



Original Article

# Genotyping Method and Frequency of *ADRB3*-rs4994 Single Nucleotide Polymorphism Genotypes in Hanoi 3-5 Years Old Children

Nguyen Thi Hong Hanh<sup>1</sup>, Do Thi Nhu Trang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ngoc Lien<sup>2</sup>,  
Tran Quang Binh<sup>3</sup>, Do Nam Khanh<sup>4</sup>, Nguyen Thi Trung Thu<sup>1</sup>, Le Thi Tuyet<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Hanoi National University of Education, 136 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Nguyen Hue High School, 1095 Yen Ninh, Dong Tam, Yen Bai, Vietnam

<sup>3</sup>National Nutrition Institute, 48 Tang Bat Ho, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>Institute of Preventive Medicine and Public Health, Hanoi Medical University,  
1 Ton That Tung, Dong Da, Hanoi, Vietnam

Received 07 May 2019

Revised 15 May 2019; Accepted 21 June 2019

**Abstract:** The Trp64Arg (rs4994) polymorphism in codon 64 of *ADRB3* (*beta3-adrenergic receptor*) gene is involved in the regulation of energy metabolism. This study optimizes the genotyping method of *ADRB3* rs4994 polymorphism and determines the allele and genotype frequencies of this polymorphism in 3-5 years old children in Hanoi. A cross-sectional study was conducted on 100 three-to-five-year-old Hanoi children, using DNA extraction method from cheek mucosa cells. The genotyping of this polymorphism was performed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. The study optimized the method of genotyping of *ADRB3* rs4994 polymorphism with *MvaI* enzyme. In 3-5 years old children in Hanoi, T/T genotype accounted for the highest proportion (78%), C/C genotype accounted for the lowest proportion (3%). T and C allele frequencies were 0.785 and 0.125, respectively. The genotypes observed were in agreement with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. It is necessary to apply the genotyping method and genetic distribution for genotyping the *ADRB3* rs4994 polymorphism in large-scale studies in Vietnam.

**Keywords:** *ADRB3*, rs4994, genotyping, RFLP.

\* Corresponding author.

Email address: [lttuyet@gmail.com](mailto:lttuyet@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4167>



## Tối ưu hoá quy trình phân tích kiểu gen và xác định tần số đa hình rs4994 trên gen *ADRB3* ở trẻ 3-5 tuổi tại Hà Nội

Nguyễn Thị Hồng Hạnh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Như Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Liên<sup>2</sup>,  
Trần Quang Bình<sup>3</sup>, Đỗ Nam Khánh<sup>4</sup>, Nguyễn Thị Trung Thu<sup>1</sup>, Lê Thị Tuyết<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường THPT Nguyễn Huệ, 1095 Yên Ninh, Đồng Tâm, Yên Bái, Yên Bái, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Dinh Dưỡng Quốc Gia, 48 Tăng Bạt Hổ, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Viện Đào tạo Y học dự phòng & Y tế công cộng, Trường Đại học Y Hà Nội,  
số 1 Tôn Thất Tùng, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 08 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 15 tháng 5 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 21 tháng 6 năm 2019

**Tóm tắt:** Đa hình Trp64Arg (rs4994) ở codon 64 trên gen *ADRB3* (*beta3-adrenergic receptor*) có liên quan đến sự điều hòa chuyển hóa năng lượng. Mục đích của nghiên cứu này là tối ưu hoá phương pháp xác định kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994 và xác định tỉ lệ alen và tỉ lệ kiểu gen của đa hình này ở trẻ em. Một nghiên cứu cắt ngang được tiến hành trên 100 trẻ 3-5 tuổi tại Hà Nội, sử dụng phương pháp tách chiết ADN từ tế bào niêm mạc má. Kiểu gen được xác định bằng phương pháp đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (RFLP). Nghiên cứu đã tối ưu hoá phương pháp phân tích kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994 với enzyme *MvaI*. Ở quần thể nghiên cứu, kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (78%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (3%). Tần số alen T và C lần lượt là 0,785 và 0,125. Sự phân bố kiểu gen ở quần thể nghiên cứu tuân theo quy luật cân bằng Hardy - Weinberg. Phương pháp phân tích kiểu gen và tần số gen của nghiên cứu này có thể áp dụng để phân tích mối liên quan với các bệnh trên quy mô lớn ở người Việt Nam.

