

XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU PHƯƠNG PHÁP TETRA-PRIMER ARMS-PCR PHÁT HIỆN BIẾN THỂ c.576G>C (p.Glu192Asp) TRÊN GEN *TPM1* LIÊN QUAN TỚI BỆNH CƠ TIM PHÌ ĐẠI Ở MỘT GIA ĐÌNH VIỆT NAM

Nguyễn Thị Minh Thư¹, Nguyễn Thị Kim Nhung¹, Đặng Hoài Thương², Nguyễn Ngọc Thủy³, Nguyễn Thanh Liêm⁴, Lê Minh Thông⁴, Nguyễn Thị Thu Sương^{5,*}, Nguyễn Minh Nam^{1,5,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản Đại học Quốc gia TP HCM, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Khoa Y, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Thị Thu Sương, Khoa Y, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: nttuong@uhsvnu.edu.vn

Liên hệ

Nguyễn Minh Nam, Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản Đại học Quốc gia TP HCM, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Khoa Y, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: nmnam@uhsvnu.edu.vn

TÓM TẮT

Mục tiêu: Bệnh cơ tim phì đại (Hypertrophic cardiomyopathy - HCM) là một trong những bệnh tim mạch di truyền phổ biến. Cho đến nay, đã có ít nhất 1800 đột biến ở hơn 50 gen khác nhau có liên quan đến bệnh, trong đó đột biến gen *TPM1* đã được xác định gây ra bệnh cơ tim phì đại. Trước đó, chúng tôi đã xác định biến thể trên gen *TPM1* (c.576G>C) trong một gia đình có người mắc bệnh cơ tim phì đại. Vì vậy, nghiên cứu này bước đầu xây dựng và tối ưu quy trình Tetra-primer ARMS PCR nhằm phát hiện biến thể c.576G>C trên gen *TPM1* liên quan đến bệnh cơ tim phì đại.

Phương pháp: Các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế để phát hiện vị trí đột biến G>C trên gen *TPM1* thông qua tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp, nồng độ mồi và số chu kỳ phản ứng của Tetra-primer ARMS PCR. Quy trình được kiểm chứng trên mẫu DNA của 9 tình nguyện viên trong cùng một gia đình, bao gồm 3 bệnh nhân mắc bệnh cơ tim phì đại và 6 thành viên không mắc bệnh cơ tim phì đại đã được giải trình tự Sanger trước đó.

Kết quả: Quy trình Tetra-primer ARMS PCR cho thấy 3 bệnh nhân trong gia đình có mang biến thể trên gen *TPM1*, tương đồng với kết quả giải trình tự Sanger trước đó.

Kết luận: Nghiên cứu đã xây dựng và bước đầu tối ưu hóa quy trình Tetra-primer ARMS PCR phát hiện biến thể c.576G>C trên gen *TPM1*. Kết quả tương đồng với phương pháp giải trình tự Sanger, tuy nhiên cần mở rộng nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá đầy đủ và khẳng định giá trị ứng dụng lâm sàng của quy trình.

Từ khóa: Cơ tim phì đại, *TPM1*, PCR, Tetra-primer ARMS PCR

GIỚI THIỆU

Bệnh cơ tim phì đại (Hypertrophic cardiomyopathy, HCM) là bệnh cơ tim di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi phì đại thất trái. Tỷ lệ mắc bệnh cơ tim phì đại ở người trẻ tuổi được ước tính vào khoảng 1:200 đến 1:500, tuy nhiên khi tính cả các trường hợp HCM không triệu chứng trong cộng đồng, gánh nặng thực sự của bệnh có thể còn cao hơn nhiều¹⁻³. Do đó, việc phát hiện sớm HCM là rất quan trọng.

Ít nhất 1800 đột biến ở hơn 50 gen hiện có liên quan đến cơ chế bệnh sinh HCM, trong đó đột biến ở gen mã hóa protein sarcomere chiếm đa số⁴. Trong số đó, gen *Tropomyosin 1* (*TPM1*) - mã hóa cho protein α -tropomyosin, thành phần thiết yếu của cấu trúc sarcomere - được ghi nhận mang gần 80 biến thể gây bệnh khác nhau liên quan đến HCM tính đến năm 2024⁵. Đáng chú ý, hai biến thể mới nhất được công bố gần đây gồm c.203A>G, p.Gln68Arg (Prabodh Kumar và cộng sự năm 2024)⁶ và c.761A>G, p.Asp254Gly (Amir Azimi và cộng sự năm 2024)⁵

Mặc dù các đột biến trên gen *TPM1* chỉ chiếm khoảng 2% tổng số trường hợp HCM có xác định kiểu gen trên toàn cầu⁷, tỷ lệ này ở bệnh nhân Việt Nam được báo cáo vượt quá 20%, với hai biến thể c.842T>C, p.Met281Thr và c.422T>A, p.Met141Lys đã được công bố, cho thấy sự cần thiết phải tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về gen này⁸.

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện biến thể mới trên gen *TPM1* - c.576G>C (p.Glu192Asp, dị hợp) - ở bệnh nhi 3 tuổi mắc HCM và xác nhận đây là biến thể di truyền, khi bệnh nhi, cha và ông nội đều mắc HCM và mang cùng biến thể này. Trước đó, biến thể c.574G>A (p.Glu192Lys) nằm ở exon 6 của gen *TPM1* cũng đã được báo cáo trong cơ sở dữ liệu ClinVar là đột biến gây bệnh HCM⁹. Bằng chứng trước đó và nghiên cứu của chúng tôi cho thấy biến đổi tại vị trí amino acid 192 của *TPM1* là “điểm nóng” gây bệnh HCM và việc phát hiện các biến thể tại vị trí này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Cho đến nay, đã có nhiều phương pháp được sử dụng để xác định đa hình gen như giải trình tự gen, realtime-PCR, ARMS

Trích dẫn bài báo này: Nguyen T M T, Nguyen T K N, Dang H T, Nguyen N T, Nguyen T L, Le M T, Nguyen T T S, Nguyen M N. XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU PHƯƠNG PHÁP TETRA-PRIMER ARMS-PCR PHÁT HIỆN BIẾN THỂ c.576G>C (p.Glu192Asp) TRÊN GEN *TPM1* LIÊN QUAN TỚI BỆNH CƠ TIM PHÌ ĐẠI Ở MỘT GIA ĐÌNH VIỆT NAM. VNUHCM J. Health Sci.2026; 7(1): 911-919.

