XÂY DỰNG QUY TRÌNH KỸ THUẬT ASO REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN BIẾN THỂ RS67376798 TRÊN GEN *DPYD* LIÊN QUAN ĐẾN CHUYỂN HÓA THUỐC NHÓM FLUOROPYRIMIDIN

Nguyễn Ước Nguyện[1], Nguyễn Đăng Khoa[1], Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn[1]

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Biến thể rs67376798 (c.2846A>T) gen *DPYD* làm giảm hoạt tính enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), từ đó làm tăng nguy cơ tích lũy độc tính khi bệnh nhân điều trị bằng fluoropyrimidine.

Mục tiêu: Xây dựng và bước đầu thẩm định quy trình ASO real-time PCR sử dụng SYBR Green phát hiện rs67376798 gen *DPYD*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm tại Trung tâm Xét nghiệm và Nghiên cứu Y sinh (TTXNNCYS), Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch (Trường ĐHYK PNT) từ tháng 02/2025 đến tháng 06/2026. Hệ mồi đặc hiệu alen được thiết kế với đầu 3′ nhận diện vị trí biến thể. Plasmid chứng mang alen A và T được xây dựng bằng kỹ thuật tạo dòng và gây đột biến điểm tương ứng (đối với alen biến thể T), sau đó xác nhận bằng giải trình tự Sanger. Phản ứng được tối ưu về nồng độ mồi và nhiệt độ bắt cặp; độ đặc hiệu, hiệu suất khuếch đại và khả năng định kiểu gen được đánh giá trên 23 mẫu DNA người bằng đối chiếu với Sanger.

Kết quả: Đã xây dựng thành công plasmid chứng mang alen A (thể hoang dại) và alen T (biến thể). Hệ mồi ASO thể hiện tính đặc hiệu, không ghi nhận sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu hoặc hiện tượng primer-dimer. Điều kiện phản ứng tối ưu được xác định tại nồng độ mồi 0,1 µM và nhiệt độ bắt cặp 66°C. Trên 23 mẫu DNA người, quy trình cho kết quả định kiểu gen A/A phù hợp 100% với phương pháp giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, cần tiếp tục đánh giá trên các mẫu mang kiểu gen A/T và T/T để xác định đầy đủ khả năng phân biệt và độ tin cậy của quy trình đối với các kiểu gen khác nhau.

Kết luận: Đã xây dựng thành công quy trình ASO Real-time PCR sử dụng SYBR Green phát hiện biến thể rs67376798 gen *DPYD.*

Từ khóa: *DPYD*, c.2846A>T, rs67376798, ASO Real-time PCR.

[1]*Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch*
Tác giả chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Ước Nguyện
Email: nguyennu@pnt.edu.vn
Mã bài: N988
Ngày nhận bài: 20/6/2026
Ngày phản biện khoa học: 17/6/2026
Ngày duyệt bài: 10/8/2026

SUMMARY

DEVELOPMENT OF AN ASO REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF THE *DPYD* RS67376798 VARIANT ASSOCIATED WITH FLUOROPYRIMIDINE METABOLISM

Background: The *DPYD* rs67376798 (c.2846A>T) variant reduces dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity, thereby increasing the risk of fluoropyrimidine-related toxicity due to drug accumulation.

Objective: To develop and preliminarily validate a SYBR Green-based allele-specific real-time PCR (ASO real-time PCR) assay for the detection of the *DPYD* rs67376798 variant.

Materials and Methods: This experimental study was conducted at the Biomedical Research and Laboratory Diagnostics Center, Pham Ngoc Thach University of Medicine, from February 2025 to June 2026. Allele-specific primers were designed with their 3′ ends targeting the variant site. Reference plasmids carrying the A (wild-type) and T (variant) alleles were constructed using cloning and site-directed mutagenesis, respectively, and subsequently confirmed by Sanger sequencing. Primer concentration and annealing temperature were optimized. Analytical specificity, amplification efficiency, and genotyping performance were evaluated using DNA samples from 23 human volunteers, with genotyping results compared against Sanger sequencing.

