

## PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CÁC PROMOTER CỦA GENE *IGF2*

Nguyễn Xuân Huy<sup>1</sup>, Bùi Thị Chính<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>2</sup>, Trần Văn Giang<sup>2\*</sup>

**Tóm tắt.** Gene in dấu *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) mã hóa một yếu tố điều hòa sinh trưởng, có vai trò quan trọng trong sự phát triển phôi và hình thành nhau thai trên động vật và trên người. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp 5'-RACE và RT-PCR để xác định đầu 5' của các mRNA *Igf2* và định lượng mức độ biểu hiện của gene cũng như các promoter. Mức độ biểu hiện gene *IGF2* trên người và trình tự các promoter đã được phân tích và đánh giá. Gene *IGF2* nằm trên nhiễm sắc thể số 11 của người và nhiễm sắc thể số 7 của chuột. Sự biểu hiện và điều hòa biểu hiện của gene *IGF2* được thực hiện bởi các promoter khác nhau. Ở các mô khác nhau thì mức độ biểu hiện của gene cũng khác nhau. Mức độ biểu hiện của gene *IGF2* trong nhau thai trong mô cơ và trong dòng tế bào ung thư vú được điều khiển bởi các loại promoter đặc hiệu hPm, hP1, hP2, hP3, hP4 và hP0. Trong đó hP3, hP4 biểu hiện cao nhất.

**Từ khóa:** Biểu hiện, gene in dấu, *IGF2*, promoter, nhau thai.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một tế bào điển hình ở người chỉ biểu hiện khoảng 20% tổng số gene của nó vào một thời điểm nhất định, trong đó khoảng 1,5% mã hóa cho các protein (Biressi và cs.). Điều đó có nghĩa là, trong cơ thể sinh vật, mỗi tế bào chỉ biểu hiện một số nhóm gene cần thiết. Gene *Igf2* (Insulin-like growth factor 2) mã hóa một yếu tố điều hòa sinh trưởng, đặc biệt hoạt động mạnh trong giai đoạn phôi và cơ thể còn non ở động vật có vú, là gene in dấu (Imprinting gene) chỉ biểu hiện trên allele có nguồn gốc từ cá thể đực (Tran V.G. và cs., 2012). Chúng kiểm soát sự tăng sinh, sinh trưởng và biệt hóa của tế bào và đặc biệt là liên quan đến sự điều hòa phát triển phôi [3]. Để thực hiện chức năng đó, gene *IGF2* biểu hiện sớm trong quá trình phát triển phôi ở tất cả các loại mô nội bì, ngoại bì và trung bì. Ban đầu, người ta chỉ mới biết vai trò của gene *IGF1* và *IGF2* như là các receptor của hormone GH trong sự phát triển của tế bào cơ xương. Ở trên người, sự biểu hiện bất thường hoặc mất in dấu, hoặc siêu methyl hóa của gene *IGF2* dẫn đến hội chứng Beckwith-Wiedeman, Russell-Silver, khối u Wilms cũng như liên quan đến một số con đường phát sinh ung thư (Janot M. và cs., 2009). Khi bất hoạt gene *IGF2* trên phôi chuột, dẫn đến chuột con giảm 40% trọng lượng so với chuột con bình thường cùng một lứa. Nhiều nghiên cứu sau đó đã khẳng định gene *IGF2* đóng vai trò quan trọng và trực tiếp trong quá trình tăng sinh, phân hóa và biệt hóa của tế bào trên động vật có vú. Gene này còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và biệt hóa của nhau thai, chuột bị loại bỏ gene *IGF2* thì kích thước nhau thai giảm mạnh, dẫn đến trọng lượng cơ thể lúc sinh chỉ đạt 60% so với chuột hoang dại (Kusinski L.C. và cs., 2010). Tuy nhiên, làm sáng tỏ mức độ biểu hiện của gene *IGF2* trong các mô

<sup>1</sup> Đại học Huế

<sup>2</sup> Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

\* Email: tvgiang@hueuni.edu.vn

và dòng tế bào ung thư cũng như đánh giá vai trò của các promoter đặc hiệu thì chưa được đề cập đầy đủ. Do vậy, phân tích trình tự và nghiên cứu sự biểu hiện của gene *IGF2* thực sự là cần thiết là cơ sở để làm sáng tỏ cơ chế điều hòa biểu hiện của gene *IGF2* trên người và trên chuột.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên liệu và hoá chất**