Lịch sử

- Ngày nhận: 25-06-2025
- Ngày sửa đổi: 01-12-2025
- Ngày chấp nhận: 24-04-2026
- Ngày đăng: 12-06-2026

DOI:

<https://doi.org/10.32508/vnuhcmj-hs.v7i1.672>



Check for updates

Bản quyền

© Tạp chí ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

PCR, RFLP-PCR, ... Trong đó, phương pháp Tetra-primer ARMS PCR (T-ARMS PCR) là kỹ thuật tối ưu hơn do tính chính xác, độ đặc hiệu cao, ít tốn kém, không cần các trang thiết bị đắt tiền và thiết kế quy trình cũng không quá phức tạp. Phương pháp này sử dụng bốn mỗi trong một lần PCR duy nhất và sau đó là điện di gel¹⁰.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu xây dựng quy trình T-ARMS PCR để phát hiện biến thể c.576G>C của gen *TPM1* liên quan đến HCM.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu bao gồm xây dựng và tối ưu quy trình trên mẫu DNA được tách chiết từ mẫu nước bọt của bệnh nhân mắc HCM. Sau đó áp dụng quy trình đã tối ưu lên mẫu DNA của 9 tình nguyện viên trong cùng một gia đình, bao gồm 3 bệnh nhân mắc HCM và 6 thành viên không mắc HCM, đã có kết quả giải trình tự Sanger trước đó.

Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản ĐHQG HCM, Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu: Mẫu nước bọt của người tham gia được thu vào buổi sáng, đảm bảo người được lấy không đánh răng, ăn, uống, nhai kẹo cao su trước khi lấy mẫu nước bọt ít nhất 30 phút. Tối thiểu 1mL nước bọt của người tham gia được thu vào ống đựng mẫu. Mẫu sau khi lấy được bảo quản lạnh và đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết DNA.

Tách chiết DNA: DNA hệ gen được tách chiết từ mẫu nước bọt bằng phương pháp amoni sulfat, cụ thể như sau: Mẫu nước bọt được trộn với Proteinase K theo tỉ lệ 1:500, sau đó ủ ở 50–56°C trong 30 phút để phân giải protein. Tiếp theo, dung dịch amoni sulfat (50 mM) được bổ sung vào mẫu và tiến hành ly tâm để tách pha. Phần dịch nổi được thu lại, trộn với isopropanol lạnh và ly tâm nhằm kết tủa DNA. Kết tủa DNA thu được được rửa hai lần bằng ethanol 70–80%, sau đó làm khô tự nhiên và hòa tan lại trong nước. Các mẫu DNA sau đó được định lượng và đánh giá độ tinh sạch bằng máy Nanodrop và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Thiết kế mỗi: Xác định vị trí c.576G>C trên *TPM1* thuộc exon 6 trên nhiễm sắc thể số 15 của bộ gen *Homo sapiens*. Sau khi đã có trình tự gen tham chiếu (Gen *TPM1*: NG_007557.1), chương trình thiết kế

mỗi cho phương pháp T-ARMS PCR được xây dựng bởi Ye (2001)¹¹ (<https://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) được sử dụng. Các mỗi đặc hiệu cho alen G và alen C được thiết kế theo nguyên tắc chỉ sai khác nhau ở nucleotide cuối cùng đầu 3'. Để tăng tính đặc hiệu của mỗi, 1 trong 3 nucleotide ở đầu 3' đã được thay đổi để không bắt cặp với khuôn (tạo thêm 1 mismatch). Trình tự của 4 mỗi và kích thước sản phẩm khuếch đại được trình bày trong Bảng 1. Sơ đồ vị trí các mỗi trong T-ARMS PCR để phát hiện c.576G>C như Hình 1. Các cặp mỗi được kiểm tra độ đặc hiệu bằng Primer Blast và kiểm tra cấu trúc thứ cấp và dimer bằng IDT OligoAnalyzer.

Trong đó, nucleotide đặc hiệu cho alen ở tận cùng đầu 3' của mỗi được in đậm, gạch chân; nucleotide số 3 ở đầu 3' được thiết kế không bắt cặp được in đậm và in nghiêng.

Tetra-primer ARMS PCR: Hai cặp mỗi, gồm một cặp mỗi bên ngoài (Outer primer) khuếch đại đoạn DNA có chứa SNP cần xác định và được xem như tham chiếu chuẩn trong PCR; một cặp mỗi bên trong (Inner primer) đặc trưng cho alen đột biến và alen thường, theo hướng ngược nhau và kết hợp với mỗi bên ngoài, được dùng để khuếch đại cả alen đột biến và alen thường. Dựa vào sản phẩm khuếch đại của hai cặp mỗi sẽ cho phép xác định mẫu có mang alen đột biến hay không.

Thành phần phản ứng gồm: 10μL 2X master mix; 1μL cặp mỗi OF, OR (10μM); 1μL cặp mỗi IF, IR (10μM); 5μL H₂O; 1μL mẫu DNA. Tổng thể tích phản ứng là 20μL. Chu trình nhiệt của PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95°C trong 20 giây, gradient (52–65°C) trong 20 giây, 72°C 20 giây; thời gian kéo dài cuối 72°C trong 5 phút.

Điện di DNA trên gel agarose: Sản phẩm khuếch đại bằng PCR sẽ được điện di trên gel agarose 2%, sử dụng thuốc nhuộm GelRed và đặt trong bể chứa dung dịch đệm TAE 1X. Bể chứa được đặt vào dòng điện một chiều với hiệu điện thế lần lượt là 70V trong 15 phút, 90V trong 5 phút và 100V trong 20 phút.