Results: Plasmid controls carrying allele A (wild type) and allele T (variant) were successfully constructed. The ASO primer system demonstrated high specificity, with no non-specific amplification products or primer-dimer formation observed. The optimal reaction conditions were determined to be a primer concentration of 0.1 µM and an annealing temperature of 66°C. Testing of 23 human DNA samples showed 100% concordance between the genotyping results (A/A) obtained using this protocol and those obtained by Sanger sequencing. However, further evaluation using samples with A/T and T/T genotypes is required to fully assess the protocol's ability to discriminate between different genotypes and its overall reliability.

Conclusion: A SYBR Green-based ASO real-time PCR assay for detecting the DPYD rs67376798 variant was successfully developed. The preliminary findings support further evaluation of its analytical performance using samples representing different genotypes.

Keywords: *DPYD, c.2846A>T, rs67376798, allele-specific real-time PCR*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc nhóm fluoropyrimidin, đặc biệt là 5-fluorouracil (5-FU), được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư nhưng có thể gây độc tính nghiêm trọng (độ 3-4 theo CTCAE) ở khoảng 20–30% bệnh nhân [1]. Một yếu tố nguy cơ quan trọng là các biến thể di truyền trên gen *DPYD*, mã hóa enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) tham gia chuyển hóa 5-FU. Trong đó, biến thể rs67376798 (c.2846A>T; p.Asp949Val) làm giảm hoạt tính DPD và có liên quan đến tăng nguy cơ độc tính do fluoropyrimidin [2]. Do đó, các hướng dẫn dược di truyền quốc tế khuyến cáo xét nghiệm các biến thể có ý nghĩa trên *DPYD* trước điều trị nhằm hỗ trợ cá thể hóa liều thuốc và giảm nguy cơ biến cố bất lợi [3].

Theo dữ liệu gnomAD, tần suất alen rs67376798 khác nhau giữa các quần thể, đạt khoảng 0,6% ở người châu Âu không thuộc Phần Lan và dưới 0,1% ở một số quần thể khác [4].

Tuy nhiên, dữ liệu về biến thể này tại Việt Nam còn hạn chế, đặt ra nhu cầu khảo sát đặc điểm di truyền của biến thể trong quần thể người Việt Nam. Trong bối cảnh đó, ASO real-time PCR (allele-specific oligonucleotide real-time PCR) là phương pháp tiềm năng để phát hiện biến thể đích. Kỹ thuật sử dụng mồi đặc hiệu alen, dựa trên sự phù hợp tại đầu 3′ của mồi với trình tự DNA đích, kết hợp theo dõi tín hiệu khuếch đại theo thời gian thực. Với quy trình tương đối đơn giản, thời gian phân tích ngắn và tiềm năng tối ưu chi phí, phương pháp có thể phù hợp cho khảo sát biến thể trên số lượng mẫu lớn.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này nhằm xây dựng và bước đầu đánh giá quy trình ASO real-time PCR phát hiện rs67376798, hướng đến phát triển công cụ sàng lọc phục vụ nghiên cứu dịch tễ học phân tử, góp phần bổ sung dữ liệu di truyền quần thể người Việt Nam và tạo cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng dược di truyền trong điều trị ung thư tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