Mô nhau thai 24 tuần, dòng tế bào ung thư vú, tế bào cơ thương mại MCF7 được Viện Di truyền Phân tử - Montpellier, Cộng hòa Pháp cung cấp. Các mô và dòng tế bào được xử lý với nitor lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -20 °C để tiến hành tách chiết DNA. Các cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm thể hiện qua Bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Mồi xuôi	Mồi ngược
hPm	5'-CTCTGAGGACCCTTGGAGACA-3'	5'-CCATTGGTGTCCAGGTCCTGT-3'
hP1	5'-GATGAGGCTCTCCCATCTGTAGG-3'	5'-GGATTCCCATTGGTGTCTGTAC-3'
hP2	5'-GTTCTGTCCCGTCGCACATT-3'	5'-GGTATGCAAACCGAACAGCG-3'
hP3	5'-CTGGACATTAGCTTCTCCTG-3'	5'-CTGAAGTTGGGTAAGGAGGC-3'
hP4S	5'-AGCGAGCCTTCTGCTGAGCT-3'	5'-CAGCATCGACTTCCCCATTGG-3'
hP0	5'-AACCCAGGGTTCTGAGTCTC-3'	5'-GAGACTCAGAACCCTGGGTT-3'
<i>IGF2</i>		
tổng số	5'-CCAATGGGGAAGTCGATGCTG-3'	5'-GGCCAAGAAGGTGAGAAGCAC-3'
5'PRace	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	
Oligo	5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA3'	
5'Race		

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

Các phương pháp sinh học phân tử chính được tham khảo theo Sambrook và Ruesel (2001) có cải tiến (Sambrook và cs. 2001).

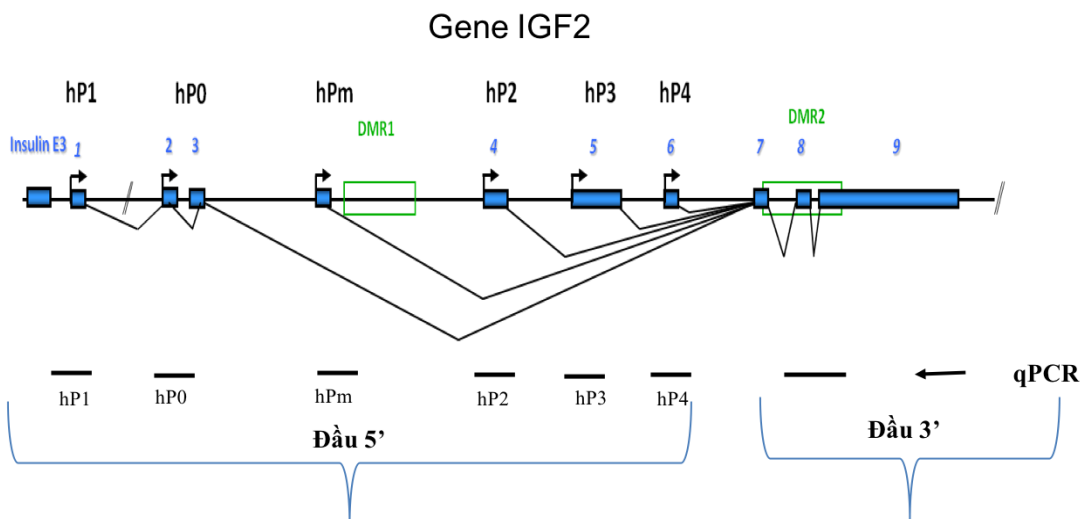
**Tách chiết DNA-tổng số:** 2 mL dịch mô tế bào được giải đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 40 µL proteinase (20 µg/mL) đã được hòa tan trong đệm pK 2X. Sau 4 giờ ủ ở nhiệt độ 50 °C, dịch tế bào được chiết với 4 mL phenol/chloroform (1:1). Ly tâm dịch chiết trong 30 phút ở 20 °C với tốc độ 6000 g/1 phút. Dịch nổi được tủa bằng 8 mL (EtOH) 70% và 300 µL NaCl 5 M ở nhiệt độ -20 °C trong 12 giờ hoặc qua đêm. Ly tâm thu lấy tủa, rửa tủa bằng 500 µL (EtOH) 70%. Ly tâm, làm khô DNA ở nhiệt độ phòng.