**Từ khóa:** *ADRB3*, rs4994, phân tích kiểu gen, RFLP.

### 1. Mở đầu

Hệ thống adrenergic đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh cân bằng năng lượng thông qua việc kích thích sinh nhiệt và huy động

lipid trong mô mỡ. Các đa hình trong các gen thụ thể adrenergic (adrenergic receptor, ADR) đã được nghiên cứu rộng rãi để xác định mối liên kết với các kiểu hình liên quan đến béo phì và rối loạn chuyển hoá [1]. Trong số các gen thụ thể

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: [lttuyet@gmail.com](mailto:lttuyet@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4167>

adrenergic, gen *ADRB3* ( $\beta$ -3 adrenergic receptor), gồm hai exon và một intron, mã hoá cho thụ thể adrenergic  $\beta$ -3 nằm ở vị trí 11.23 trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 8 ở người, được nghiên cứu nhiều trong vài thập kỷ trở lại đây. Gen *ADRB3* biểu hiện chủ yếu ở mô mỡ, tham gia vào điều hòa quá trình phân giải lipid, sinh nhiệt, vận chuyển axit béo tự do và được coi là một trong những yếu tố chìa khoá của hệ thống cân bằng năng lượng ở người [2, 3].

Đa hình rs4994 thuộc gen *ADRB3* dẫn đến sự thay thế tryptophan bằng arginine ở codon 64 (Trp64Arg). Sự thay thế này làm ảnh hưởng đến liên kết giữa thụ thể với noradrenalin và protein G trong các tế bào mỡ [4]. Do đó, đa hình này sẽ làm giảm phân giải lipid trong mô mỡ trắng [5], từ đó có thể làm tăng nguy cơ mắc các bệnh chuyển hoá như: đái tháo đường [6], béo phì [7], hội chứng chuyển hoá [8].

Hiện có nhiều nghiên cứu về mối liên quan của đa hình rs4994 đến nguy cơ mắc các bệnh chuyển hoá ở nhiều quần thể người khác nhau như Ấn Độ [9], Pháp [10], Nhật Bản [11], Indonesia [12] và Phần Lan [13]. Tuy nhiên, kết quả về mối liên quan này ở những nghiên cứu này không giống nhau, có thể do sự khác biệt về quần thể nghiên cứu (giới tính, tuổi, chủng tộc) và các yếu tố môi trường hoặc lối sống (mức năng lượng ăn vào và mức độ hoạt động thể chất). Đồng thời, tỷ lệ alen C và T là khác nhau ở những quần thể khác nhau [9, 14-16].

Do đó, việc xác định kiểu gen của đa hình này trên quần thể người Việt Nam sẽ có ý nghĩa rất lớn đối với sức khỏe cộng đồng vì sự thay đổi lối sống và khẩu phần ăn tại Việt Nam trong những năm gần đây dẫn đến tỉ lệ người mắc béo phì và các rối loạn chuyển hoá tăng nhanh. Việc xác định kiểu gen, phân tích mối quan hệ giữa đa hình Trp64Arg và các rối loạn kể trên sẽ giúp cung cấp những dữ liệu quan trọng cho phép các chuyên gia y tế đề xuất mức năng lượng thích hợp cho những người có kiểu gen cụ thể. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nghiên cứu nào về xác định kiểu gen của đa hình Trp64Arg tại các phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Do vậy, nghiên

cứu này được tiến hành nhằm áp dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định kiểu gen *ADRB3* rs4994 trong điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam và xác định tỉ lệ kiểu gen và tỉ lệ alen của SNP này ở trẻ em lứa tuổi mầm non tại Hà Nội.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 100 trẻ (36-60 tháng tuổi, 50 nam, 50 nữ) được lựa chọn ngẫu nhiên từ những trẻ có tình trạng dinh dưỡng bình thường thuộc đề tài B2018-SPH50 - là đề tài thực hiện nghiên cứu cắt ngang xác định tình trạng dinh dưỡng của trẻ mầm non trên 38 trường mầm non tại Hà Nội.

Tiêu chuẩn phân loại tình trạng dinh dưỡng trẻ là tiêu chuẩn WHO 2006, những trẻ bình thường là những trẻ có Z-score BMI theo tuổi và giới nằm trong khoảng từ -2 đến 2.

Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng nghiên cứu là những trẻ mắc các bệnh cấp tính hoặc các bệnh mãn tính như lao, HIV/AIDS.

Các đối tượng chỉ được lấy mẫu tế bào niêm mạc má khi có sự đồng ý của cha mẹ hoặc người giám hộ. Đề tài đã được Hội đồng Y đức của Viện dinh dưỡng thông qua với quyết định số 343/VDD-QLKH ngày 27/7/2018.

### 2.2. Phương pháp tách ADN

ADN được tách từ mẫu tế bào niêm mạc má bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 2.3. Phương pháp phân tích kiểu gen

Phân tích kiểu gen SNP rs4994 bằng phương pháp RFLP-PCR với các bước sau:

- *Phản ứng PCR*: sử dụng đoạn mồi oligonucleotide do nhóm nghiên cứu tự thiết kế với trình tự mồi xuôi và mồi ngược lần lượt là: *Mồi xuôi*: 5'-cgcccaataaccgccaacac-3' và *mồi ngược*: 5'-ccaccaggagtcccatcacc-3'.

Thành phần của phản ứng PCR gồm 3,5  $\mu$ L nước tinh sạch; 7,5  $\mu$ L master mix Dream Taq Green (thành phần chứa: 0,4 mM Dream Taq DNA polymerase; 0,4 mM 2X Dream Taq Green buffer; 0,4 mM dATP; 0,4 mM dCTP; 0,4 mM dGTP; 0,4 mM dTTP và 4 mM  $MgCl_2$ ); 10 pmol mỗi mỗi loại; 2  $\mu$ L ADN mẫu trong tổng thể tích là 15  $\mu$ L.

Hỗn hợp phản ứng được biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 3 phút; tiếp theo 35 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây; giai đoạn bắt mồi trong 30 giây được thực hiện ở 3 nhiệt độ khác nhau: 56°C, 60°C, 65°C; giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 30 giây, giai đoạn ủ ở nhiệt độ 72°C trong 8 phút. Năm  $\mu$ L sản phẩm PCR 210 bp được điện di trên gel agarose 2,0% ở 100 V trong 50 phút, nhuộm với Redsafe để kiểm tra sản phẩm.

- **Cắt với enzyme giới hạn:** Enzyme giới hạn *MvaI* (*Bst*NI) được sử dụng để phân biệt các kiểu gen được xác định bằng phần mềm online tại <http://www.restrictionmapper.org>. Năm  $\mu$ L sản phẩm PCR được sử dụng để ủ với enzyme *MvaI* fast digest (Thermo Corporation, USA) ở 2 nồng độ khác nhau: 0,3  $\mu$ L và 0,5  $\mu$ L enzyme ở 37°C trong 15 phút. Mỗi phản ứng cắt enzyme chứa 9,0  $\mu$ L nước tinh sạch; 1,0  $\mu$ L 10X Buffer; 0,05  $\mu$ L (hoặc 0,04  $\mu$ L) *MvaI* và 5,0  $\mu$ L sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR sau ủ enzyme được điện di trên gel agarose 2,0% ở 100 V trong 35 phút, nhuộm với RedSafe, marker  $\Phi$ X174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) và được chụp hình để kiểm tra sản phẩm.

- **Nhận định kết quả:** Enzyme *MvaI* nhận biết và cắt tại vị trí sau: 5'...CC↓WGG...3', 3'...GGW↑CC...5'

Sau khi ủ với enzyme giới hạn, dựa vào kích thước các đoạn ADN để xác định kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994. Kiểu gen C/C chứa đoạn ADN có kích thước 158 bp, 31 bp, 15 bp, 6 bp, kiểu gen T/T chứa các đoạn ADN có kích thước 97 bp, 61 bp, 31 bp, 15 bp, 6 bp, kiểu gen T/C chứa các đoạn ADN có kích thước 158 bp, 97 bp, 61 bp, 31bp, 15bp, 6bp. Băng sản phẩm 31bp, 15bp, 6bp không xuất hiện do kích thước nhỏ đã chạy ra khỏi bản thạch trong quá trình điện di.

