béo phì ở người Việt Nam.

Từ khóa: rs7498665, gen *SH2B1*, AS-PCR, Thừa cân, béo phì, xác định kiểu gen.

DEVELOPMENT OF AN ALLELE-SPECIFIC PCR METHOD FOR GENOTYPING *SH2B1* RS7498665 POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH ADULT OVERWEIGHT AND OBESITY

ABSTRACT

Aims: To develop a genotyping protocol for single nucleotide polymorphism (SNP) rs7498665 on *SH2B1* gene using allele-specific primer method (AS-PCR) on total DNA samples of adult people.

Methods: Specific primers for the AS-PCR method were designed using Primer3 bioinformatics software and PCR reaction conditions were optimized at different annealing temperatures. The reliability of the AS-PCR method was confirmed by Sanger sequencing.

Results: A protocol for genotyping the rs7498665 has been developed and optimized using the AS-PCR method with accurate results.

Conclusion: The AS-PCR protocol for genotyping *SH2B1* rs7498665 is highly accurate, provides rapid results and can be performed with larger sample sizes as well as on different populations to study the association of this polymorphism with overweight and obesity in Vietnamese populations.

Keywords: rs7498665, *SH2B1* gene, AS-PCR, overweight, obesity, genotyping.

✉ Tác giả liên hệ: Trần Quang Bình
Email: tranquangbinh@ dinhduong.org.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/923

Nhận bài: 17/6/2025 Chính sửa: 22/6/2025
Chấp nhận đăng: 24/6/2025
Công bố online: 25/5/2025

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thừa cân và béo phì là tình trạng tích tụ mỡ thừa quá mức hoặc không bình thường tại một vùng cơ thể hoặc toàn cơ thể, gây ảnh hưởng đến sức khỏe [1]. Đây là yếu tố nguy cơ quan trọng của nhiều bệnh mạn tính không lây như đái tháo đường type 2, bệnh tim mạch, tăng huyết áp, rối loạn lipid máu, và một số loại ung thư như ung thư đại trực tràng và ung thư vú sau mãn kinh. Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2022, có khoảng 1,9 tỷ người trưởng thành bị thừa cân, trong đó hơn 650 triệu người béo phì trên toàn cầu [1]. Tại Việt Nam, tình trạng thừa cân, béo phì cũng đang gia tăng nhanh trong những năm gần đây, đặc biệt ở khu vực thành thị và trong nhóm người trung niên. Theo “Tổng điều tra Dinh dưỡng toàn quốc 2019–2020” do Viện Dinh dưỡng thực hiện, tỷ lệ thừa cân và béo phì ở người trưởng thành tăng từ 10,5% năm 2005, 14,8% năm 2010 lên 19,9% năm 2015, và đạt 21,3% vào năm 2020. Trong nhóm người từ 40–59 tuổi, tỷ lệ thừa cân và béo phì dao động từ 26% đến 32% [2].

Cùng với lối sống, yếu tố di truyền đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành thừa cân và béo phì. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu báo cáo vai trò của một số đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism-SNP) trên gene làm tăng tính nhạy cảm đối với béo phì, như đa hình gene *FTO* rs9939609 làm tăng cảm giác thèm ăn và tổng năng lượng tiêu thụ hàng ngày, từ đó làm tăng chỉ số khối cơ thể (BMI) và nguy cơ béo phì [4]; đa hình gene *MC4R* rs17782313 cũng liên quan đến tích mỡ vùng bụng và tăng nguy cơ béo phì ở người lớn [5]. Gene *SH2B1* (Src homology 2B adaptor protein 1) thuộc họ gene *SH2B* (Src 2B) có vai trò quan trọng trong điều hòa cân bằng năng lượng và cảm giác no thông qua tín hiệu

insulin và leptin - hai hormone quan trọng kiểm soát cảm giác đói và chuyển hóa năng lượng, có liên quan rõ rệt đến nguy cơ béo phì. Các nghiên cứu GWAS trên Thế giới đã xác định các SNP trong vùng gene *SH2B1*, như rs7498665, rs4788102 và rs7359397, có liên quan đến tăng nguy cơ thừa cân và béo phì ở các quần thể khác nhau. Đa hình đơn nucleotide rs7498665 (Thr484Ala) nằm trong vùng mã hóa của gene *SH2B1*. Allele G của rs7498665 có liên quan đến chỉ số BMI cao hơn, tăng nguy cơ béo phì và tỉ lệ tích mỡ nội tạng. Người mang kiểu gene GG thường có xu hướng tăng cảm giác thèm ăn và giảm độ nhạy với leptin – góp phần hình thành tình trạng tích mỡ kéo dài. Nghiên cứu trên quần thể Châu Âu cho thấy người mang allele G có nguy cơ béo phì cao hơn khoảng 20–25% (với OR $\approx 1,21$) so với kiểu gene AA, và mức BMI trung bình tăng từ 0,3–0,8 đơn vị [9, 10]. Mặc dù, đa hình rs7498665 không trực tiếp làm thay đổi hoạt động enzyme hay cấu trúc protein một cách rõ rệt, nhưng biến thể này có thể ảnh hưởng đến biểu hiện của *SH2B1* tại vùng dưới đồi, nơi điều hòa cảm giác đói – no [11]. Do đó, rs7498665 được xem là một dấu ấn di truyền có giá trị trong tiên lượng nguy cơ thừa cân, béo phì, đặc biệt khi kết hợp với yếu tố môi trường như chế độ ăn dư thừa và lối sống ít vận động.