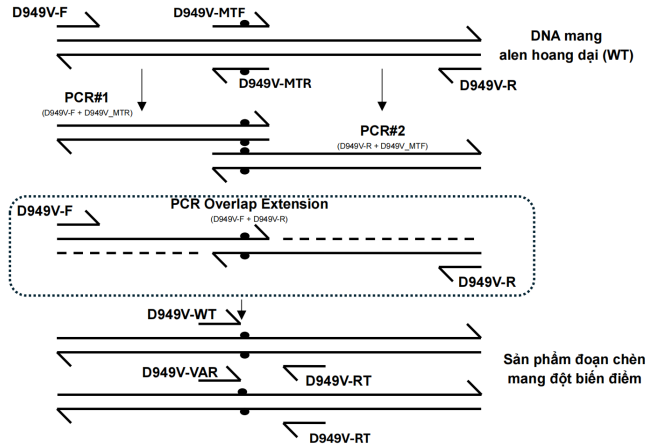
2.1. Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm được thực hiện tại TTXNNCYS, Trường ĐHYK PNT từ tháng 02/2025 đến 06/2026, trên 23 mẫu DNA bộ gen tách chiết từ máu toàn phần của người tình nguyện khỏe mạnh (≥ 18 tuổi), có kết quả khám sức khỏe trong giới hạn bình thường và đồng ý tham gia nghiên cứu. Mẫu được thu thập theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện. Các mẫu máu không đủ thể tích, bị tán huyết, bị đông, cũng như các mẫu DNA sau ly trích không đạt độ tinh sạch (A_{260}/A_{280} <1,8) đều được xem như không đạt chất lượng và loại bỏ ra khỏi nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Thiết kế mồi: Trình tự tham chiếu gen *DPYD* và vị trí biến thể rs67376798 được xác định từ NCBI GenBank (GRCh38) và dbSNP. Các mồi khuếch đại, mồi gây đột biến rs67376798 và mồi đặc hiệu alen cho ASO Real-time PCR được thiết kế bằng Primer-BLAST (NCBI).

2.2.2. Xây dựng và đánh giá DNA plasmid chứng:

DNA plasmid chứng cho alen A (hoang dại hay wild-type, WT) và alen T (biến thể hay variant, VAR) của rs67376798 được chuẩn bị như sau: (i) DNA plasmid alen A: Đoạn gen *DPYD* mục tiêu được khuếch đại từ DNA bộ gen người có kiểu gen đồng hợp A/A (Giải trình tự Sanger, SGS) bằng cặp mồi D949V-F/R đã được công bố trước đó [5], sau đó tạo dòng vào vector pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen); (ii) DNA plasmid alen T: Được xây dựng bằng kỹ thuật đột biến điểm định hướng kết hợp Overlap Extension PCR trên nền khuôn là DNA plasmid hoang dại đã tạo (i). Hai đoạn trung gian mang điểm đột biến rs67376798 được khuếch đại riêng biệt (bởi các cặp mồi D949V-F/D949V-MTR và D949V-MTF/D949V-R), sau đó nối chồng lấp và khuếch đại kéo dài bằng cặp mồi ngoài D949V-F/R (Sơ đồ 1). Sản phẩm hoàn chỉnh được tạo dòng vào vector pCR™2.1-TOPO®. Tất cả các dòng plasmid tái tổ hợp (*E. coli*) sau khi sàng lọc bằng Colony PCR (đoạn mồi M13 đặc hiệu vector) đều được tách chiết và giải trình tự Sanger để xác nhận chính xác trình tự alen trước khi đưa vào thử nghiệm. DNA plasmid chuẩn sẽ được sử dụng để giả lập các kiểu gen A/A, T/T và A/T của biến thể rs67376798.



