

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NHỮNG BIẾN ĐỔI ĐA HÌNH GEN GSTO1 Ở TRẺ SƠ SINH BỊ PHƠI NHIỄM ASEN TRƯỚC SINH

Tạ Thị Bình³, Trần Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Minh Thu^{1,2}, Nguyễn Hữu Đức²,
Nguyễn Thị Kim Liên¹, Nguyễn Huy Hoàng^{1*}

¹*Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;*

²*Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;*

³*Viện Y học lao động và Vệ sinh môi trường*

Email*: nhhoang@igr.ac.vn

Ngày gửi bài: 26.04.2013

Ngày chấp nhận: 22.08.2013

TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, ô nhiễm asen cũng như tác động của các yếu tố ô nhiễm lên sức khỏe cộng đồng ngày càng trở thành vấn đề quan trọng và nghiêm trọng trên thế giới, đặc biệt đối với các nước đang phát triển. Cùng với các enzyme trong tế bào, glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1) là enzyme khử độc giai đoạn II trong quá trình chuyển hóa các chất độc ngoại lai ở rất nhiều loài động vật và cả ở người, xúc tác quá trình methyl hóa asen. Hiệu suất methyl hóa asen phụ thuộc vào đa hình di truyền ở mức độ cá thể. Để bước đầu đánh giá những biến đổi đa hình nucleotide đơn gen GSTO1, kỹ thuật PCR-RFLP (đa hình độ dài đoạn hạn chế) đã được sử dụng. Trong nghiên cứu này, cả hai SNP rs11509438 và SNP rs15032 ở 4 mẫu nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử CC. Kết quả này là tiền đề cho nghiên cứu đa hình di truyền ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh.

Từ khóa: Đa hình nucleotide đơn, GSTO1, PCR-RFLP, phơi nhiễm asen.

Early Evaluation o GSTO1 Polymorphisms of in Fants with Pre-born Exposure to Arsenic

ABSTRACT

In recent years, arsenic contamination as well as its effects on public health are increasingly becoming important and serious issues in worldwide, especially in developing countries. Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1) is a phase II enzymatic detoxification of xenobiotics in a variety of animals including humans, catalyzing the arsenic methylation. The efficiency of arsenic methylation is influenced by genetic polymorphisms at individual level. To assess the variations of single nucleotide polymorphisms of GSTO1, PCR-RFLP technique was utilized. In this study, both SNP rs11509438 and SNP rs15032 in four studied samples were found homozygous CC. These results may serve as basis for further studies on genetic polymorphisms of infants with pre-born arsenic exposure.

Keywords: Arsenic exposure, GSTO1, PCR-RFLP, single nucleotide polymorphism.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Asen (As) đã được phân loại là chất gây ung thư ở người (Humans, 2004). Tuy nhiên, trên thế giới có hàng triệu người vẫn đang phơi nhiễm As với mức độ tương đối cao thông qua hít thở không khí, hấp thụ thức ăn và qua nước uống bị nhiễm asen (Mandal and Suzuki, 2002). Việt Nam cũng là một trong những nước nằm trong vùng có ô nhiễm asen nguồn nước ngầm trên bản đồ thế giới. Hội đồng Châu Âu cho

phép mức tối đa asen trong nước ăn uống là 10 µg/L, tương tự với chỉ số mà Tổ chức Y tế thế giới (WHO) khuyến cáo cũng như tiêu chuẩn của Việt Nam hiện nay. Đến nay đã có khá nhiều các nghiên cứu đánh giá mức độ ô nhiễm asen nguồn nước ngầm ở Việt Nam, đặc biệt là vùng đồng bằng sông Hồng. Kết quả nghiên cứu phát hiện ô nhiễm asen trong nước giếng khoan tại xã Hoà Hậu, huyện Lý Nhân đến 83,3% trung bình từ 121,33 ± 104,90 µg/L. Trong 5