**Tách chiết RNA-tổng số:** Quá trình tách chiết RNA mô tế bào cũng thực hiện tương tự, nhưng có một số sai khác đó là sau khi thêm pK, tiếp tục thêm DNase để loại bỏ DNA. Trong quá trình tách chiết đều thực hiện ly tâm ở nhiệt độ thấp (4 °C). Sau khi thu được

RNA tổng số, tiến hành chiết RNA tổng số qua cột có chứa oligo T để tách mRNA ra khỏi hỗn hợp. Sau đó thu hồi mRNA bằng dung dịch thôi giải.

**Tạo dòng cDNA:** Chuẩn bị 2 µg RNA sau khi xác định bằng máy định lượng RNA và đã xử lý với DNase. Cho vào ống Eppendorf 1,5 mL đã khử trùng 1 µL Random primer hoặc môi đặc hiệu và 10 µL H<sub>2</sub>O cất khử trùng), ủ ở 70 °C/10 phút, sau đó đặt trong đá tuyết 5 phút. Thêm 4 µL Buffer 5x (FS), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL dNTP 2,5 mM, 0,7 µL enzyme sao chép ngược. Ôn định hỗn hợp khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ủ 42 °C trong 1 giờ. cDNA được tinh sạch bằng các viên bi thủy tinh và dung dịch rửa. Pha loãng cDNA 10 lần để thực hiện PCR định lượng hoặc bảo quản ở -20 °C.

**Phương pháp RT- PCR:** Trong phương pháp này, gene tham chiếu *GAPDH* được sử dụng để tính toán hàm lượng mRNA từ gene đích được biểu hiện trong mẫu nghiên cứu. Phản ứng bao gồm: 1 µL cDNA (5 ng/1µL), 1 µL mix qPCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, đệm qPCR 10X đã được pha theo tỷ lệ thích hợp), 0,5 µL (10 µM) mỗi loại môi, 7 µL nước khử trùng. Trình tự và vị trí các cặp môi được sử dụng trong thí nghiệm thể hiện qua Bảng 1 và Hình 1.



**Hình 1.** Vị trí các promoter và các cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu. Cặp môi IGF2 tổng số được thiết kế trên exon chung (exon 7) cho tất cả các promoter

Chu kỳ nhiệt: (1). **Sg70:** 95 °C; 2 phút; 45 chu kỳ (95 °C/5 giây; 52 °C/15 giây; 72 °C/30 giây)

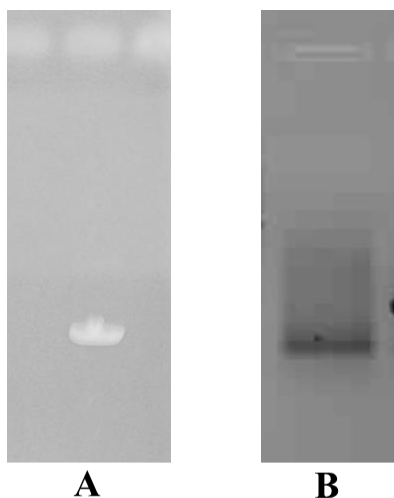
**Phương pháp 5'RACE:** Phương pháp này được sử dụng để sàng lọc các promoter mới (nếu có). 2 µg RNA sau khi xử lý với DNase, cho vào ống Eppendorf 1,5 mL, 1 µL Buffer CIP (Calf Intestine Alakine Phosphatase) 10X, 1 µL RNAOut (40U/1 µL), 1µL CIP (10U/1 µL) và 5 µL nước DEPC) được thêm vào và trộn đều, ủ ở 50 °C/1 giờ, sau đó thêm 90 µL DEPC và 100 µL phenol:chloroform, vortex mạnh (30s). Tiến hành ly tâm 16000 g/phút (5 phút) ở nhiệt độ phòng, thu lấy dịch nổi, thêm 2 µL 10 mg/mL glycogen, 10 µL 3 M sodium acetate, pH 5,2 và trộn đều, thêm 220 µL, 95% ethanol, vortex nhẹ, để trong đá tuyết khoảng 10 phút. Ly tâm lạnh (4 °C) trong 20 phút (16000 g/phút) để thu tủa, rửa tủa bằng 500 µL 70% ethanol, ly tâm, làm khô và hòa tủa trong 7 µL nước xử lý