Hiện nay, nhiều kỹ thuật dựa trên phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction-PCR) đã được ứng dụng trong phân tích SNP, bao gồm RFLP-PCR (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), AS-PCR, ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System PCR), T-ARMS PCR (Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System PCR), Realtime-PCR

và giải trình tự gen theo phương pháp Sanger. Trong số đó, kỹ thuật PCR đặc hiệu alen (Allele-Specific PCR: AS-PCR) được đánh giá là phương pháp có nhiều ưu điểm vượt trội nhờ độ đặc hiệu và độ chính xác cao, không yêu cầu trang thiết bị phức tạp và quy trình thiết kế phản ứng tương đối đơn giản.

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tối ưu quy trình AS-PCR để

phân tích SNP *SH2B1* rs7498665 trên đối tượng người trưởng thành thừa cân và béo phì. Kết quả thu được sẽ đóng vai trò làm cơ sở cho việc áp dụng phương pháp này trong các nghiên cứu dịch tễ học di truyền quy mô lớn nhằm đánh giá mối liên quan giữa đa hình gene *SH2B1* và nguy cơ thừa cân, béo phì ở người trưởng thành Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 63 mẫu ADN đã tách chiết và lưu -80° tại Phòng thí nghiệm Gen-Dinh dưỡng, Khoa Dinh dưỡng và Bệnh không lây nhiễm, Viện Dinh dưỡng Quốc Gia. Các mẫu ADN này có nồng độ 20 ng/μl trở lên và độ tinh sạch đảm bảo với tỉ số A260/A280 là 1,8-2,0. Các mẫu ADN

thuộc các đối tượng của đề tài “Nghiên cứu thuần tập 5 năm về bệnh đái tháo đường týp 2 và hội chứng chuyển hóa ở người Việt Nam: Vai trò yếu tố di truyền và lối sống” mã số 106-YS.01-2015.10. Nghiên cứu được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

2.2. Thiết kế môi đặc hiệu cho phản ứng AS-PCR

Nguyên lý AS-PCR: Đa hình đơn nucleotide rs7498665 nằm trên nhiễm sắc thể số 16 (chr16:28871920, theo bản đồ hệ gene GRCh38.p13) và được xác định thuộc trình tự gene *SH2B1*, theo dữ liệu từ ngân hàng gene NCBI (NC_000016.10, vị trí 28871920). Trong nghiên cứu này, hai phản ứng PCR độc lập được tiến hành song song nhằm phân biệt và phát hiện sự hiện diện của hai allele đặc hiệu là allele G và allele A. Các cặp mồi được thiết kế sao cho đầu 3' của mồi xuôi (forward primer) hoặc mồi ngược (reverse primer) trùng khớp chính xác với nucleotide tại vị trí SNP, đảm bảo tính đặc hiệu cho từng allele [12].

Quy trình thiết kế mồi: Các cặp mồi được thực hiện theo nguyên tắc do Wangkumhang và cộng sự (2007) đề xuất [12], bao gồm các bước: (i) thu thập trình tự 200 nucleotide bao quanh SNP mục

tiêu từ cơ sở dữ liệu NCBI SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>); (ii) xác định nucleotide tại vị trí gây không tương hợp (mismatch); (iii) thiết kế các cặp mồi đặc hiệu allele được thiết kế sao cho đầu 3' trùng khớp tuyệt đối với nucleotide đặc hiệu tại vị trí SNP, nhằm đảm bảo chỉ khuếch đại trình tự chứa allele tương ứng. Để tăng cường tính đặc hiệu, tại vị trí kề cận đầu 3' cần chèn thêm một nucleotide không tương thích với khuôn mẫu (mismatch), giúp phân biệt rõ hơn giữa các allele tương tự nhau. Bên cạnh đó, các cặp mồi được thiết kế với chiều dài từ 18–22 nucleotide, hàm lượng G/C trong khoảng 40–60% và nhiệt độ nóng chảy (T_m) nằm trong khoảng 50–65°C được tính toán dựa trên website: <https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (Bảng 1).