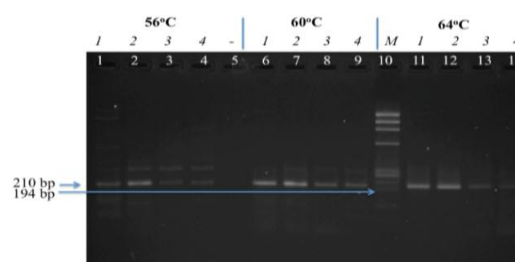
### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Tối ưu quy trình phân tích kiểu gen *ADRB3* rs4994

##### 3.1.1. Lựa chọn nhiệt độ bắt mồi

Kết quả điện di sản phẩm PCR 210 bp của 4 mẫu nghiên cứu ở 3 nhiệt độ bắt mồi khác nhau được thể hiện ở Hình 1.

Kết quả từ hình ảnh điện di PCR cho thấy có sự khác nhau ở những nhiệt độ bắt mồi khác nhau. Ở nhiệt độ bắt mồi 56°C, có sự xuất hiện của nhiều sản phẩm phụ, gây ảnh hưởng đến việc nhận định kết quả. Ở nhiệt độ bắt mồi 60°C, các băng điện di sản phẩm PCR lên đậm, rõ nét và có ít sản phẩm phụ nhất. Nhiệt độ bắt mồi 64°C, các băng điện di sản phẩm PCR lên rõ nét và không có sản phẩm phụ. Do vậy, nhiệt độ bắt mồi 64°C được chọn để sử dụng để xây dựng quy trình phân tích gen.



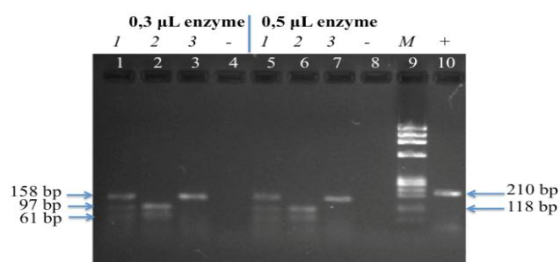
Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR ở các mức nhiệt độ bắt mồi khác nhau.

Giếng 1-4: nhiệt độ bắt mồi là 56°C; giếng 6-9: nhiệt độ bắt mồi là 60°C; giếng 11-14: nhiệt độ bắt mồi là 64°C; giếng 5: mẫu chứng âm (nước); giếng 10: marker  $\Phi$ X174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III)

##### 3.1.2. Lựa chọn enzyme và nồng độ enzyme

Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *MvaI* ở hai nồng độ khác nhau của một số mẫu nghiên cứu được thể hiện ở Hình 2.

Do các sản phẩm cắt enzyme có kích thước nhỏ nên với thời gian chạy điện di 60 phút nên các băng sản phẩm mờ, tuy nhiên các băng phân tách rõ ràng và dễ dàng phân biệt được các kiểu gen.



Hình 2. Hình ảnh điện di sau khi cắt với enzyme giới hạn *MvaI* ở nồng độ 0,3  $\mu\text{L}$  và 0,5  $\mu\text{L}$  của một số mẫu nghiên cứu.

Giếng 1-3: các mẫu ADN được ủ với 0,3  $\mu\text{L}$  enzyme *MvaI*; giếng 5-7: các mẫu ADN được ủ với 0,5  $\mu\text{L}$  enzyme *MvaI*; giếng 4, 8: mẫu chứng âm (nước); giếng 9: marker  $\Phi\text{X174 DNA/BsuRI}$  (*HaeIII*); giếng 10: mẫu chứng dương (ADN không ủ với enzyme *MvaI*).

Hình ảnh điện di sản phẩm ủ enzyme cho thấy, ở cả hai nồng độ enzyme 0,3  $\mu\text{L}$  và 0,5  $\mu\text{L}$ , đều không còn sản phẩm PCR dư ở vị trí 210 bp nên đều có thể nhận định được chính xác kiểu gen. Do đó, nồng độ enzyme 0,3  $\mu\text{L}$  được chọn để xây dựng quy trình phân tích gen và nhằm tiết kiệm chi phí so với nồng độ khuyến cáo của nhà sản xuất. Bên cạnh đó, khi tiến hành phân tích, dựa vào hình ảnh điện di kết quả PCR, nồng độ enzyme sẽ được điều chỉnh phụ thuộc vào độ đậm của băng sản phẩm. Bên cạnh đó, để quan sát các sản phẩm cắt enzyme rõ nét hơn, thời gian điện di sẽ được giảm xuống 35 phút.

