

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *HNF1A* VÀ *GCK* TRONG CHẨN ĐOÁN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG DI TRUYỀN MODY

Mai Phương Thảo<sup>1,\*</sup>, Đỗ Đức Minh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT:

**Mục tiêu:** MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) là một dạng đái tháo đường (ĐTĐ) di truyền đặc biệt với biểu hiện lâm sàng là hội chứng tăng đường huyết mang tính chất gia đình và thường được phát hiện trước 25 tuổi. Đột biến gen *HNF1A* là nguyên nhân thường gặp nhất của ĐTĐ MODY ở Châu Âu, Châu Mỹ cũng như Trung Quốc, Nhật Bản (MODY3). Trong khi đó, đột biến gene *GCK* cũng chiếm tần suất khá lớn trong nhóm bệnh nhân MODY (MODY2). Nghiên cứu này nhằm thiết lập và ứng dụng quy trình kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA nhằm xác định các đột biến của gen *HNF1A* và *GCK* trên bệnh nhân được chẩn đoán MODY trên lâm sàng. **Đối tượng và phương pháp:** Chúng tôi thiết kế các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại 10 exon và vùng tiếp giáp exon-intron của gen *HNF1A* và *GCK*. DNA được tách chiết từ máu ngoại vi của bệnh nhân được chẩn đoán MODY trên lâm sàng. Các mẫu DNA này sau đó được khuếch đại và giải trình tự bằng kỹ thuật Sanger. **Kết quả:** Chúng tôi đã khuếch đại thành công được 10 exon và vùng tiếp giáp exon-intron của gen *HNF1A* và *GCK*. Kết quả giải trình tự không phát hiện đột biến gây bệnh nào trên 2 gen *GCK* và *HNF1A*, chỉ phát hiện một số điểm đa hình trên gen *HNF1A*.

**Từ khóa:** Đái tháo đường, di truyền MODY, gen *HNF1A*, gen *GCK*

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ:

MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) là một dạng đái tháo đường (ĐTĐ) di truyền đặc biệt với biểu hiện lâm sàng là hội chứng tăng đường huyết mang tính chất gia đình và thường được phát hiện trước 25 tuổi. Cơ chế di truyền phân tử của MODY được mô tả lần đầu vào thập niên 90 của thế kỷ trước, trong đó các đột biến gene di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường dẫn đến rối loạn chức năng của tế bào beta tụy [2, 9, 11]. MODY chiếm khoảng 1%-2% tổng số bệnh nhân được chẩn đoán ĐTĐ, tuy nhiên tỷ lệ này đang có khuynh hướng tăng lên do các chương trình tầm soát sức khỏe ngày càng có xu hướng trẻ hóa cũng như sự tiến bộ vượt bậc của các

công cụ chẩn đoán di truyền [6]. Cho đến hiện nay, MODY đã được xác định liên quan đến đột biến ít nhất 9 gene, trong số đó, tần suất cao nhất là gene *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha-HNF1A* (52%) và *Glucokinase-GCK* (32%) [7].

Đột biến gen *HNF1A* là nguyên nhân thường gặp nhất của ĐTĐ MODY ở Châu Âu, Châu Mỹ cũng như Trung Quốc, Nhật Bản (MODY 3). Bệnh nhân MODY3 thường có đường huyết 2 giờ sau khi làm nghiệm pháp dung nạp glucose tăng cao hơn 6mmol/l so với đường huyết đói và rất nhạy với nhóm thuốc hạ đường huyết sulphonylureas [1-5, 10].

Trong khi đó, đột biến gene *GCK* cũng chiếm tần suất khá lớn trong nhóm bệnh nhân MODY (MODY2). Biểu hiện lâm sàng của nhóm bệnh nhân này là đường huyết thường tăng nhẹ, ổn định và đường huyết 2 giờ sau làm nghiệm pháp dung nạp glucose thường không tăng cao (<3 mmol/l trong khoảng 70% bệnh nhân) [8].