Bảng 1. Primer SNP rs7498665 gen SH2B1 và các thông số

Primer	Trình tự primer 5' - 3'	Primer (bp)	GC (%)
Mũi xuôi F (chung)	TTGGGTTCTCAGCTTTGCC	19	52,6
Mũi ngược phát hiện allele A(R _A)	AGGGGATGAACTGTCCCTAT	20	50
Mũi ngược phát hiện allele G(R _G)	AGGGGATGAACTGTCCCTAC	20	55

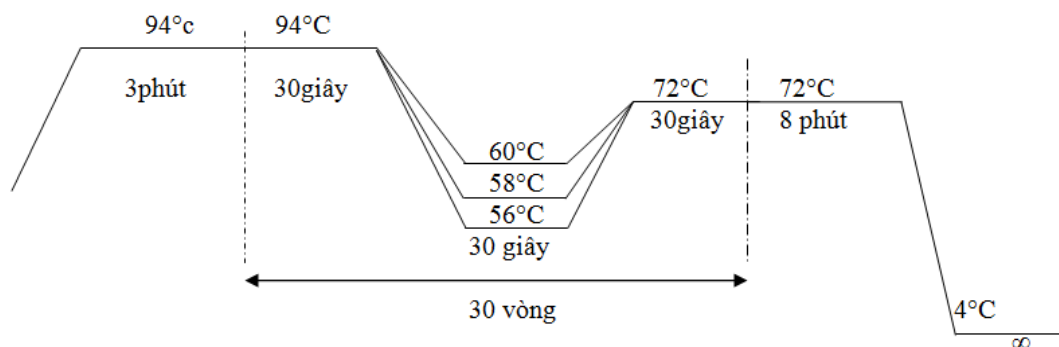
Các hóa chất, máy móc được sử dụng trong quy trình phân tích gen gồm bộ kit tách chiết DNA Winzard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Mỹ), nước khử ion (Fermentas, Mỹ), Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Mỹ), mũi

(IDT, Mỹ), agarose (Promega, Mỹ), đệm TBE (Fermentas, Mỹ), Redsafe (Ion, Hàn Quốc), máy NanoDrop 2000 (Nhật Bản), máy vortex (Eppendorf, Đức), máy PCR mastercycler epgradient (Eppendorf), máy điện di Mupid Exu (Nhật Bản) và máy chụp Geldoc (BioRad, Mỹ).

2.3. Tối ưu quy trình AS-PCR

Nhằm đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong việc phát hiện các biến thể đơn nucleotide. Quá trình tối ưu hóa quy trình cần được thực hiện để chuẩn hóa các thông số phản ứng như nhiệt độ gắn mũi (annealing temperature, T_a), nồng độ $MgCl_2$, nồng độ mũi và số chu kỳ PCR. Nhiệt độ gắn mũi được tối ưu trong khoảng 55–65°C để giảm bắt cặp không đặc hiệu, trong khi nồng độ $MgCl_2$ được điều chỉnh (thường từ 1,5–2,5 mM) để đạt được hiệu quả khuếch đại tối ưu. Ngoài ra, nồng độ mũi từ 0,2–0,5 μM và enzyme ADN polymerase với độ chính xác cao cũng được sử dụng để tăng hiệu quả phản ứng. Một phương pháp PCR gradient

được tiến hành để xác định nhiệt độ gắn mũi với dãy nhiệt độ gắn mũi thử nghiệm là 56°C, 58°C và 60°C. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: Biến tính ban đầu 94°C trong 3 phút, 32–35 chu kỳ (vòng tùy theo nồng độ ADN ban đầu): biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mũi ở dải nhiệt 56°C/58°C/60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây, thời gian kéo dài cuối cùng là 72°C trong 8 phút, bảo quản ở 4°C (Hình 1). Sản phẩm PCR được đánh giá trên thạch agarose 1,5% có nhuộm Redsafe và quan sát với hệ thống chụp ảnh điện di Geldoc-It™ (BioRad, Mỹ).