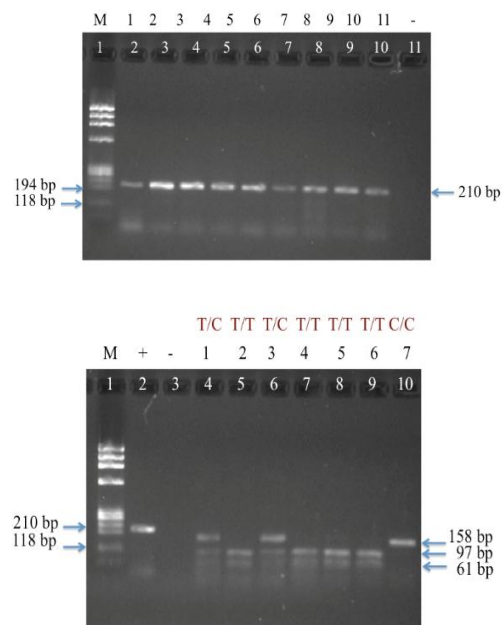
Đa hình *ADRB3* rs4994 đã được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Các phương pháp được sử dụng để xác định kiểu gen của đa hình này phần lớn là PCR-RFLP như nghiên cứu ở Indonesia, Nhật Bản, Ấn Độ... [9, 11, 12]. Bên cạnh đó, một vài nghiên cứu sử dụng phương pháp Real-time PCR [17]. Tuy nhiên, hiện nay rất nhiều phòng thí nghiệm tại Việt Nam chưa được trang bị máy Real-time PCR. Nên phương pháp PCR-RFLP là phương pháp phù hợp với hầu hết các phòng thí nghiệm sinh học phân tử trên cả nước với chi phí phải chăng.

### 3.1.3. Kết quả xác định kiểu gen

Sau khi lựa chọn được nhiệt độ bắt mồi và nồng độ enzyme thích hợp, chúng tôi tiến hành

xác định kiểu gen của 100 mẫu ADN. Do đã nhận định được chính xác sản phẩm PCR và các sản phẩm cắt enzyme, nên thời gian điện di được giảm xuống còn 35 phút. Kết quả điện di sản phẩm PCR và sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *MvaI* của một số mẫu nghiên cứu được thể hiện trong Hình 3.

Theo kết quả điện di, tỉ lệ xác định kiểu gen của các mẫu nghiên cứu là 100%. Căn cứ vào các băng sản phẩm sau khi ủ với enzyme giới hạn để xác định kiểu gen. Các mẫu 2, 4-6 mang kiểu gen T/T do có băng 97 bp và 61 bp. Các mẫu 1, 3 mang kiểu gen T/C do có các băng 158 bp, 97 bp và 61 bp. Mẫu 7 mang kiểu gen C/C do chỉ có băng 158 bp.



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR (A) và sau khi cắt với enzyme giới hạn (B)

A: Kết quả điện di sản phẩm PCR 210 bp của mẫu nghiên cứu, giếng 1: marker  $\Phi\text{X174 DNA/BsuRI}$  (*HaeIII*), Igiếng 2-10: các mẫu nghiên cứu, giếng 11: mẫu chứng âm (nước); B: Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khi ủ với enzyme *MvaI*, giếng 1: marker  $\Phi\text{X174 DNA/BsuRI}$  (*HaeIII*); giếng 2: mẫu chứng dương (ADN không ủ với enzyme *MvaI*); giếng 11: mẫu chứng âm (nước); giếng 4-10: các mẫu nghiên cứu.

### 3.2. Đa hình *ADRB3* rs4994 ở trẻ em 3-5 tuổi tại Hà Nội

Sự phân bố tỉ lệ alen và kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994 ở trẻ em 3-5 tuổi có tình trạng dinh dưỡng bình thường tại một số trường mầm non Hà Nội thể hiện qua Bảng 1.

Trong toàn mẫu, kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (78%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (3%). Tỉ lệ alen T và C lần lượt là 78,5% và 12,5%. Sự phân bố kiểu gen trong mẫu nghiên cứu tuân theo quy luật cân bằng Hardy - Weinberg ( $P = 0,189$ ).