KẾT QUẢ

Kết quả tách chiết DNA

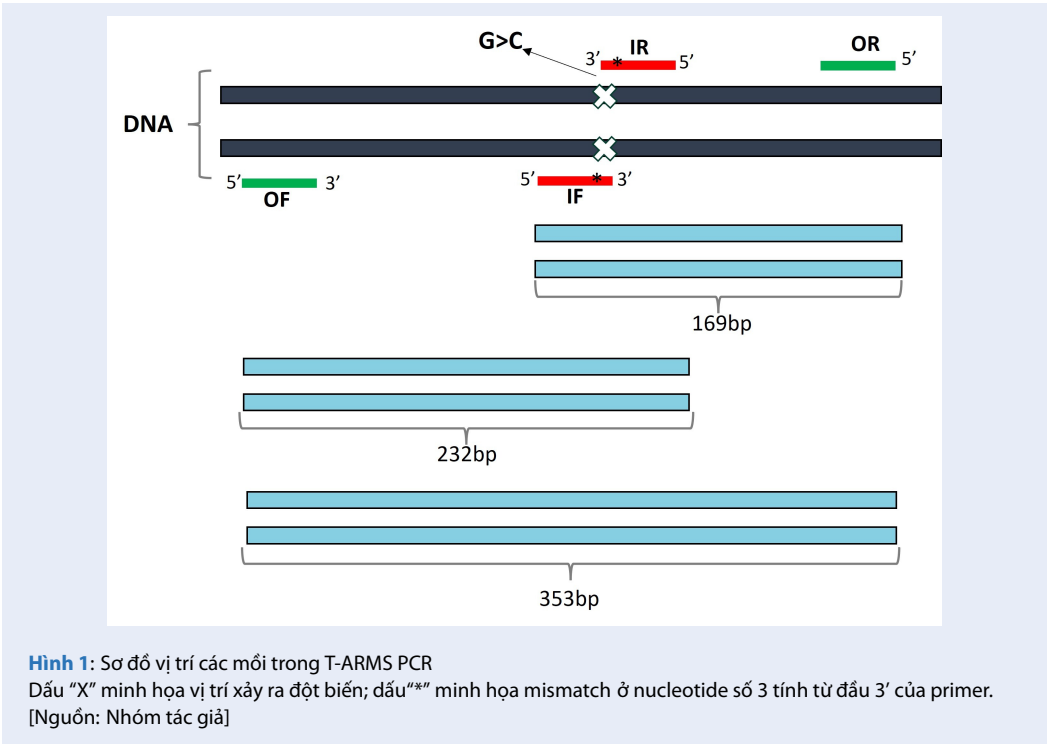
Các mẫu DNA tách chiết đều có nồng độ $\geq 20\text{ng}/\mu\text{L}$ và giá trị A260/A280 nằm trong khoảng từ 1,7 đến 2,0 và A260/A230 từ 2,0 đến 2,2.

Kết quả tối ưu điều kiện nhiệt độ bắt cặp PCR cho từng cặp mỗi

Trước khi chuẩn hóa quy trình cho T-ARMS PCR, cần chuẩn hóa điều kiện PCR gồm nồng độ mỗi, nhiệt độ gắn mỗi cho từng cặp mỗi đồng thời kiểm tra mỗi cặp mỗi thiết kế có khuếch đại đặc hiệu không (bằng sản

Bảng 1: Các cặp mồi phát hiện SNP c.576G>C trong T-ARMS PCR

	Primer	Trình tự Primer 5'-3'	Kích thước
Outer primer	Outer primer F (OF)	CCTTCTGCTGTTGCGAGGTTG	353 bp
	Outer primer R (OR)	ACTGTAAGTGTTGCTTTCTGGCAG	
Inner primer	Inner primer_F (IF)	AAAACATTAGCAAATGTGCCTAG	232 bp
	Inner primer_R (IR)	TCACAGTTTCAATTCTTCTTCATGG	169 bp

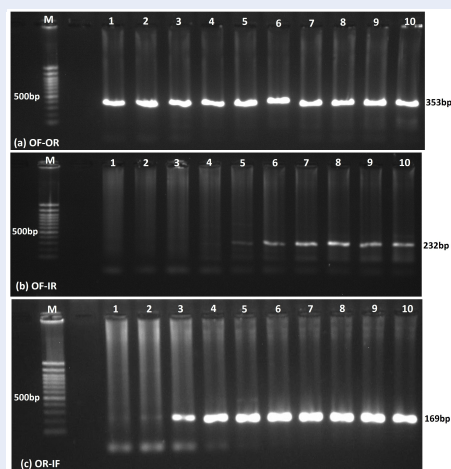


phẩm điện di có lên đúng kích thước như tính toán hay không). Mẫu DNA người có mang đột biến được dùng để chạy gradient nhiệt độ gần mồi cho từng cặp mồi với dải nhiệt độ từ 52-65°C. Thành phần và điều kiện phản ứng được thể hiện trong Bảng 2. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, nhuộm GelRed, quan sát và chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel để phân tích kết quả.