năm từ 2005 đến 2009 gần 100.000 giếng khoan của 17 tỉnh đồng bằng miền Bắc, miền Trung, miền Nam được khảo sát về nồng độ asen trong nước (Lê Đình Minh, Bùi Văn Trường, 2002). Kết quả cho thấy nguồn nước ngầm của các tỉnh vùng lưu vực sông Hồng (Hà Nam, Nam Định, Hà Tây, Hưng Yên, Vĩnh Phúc) và các tỉnh (An Giang, Đồng Tháp) thuộc lưu vực sông Mê Kông bị nhiễm asen cao. Khi cơ thể phơi nhiễm asen vô cơ, chất hóa học này nhanh chóng được đưa đến bào thai ở các phụ nữ đang mang thai làm tăng nguy cơ sảy thai, sinh non hoặc tử vong sơ sinh (Carty et al., 2007) hoặc gây giảm cân ở trẻ sơ sinh dù chỉ phơi nhiễm ở một lượng rất nhỏ. Một nghiên cứu trên 29.134 các bà mẹ có thai ở Bangladesh cho thấy, có sự liên quan đáng kể giữa phơi nhiễm asen thời kỳ trước sinh và số trẻ còn sống sau sinh. Các bà mẹ phơi nhiễm asen trong nước uống với mức cao hơn 50 microgam/l trong thời kỳ thai nghén có sự tăng đáng kể tỷ lệ sảy thai và trẻ chết trong năm đầu đời (Rahman et al., 2010).

GST là một trong hai enzyme quan trọng trong quá trình chuyển hóa sinh học, có chức năng quan trọng trong cân bằng nội môi và có tác dụng khử các chất độc hại ngoại lai bằng việc xúc tác glutathione khử. Họ enzyme GST bao gồm 7 phân lớp α , μ , ω , π , θ , σ , và ζ , trong đó GSTO thuộc phân lớp ω . Các thành viên của họ enzyme này có khả năng xúc tác cho sự hình thành một liên kết giữa các thiol trong glutathione (GSH) và asen vô cơ hóa trị 3. Những hợp chất As-GSH này là chất nền tiết ra từ các tế bào nhiễm As. Trong số các đồng phân GSTO, GSTO1 liên quan tới sự khử arsenate (As^V), acid monomethylarsonic (MMA^V), và acid dimethylarsinic (DMA^V) (Mukherjee et al., 2006).

Sự thay đổi các protein GSTO1 do các biến thể di truyền trong chuỗi DNA mã hóa cho các thay đổi amino acid có thể ảnh hưởng đến đáp ứng với phơi nhiễm As mãn tính (Reyes et al., 2010). Vì vậy, biến đổi kiểu gen cũng có thể làm ảnh hưởng đến con đường chuyển hóa asen, hoặc là nguyên nhân dẫn đến các triệu chứng ngộ độc As và gây ung thư. Sự sai khác về MMAs trong nước tiểu giữa các cá thể liên quan đến sự đa hình di truyền (Vahter, 2009). Tuy nhiên, để kết luận đa hình di truyền chỉ ảnh hưởng lên quá trình chuyển hóa asen hay đó là nguyên nhân gây ra các bệnh tật khác do phơi nhiễm asen thì vẫn còn chưa rõ ràng. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR-RFLP được sử dụng để đánh giá những biến đổi đa hình gen GSTO1, tạo cơ sở dữ liệu cho việc đánh giá mức độ tổn thương di truyền gen gây ra do asen để từ đó làm tiền đề cho việc đưa ra các biện pháp dự phòng hạn chế ảnh hưởng của phơi nhiễm As trước sinh đến sự phát triển của trẻ em.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng 4 mẫu máu cuống rốn (VH-06, VN-06, VB-24, VH-01) của trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh làm DNA khuôn. Chúng được thu thập từ Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Nam – vùng được đánh giá có mức độ ô nhiễm asen cao. Các bà mẹ khi mang thai đều đã được tiến hành các xét nghiệm để xác định nồng độ asen tổng số trong nước tiểu vượt quá mức cho phép ($>60\mu\text{g/L}$).

Các điểm đa hình nucleotide đơn được nghiên cứu và cặp mỗi đặc hiệu cũng như enzyme giới hạn được chọn lọc theo nghiên cứu của Agusa et al. (2009) (Bảng 1).