Chúng tôi tiến hành so sánh tần số alen của SNP này với các quần thể khác trên thế giới theo cơ sở dữ liệu Hapmap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Kết quả so sánh được thể hiện trong Hình 4.

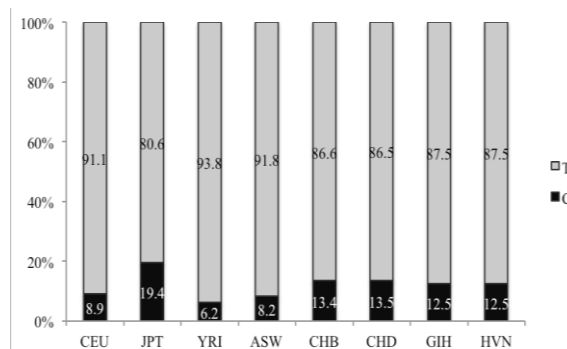
Bảng 1. Phân bố alen và kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994 ở trẻ em 3-5 tuổi tại Hà Nội

		n	%	Cân bằng Hardy-Weinberg (P)
Kiểu gen	T/T	78	78%	0,189
	T/C	19	19%	
	C/C	3	3%	
Alen	T	175	78,5%	
	C	25	12,5%	

Giá trị P thu được từ kiểm định  $\chi^2$  test

Kết quả tần số alen của các quần thể khác trên thế giới đều cho thấy tần số alen C chiếm tỉ lệ thấp, dao động từ 6,2% đến 19,4%. Các quần thể người sống ở bang Utah Mỹ có nguồn gốc từ Bắc và Tây châu Âu (CEU), người Yoruban ở Inbada, Nigeria (YRI) và người Châu Phi ở khu vực Tây Nam Hoa Kỳ (ASW) có tần số alen C thấp hơn so với những quần thể khác. Quần thể người Nhật ở Tokyo, Nhật Bản (JPT) có tần số alen C cao nhất (19,4%). Tần số alen C trong nghiên cứu của chúng tôi (12,5%) tương đương với quần thể người Hán ở Bắc Kinh, Trung Quốc (CHB); người Trung Quốc ở Metropolitan Denver, bang Colorado, Hoa Kỳ (CHD) và người Gurarat Ấn Độ sống ở bang Texas, Hoa

Kỳ (GIH) (Hình 4). Việc không đồng nhất về tỉ lệ alen ở các quần thể khác nhau là do ảnh hưởng của đặc điểm di truyền chủng tộc. Theo Marth (2004), quá trình lịch sử và đặc điểm hình thành của một dân tộc có ảnh hưởng lớn đến đặc điểm sinh học, nhân trắc và nền tảng di truyền của dân tộc đó [18].



Hình 4. Tỉ lệ alen đa hình *ADRB3* rs4994 của một số quần thể trên thế giới.

(Nguồn: International Hapmap Project [19])

Chú thích: **CEU**: Utah residents with Northern and Western European ancestry (Người sống ở bang Utah Mỹ có nguồn gốc từ Bắc và Tây châu Âu); **JPT**: Japanese in Tokyo, Japan (Người Nhật ở Tokyo, Nhật bản); **YRI**: Yoruban in Inbadan, Nigeria (Người Yoruban ở Inbada, Nigeria); **ASW**: African Ancestry in South-West USA (Người Châu Phi ở khu vực Tây Nam Hoa Kỳ); **CHB**: Han Chinese in Beijing, China (Người Hán ở Bắc Kinh, Trung Quốc); **CHD**: Chinese in Metropolitan Denver, Colorado, USA (Người Trung Quốc ở Metropolitan Denver, bang Colorado, Hoa Kỳ); **GIH**: Gujarati Indians in Texas, USA (Người Gurarat Ấn Độ sống ở bang Texas Hoa Kỳ); **HVN**: Kinh in Hanoi, Vietnam (Người Kinh ở Hà Nội, Việt Nam thuộc nghiên cứu này)