Ở cặp mồi “Outer Primer F (OF) – Outer Primer R (OR)”, kết quả điện di trên gel cho thấy gradient nhiệt độ từ 52°C đến 65°C đều xuất hiện một băng sáng rõ duy nhất, tương ứng kích thước 353bp (Hình 2.a). Với cặp mồi “Outer Primer F (OF) – Inner Primer R (IR)”, kết quả điện di trên gel cho thấy băng sáng tương ứng kích thước 232 bp mờ dần từ 52°C đến 59,5°C (Hình 2.b). Tuy nhiên khi nhiệt độ tăng dần đến 65°C, không có xuất hiện băng sản phẩm. Với phản ứng “Outer Primer R (OR) – Inner Primer F (IF)”, kết quả điện di trên gel cho thấy các băng có kích thước

Bảng 2: Thành phần và điều kiện PCR đơn mồi

Thành phần	Thể tích (μL)	Nồng độ cuối (μM)
2X master mix	10	1X
Mồi xuôi (10μM)	1	0,5
Mồi ngược (10μM)	1	0,5
H ₂ O	7	
DNA (10ng/μL)	1	
Tổng	20	
Chu trình: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95°C trong 20 giây, gradient (52-65°C) trong 20 giây, 72°C 20 giây; 72°C trong 5 phút		



Hình 2: Sản phẩm tối ưu nhiệt độ gắn mỗi cho từng cặp primer

(a) OF-OR: PCR sử dụng cặp mỗi Outerprimer F và Outer primer R;

(b) OF-IR: PCR sử dụng cặp mỗi Outer primer F và Inner primer R;

(c) OR-IF: PCR sử dụng cặp mỗi Outer primer R và Inner primer F.

Trong đó: M: thang 100bp (Servicebio), Từ lane 1 – 10: dãy nhiệt độ gắn mỗi giảm dần 65°C; 64,5°C; 62,8°C; 61,1°C; 59,5°C; 58,3°C; 56,7°C; 55,3°C; 53,8°C; 52°C.

[Nguồn: Nhóm tác giả]

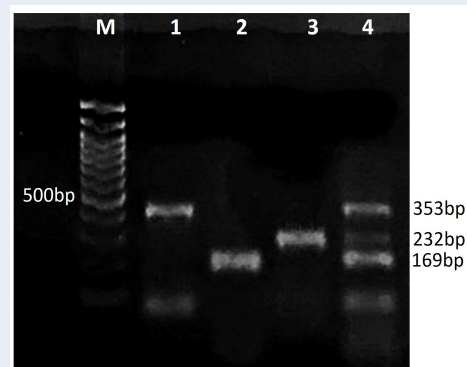
169bp, sáng rõ ở dải nhiệt độ từ 52°C đến 62,8°C, và mờ dần ở nhiệt độ 64,5°C đến 65°C. Cường độ các băng sáng cũng được định lượng bằng phần mềm ImageJ (Phụ lục 1) để hỗ trợ cho quyết định lựa chọn điều kiện tối ưu. Từ kết quả này, chúng tôi đã xác định được nhiệt độ gắn mỗi ở 54°C là phù hợp để cả 3 băng sản phẩm đều được khuếch đại đặc hiệu trong T-ARMS PCR.

Kết quả tối ưu nồng độ mỗi cho Tetra-primer ARMS PCR

T-ARMS PCR sử dụng cả 4 mỗi chạy trong cùng một phản ứng cho phép xác định nhanh kiểu gen một cách thuận tiện và chính xác. Tuy nhiên, khi sử dụng nhiều mỗi trong một phản ứng, các mỗi khác nhau có khả năng bám vào DNA khác nhau, dẫn đến tình trạng cạnh tranh mỗi. Chính vì vậy, việc xác định tỷ lệ nồng độ các mỗi, điều chỉnh các thông số trong PCR là điều vô cùng quan trọng.

Chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ mỗi trong T-ARMS PCR với nhiệt độ gắn mỗi là 54°C trên mẫu có đột biến để đánh giá kết quả phân tích đa hình gen khi chạy 4 mỗi trong cùng một phản ứng. Với thông số ban đầu, 4 mỗi đều được pha cùng thể tích và nồng độ. Kết quả ở Hình 3 cho thấy các cặp mỗi Outer primer

F - Outer primer R (OF-OR), Outer F- Inner R (OF-IR), Outer primer R - Inner F (IF-OR) xuất hiện bằng sáng, rõ và đúng với kích thước sản phẩm mong muốn tương ứng là 353bp, 232bp và 169bp. Tuy nhiên khi cho hỗn hợp mỗi để chạy T-ARMS PCR, độ sáng của băng đột biến giảm và mờ so với 2 băng còn lại. Điều này có thể do nồng độ mỗi IR không đủ để phản ứng dẫn đến tình trạng băng đột biến mờ đi.



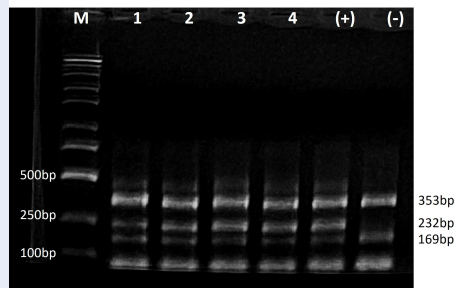
Hình 3: Sản phẩm PCR ở mẫu bệnh nhân có đột biến [Nguồn: Nhóm tác giả] Trong đó: Lane 1: mẫu PCR của cặp mỗi OF- OR; Lane 2: mẫu PCR của cặp mỗi OF- IR; Lane 3: mẫu PCR của cặp mỗi IF- OR; Lane 4: mẫu PCR của 4 mỗi.

Nồng độ Inner primer R (IR) trong quy trình PCR ban đầu là 0,5μM. Chúng tôi tiến hành thực hiện PCR tăng dần nồng độ mỗi từ 0,5μM lên 2μM (thực hiện 4 phản ứng tương ứng với nồng độ mỗi IR là 0,5μM; 1μM; 1,5μM; 2μM). Kết quả thể hiện trong Hình 4 cho thấy ở nồng độ IR 1,5μM, các băng sản phẩm sáng, rõ nét và đồng đều nhau, cho thấy nồng độ mỗi này là tối ưu cho T-ARMS PCR. Tuy nhiên, ở tất cả các nồng độ bắt đầu có xuất hiện các băng không đặc hiệu (có kích thước lớn hơn 353bp), vì vậy chúng tôi tiến hành tối ưu số chu kỳ phản ứng để giảm nguy cơ tạo băng sản phẩm không đặc hiệu.