Bảng 1. Điểm đa hình nucleotide đơn, trình tự cặp môi, enzyme giới hạn và kích thước các đoạn cắt theo Agusa et al. (2009)

SNP ID	Thay đổi nucleotit	Thay đổi acid amine	Trình tự môi	Enzyme giới hạn	Kích thước các đoạn cắt (bp)
rs15032	C/A	Thr→Asn	5'-GACCTAGCTCACACCTTTCAT-3' 5'-CACCGTTTGGCTGTTGATGTC-3' (GST4)	MseI	CC: 333 CA: 114, 219, 333 AA: 114, 219
rs11509439	C/T	Ala→Val	F:5'-CTGTGATGTCATCCTAGTTG-3' R:5'-CATGCAACCTGAACCTTGGT-3' (GST5)	StuI	CC: 116, 192 CT: 116, 192, 308 TT: 308

Các hóa chất dùng cho phản ứng PCR (buffer, dNTP, enzyme taq polymerase...) và bộ Kit tách chiết DNA, tinh sạch DNA nhập từ hãng Fermentas PureXtreme (Mỹ) cung cấp. Ngoài ra, một số hóa chất khác còn được chúng tôi sử dụng như: Ethidium Bromide, gel agarose, dung dịch đệm TAE 1X và các hóa chất dùng tách máu như: PBS, protein K, Lysis buffer,... được cung cấp từ nhiều hãng khác nhau như thermo scientific, biobasic,... Các cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi hãng Integrated DNA Technologies. Enzyme giới hạn được nhập của hãng New England Biolabs.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

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

Sau đó, sản phẩm DNA tổng số được tiến hành điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 0,8% và đo quang phổ để xác định nồng độ và độ tinh sạch.

2.2.2. Nhân gen bằng phương pháp PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 25µl, gồm các thành phần: ADN khuôn (100ng), mồi xuôi và mồi ngược (0,4 pmol/µl), dNTP (0,4mM), Taq polymerase (1 U/µl), buffer PCR (1X), nước khử ion vô trùng. Với mỗi mẫu và cặp mồi khác nhau đều áp dụng thành phần tương tự như trên để thu được những đoạn DNA mong muốn.

Chu trình nhiệt trong kỹ thuật PCR của mỗi GST4 và GST5 được thực hiện gồm 30 chu kỳ với gán mỗi lần lượt ở 59°C trong 40 giây và

55°C trong 35 giây kéo dài chuỗi ở 72°C trong 45 giây và 72°C trong 40 giây.

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

Phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme hạn chế cho 20µl gồm các thành phần sau: 2µl RE buffer (1X); 10µl sản phẩm PCR; 0,5µl (10 U/µl) enzyme và 7,5µl H₂O. Hỗn hợp được ủ 2h ở 37°C với enzyme *StuI* và ở 65°C với enzyme *MseI*. Kết quả sản phẩm cắt enzyme giới hạn được kiểm tra trên gel agarose 2%, nhuộm bằng Ethidium bromide và phát hiện dưới ánh sáng UV.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

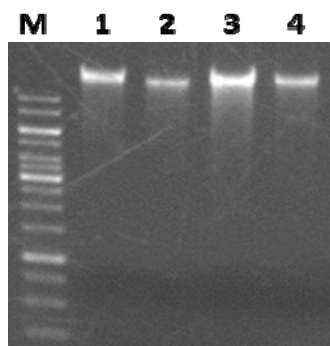
Để kiểm tra độ tinh sạch của dung dịch, mẫu DNA được đo quang phổ ở bước sóng 280 nm. DNA tổng số sau khi tách chiết có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2$) ở bảng 2, có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 1).

3.1. Phân tích đa hình gen GSTO1 rs11509439 bằng *StuI*

Sản phẩm PCR của bốn mẫu (VH- 06, VN-06, VB-24, VH-01) được nhân lên từ cặp mồi GST5 kích thước đoạn nhân là 308 bp có chứa điểm đa hình nucleotide đơn rs11509439 (Hình 2). Hình ảnh điện di trên gel agarose 2% có một băng rõ nét, cho thấy đoạn gen đã được nhân một cách đặc hiệu.