Áp dụng phương pháp phân tích kiểu gen PCR-RFLP, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thành công trong việc xác định kiểu gen của nhiều đa hình đơn nucleotide ở người Việt Nam như rs6265 gen *BDNF* [20], rs 17782313 gen *MC4R* [21-22]. Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định phân bố tần số alen và tần số kiểu gen của đa

hình rs4994 trên gen *ADRB3* ở trẻ em mầm non Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới tập trung nghiên cứu ở một nhóm nhỏ trẻ em người Kinh có tình trạng dinh dưỡng bình thường tại Hà Nội và chưa phân tích được các yếu tố ảnh hưởng đến sự phân bố tần số kiểu gen và tần số alen ở quần thể này cũng như mối liên quan của đa hình này đến các bệnh chuyển hoá ở người Việt Nam. Do vậy, cần mở rộng nghiên cứu phân bố các kiểu gen của đa hình *ADRB3* rs4994 ở nhiều nhóm tuổi, giới của nhiều dân tộc tại các vùng địa lý khác nhau của Việt Nam.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi đã tối ưu hóa được quy trình xác định kiểu gen *ADRB3* rs4994 bằng phương pháp PCR-RFLP trên mẫu ADN tách từ tế bào niêm mạc má của trẻ 3-5 tuổi Hà Nội. Cụ thể, quy trình gồm 3 bước sau: (1) gen *ADRB3* trong hệ gen được khuếch đại trong phản ứng PCR bằng cặp mồi xác định với nhiệt độ bắt mồi là 64°C; (2) sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn Fast digest *MvaI* ở nồng độ 0,3  $\mu$ L; (3) điện di sản phẩm sau khi ủ enzyme trên gel agarose 2,5% trong 35 phút ở 100 V.

Ở trẻ em 3-5 tuổi tại Hà Nội, kiểu gen T/T chiếm tỉ lệ cao nhất (78%), kiểu gen C/C chiếm tỉ lệ thấp nhất (3%). Tần số alen T và C lần lượt là 78,5% và 12,5%.

Phương pháp xác định kiểu gen ở nghiên cứu này đã được thiết kế và tối ưu, đảm bảo được tính chính xác, có chi phí phù hợp, có thể áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử tại Việt Nam để xác định kiểu gen *ADRB3* rs4994 ở người Việt Nam với cỡ mẫu lớn.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu có sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo mã số B2018-SPH50 và sự giúp đỡ hợp tác của Phòng thí nghiệm Trung Tâm, Đại học Y Hà Nội.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] T. Rankinen, A. Zuberi, Y.C. Chagnon, S.J. Weisnagel, G. Argyropoulos, B. Walts and C. Bouchard, The human obesity gene map: the 2005 update, *Obesity*. 14 (2006) 529-644. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.71>.
- [2] S. Krief, F. Lönnqvist, S. Raimbault, B. Baude, A. Van Spronsen and P. Arner, Tissue distribution of  $\beta_3$ -adrenergic receptor mRNA in man, *J Clin Invest*. 91 (1993) 344-349. <https://doi.org/10.2337/db18-0462>.
- [3] F.Lönnqvist, S. Krief, A.D. Strsberg, S. Nyberg, L.J. Emorine and P. Amer, A pathogenic role of visceral fat  $\beta_3$ -adrenoceptors in obesity, *J Clin Invest*. 95 (1995) 1109-1116. <https://doi.org/10.1172/JCI117758>.
- [4] J. Walston, K. Silver, C. Bogardus, W.C. Knowler, F.S. Celi and S. Austin, Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the  $\beta_3$ -adrenergic-receptor-gene, *N Engl J Med*. 333 (1995) 343-347.
- [5] P. Katzmarzyk, L. Perusse and C. Bouchard, Genetics of abdominal visceral fat levels, *Am J Hum Biol*. 11 (1999) 225-235. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6300\(1999\)11:2<225::AID-AJHB10>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(1999)11:2<225::AID-AJHB10>3.0.CO;2-J).
- [6] J.A. Ryuk, X. Zhang, B.S. Ko, J.W. Daily and S. Park, Association of  $\beta_3$ -adrenergic receptor rs4994 polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Diabetes research and clinical practice*. 129 (2017) 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.034>.
- [7] N. Kurokawa, E.H. Young, Y. Oka, H. Satoh, N.J. Wareham, M.S. Sandhu and R.J. Loos, The *ADRB3* Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44,833 individuals, *International journal of obesity*. 32 (2008) 1240-1249. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.90>.
- [8] M. Daghestani, M. Daghestani, M. Daghistani, A. Eldali, Z.K. Hassan, M.H. Elamin and A. Warsy, *ADRB3* polymorphism rs4994 (Trp64Arg) associates significantly with bodyweight elevation and dyslipidaemias in Saudis but not rs1801253 (Arg389Gly) polymorphism in ARDB1, *Lipids in health and disease*. 17 (2018) 58-66. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0679-7>.
- [9] J. Walston, K. Silver, C. Bogardus, W.C. Knowler, F.S. Celi, S. Austin, Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene, *N Engl J Med*. 333 (1995) 343-347. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508103330603>