<sup>1</sup>Trường Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh

\*Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Mai Phương Thảo

Email: [drtuan.physiology.hcm@gmail.com](mailto:drtuan.physiology.hcm@gmail.com)

Ngày nhận bài: 20/10/2016

Ngày nhận bài phản biện: 8/11/2016

Ngày chấp nhận đăng: 10/11/2016

Mặc dù các ca bệnh MODY chiếm tỉ lệ nhỏ trong tổng số ca ĐTĐ, tuy nhiên việc chẩn đoán MODY thông qua các công cụ di truyền là hết sức cần thiết vì:

- Giúp tiên lượng rất tốt diễn tiến tự nhiên của bệnh, từ đó có các biện pháp điều trị lâm sàng phù hợp cho bệnh nhân.
- Khi xác định được gene đột biến gây bệnh, việc chẩn đoán cho các thành viên bị bệnh trong gia đình sẽ dễ dàng hơn.
- Giúp có hướng tư vấn và xử lý phù hợp cho các thế hệ sau của bệnh nhân.
- Xác định các đột biến trên các gene này sẽ giúp xây dựng ngân hàng dữ liệu về đột biến trên quần thể bệnh nhân MODY ở Việt Nam

Do đó, chúng tôi thiết kế nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình kỹ thuật xác định các đột biến trên 2 gene *HNF1A* và *GCK* để từ đó có cái nhìn sâu hơn về khía cạnh di truyền phân tử trong chẩn đoán đái tháo đường MODY.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

### 1. Đối tượng nghiên cứu:

Chúng tôi tiến hành khảo sát đột biến gen *HNF1A* và *GCK* trên bệnh nhân được chẩn đoán MODY trên lâm sàng. Bệnh nhân nữ, 16 tuổi, không hề có triệu chứng lâm sàng của tăng đường huyết, được phát hiện tình cờ khi khám sức khỏe định kì, có cha và bà nội mắc bệnh đái tháo đường. Đường huyết đói của bệnh nhân là 134 mg/dl, HbA1C là 7.2%.

### 2. Phương pháp nghiên cứu:

#### - Tách chiết Genomic DNA:

Bệnh phẩm máu ngoại vi của bệnh nhân được tách chiết DNA bằng bộ kit QIAamp DNA Kit (Qiagen, Mỹ), theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

#### - Thiết kế mồi:

Các đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự DNA của gen *HNF1A* và *GCK* lần lượt mang mã số NG\_011731.2 và NG\_008847.1 trong kho dữ liệu của NCBI và được tổng hợp bởi công ty Integrated

DNA Technologies, Hoa Kỳ. Thông tin các đoạn mồi được trình bày như bảng 1.

#### - Thực hiện PCR:

Mỗi tube PCR có thể tích 25  $\mu$ l chứa các thành phần: PCR buffer, dNTP (250  $\mu$ M cho mỗi loại), 2 mồi xuôi và ngược (0,5  $\mu$ M cho mỗi loại), 1,25U TaKaRa Taq™ HotStart Polymerase (Takara, Nhật Bản) và 50-100 ng genomic DNA. Chu trình luân nhiệt cho PCR được thực hiện trên máy Mastercycler@Pro S (Eppendorf, Đức) bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 98°C trong 3 phút, theo sau bằng 40 chu kỳ gồm biến tính ở 98°C trong 10 giây, gắn mồi ở 54°C trong 15 giây, tổng hợp chuỗi DNA ở 72°C trong 1,5 phút và kết thúc bằng giai đoạn kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 0,7% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới hệ thống chụp ảnh điện di Geldoc-It™ (UVP, Mỹ). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Anh) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất và được kiểm tra lại bằng điện di trên thạch agarose 0,7%. Các phản ứng luôn kèm theo một chứng âm không chứa DNA để kiểm soát ngoại nhiễm.

#### - Thực hiện giải trình tự DNA:

Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Mỹ) theo hai chiều xuôi và ngược với các mồi trong Bảng 1. Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, hòa tan trong Hi-Di formamide, biến tính ở 95°C trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự DNA được đọc bằng máy ABI 3130 Genetic Analyzer, với POP-7 polymer và capillary 50 cm (Applied Biosystems, Mỹ). Kết quả giải trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench.