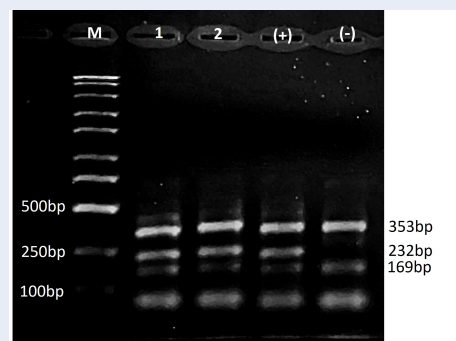
Kết quả tối ưu số chu kỳ phản ứng

Kết quả thể hiện ở hình 5 cho thấy, ở phản ứng 30 chu kỳ, băng sản phẩm xuất hiện rõ ràng, giảm sản phẩm không đặc hiệu hơn so với mẫu phản ứng 35 chu kỳ. Vì vậy, 30 chu kỳ là đủ để khuếch đại DNA mục tiêu mà không tạo ra nhiều sản phẩm phụ. Ở mẫu đối chứng âm (mẫu không mang đột biến), các băng sản phẩm sáng và rõ, không có dải đặc hiệu cho đột biến, cho thấy rằng mẫu này không mang đột biến G>C.

Qua nhiều lần thí nghiệm và tối ưu các thông số về nhiệt độ bắt cặp, nồng độ mỗi và số chu kỳ của T-ARMS PCR, chúng tôi đã bước đầu xây dựng được



Hình 4: Sản phẩm PCR khi tăng dần nồng độ mỗi Inner primer R [Nguồn: Nhóm tác giả] Trong đó: M: Thang 100bp (Servicebio); Lane 1: Nồng độ mỗi IR 0,5 μ M; Lane 2: Nồng độ mỗi IR 1 μ M; Lane 3: Nồng độ mỗi IR 1,5 μ M; Lane 4: Nồng độ mỗi IR 2 μ M; Mẫu (+): mẫu mang đột biến; Mẫu (-): mẫu không mang đột biến.



Hình 5: Sản phẩm tối ưu chu kỳ T-ARMS PCR [Nguồn: Nhóm tác giả] Trong đó: M: thang 100bp (Servicebio), Lane 1: 35 chu kỳ; Lane 2: 30 Chu kỳ Mẫu (+): mẫu mang đột biến; Mẫu (-): mẫu không mang đột biến

Bảng 3: Thành phần và điều kiện T-ARMS PCR

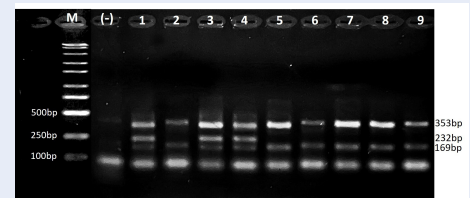
Thành phần	Thể tích (μ L)	Nồng độ cuối (μ M)
2X master mix	10	1X
Outer Primer F (10 μ M)	1	0,5
Outer Primer R (10 μ M)	1	0,5
Inner Primer F (10 μ M)	1	0,5
Inner Primer R (10 μ M)	3	1,5
H ₂ O	3	
DNA (10ng/ μ L)	1	
Tổng	20	

Chu trình: 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ: 95°C trong 20 giây, 54°C trong 20 giây, 72°C 20 giây; 72°C trong 5 phút

quy trình phân tích biến thể G>C như trình bày ở Bảng 3.

Kết quả kiểm chứng trên mẫu DNA của 9 tình nguyện viên trong cùng một gia đình

Sau khi đã bước đầu tối ưu thành công quy trình T-ARMS PCR xác định SNP G>C, chúng tôi tiến hành kiểm tra trên mẫu DNA của 9 tình nguyện viên trong cùng một gia đình đã có kết quả giải trình tự Sanger trước đó. Kết quả cụ thể được thể hiện trong hình 6, cho thấy 3 bệnh nhân trong gia đình có mang biến thể trên *TPM1* (bao gồm ông nội, ba và bệnh nhân), các thành viên còn lại trong gia đình không mang biến thể này.



Hình 6: Sản phẩm T-ARMS PCR của 9 thành viên trong gia đình [Nguồn: Nhóm tác giả] Trong đó: M: Thang 100bp; (-): Đối chứng âm không chứa mẫu; (1): Ông nội; (2): Bà nội; (3): Bệnh nhân; (4): Ba; (5): Mẹ; (6): Chú; (7): Thím; (8): Em họ 1; (9): Em họ 2;

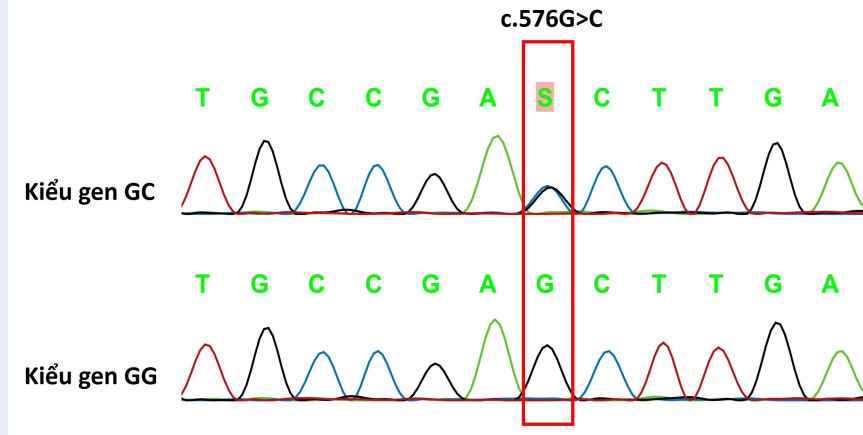
Kết quả đối chiếu với giải trình tự Sanger

Để kiểm tra kết quả của T-ARMS PCR, chúng tôi tiến hành đối chiếu kết quả điện di với kết quả giải trình tự Sanger trước đó. Kết quả cho thấy hai phương pháp có độ tương đồng 100% khi kết quả điện di cho thấy có 3 mẫu có mang biến thể, tương tự kết quả giải trình tự Sanger, tương ứng với mẫu DNA của ông nội, ba và bệnh nhân trong cùng một gia đình. Trong đó, kiểu gen đồng hợp tử GG có một đỉnh G duy nhất (ở các mẫu không mang đột biến), trong khi kiểu gen dị hợp tử GC có hai đỉnh nucleotide G và nucleotide C lồng vào nhau (ở các mẫu có mang đột biến) (Hình 7).