**Hình 1.** Chu trình nhiệt của phản ứng tối ưu hóa quy trình PCR gradient.

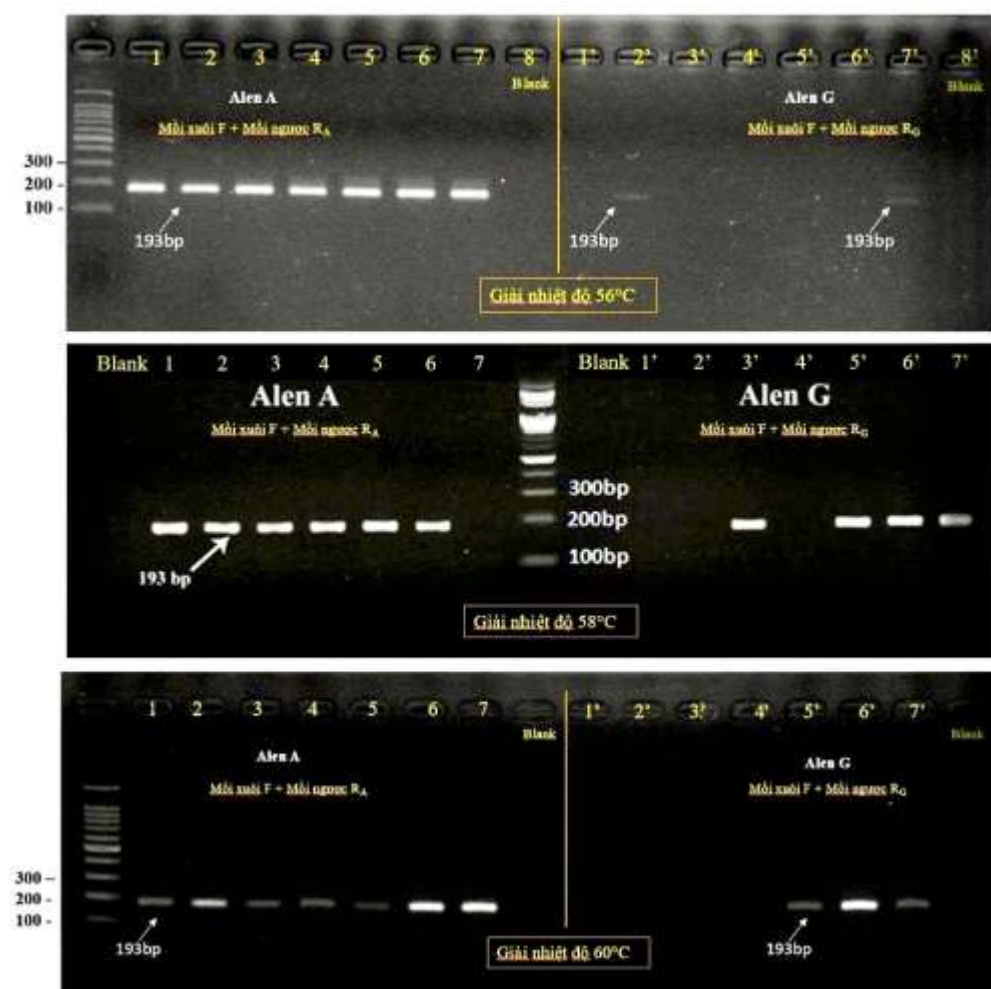
2.4. Xác định kiểu gen chuẩn làm đối chứng bằng phương pháp giải trình tự

Để xác minh độ chính xác của kiểu gen từ phương pháp AS-PCR, phương pháp giải trình tự Sanger đã được sử dụng như một tiêu chuẩn đối chứng. ADN tổng số được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu: 5'-TTGGGTTCCTCAGCTTTGCC-3' và 5'-CTTGCCTTCCCCTCAAGG-3'. Ba mẫu đại diện mang các kiểu gen khác nhau từ

quy trình AS-PCR được lựa chọn, và mỗi mẫu sử dụng 30 µl sản phẩm PCR để thực hiện giải trình tự nucleotide tại công ty Integrated ADN Technologies (IDT), Malaysia. Dữ liệu trình tự được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2.6 nhằm xác định chính xác kiểu gen và đánh giá độ phù hợp giữa kết quả AS-PCR và trình tự nucleotide.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tối ưu điều kiện phản ứng AS-PCR xác định SNP rs7498665 gen *SH2B1*



Hình 2. Kết quả thử nghiệm dài nhiệt độ gắn mồi.

Bảng sản phẩm PCR gradient của giải nhiệt độ 56°C, 58°C và 60°C. Giếng số 8 và 8' là mẫu nước (không có ADN khuôn mẫu), giếng đầu tiên là thang chỉ thị ADN 100 bp (Invitrogen), đến giếng từ 1, (1') đến 8 (8') giống nhau tương ứng có chứa ADN mẫu cần phân tích kiểu gen tương ứng.

Quy trình PCR được thực hiện với hai cặp mồi riêng biệt, mỗi cặp mồi nhận biết một nucleotide. Trình tự mồi nhân dòng trong phản ứng PCR để phát hiện allele A gồm: mồi xuôi F (chung): 5' TTGGGTTCTCAGCTTTGCC 3' và mồi ngược R_A: 5' AGGGGATGAACTGTCCCTAT 3'; và phản ứng PCR để phát hiện allele G gồm: mồi xuôi F (chung): 5' TTGGGTTCTCAGCTTTGCC 3' và mồi ngược R_G: 5' AGGGGATGAACTGTCCCTAC 3'. Sản phẩm PCR khi kiểm tra trên cơ sở dữ liệu genome có kích thước 193bp.