**Bảng 1.** Các cặp mồi dùng để khuếch đại và giải trình tự 10 exon của gen *HNF1A* và *GCK*

| Tên mồi   | Trình tự chuỗi (5'-3') | Đoạn gen khuếch đại                   |
|-----------|------------------------|---------------------------------------|
| HNF1A-1F  | AGTTTGGTTTGTGTCTGCCG   | Exon 1 và vùng lân cận (544 bp)       |
| HNF1A-1R  | ACTAGGCTAAAGGCTGAAGG   |                                       |
| HNF1A-2F  | GTCCCTGAGTCTATGTGTAG   | Exon 2 và vùng lân cận (437 bp)       |
| HNF1A-2R  | CCTTTCCATCTACCTGTCTG   |                                       |
| HNF1A-3F  | TGTAAGCTCCTCTGGTTCAG   | Exon 3, 4 và vùng lân cận (1092 bp)   |
| HNF1A-4R  | AGAGGTTTAGGTGACTGCTG   |                                       |
| HNF1A-5F  | TGGAGTTTGAAGTGCTGAGG   | Exon 5,6, 7 và vùng lân cận (1611 bp) |
| HNF1A-7R  | GAAACACACTTGTCCCAGAG   |                                       |
| HNF1A-8F  | GTCTGTCCCTTTATCTGGAG   | Exon 8, 9 và vùng lân cận (763 bp)    |
| HNF1A-9R  | CAGTCCCTGAGATGTTCTTG   |                                       |
| HNF1A-10F | GGTTCCTGTTATCTGCTGTG   | Exon 10 và vùng lân cận (511 bp)      |
| HNF1A-10R | CCTACATCTGCCATGAACAG   |                                       |
| GCK-1F    | CGACTCGTTGGAGAACAATG   | Exon 1 và vùng lân cận (320 bp)       |
| GCK-1R    | GAGGCTCAAACAAACCATGG   |                                       |
| GCK-2F    | GATGGATAGATGGATGGATG   | Exon 2 và vùng lân cận (528 bp)       |
| GCK-2R    | TTAGCCAGCACCTACAAGAG   |                                       |
| GCK-3F    | TGCTGTTTTTCAGGAACGGAG  | Exon 3 và vùng lân cận (541 bp)       |
| GCK-3R    | TTAGCCAGCACCTACAAGAG   |                                       |
| GCK-4F    | CATTCAGTGGCCAGGTGTTG   | Exon 4,5,6 và vùng lân cận (1500 bp)  |
| GCK-6R    | TGAAGCCTGTTGTACACAGG   |                                       |
| GCK-7F    | TCCAGACAAAGCAGAGACAG   | Exon 7 và vùng lân cận (441 bp)       |
| GCK-7R    | GCTTACGAACGGATTGTCAG   |                                       |
| GCK-8F    | GGCTCATTAACGAGGGAAAG   | Exon 8 và vùng lân cận (447 bp)       |
| GCK-8R    | GCCCTAGTTTCCCATCCCTG   |                                       |
| GCK-9F    | GCAGTACTAACCAGTCCCTG   | Exon 9,10 và vùng lân cận (1080 bp)   |
| GCK-10R   | TGATTCCAGCGAGAAAGGTG   |                                       |

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN:

#### Thiết lập kỹ thuật giải trình tự DNA gen *HNF1A*.

Theo thiết kế ban đầu, tất cả các cặp mồi đều khuếch đại thành công các đoạn DNA của gen *HNF1A* và *GCK* và vùng intron lân cận với kích thước như mong đợi (hình 1 và 2). Tất cả các cặp mồi đều hoạt động ở nhiệt độ tối ưu là 54°C.

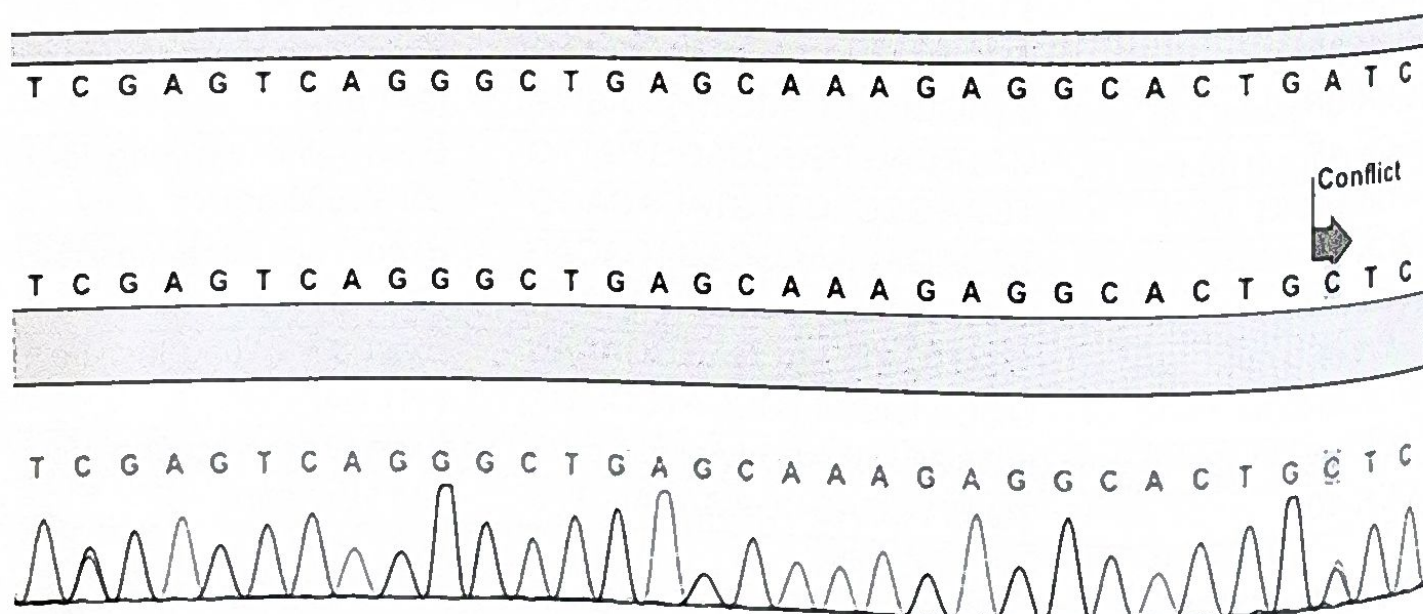
Các sản phẩm PCR sau đó được tiến hành giải trình tự và cho kết quả hoàn toàn phù hợp với trình tự của gen *HNF1A* và *GCK* mang mã số NG\_011731.2 và NG\_008847.1 trong kho dữ liệu của NCBI.