Sơ đồ 1. Thiết kế các đoạn mồi trong quy trình xây dựng ASO real-time PCR

2.2.3. Xác định và tối ưu hóa điều kiện phản ứng ASO real-time PCR

Quy trình ASO real-time PCR được xây dựng và tối ưu hóa dựa trên các mẫu chứng giả lập kiểu gen A/A, T/T và A/T. Mỗi mẫu DNA được phân tích song song trong hai phản ứng real-time PCR riêng biệt: phản ứng thứ nhất sử dụng hệ mồi đặc hiệu alen A (D949V-WT/D949V-RT), phản ứng thứ hai sử dụng hệ mồi đặc hiệu alen T (D949V-VAR/D949V-RT). Cách bố trí này cho phép so sánh giá trị Ct thu được từ hai phản ứng để biện luận kiểu gen của mẫu (Sơ đồ 1). Mỗi phản ứng có thể tích 10 µL, gồm 5 µL SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit 2X (Bioline), 5 ng DNA mẫu và nước không chứa nuclease vừa đủ. Nồng độ mồi được khảo sát ở 0,1; 0,2 và 0,4 µM, với nhiệt độ bắt cặp tương ứng 60°C, 64°C và 66°C. Chương trình nhiệt gồm 95°C trong 2 phút, sau đó 40 chu kỳ 95°C trong 5 giây và bắt cặp trong 15 giây. Đường cong nóng chảy được phân tích từ 60°C đến 95°C với tốc độ tăng nhiệt 0,15°C/s, sau giai đoạn giữ ở 95°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút. Kiểu gen được xác định dựa trên $|\Delta C_t| = |C_{tWT} - C_{tVAR}|$. Mẫu được xác định là A/T khi $|\Delta C_t| < 3$ (tiêu chí phân loại được thiết lập trong quy trình nghiên cứu). Mẫu xác định là A/A khi $|\Delta C_t| \geq 3$ và $C_{tWT} < C_{tVAR}$; T/T khi $|\Delta C_t| \geq 3$ và $C_{tWT} > C_{tVAR}$. Trường hợp chỉ một phản ứng có tín hiệu khuếch đại, kiểu gen được xác định theo hệ mồi tương ứng. Hiệu suất phản ứng được đánh giá bằng đường chuẩn từ dãy pha loãng DNA plasmid chứng 10 lần (10^{-1} đến 10^{-5} bản sao/µL), với tiêu chí đạt gồm hiệu suất 90–110%, R^2? 0,99, slope từ -3,1 đến -3,6 cho cả hai hệ mồi.

2.2.4. Đánh giá độ tương đồng: Nghiên cứu tiến hành thu thập 23 mẫu máu toàn phần từ người tình nguyện theo các tiêu chuẩn đã mô tả tại Mục 2.1. DNA bộ gen được tách chiết bằng bộ sinh phẩm TopPURE® Blood DNA Extraction Kit (ABT). Lượng DNA thu được được sử dụng đồng thời cho hai mục đích: giải trình tự SGS vùng gen mục tiêu và thử nghiệm quy trình real-time PCR đã xây dựng. Cụ thể, đoạn gen *DPYD* chứa vị trí biến thể rs67376798 được khuếch đại bằng cặp mồi D949V-F/D949V-R và giải trình tự hai chiều trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Trình tự nucleotide sau đó được phân tích bằng phần mềm tin sinh học (Mục 2.4). Tỷ lệ tương đồng theo từng kiểu gen được xác định bằng tỷ lệ phần trăm số mẫu có kết quả kiểu gen từ ASO real-time PCR trùng khớp với kết quả SGS trên tổng số mẫu thuộc kiểu gen tương ứng theo SGS. Quy trình real-time PCR được đánh giá đạt yêu cầu khi độ tương đồng so với SGS đạt 100%.

2.3. Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch chấp thuận Số: 1185/TĐHYKPNT-HĐĐĐ vào ngày 22 tháng 10 năm 2024.

2.4. Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm Microsoft Excel nhằm phục vụ xử lý số liệu. Dữ liệu SGS và ASO Real-time PCR được phân tích bằng phần CLC Main Workbench 5.5 (QIAGEN) và phần mềm QuantStudio™ Design and Analysis Software (Applied Biosystems).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả thiết kế mồi

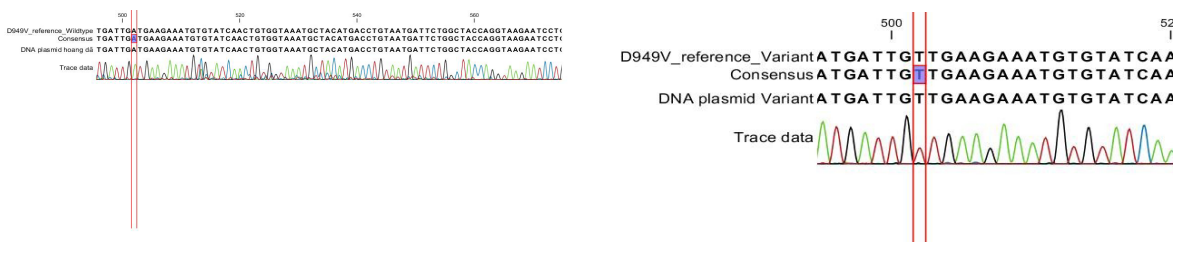
Bảng 1: Trình tự và thông số các cặp đoạn mồi