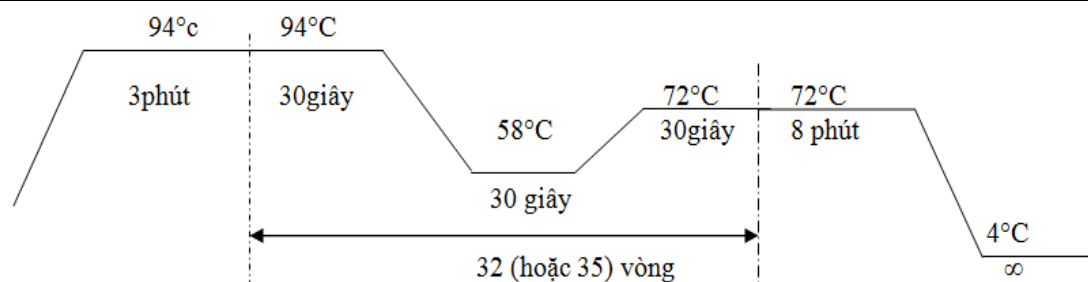
Để chọn được nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR, sử dụng phương pháp PCR gradient với cặp mồi đã thiết kế. Kết quả điện di trên gel cho thấy gradient nhiệt độ từ 56°C đến 60°C đều xuất hiện

băng có kích thước khoảng 193 bp (Hình 2). Với nhiệt độ bắt mồi 56°C và 60°C cho kết quả băng điện di trên gel agarose không rõ gây ảnh hưởng đến nhận định kết quả. Ở nhiệt độ bắt mồi 58°C cho băng điện di sản phẩm PCR lên rõ nét, không có sản phẩm phụ.

Qua nhiều lần thí nghiệm và điều chỉnh nồng độ primer và nhiệt độ gắn mồi, nghiên cứu đã xác định được quy trình phân tích đa hình SNP rs7498665 với trình tự mồi nhân dòng và thành phần trong phản ứng PCR (Bảng 2) và nhiệt độ gắn mồi là 58°C với 32-35 chu kỳ luân nhiệt [94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 40 giây], tiếp tục kéo dài 72°C trong 8 phút và bảo quản sản phẩm ở 4°C (Hình 3).

Bảng 2. Thành phần của một phản ứng PCR trong phương pháp AS-PCR

PCR phát hiện alen A		PCR phát hiện alen G	
Thành phần	Lượng (μL)	Thành phần	Lượng (μL)
Water, nuclease-free	1,3	Water, nuclease-free	1,3
PCR Master mix	2,5	PCR Master mix	2,5
Mồi xuôi F	0,35	Mồi xuôi F	0,35
Mồi ngược R _A	0,35	Mồi ngược R _G	0,35
ADN mẫu	1,0	ADN mẫu	1,0
Tổng	5,5	Tổng	5,5



Hình 3. Chu trình nhiệt của phương pháp AS-PCR SNP rs7498665 gen SH2B1

Sản phẩm sau phản ứng PCR được điện di trên thạch agarose 1,5 % đã được nhuộm Redsafe, đệm TBE 0,5x, ở 100v trong 40 phút, và chụp hình bằng máy GelDoc để xác định sự có mặt của các