Như vậy, chúng tôi đã xây dựng và tối ưu được quy trình phát hiện biến thể G>C trên gen *TPM1*; kết quả cho thấy tính khả thi và độ chính xác bước đầu của quy trình.

THẢO LUẬN

Bệnh cơ tim phì đại là một bệnh tim di truyền, và việc tầm soát các đột biến di truyền liên quan đến bệnh có vai trò trong việc theo dõi lâm sàng, tư vấn cho gia đình và điều trị phòng ngừa nhằm giảm thiểu tỷ lệ tử vong do bệnh. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Tran Vu MT và các cộng sự (2019) trên 104 bệnh nhân đã phân tích 23 gen liên quan đến bệnh HCM cho thấy tỉ lệ



Hình 7: Kết quả giải trình tự Sanger khẳng định tính chính xác của T-ARMS PCR [CLC Main Workbench 5]

biến thể trên gen *MYBPC3* chiếm đa số (38,6%), tiếp theo là *TPM1* (20,5%) và *MYH7* (18,2%), đặc biệt các đột biến gen trên *MYH7*, *TPM1* và *TNNT2* được ghi nhận có liên quan đến tiên lượng xấu. Nghiên cứu này cũng công bố hai biến thể là c.842T>C (p.Met281Thr) và c.422T>A (p.Met141Lys) trên gen *TPM1* liên quan đến bệnh HCM ở bệnh nhân Việt Nam⁸. Trong nghiên cứu của chúng tôi, một biến thể mới c.576G>C (p.Glu192Asp) trên gen *TPM1* cũng đã được phát hiện ở bệnh nhân Việt Nam mắc bệnh HCM. Vị trí codon 192 của *TPM1* trước đây đã được ghi nhận là vị trí có ý nghĩa bệnh lý, với đột biến p.Glu192Lys đã từng được báo cáo ở bệnh nhân HCM⁹. Việc phát hiện thêm biến thể p.Glu192Asp (c.576G>C) ở một gia đình có người mắc HCM gợi ý rằng cùng một vị trí amino acid có thể xuất hiện nhiều dạng biến đổi khác nhau với ý nghĩa bệnh lý. Tuy nhiên, sự thay đổi từ glutamic acid (Glu) sang aspartic acid (Asp) vẫn thuộc cùng nhóm acid, mức độ tác động có thể yếu hơn so với sự thay đổi từ glutamic acid (Glu) sang lysine (Lys). Do đó, để đánh giá chính xác ý nghĩa bệnh lý tiềm năng của biến thể này, cần thực hiện thêm các phân tích *in silico* (như SIFT, PolyPhen, REVEL) cũng như các thử nghiệm chức năng nhằm xác định tác động của biến đổi lên cấu trúc và hoạt động của protein. Ngoài ra, nghiên cứu hiện tại chỉ mới đánh giá biến thể trong phạm vi một gia đình, cần mở rộng khảo sát trên cỡ mẫu lớn hơn để ước tính tần suất xuất hiện của biến thể, và xem xét khả năng tích hợp vào panel xét nghiệm (cho các gen thường gặp) phục vụ cho việc tầm soát bệnh cơ tim phì đại trong tương lai. Phân tích các đa hình đơn nucleotide (SNP) ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền, đặc biệt trong các bệnh phức tạp, được thực hiện bởi các kỹ thuật PCR nhanh chóng, đơn giản,

chi phí thấp và thông lượng cao. Tuy nhiên, nhiều phương pháp phân tích SNP truyền thống vẫn đòi hỏi bước hậu PCR phức tạp. Chẳng hạn, RFLP-PCR cần cắt sản phẩm PCR bằng enzyme cắt giới hạn; ASO-PCR phụ thuộc vào lai phân tử đặc hiệu alen và thẩm màn; ARMS-PCR tiêu chuẩn tuy không yêu cầu xử lý sau PCR nhưng phải thực hiện hai phản ứng riêng biệt cho từng alen. Phương pháp Tetra-primer ARMS PCR được thực hiện trong nghiên cứu này đã khắc phục được những hạn chế trên. Nguyên lý của kỹ thuật này dựa trên việc Taq DNA polymerase không có hoạt tính exonuclease 3'-5'. Theo đó, khi một bazơ đơn lẻ ở đầu 3' không khớp, đoạn mồi không kéo dài, trong khi nếu nó bổ sung cho nhau, PCR sẽ tiếp tục¹². Do đó, có thể thiết kế hai đoạn mồi bên trong có hướng kéo dài ngược nhau và hai đoạn mồi bên ngoài đối chứng dương tính cho bất kỳ vị trí SNP nào^{13,14}. Dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt và kích thước sản phẩm khuếch đại của bốn đoạn mồi, có thể phân biệt các kiểu gen khác nhau. Tetra-primer ARMS PCR phù hợp để xác định hầu hết các vị trí đột biến một bazơ và đã được khẳng định tính ưu việt so với các kỹ thuật PCR truyền thống, với độ tương đồng cao khi so sánh với kết quả giải trình tự gen. Trong nghiên cứu của Honardoost MA và cộng sự (2014), phương pháp T-ARMS PCR đạt độ đặc hiệu, độ nhạy và độ chính xác đều ở mức 100%, trong khi kỹ thuật ARMS-PCR thông thường chỉ đạt 47,1%¹⁵. Tương tự, nghiên cứu của Linjawi, Sabah (2019) cũng ghi nhận rằng phương pháp Tetra-primer ARMS-PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn rõ rệt so với các phương pháp phân tích SNP truyền thống như ARMS-PCR và RFLP-PCR¹⁶. Bên cạnh đó, ước tính sơ bộ về hóa chất, vật tư và chi phí vận hành thiết bị cho T-ARMS PCR cho thấy phương pháp này sẽ thấp hơn đáng kể so với giải trình