bằng DEPC. Thêm 1  $\mu\text{L}$  Buffer TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 10X, 1  $\mu\text{L}$  RNaseOut (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  TAP (0,5 U/ $\mu\text{L}$ ), tổng thể tích lúc này là 10  $\mu\text{L}$ , lắc nhẹ và ủ ở 37 °C/1 giờ. Tiến hành ly tâm thu lấy tủa RNA, hòa tan trong 7  $\mu\text{L}$  nước xử lý bằng DEPC. Hút dịch này cho vào ống đã chứa GeneRacer RNA Oligo (0,25  $\mu\text{g}$ ), đảo đều dung dịch, ủ ở 65 °C/5 phút, làm lạnh bằng đá tuyết trong 2 phút, thêm vào 1  $\mu\text{L}$  Buffer ligase10X, 1  $\mu\text{L}$  ATP (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  RNaseOut (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  RNA T4 ligase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), ủ hỗn hợp ở 37 °C/1 giờ. Ly tâm thu tủa RNA, hòa tan tủa bằng 10  $\mu\text{L}$  nước xử lý bằng DEPC, bảo quản ở -20 °C .

### **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Kết quả tách chiết DNA và RNA tổng số**

DNA và RNA tổng số được tách chiết theo phương pháp mô tả ở trên. Độ tinh sạch của DNA được đánh giá tương đối qua điện di trên gel agarose (1%) (Hình 2A). Điện di cho thấy DNA tổng số không bị gãy và tương đối sạch, sản phẩm tốt để thực hiện các phản ứng tiếp theo. Đối với RNA, sau khi điện di (Hình 2B), được định lượng bằng máy quang phổ ở bước sóng 260 nm. Nồng độ được xác định là 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