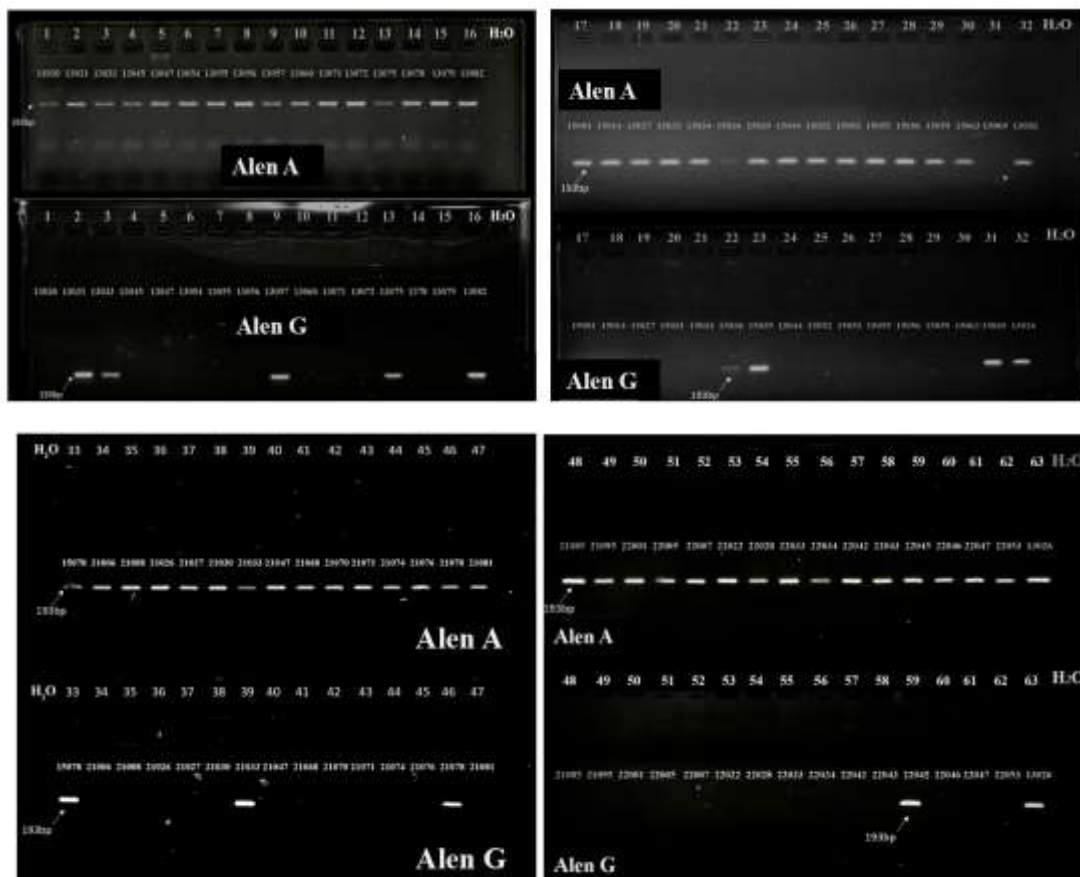
alen trong SNP dựa trên sự xuất hiện của sản phẩm PCR sau điện di. Băng thu được có kích thước 193bp với 3 trường hợp xảy ra: đồng hợp tử AA, dị hợp tử AG và đồng hợp tử GG (Bảng 4)

Bảng 4. Nhận định kết quả điện di kết quả SNP rs7498665 gen SH2B1

Trường hợp	PCR phát hiện alen A	PCR phát hiện alen G	Kết quả
1	+	-	AA
2	-	+	GG
3	+	+	AG

(+): xuất hiện băng; (-): không xuất hiện băng,

3.2. Thực hiện quy trình trên các mẫu ADN

**Hình 4.** Kết quả điện di 64 sản phẩm PCR theo phương pháp AS-PCR.

Các băng ADN tương ứng với số 1-63 là các mẫu PCR điện di trên thạch agarose 1,5%, TBE 0,5X. H₂O: chứng âm.

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy sản phẩm được nhuộm RedSafe và chụp bằng máy GelDoc. Với kiểu gene đồng hợp tử allele AA chỉ xuất hiện băng sáng tại vị trí 193bp với phản ứng PCR nhận diện allele A, với kiểu gene đồng hợp tử allele đột biến GG chỉ xuất hiện một băng sáng tại

vị trí 193bp với phản ứng PCR nhận diện allele G, với kiểu gene dị hợp tử AG xuất hiện băng sáng tại vị trí 193 bp ở cả hai phản ứng nhận diện allele A và allele G (Hình 4). Như vậy, ADN của các mẫu đều đảm bảo chất lượng để thực hiện phản ứng; chứng âm không xuất hiện băng đảm bảo phản ứng PCR thực hiện đúng