tự Sanger hay giải trình tự thế hệ mới. Vì vậy, T-ARMS PCR là một phương pháp sàng lọc mục tiêu, nhanh chóng và chi phí-hiệu quả, phù hợp để phát hiện các biến thể ở giai đoạn đầu, đặc biệt trong bối cảnh nguồn lực hạn chế tại Việt Nam và tại các cơ sở không có khả năng thực hiện giải trình tự toàn bộ gen. Trong giai đoạn bước đầu phát triển quy trình, các yếu tố đã được xem xét bao gồm: chất lượng DNA, nhiệt độ gắn mỗi, nồng độ các mỗi và chu kỳ phản ứng. Tuy nhiên, nghiên cứu gặp phải một vài hạn chế trong việc khuếch đại sản phẩm của cặp mỗi OF-IR, kết quả cho thấy băng sáng của sản phẩm còn khá mờ. Chúng tôi đề xuất tiếp tục tối ưu quy trình, bao gồm (1) tăng nồng độ mỗi IR; (2) điều chỉnh nồng độ thuốc thử PCR (đặc biệt là $MgCl_2$); (3) tinh chỉnh dải nhiệt độ bắt cặp; thiết kế lại mỗi IR (đổi vị trí hoặc thay mismatch) hoặc sử dụng mỗi LNA/modified nucleotides để tăng khả năng bắt cặp allele-specific trong các nghiên cứu mở rộng tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn. Nhìn chung, đây chỉ là nghiên cứu sơ bộ ban đầu nhằm phát triển và tối ưu quy trình T-ARMS PCR cho việc phát hiện biến thể tại vị trí c.576G>C trên gen *TPM1* trong một gia đình gồm 9 thành viên. Kết quả thu được tương đồng 100% với kết quả giải trình tự Sanger trên các mẫu này, cho thấy tính khả thi và độ chính xác bước đầu của quy trình. Tuy nhiên, để đánh giá tính ứng dụng rộng rãi và độ tin cậy của quy trình, cần tiến hành nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn trong các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu hóa bước đầu quy trình Tetra-primer ARMS PCR phát hiện biến thể c.576G>C trên gen *TPM1* ở một gia đình mắc HCM. Kết quả tương đồng với phương pháp giải trình tự Sanger, tuy nhiên cần mở rộng nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá đầy đủ và khẳng định giá trị ứng dụng lâm sàng của quy trình.

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT ĐƯỢC SỬ DỤNG

TPM1: *Tropomyosin 1*

T-ARMS PCR: Tetra-primer Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction

SNP: Đa hình đơn nucleotide

RFLP: Restriction fragment length polymorphisms

HCM: Bệnh cơ tim phì đại

SỰ CHẤP THUẬN VỀ MẶT ĐẠO ĐỨC

Sự chấp thuận về mặt đạo đức đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cấp cơ sở Khoa Y - Đại học Quốc gia TPHCM (Trường Đại học Khoa học Sức khỏe-ĐHQG HCM) phê duyệt theo quyết định số 11/QĐ-IRB-VN01.017.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết rằng không có xung đột lợi ích khi thực hiện nghiên cứu này.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Nguyễn Thị Minh Thư: thực hiện thí nghiệm, phân tích dữ liệu, viết và chỉnh sửa bản thảo.

Nguyễn Thị Kim Nhung: thực hiện thí nghiệm, phân tích dữ liệu.

Đặng Hoài Thương: thực hiện thí nghiệm, phân tích dữ liệu.

Nguyễn Ngọc Thủy: thu mẫu, thực hiện thí nghiệm, phân tích dữ liệu.

Nguyễn Thanh Liêm: thu mẫu, thực hiện thí nghiệm, phân tích dữ liệu.

Lê Minh Thông: phân tích dữ liệu, chỉnh sửa bản thảo.

Nguyễn Thị Thu Sương: xây dựng ý tưởng, thiết kế thí nghiệm, chỉnh sửa bản thảo.

Nguyễn Minh Nam: xây dựng ý tưởng, thiết kế thí nghiệm, chỉnh sửa bản thảo.

CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (VNU-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số C2024-44-28.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ommen SR, Mital S, Burke MA, Day SM, Deswal A, Elliott P. 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2020;142(25):e533–57.
2. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(12):1249–54.
3. Ommen SR, Semsarian C. Hypertrophic cardiomyopathy: a practical approach to guideline directed management. *Lancet*. 2021;398(10316):2102–8.
4. Hong Y, Xi HT, Yang XY, Su WW, Li XP. Pathogenic genes and clinical prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2025;17(1):99595.
5. Azimi A, Soveizi M, Salmanipour A, Mozafarybazargany M, Jolfayi AG, Maleki M. Identification of a novel likely pathogenic TPM1 variant linked to hypertrophic cardiomyopathy in a family with sudden cardiac death. *ESC Heart Fail*. 2024;11(5):3180–90.
6. Kumar P, Paramasivam G, Devasia T, Prabhu M, Rai MK, Prakashini K. A Novel TPM1 Mutation Causes Familial Hypertrophic Cardiomyopathy in an Indian Family: Genetic and Clinical Correlation. *Indian J Clin Biochem*. 2024;39(1):142–5.
7. Wilde AA, Semsarian C, Márquez MF, Shamlou AS, Ackerman MJ, Ashley EA, et al. European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases. *Europace*. 2022;24(8):1307–67.