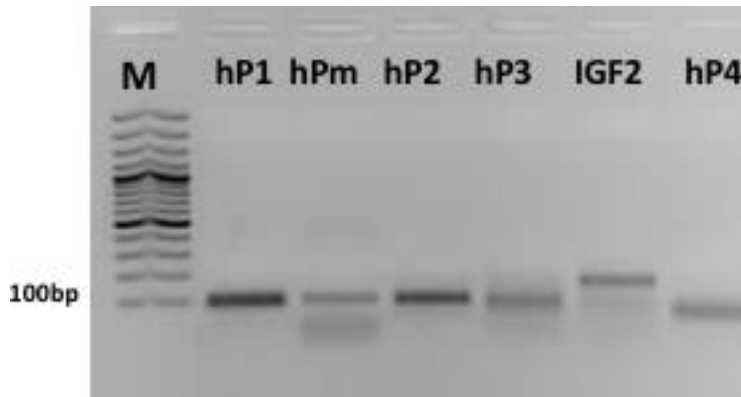


**Hình 2.** Điện di đồ DNA tổng số (A), RNA tổng số (B)

#### **3.2. Kích thước đoạn khuếch đại từ các promoter của gene *IGF2***

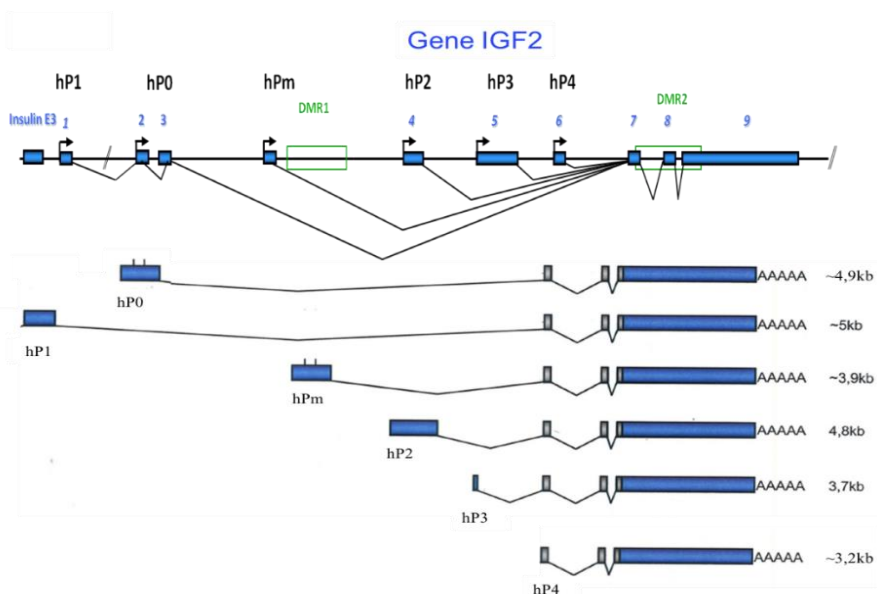
Với cặp mồi được sử dụng để khuếch đại đối với mỗi promoter, các vùng đặc hiệu này được khuếch đại thành công từ cDNA, kích thước đoạn khuếch đại đúng theo lý thuyết đã tính toán (hPm: 120, hP1: 98, hP2: 105, hP3: 121, *IGF2* tổng số: 216, hP4: 120) (Hình 3). Gene *IGF2* nằm trên nhiễm sắc thể số 11 của người. Gene này có cấu trúc phức tạp gồm nhiều exon (1,2,3,4,5,6,7,8,9) và 6 promoter (hP1, hP2, hP0, hP2, hP3, hP4), trong đó có 3 exon chung (7,8,9) và codon khởi đầu phiên mã nằm trên exon chung đầu tiên, từ mỗi promoter tạo ra một bản sao có kích thước khác nhau tùy theo độ dài đặc hiệu của mỗi promoter (Hình 4). Trong số các promoter trên thì mức độ phiên mã của hP2, hP3

và hP4 đóng góp số lượng bản sao lớn nhất của gene IGF2. Constância và cs., (2002) khi nghiên cứu trên chuột thì xác định được 4 promoter điều khiển biểu hiện gene IGF2 và có 3 exon chung là 4, 5, 6 (Constância M. và cs., 2002).



**Hình 3.** Điện di đồ khuếch đại các promoter đặc hiệu của IGF2, M (Marker 100 bp).

Các cặp môi này tiếp tục được sử dụng để định lượng mức độ biểu hiện của các promoter đặc hiệu trong nhau thai chuột.