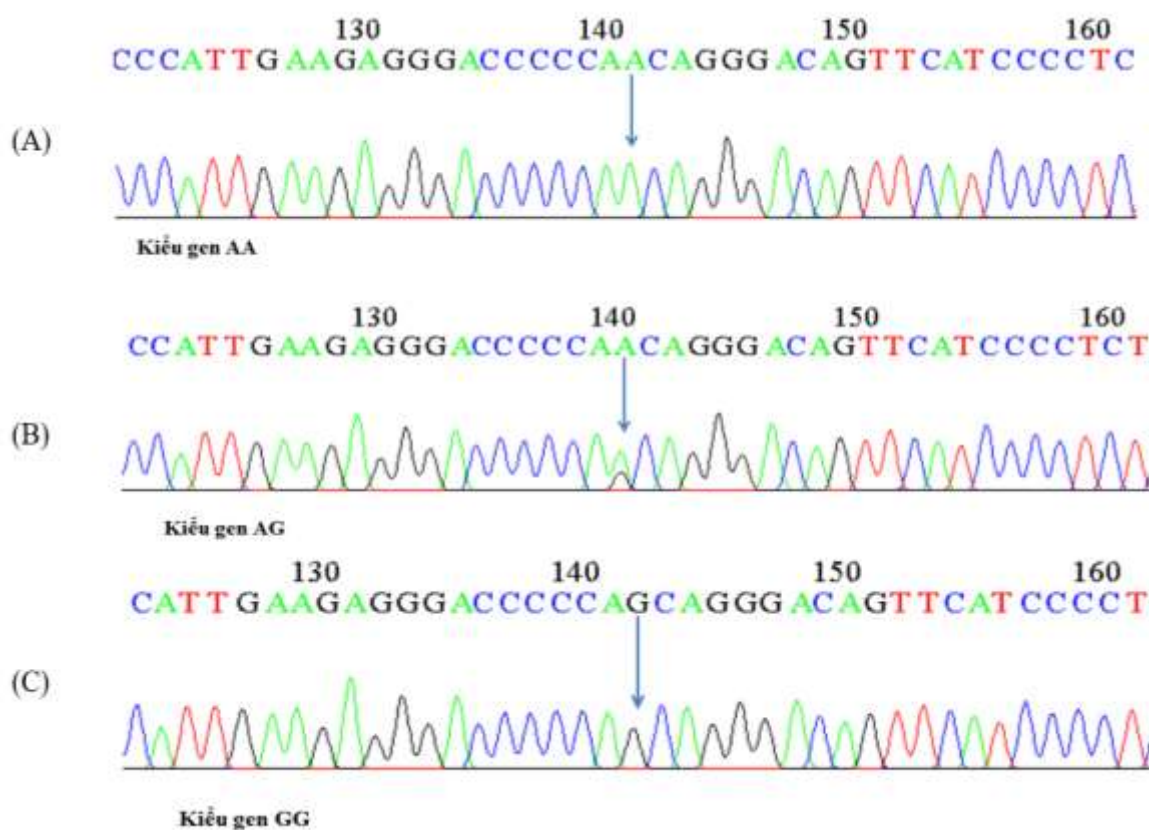
kỹ thuật. Có thể thấy, đối với phản ứng mỗi đặc hiệu cho allele đột biến G và allele thường A tại nhiệt độ gần mỗi 58°C

là rất tốt, không xảy ra tình trạng mỗi đột biến lại được khuếch đại ở mẫu đồng hợp allele thường GG và ngược lại.

3.3. Giải trình tự kiểu gen thu được của phản ứng AS-PCR

Lựa chọn 3 mẫu đã biết kiểu gene, 3 mẫu này tương ứng với 3 kiểu gene AA, AG và GG được xác định bằng phương pháp AS-PCR, để gửi đi giải trình tự. Kết quả cho thấy độ tương đồng là 100% giữa

kiểu gene xác định bằng AS-PCR và giải trình tự DNA, trình tự nucleotide thu được trùng với trình tự nucleotide trên Genebank chuẩn chứa đa hình *SH2B1* rs7498665 (Hình 5).



Hình 5. Kết quả giải trình tự gen của 3 kiểu gen của SNP rs7498665 gen *SH2B1*.

(A) Mẫu đồng hợp allele AA có một đỉnh nucleotide A duy nhất;

(B) Mẫu dị hợp allele AG có hai đỉnh nucleotide A và nucleotide G lồng vào nhau;

(C) Mẫu đồng hợp allele GG có một đỉnh nucleotide G duy nhất.

IV. BÀN LUẬN

Để phân tích đa hình đơn gene *SH2B1* rs7498665, nghiên cứu đã lựa chọn phương pháp AS-PCR để xác định kiểu gene của SNP rs7498665 trên gene

SH2B1. AS-PCR là một kỹ thuật PCR chuyên biệt, cho phép phân biệt các allele khác nhau của một locus gene dựa trên sự khác biệt chỉ tại một nucleotide duy nhất.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, quy trình AS-PCR được tối ưu hóa có độ lặp lại tốt, mỗi có độ đặc hiệu và độ chính xác cao trong việc phân tích đa hình *SH2B1* rs7498665. Phương pháp này đã được ứng dụng thành công trên 63 mẫu ADN, với khả năng khuếch đại ổn định khi nồng độ ADN đầu vào ≥ 20 ng/ μ l. Đặc biệt, khi so sánh kết quả kiểu gene thu được từ phương pháp AS-PCR với kết quả từ giải trình tự ADN, không ghi nhận sự khác biệt, cho thấy AS-PCR có độ chính xác tương đương với phương pháp giải trình tự. Tuy nhiên, một trong những hạn chế đáng lưu ý của kỹ thuật AS-PCR là tính phụ thuộc cao vào thiết kế mồi. Chỉ một sai lệch duy nhất tại nucleotide ở đầu 3' của mồi cũng có thể dẫn đến thất bại của phản ứng PCR. Để khắc phục nhược điểm này, phương pháp AS-PCR thường sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu thực hiện song song trong hai phản ứng PCR riêng biệt nhằm phân biệt allele dạng dại và allele đột biến. Trong đó, bước thiết kế mồi được xem là yếu tố then chốt quyết định độ tin cậy và tính đặc hiệu của toàn bộ quy trình. Nhằm nâng cao hiệu quả phân biệt giữa các allele, ngoài việc đặt nucleotide đặc hiệu tại vị trí 3', các mồi còn được bổ sung thêm một nucleotide sai khác (*mismatch*) tại vị trí thứ hai tính từ đầu 3'. Thiết kế này giúp tăng cường khả