Phụ lục 1: Định lượng cường độ băng (integrated density) trong Hình 2 bằng ImageJ

Hình 2a			Hình 2b		Hình 2c	
		Tỉ lệ		Tỉ lệ		Tỉ lệ
1	31,602.359	1.000	6,081.468	1.000	6,815.489	1.000
2	34,108.439	1.079	4,515.024	0.742	7,470.853	1.096
3	31,669.317	1.002	7,661.731	1.260	25,754.995	3.779
4	28,777.075	0.911	5,888.175	0.968	33,829.631	4.964
5	33,644.903	1.065	7,025.175	1.155	34,497.217	5.062
6	31,132.368	0.985	16,497.782	2.713	35,157.510	5.158
7	30,155.953	0.954	24,628.660	4.050	34,130.388	5.008
8	30,422.489	0.963	29,688.953	4.882	34,387.368	5.045
9	33,020.146	1.045	22,978.317	3.778	37,474.238	5.498
10	32,113.459	1.016	21,114.711	3.472	34,540.551	5.068

Phụ lục 2: Định lượng cường độ băng (integrated density) trong Hình 4 bằng ImageJ

Band 353bp			Band 232bp		Band 169bp	
		Tỉ lệ		Tỉ lệ		Tỉ lệ
1	37,271.986	1.000	21,087.208	1.000	29,313.401	1.000
2	34,726.865	0.932	32,161.208	1.525	31,945.037	1.090
3	36,495.693	0.979	40,477.815	1.920	28,279.158	0.965
4	31,245.137	0.838	34,752.451	1.648	25,187.622	0.859

8. Vu MTT, Nguyen TV, Huynh NV, Thai HTN, Nguyen VP, Huynh TDH. Presence of Hypertrophic Cardiomyopathy Related Gene Mutations and Clinical Manifestations in Vietnamese Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J*. 2019;83(9):1908–16.
9. ClinVar. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
10. Medrano RF, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*. 2014;56(7):599–608.
11. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(17).
12. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503–16.
13. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(17):88–8.
14. Alyethodi RR, Singh U, Kumar S, Alex R, Sengar GS, Raja TV. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle. *BMC Biotechnol*. 2021;21(1):36.
15. Honardoost MA, Tabatabaiean H, Akbari M, Salehi M. Investigation of sensitivity, specificity and accuracy of Tetra primer ARMS PCR method in comparison with conventional ARMS PCR, based on sequencing technique outcomes in IVS-II-I genotyping of beta thalassemia patients. *Gene*. 2014;549(1):1–6.
16. Linjawi S, Al-Gaithy Z, Sindi S, Hamdi N, Linjawi A, Alrofidi AJE-JPMR; 2019.

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A TETRA-PRIMER ARMS-PCR METHOD FOR DETECTING THE c.576G>C (p.Glu192Asp) VARIANT IN *TPM1* GENE ASSOCIATED WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IN A VIETNAMESE FAMILY

Thi Minh Thu Nguyen ¹, Thi Kim Nhung Nguyen ¹, Hoai Thuong Dang ², Ngoc Thuy Nguyen ³, Thanh Liem Nguyen ⁴, Minh Thong Le ⁴, Thi Thu Suong Nguyen ^{5,*}, Minh Nam Nguyen ^{1,5,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Research Center for Genetics and Reproductive Health Vietnam National University Ho Chi Minh City, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City Open University, Vietnam

³Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴School of Biotechnology, International University, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Thi Thu Suong Nguyen, Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: nttsuong@uhsvnu.edu.vn

Correspondence

Minh Nam Nguyen, Research Center for Genetics and Reproductive Health Vietnam National University Ho Chi Minh City, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: nmnam@uhsvnu.edu.vn

History

- Received: 25-06-2025
- Revised: 01-12-2025
- Accepted: 24-04-2026
- Published Online: 12-06-2026

DOI :
<https://doi.org/10.32508/vnuhcmj-hs.v7i1.672>



Copyright

© VNUHCM Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

ABSTRACT

Objective: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is one of the most common inherited cardiovascular diseases. To date, at least 1,800 mutations in more than 50 different genes have been reported to be associated with this condition, among which mutations in the *TPM1* gene have been identified as causing hypertrophic cardiomyopathy. Previously, we identified a variant in the *TPM1* gene (c.576G>C) in a family with individuals affected by hypertrophic cardiomyopathy. Therefore, this study initially aimed to develop and optimize a Tetra-primer ARMS PCR protocol to detect the c.576G>C variant in the *TPM1* gene associated with hypertrophic cardiomyopathy.

Methods: Specific primer pairs were designed to detect the G>C mutation site in the *TPM1* gene by optimizing the annealing temperature, primer concentration, and the number of PCR cycles in the Tetra-primer ARMS PCR. The protocol was validated using DNA samples from 9 volunteers in the same family, including 3 patients with hypertrophic cardiomyopathy and 6 unaffected members who had been previously analyzed by Sanger sequencing.

Results: The Tetra-primer ARMS PCR protocol showed that 3 patients in the family carried the variant in the *TPM1* gene, consistent with the results obtained from previous Sanger sequencing.

Conclusion: This study developed and initially optimized a Tetra-primer ARMS PCR protocol for detecting the c.576G>C variant in the *TPM1* gene. The results were consistent with the Sanger sequencing method; however, further studies with larger sample sizes are needed to fully evaluate and confirm the clinical applicability of this protocol.

Key words: Hypertrophic cardiomyopathy, *TPM1*, PCR, Tetra-primer ARMS PCR

Cite this article : Nguyen T M T, Nguyen T K N, Dang H T, Nguyen N T, Nguyen T L, Le M T, Nguyen T S, Nguyen M N. **DEVELOPMENT AND OPTI-MIZATION OF A TETRA-PRIMER ARMS-PCR METHOD FOR DETECTING THE c.576G>C (p.Glu192Asp) VARIANT IN *TPM1* GENE ASSOCIATED WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IN A VIETNAMESE FAMILY.** *Sci. Tech. Dev. J. - Health Sci.* 2026; 7 (1):911-919.