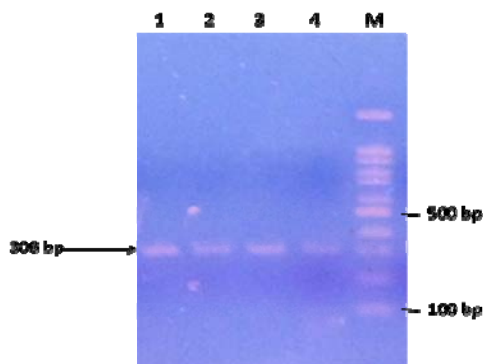
Khi cắt bằng enzyme giới hạn *StuI* thu được 2 băng có kích thước khoảng 116 bp và 192 bp sau khi điện di kiểm tra trên gel agarose 2%. Kết quả cắt sản phẩm PCR từ cặp mồi GST5 được thể hiện ở hình 3.

STT	Mẫu máu	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} / A _{280 nm}	Nồng độ DNA (ng/µl)
1	VN-06	0,013	0,007	1,8571	65
2	VB-24	0,014	0,0073	1,9156	70
3	VH-01	0,018	0,0095	1,8763	90
4	VH-06	0,016	0,0087	1,8328	80



Hình 1. Phổ điện di DNA tổng số từ mẫu máu cuống rốn trên gel agarose 1,5%

(M: Maker – thang DNA chuẩn 1 kb; 1: DNA tổng số mẫu VN-06, 2: DNA tổng số mẫu VB-24, 3: DNA tổng số mẫu VH-01, 4: DNA tổng số mẫu VH-06)



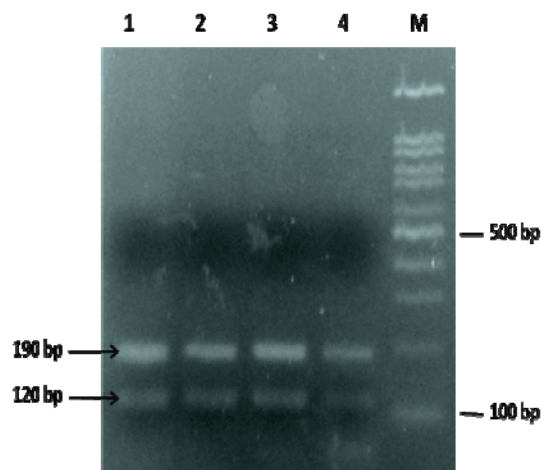
Hình 2. Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp mỗi GST5

(M: Marker – thang DNA chuẩn 100bp; 1: Sản phẩm PCR mẫu VN-06 từ cặp mỗi GST5; 2: Sản phẩm PCR mẫu VB-24 từ cặp mỗi GST5; 3: Sản phẩm PCR mẫu VH-01 từ cặp mỗi GST5; 4: Sản phẩm PCR mẫu VH-06 từ cặp mỗi GST5)

Ở người gen GSTO1 chứa điểm đa hình SNP rs11509439 thuộc exon 9, tại điểm này, nucleotide ban đầu C bị chuyển thành T dẫn đến sự thay đổi amino acid Ala→Val. Theo Agusa et al. (2009), sản phẩm PCR từ cặp mỗi GST5 khi cắt bằng enzyme *StuI* sẽ thu được 3 kiểu gen CC, CT và TT. Theo lý thuyết kiểu gen CC có 2 băng kích thước khoảng 116bp, 192bp, CT thu được 3 băng có kích thước lần lượt là 116bp, 192bp, 308bp, còn kiểu gen TT thu được 1 băng có kích thước 308bp. Hình ảnh điện di

sản phẩm PCR từ cặp mỗi GST5 sử dụng enzyme giới hạn *StuI* thu được 2 băng có kích thước khoảng 120bp à 190bp tương ứng với kích thước của kiểu gen CC theo lý thuyết.