Đoạn mồi	Trình tự (5′-3′)	Độ dài (nt)	T_m (°C)	%GC	Sản phẩm (bp)
A. Phản ứng PCR tạo đoạn chèn và PCR overlap extension					
D949V-F	CCAGTCTCCCAAGTTAATATAATGC	25	57,6	40,0	380
D949V-R	AGAGCAATATTTGGCACCACTG	22	59,2	45,4	
B. Phản ứng PCR tạo đột biến có định hướng					
D949V-F	CCAGTCTCCCAAGTTAATATAATGC	25	57,6	40,0	212
D949V-MTR	GCTATGATTGTT*GAAGAAATGTGTATC	27	62,2	33,3	
D949V-MTF	CATTTCTTCAA*CAATCATAGCCACAAC	27	63,7	37,0	189
D949V-R	AGAGCAATATTTGGCACCACTG	22	59,2	45,4	
C. Phản ứng ASO real-time PCR					
Trình tự đặc hiệu cho alen hoang dại (Wild-type)					
D949V-WT	GAGCAAGTTGTGGCTATGATTGA**	23	61,1	43,5	111
D949V-RT	GCATTCTAATTCCAGCAGGATTCTT	25	62,5	40,0	
Trình tự đặc hiệu cho alen biến thể (Variant)					
D949V-VAR	GAGCAAGTTGTGGCTATGATTGT**	23	61,1	43,5	111
D949V-RT	GCATTCTAATTCCAGCAGGATTCTT	25	62,5	40,0	

** Vị trí đột biến điểm được thiết kế nhân tạo; ** Vị trí nucleotide (nt) đặc hiệu alen*

Các mồi được thiết kế có chiều dài 22–27 nucleotide, hàm lượng GC từ 33,3% đến 45,4%. Hai hệ mồi ASO có Tm lần lượt là 61,1°C và 62,5°C đối với mồi đặc hiệu alen và mồi chung, với chênh lệch T_m là 1,4°C. Sản phẩm ASO real-time PCR có kích thước dự kiến 111 bp, phù hợp với mục tiêu khuếch đại đoạn DNA ngắn. Các thông số thiết kế là cơ sở ban đầu cho việc tối ưu hóa điều kiện phản ứng thực nghiệm.

3.2. Kết quả xây dựng và xác nhận trình tự các DNA plasmid chứng.

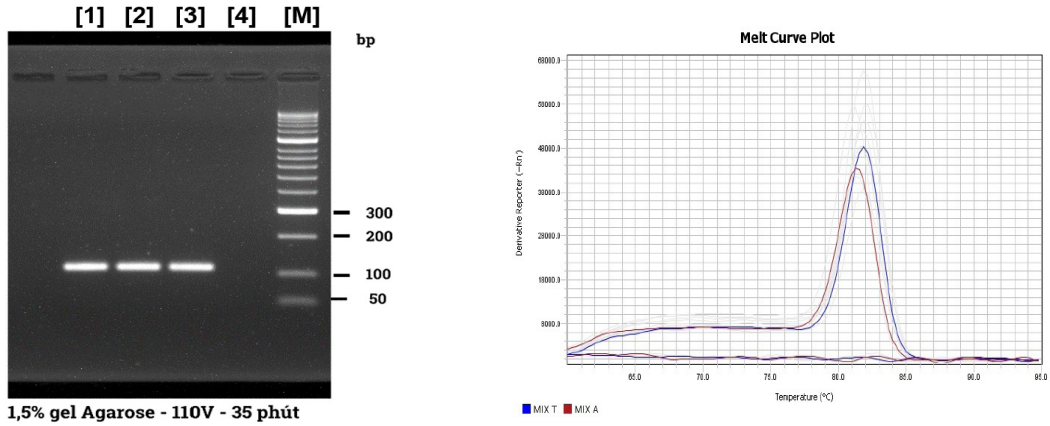


Hình 1. Kết quả SGS của hai DNA plasmid alen A (A) và alen T (B) đối chứng với trình tự tham chiếu

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng thành công hai plasmid tái tổ hợp mang alen hoang dại và alen biến thể của gen *DPYD*. Giải trình tự Sanger xác nhận trình tự các plasmid phù hợp với thiết kế, không ghi nhận đột

biến ngoài ý muốn trong vùng khảo sát so với trình tự tham chiếu NCBI GenBank (GRCh38). Plasmid hoang dại mang nucleotide A, trong khi plasmid biến thể mang nucleotide T tại vị trí đích (hình 1).