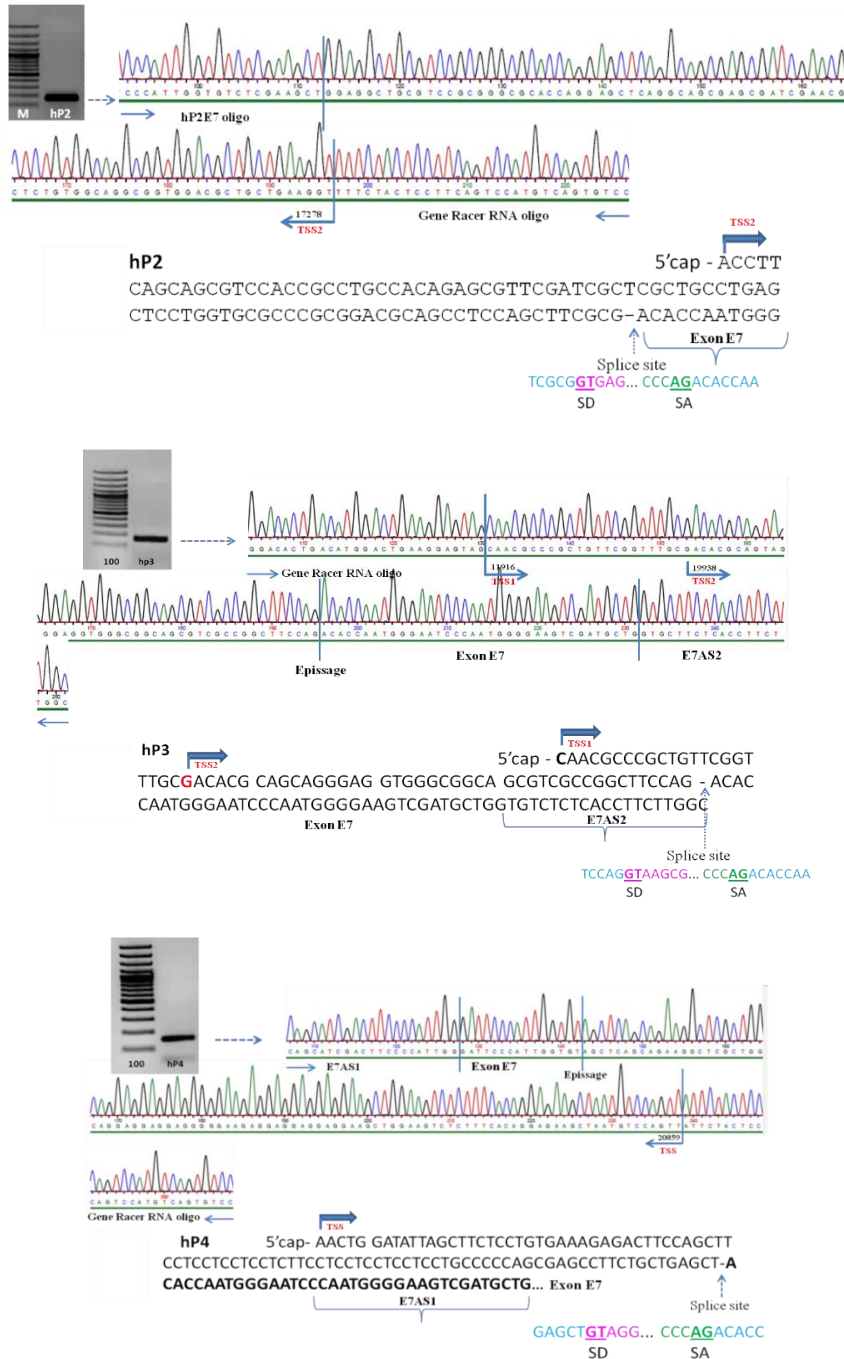


**Hình 4.** Cấu trúc di truyền của gene IGF2, vị trí và kích thước các promoter theo lý thuyết, các vùng phân hóa methyl DMR1, DMR2 (A). Kích thước các bản sao của IGF2 từ các promoter khác nhau (B)

### 3.3. Phân tích trình tự các promoter của gene IGF2

Bằng kỹ thuật 5'RACE, trình tự và vị trí khởi đầu phiên mã TSS của các promoter được xác định sau khi giải trình tự các sản phẩm tách chiết DNA tổng số từ khuôn mẫu.

Kích thước các bản sao từ các promoter này không lớn hp2: 105 bp, hp3: 121 bp, hp4: 121 bp và chứa 1 đến 2 điểm khởi đầu phiên mã (TSS) (Hình 5).



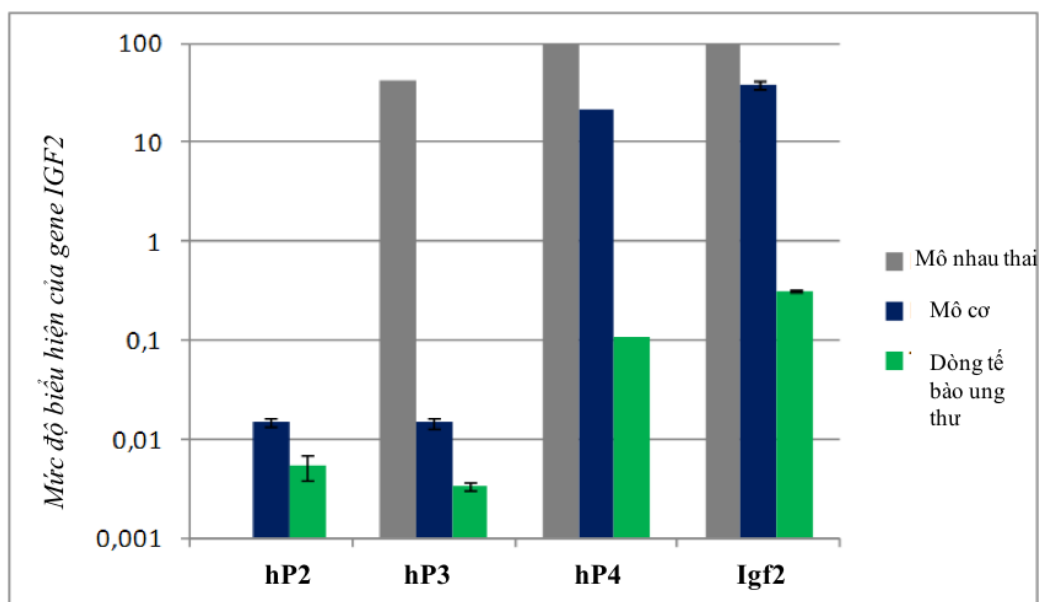
**Hình 5.** Vị trí TSS và trình tự của promoter hp2 (A), TSS và trình tự của promoter hp3 (B), TSS và trình tự của promoter hp4 (C)