Trong nghiên cứu này không có sự thay đổi nucleotide ở SNP rs11509439 đối với bốn mẫu (VH- 06, VN-06, VB-24, VH-01). Giống với nghiên cứu của Agusa et al. (2009), ông đã không tìm được alen đột biến xuất hiện ở SNP rs11509439 trên dân cư sống vùng đồng bằng sông Hồng. Tuy nhiên, Baidehi Mukherjee et al. (2006) đã tìm ra được tần số đột biến gen trên SNP rs11509439 ở người Mỹ gốc Mexico là 0,05% nhưng không tìm được đột biến ở người Mỹ gốc Phi và người Mỹ gốc Trung Quốc [5]. Ở Mexico những người đã tiếp xúc với asen qua nước uống có thành phần các hợp chất trong nước tiểu bất thường; trong nước tiểu của người có gen GSTO1 thay đổi Glu155del và Glu208Lys thì tỷ lệ AS^V cao và tỷ lệ DMA^V thấp và người có GSTO1 thay đổi Ala140Asp thì tỷ lệ As^{III} cao và tỷ lệ DMA^V thấp (Agusa et al., 2009).

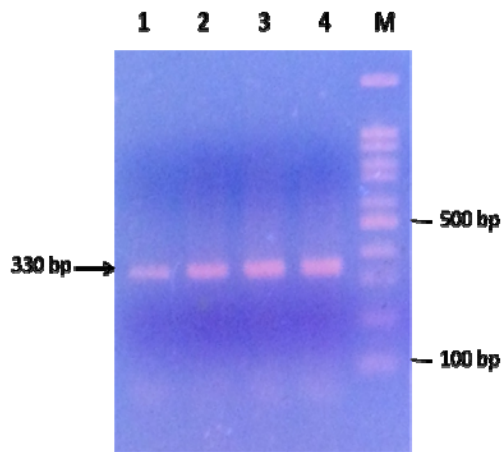


Hình 3. Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp mỗi GST5 được cắt bằng enzyme giới hạn *StuI*

(M: Marker – thang DNA chuẩn 100bp; 1: Sản phẩm PCR mẫu VH-06 từ cặp mỗi GST5 cắt bằng *StuI*; 2: Sản phẩm PCR mẫu VN-06 từ cặp mỗi GST5 cắt bằng *StuI*; 3: Sản phẩm PCR mẫu VB-24 từ cặp mỗi GST5 cắt bằng *StuI*; 4: Sản phẩm PCR mẫu VH-01 từ cặp mỗi GST5 cắt bằng *StuI*)

3.2. Phân tích đa hình gen GSTO1 rs15032 bằng MseI

Sản phẩm của phản ứng PCR của bốn mẫu (VH-06, VN-06, VB-24, VH-01) được nhân lên từ cặp môi GST4 kích thước đoạn nhân là 333 bp có chứa điểm đa hình nucleotide đơn ở rs15032 (hình 4). Hình ảnh điện di trên gel agarose 2% có một băng rõ nét, cho thấy đoạn gen đã được nhân một cách đặc hiệu.



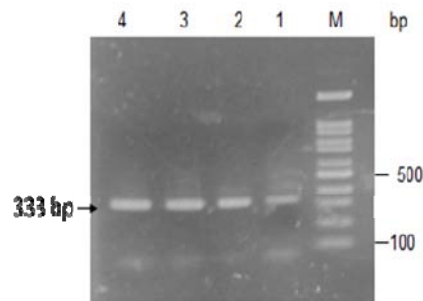
Hình 4. Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp môi GST4

(M: Marker – thang DNA chuẩn 100bp; 1: Sản phẩm PCR mẫu VH-06 từ cặp môi GST4; 2: Sản phẩm PCR mẫu VN-06 từ cặp môi GST4; 3: Sản phẩm PCR mẫu VB-24 từ cặp môi GST4; 4: Sản phẩm PCR mẫu VH-01 từ cặp môi GST4).

Khi cắt bằng enzyme giới hạn *MseI* thu được 1 băng có kích thước khoảng 330 bp sau khi điện di kiểm tra trên gel agarose 2%. Kết quả cắt sản phẩm PCR từ cặp môi GST4 được thể hiện ở hình 5.

Theo Agusa et al. (2010), sản phẩm PCR từ cặp môi GST4 khi cắt bằng enzyme *MseI* sẽ thu được 3 kiểu gen CC, CA và AA. Theo lý thuyết kiểu gen CC có 1 băng kích thước khoảng 333 bp, CA thu được 3 băng có kích thước lần lượt là 114 bp, 219 bp, 333 bp, còn kiểu gen AA thu được 2 băng có kích thước 114 bp và 219 bp. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ cặp môi GST4 sử dụng enzyme giới hạn *MseI* thu được 1 băng có kích thước khoảng 333 bp tương ứng với kích thước của kiểu gen CC theo lý thuyết.