năng phân biệt giữa các allele có trình tự gần giống nhau. Nhiều nghiên cứu đã xác nhận tính ưu việt của kỹ thuật AS-PCR so với các phương pháp PCR truyền thống, đặc biệt là ở khả năng tái lặp và độ tương đồng cao với kết quả thu được từ giải trình tự gene. Vì vậy, chúng tôi khuyến khích sử dụng phương pháp AS-PCR để xác định kiểu gene cho SNP rs7498665 gene *SH2B1*.

Kiểu gene của SNP rs7498665 được xác định bằng phương pháp AS-PCR với quy trình tối ưu hóa sử dụng mồi thiết kế đặc hiệu cho từng allele. Kết quả điện di cho thấy các sản phẩm khuếch đại rõ ràng, đặc hiệu, không xuất hiện băng phụ hay hiện tượng tạo primer dimer, chứng tỏ mồi hoạt động hiệu quả và phản ứng PCR đạt độ đặc hiệu cao. Các mẫu chứng âm không có sản phẩm khuếch đại, khẳng định phản ứng không bị nhiễm chéo và quy trình thí nghiệm được kiểm soát nghiêm ngặt. Kết quả AS-PCR hoàn toàn tương đồng với giải trình tự Sanger, cho thấy độ chính xác và độ tin cậy cao của phương pháp. Việc tối ưu này góp phần nâng cao độ đặc hiệu, độ tin cậy của kết quả, đồng thời rút ngắn thời gian thao tác và giảm chi phí xét nghiệm, tạo tiền đề cho việc ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc và nghiên cứu dịch tễ học di truyền.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình phân tích kiểu gene của đa hình đơn nucleotide rs7498665 gene *SH2B1* liên quan đến thừa cân, béo phì bằng phương pháp AS-PCR. Kết quả thử nghiệm phân tích gene trên 63 mẫu ADN quy trình có độ ổn định tốt và kiểu gene

thu được trùng với kiểu gene khi giải trình tự nucleotide. Kết quả này là tiền đề quan trọng để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về vai trò của đa hình rs7498665 trên gene *SH2B1* liên quan đến bệnh thừa cân, béo phì trên cỡ mẫu lớn ở nhiều quần thể người Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO; 2022 [accessed 2025 Jun 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Bộ Y tế. Báo cáo tóm tắt kết quả Tổng điều tra dinh dưỡng toàn quốc 2019–2020. Truy cập ngày 10/6/2025 https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset_publisher/3Yst7YhbKA5j/content/bo-y-te-cong-bo-ket-qua-tong-ieu-tra-dinh-duong-nam-2019-2020
3. Nguyễn Thị Lâm, Phạm Hùng Cường, Trần Thị Thu Hà. Đặc điểm dinh dưỡng và lối sống ở người trưởng thành trung niên tại Việt Nam. *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*. 2019;4:45–52. .
4. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007;39(6):724–6. .
5. Loos RJF, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet*. 2008;40(6):768–75.
6. Sztalryd C, & Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(10):1221–1232.
7. Farooqi IS, & O’Rahilly S. Leptin and human obesity: lessons from the leptin gene mutation. *Endocrine Reviews*. 2008;29(2):161–179.
8. Tontonoz P, & Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry*. 2008;77:289–312.
9. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet*. 2009;41(1):18–24. .
10. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet*. 2009;41(1):18–24. .
11. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*. 2010;463(7281):666–70. .
12. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, et al. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomic*. 2007;8:275 – 283.
13. Jamshidi Y, Snieder H, Ge D, Spector TD, O’Dell SD. The SH2B gene is associated with serum leptin and body fat in normal female twins. *Obesity* (Silver Spring). 2007;15(1): 5–9.
14. Thorleifsson G, Walters GB et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Gene*. 2009;41:18 - 24.
15. Willer CJ, Speliotes EK, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 2009;41(1):25 – 34.
16. Renström F, Payne F, Nordström A, Brito EC, et al. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet*. 2009;18:1489 - 1496.
17. Beckers S, Zegers D, Van Gaal LF, Van Hul W. Replication of the SH2B1 rs7498665 association with obesity in a Belgian study population. *Obes Facts*. 2011;4:473 - 477.
18. Shi J, Long J, Gao YT, Lu W, Cai Q, Wen W, et al. Evaluation of genetic susceptibility loci for obesity in Chinese women. *Am J Epidemiol*. 2010;172:244-254.
19. Ng MC, Tam CH, So WY, Ho JS, Chan AW, et al. Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTCH2, BCDIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2418 - 2425.