#### Phát hiện điểm đa hình trên gen *HNF1A*:

Ứng dụng các kỹ thuật giải trình tự, chúng tôi không phát hiện điểm đột biến nào trên gen *GCK*. Trên gen *HNF1A*, chúng tôi phát hiện có sự thay đổi 1 nucleotide tại vị trí c.51C>G và c.79A>C. Trong đó, c.51C>G không làm thay đổi acid amin được dịch mã và đã được mô tả trước đây [3]. C.79A>C mặc dù làm thay đổi acid amin từ Isoleucin thành Leucin tuy nhiên đây cũng chỉ là điểm đa hình mà không phải là đột biến gây bệnh trên gen *HNF1A* [3].



Hình 1. Các sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn DNA của gen *HNF1A* và *GCK*



Hình 2. Các điểm đa hình trên gen *HNF1A* c.51C>G và c.79A>C

#### 4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật giải trình tự gen *HNF1A* và *GCK* từ DNA tách chiết từ máu ngoại vi của bệnh nhân, làm cơ sở để phân tích các trường hợp nghi ngờ chẩn đoán đái tháo đường di truyền MODY ở Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Costa A, Bescós M, Velho G, et al (2000) Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families.

Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc 142(4):380–386

2. Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, et al (1997) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. Diabetes 46(4):720–725

3. Iwasaki N, Oda N, Ogata M, et al (1997) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha/MODY3 gene in Japanese subjects with early- and late-onset NIDDM. Diabetes 46(9):1504–1508

4. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, et.al. (1999) High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 42(9):1131–1137

5. McKinney JL, Cao H, Robinson JF, et.al. (2004) Spectrum of HNF1A and GCK mutations in Canadian families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Clin Investig Med Médecine Clin Exp* 27(3):135–141

6. Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, et.al. (2001) Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 18(5):417–421

7. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, et.al. (2010) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 53(12):2504–2508

8. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, et al (2002) The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia* 45(3):427–435

9. Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, et.al. (1992) Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356(6371):721–722

10. Xu JY, Dan QH, Chan V, et al (2005) Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet* EJHG 13(4):422–427

11. Yamagata K, Furuta H, Oda N, et.al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384(6608):458–460

## SUMMARY

### SETTING UP A DNA SEQUENCING PROCEDURE TO INVESTIGATE THE MUTATION OF HNF1A AND GCK GENES IN DIAGNOSE OF MODY

Mai Phuong Thao<sup>1</sup>, Đỗ Đức Minh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical and Pharmaceutical University, TP. Ho Chi Minh

**Objectives:** MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) is hereditary monogenic forms of diabetes with typical familial early onset hyperglycemia, usually before the age of 25. Mutations in HNF1A and GCK gene contributes up to 90% of the MODY cases. We conduct this study to set up a DNA sequencing procedure to investigate the mutation of HNF1A and GCK gene in MODY diagnosed patient. **Methods:** Primers for amplification of 10 exons and the exon-intron boundaries of HNF1A and GCK gene were designed. Genomic DNA was extracted from peripheral blood sample of MODY patient. These DNA were respectively amplified and sequenced by Sanger technique. **Results:** The whole coding site and the exon-intron boundaries of HNF1A and GCK gene were successfully amplified. After sequencing, no pathogenic mutation was found in these 2 genes.

**Keywords:** Diabetes, MODY, HNF1A gene, GCK gene.