Nghiên cứu này đã không tìm thấy sự thay đổi nucleotide nào tại SNP rs15032 đối với bốn mẫu (VH-06, VN-06, VB-24, VH-01). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Agusa et al. (2009), ông đã không tìm được alen đột biến xuất hiện ở SNP rs15032 trên dân cư sống vùng đồng bằng sông Hồng. Cho đến nay, không có thông tin về sự biến đổi Thr → Asn tại vị trí 217 trên gen GSTO1, mặc dù đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu NCBI là SNP rs15032. Theo nghiên cứu của Tanaka-Kagawa (2003), ông đã tìm được thể đột biến tại SNP rs15032 và thấy rằng thể đột biến CA có hoạt tính khử MMA^V thấp hơn so với các thể hoang dại sử dụng trong *in vitro*.



Hình 5. Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ cặp môi GST4 được cắt bằng enzyme giới hạn *MseI*

(M: Marker – thang DNA chuẩn 100bp; 1: Sản phẩm PCR mẫu VH-06 từ cặp môi GST4 được cắt bằng *MseI*; 2: Sản phẩm PCR mẫu VN-06 từ cặp môi GST4 được cắt bằng *MseI*; 3: Sản phẩm PCR mẫu VB-24 từ cặp môi GST4 được cắt bằng *MseI*; 4: Sản phẩm PCR mẫu VH-01 từ cặp môi GST4 được cắt bằng *MseI*).

4. KẾT LUẬN

Đoạn gen chứa SNP rs11509438 và SNP rs15032 của GSTO1 đã được khuếch đại thành công một cách đặc hiệu với độ dài tương ứng là 308 bp và 333 bp. Sự đa hình gen GSTO1 của SNP rs11509438 và SNP rs15032 cũng đã được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Nguyên lý của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của enzyme giới hạn (Restriction endonuclease) đối với vị trí nhận biết của chúng trên DNA bộ gen mà tại vị trí này có chứa điểm đa hình. Sự khác

biệt vị trí cắt giữa hai cá thể sẽ tạo những phân đoạn cắt khác nhau, vì vậy dựa vào độ dài và số lượng đoạn cắt có thể xác định được kiểu gen tại vị trí đa hình. Cả hai SNP rs11509438 và SNP rs15032 ở 4 mẫu nghiên cứu đều đã tìm được là có kiểu gen đồng hợp tử CC. Quy trình phân tích kiểu gen tại các điểm đa hình trên đã được hoàn thiện và là bước đầu cho những nghiên cứu biến đổi đa hình gen GSTO1 để xác định tần xuất xuất hiện của các alen cũng như xác định mối tương quan giữa đa hình gen GSTO1 và phơi nhiễm asen trước sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum., 84: 1-477.
- Mandal, B.K. and Suzuki K.T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1): 201-35.
- McCarty, K.M., et al. (2007). Arsenic methylation, GSTT1, GSTM1, GSTP1 polymorphisms, and skin lesions. *Environ Health Perspect*, 115(3): 341-345.
- Rahman, A., et al. (2010). Arsenic exposure and risk of spontaneous abortion, stillbirth, and infant mortality. *Epidemiology*, 21(6): 797-804.
- Mukherjee, B., et al. (2006). Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos*. 34(7): 1237-1246.
- Sampayo-Reyes, A., et al. (2010). Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. *Toxicol Sci.*, 117(1): 63-71.
- Vahter, M. (2009). Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annu Rev Nutr*, 29: 381-99.
- Agusa, T., et al. (2010). Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol*, 242(3): 352-62.
- Tanaka-Kagawa, T., et al. (2003). Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem Biophys Res Commun*, 301(2): 516-520.
- Lê Đình Minh và Bùi Văn Trường (2002). Nghiên cứu phát hiện asen, nitrit trong nước giếng khoan, thăm dò khả năng xử lý asen trong phòng thí nghiệm, Viện Y học lao động và Vệ sinh môi trường.