- [10] K. Clement, C. Vaisse, B.S. Manning, A. Basdevant, B. Guy-Granda and J. Ruiz, Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity, *N Engl J Med.* 333 (1995) 352-354. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508103330605>
- [11] H. Kim-Motoyama, K. Yasuda, T. Yamaguchi, N. Yamada, T. Katakura and A.R. Shuldiner, A mutation of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride, *Diabetologia.* 40 (1997) 469-472.
- [12] S.G. Malik, M.R. Saraswati, K. Suastika, H. Trimarsanto, S. Oktavianthi and H. Sudoyo, Association of beta3-adrenergic receptor (ADRB3) Trp64Arg gene polymorphism with obesity and metabolic syndrome in the Balinese: a pilot study, *BMC research notes* 4 (2011) 167-173. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-167>
- [13] E. Widen, M. Lehto, T. Kanninen, J. Walston, A.R. Shuldiner, L.C. Groop, Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns, *N Engl J Med* 333 (1995) 348-351. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508103330604>
- [14] A.J. Biery, S.O.E. Ebbesson, A.R. Shuldiner, B.B. Boyer, The  $\beta$  3-adrenergic receptor TRP64ARG polymorphism and obesity in Alaskan Eskimos, *International journal of obesity.* 21 (1997) 1176-1179.
- [15] X. Yuan, K. Yamada, K.I. Koyama, F. Ichikawa, S. Ishiyama, A. Koyanagi and K. Nonaka,  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene polymorphism is not a major genetic determinant of obesity and diabetes in Japanese general population, *Diabetes research and clinical practice*, 37 (1997) 1-7. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(97\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(97)00064-8)
- [16] N. Sakane, T. Yoshida, T. Umekawa, A. Kogure, Y. Takakura and M. Kondo, Effects of Trp64Arg mutation in the  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene on weight loss, body fat distribution, glycemic control, and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients, *Diabetes care* 20 (1997) 1887-1890. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.12.1887>
- [17] R. Bracale, F. Pasanisi, G. Labruna, C. Finelli, C. Nardelli, P. Buono and G. Oriani, Metabolic syndrome and ADRB3 gene polymorphism in severely obese patients from South Italy, *European journal of clinical nutrition.* 61 (2007) 1213-1219. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602640>
- [18] G.T. Marth, E. Czabarka, J. Murvai, S.T. Sherry, The Allele Frequency Spectrum in Genome-Wide Human Variation Data Reveals Signals of Differential Demographic History in Three Large World Populations, *Genetics.* 166 (2004) 351-372.
- [19] National Center for Biotechnology Information. [http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?do\\_not\\_redirect&rs=rs4994](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4994) (accessed 6 March 2019).
- [20] L.T. Tuyet, B.T.N. Anh, T.Q. Binh, Application of restriction fragment length polymorphism method for genotyping BDNF rs6265 polymorphism. *Journal of science of HNUE, Chemical and Biological Science,* 59 (2014) 123-130. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v37n1se.6095>
- [21] L.T. Tuyết, T.Q. Binh, Bước đầu nghiên cứu đa hình nucleotide đơn MC4R-rs17782313 ở trẻ 5-6 tuổi Hà Nội bằng phương pháp PCR-RFLP. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, chuyên san KHTN và Công nghệ.* 31 (2015) 57-63. <https://js.vnu.edu.vn/NST/article/view/84>
- [22] L.T. Tuyết, T.Q. Binh, Associations of Single Nucleotide Polymorphism rs17782313 in Melanocortin 4 Receptor Gene with Anthropometric Indices in Normal and Obesity Primary School Children in Hanoi. *NU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences.* 34 (2018) 1-7. <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4107>