Khi phân tích trình tự promoter hP2 cho thấy, vị trí khởi đầu phiên mã (TSS) bắt đầu từ nucleotide A từ vị trí 17278 nucleotide (Hình 5A). Đối với hP3 thì có 2 vị trí khởi đầu phiên mã TSS1 bắt đầu từ nucleotide C tương ứng với vị trí 19916 nucleotide và TSS2 bắt đầu bằng nucleotide G tương ứng với vị trí 19938 nucleotide (Hình 5B). Đối với hP4 thì chỉ có 1 vị trí khởi đầu phiên mã TSS bắt đầu từ nucleotide A tương ứng với vị trí 20859 nucleotide (Hình 5C). Theo Tran và cs., (2022) khi nghiên cứu trên chuột thì đối với promoter P0 trong nhau thai có 2 phiên bản và có 1-2 điểm khởi đầu phiên mã (TSS).

Trong tương quan với các promoter khác của gene IGF2 thì 3 promoter này nằm liền kề và khá gần như exon chung (Hình 5A). Trong các promoter này thì hP2 có 10 đảo CpG, còn hP3 và hP4 hầu như không có CpG, cả 3 promoter không có hộp TATA (Hình 5).

### 3.4. Mức độ biểu hiện của các promoter của gene IGF2

Các RNA tách từ mô nhau thai 24 tuần, mô cơ thương mại MCF7 và dòng tế bào ung thư vú của người được dùng khi định lượng mức độ biểu hiện các promoter. Mục tiêu là so sánh mức độ biểu hiện của các promoter so với mức độ biểu hiện của gen IGF2. Đồng thời cũng đánh giá mức độ biểu hiện đặc hiệu của các promoter trong các mô khác nhau đặc biệt là đánh giá mức độ biểu hiện của gene IGF2 trong các khối u. Trong ba mẫu RNA, mức độ biểu hiện của hP2 rất thấp so với hP4 và thậm chí thấp hơn cả hP3. Mặt khác, nó đại diện cho tỷ lệ biểu hiện tổng số RNA IGF2 trong mô cơ và khối u và hầu như không biểu hiện trong mô nhau thai (Hình 6).



**Hình 6.** Đánh giá mức độ biểu hiện của các promoter của gene IGF2 tương quan với sự biểu hiện của IGF2 tổng số

Theo Wolffe (2000) trong các promoter thì hP3 và hP4 của IGF2 trên người (tương đương với P2 và P3 trên chuột) đóng góp lớn vào tổng số các bản sao của IGF2, nghĩa là

chúng biểu hiện mạnh nhất trong tương quan với các promoter khác. Giải thích hiện tượng này, tác giả đã chỉ ra rằng, do vùng tăng cường đã kích hoạt vùng phân hóa methyl DMR2 và chính vùng này được xem như là yếu tố hoạt hóa 2 promoter gần kề (Wolffe, 2000). Pierluigi và cs., (2023) đã chỉ ra điều hòa biểu hiện và phiên mã gene IGF2 ở người liên quan đến sự tăng trưởng phát triển và phát triển khối u (Pierluigi S.và cs., 2023). Ngoài ra, điều hòa biểu hiện IGF2 còn liên quan đến mi483 (Rakan N.và cs., 2021).

#### **4. KẾT LUẬN**

Kích thước của mỗi promoter được khuếch đại với kích thước chính xác theo tính toán trên lý thuyết từ cDNA (hPm: 120, hP1: 98, hP2: 105, hP3: 121, *Igf2* tổng số: 216, hP4: 120). Mức độ biểu hiện của promoter của gen IGF2 trong ba mẫu RNA cho thấy mức độ biểu hiện của hP2 rất thấp so với hP4 và thậm chí cả hP3. Mặt khác, giống như hP2, nó đại diện cho tỷ lệ biểu hiện tổng số RNA IGF2 trong mô cơ và khối u và hầu như không biểu hiện trong mô nhau thai.

#### **LỜI CẢM ƠN**

*Công trình này được hỗ trợ từ kinh phí Nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế mã số: NCM.DHH.2022.07.*

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Biressi S., Molinaro M. and Cossu G. (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Devel Bio.* 308: 281-293.
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature.* 417(6892): 945-948.
- Janot M, Audfray A, Loriol C, Germot A, Maftah A. and Dupuy F. (2009). Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics.* 10: 483.
- Kusinski LC, Jones CJ, Baker PN, Sibley CP, Glazier JD (2010). Isolation of plasma membrane vesicles from mouse placenta at term and measurement of system A and system beta amino acid transporter activity. *Placenta.* 31(1): 53-59.
- Pierluigi S, Stephen JW, Yoko F-Y (2023) Human IGF2 Gene Epigenetic and Transcriptional Regulation: At the Core of Developmental Growth and Tumorigenic Behavior. *Biomedicines.* 11(6): 1655.
- Rakan N, Mårten L, Leif A, Shady Y (2021). ZBED6 regulates *Igf2* expression partially through its regulation of miR483 expression. *Sci Rep.* 11(1): 194-204.
- Sambrook, J, Russel, D. W (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, cold spring harbor laboratory press.
- Tran VG, Court F, Duputié A, Antoine E, Aptel N, Milligan L, Carbonell F, Lelay-Taha MN, Piette J, Weber M, Montarras D, Pinset C, Dandolo L, Forné T, Cathala G



(2012). H19 antisense RNA can up-regulate *Igf2* transcription by activation of a novel promoter in mouse myoblasts. *PLoS One*. 7(5): e37923.

Tran VG and Guy Cathala (2022). Detection of novel transcripts and evaluation of expression levels of *IGF2* in mouse placenta. *Veterinary Integrative Sciences*, 20(3): 719-729.

Wolffe, A. P. (2000). Transcriptional Control: Imprinting Insulation. *Current Biology*. 10(12): 463-465. Human *IGF2* Gene Epigenetic and Transcriptional Regulation: At the Core of Developmental Growth and Tumorigenic Behavior.

## SEQUENCE ANALYSIS AND EVALUATION OF EXPRESSION LEVEL OF PROMOTERS OF *IGF2* GENE

Nguyen Xuan Huy<sup>1</sup>, Bui Thi Chinh<sup>2</sup>, Nguyen Thi Hien<sup>2</sup>, Tran Van Giang<sup>2\*</sup>

**Abstract:** The imprinted gene *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) encodes a growth-regulated factor, which plays an important role in embryonic development and placental formation in animals and humans. This study uses 5'-RACE and RT-PCR methods to determine the 5' TSS of *IGF2* mRNAs and quantify the expression levels of this gene as well as promoters. *IGF2* gene expression levels in humans and promoter sequences are analyzed and evaluated. The *IGF2* gene is located on human chromosome 11 and mouse chromosome 7. Expression and regulation of the *IGF2* gene is carried out by different promoters. In different tissues, the level of gene expression is also different. The expression level of the *IGF2* gene in the placenta, muscle tissue and in breast cancer cell lines is controlled by specific promoters hPm, hP1, hP2, hP3, hP4 and hP0. Among them, hP3 and hP4 showed the highest expression.

---

**Keywords:** Expression, *IGF2*, imprinted gene, placenta, promoter.

---

---

<sup>1</sup> Hue University

<sup>2</sup> Hue University of Education, Hue University

\* Email: tvgiang@hueuni.edu.vn