3.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện phản ứng ASO Real-time PCR



(A) Kết quả điện di sản phẩm PCR *(B) Đồ thị đường cong nóng chảy*

Hình 2: Kết quả đánh giá độ đặc hiệu đoạn mồi đặc hiệu alen của ASO real-time PCR

Kết quả điện di trên gel agarose 1,5% ghi nhận chỉ xuất hiện vạch sáng duy nhất [1-3], kích thước sản phẩm đúng như dự kiến (khoảng 111 bp), chứng âm không xuất hiện và đồng thời không có sản phẩm phụ [4]. Phân tích đường cong nóng chảy chỉ xuất hiện một đỉnh duy nhất, nhiệt độ nóng chảy alen A (81,5 °C) và alen T (82?C), không ghi nhận các đỉnh phụ ở mức nhiệt độ khác và chứng âm không xuất hiện tín hiệu. Điều này cho thấy cặp mồi ASO được thiết kế có độ đặc hiệu cao.

3.4. Tối ưu hóa nồng độ đoạn mồi đặc hiệu alen

Bảng 2: Kết quả tối ưu hóa nồng độ đoạn mồi đặc hiệu alen tại 60?C

Nồng độ (µM)	Kiểu gen	$C_{t\ WT}$ (Mean ± SD)	$C_{t\ VAR}$ (Mean ± SD)	$\|\Delta C_t\|$
0,4	A/A	15,3 ± 0,2	16,2 ± 0,6	0,9
	T/T	24,8 ± 0,3	14,7 ± 0,3	10,1
	A/T	17,1 ± 0,1	16,7 ± 0,25	0,4
	Chứng âm (NTC)	39,436	Không xuất hiện	
0,2	A/A	14,2 ± 0,6	16,3 ± 0,05	2,1
	T/T	23,4 ± 0,1	14,5 ± 0,1	8,9
	A/T	17,0 ± 0,25	16,8 ± 0,1	0,2
	Chứng âm (NTC)	32	34,7	
0,1	A/A	17,4 ± 0,1	19,55 ± 0,35	2,15
	T/T	30,4 ± 0,4	16,95 ± 0,25	13,5
	A/T	20,5 ± 0,3	18,2 ± 0,01	2,3
	Chứng âm (NTC)	Không xuất hiện	Không xuất hiện	

NTC: no template control – mẫu chứng không chứa khuôn mẫu

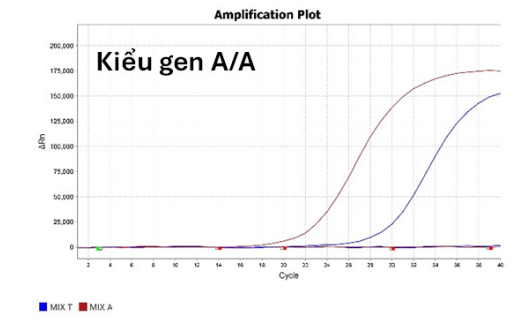
Ở cả ba mức nồng độ mồi (0,4; 0,2 và 0,1 µM), giá trị $|\Delta C_t|$ của kiểu gen A/A dao động từ 0,9 đến 2,1, đều nhỏ hơn 3, chưa đủ để phân biệt rõ kiểu gen A/A với A/T. Bên cạnh đó, NTC xuất hiện tín hiệu khuếch đại ở cả hai alen tại mức nồng độ 0,4 và 0,2 µM, cho thấy nguy cơ khuếch đại không đặc hiệu. Do đó, nhiệt độ bắt cặp 60°C chưa đáp ứng yêu cầu phân biệt kiểu gen và kiểm soát tín hiệu nền. Mức nồng độ 0,1 µM được lựa chọn để tiếp tục tối ưu hóa, kết hợp khảo sát nhiệt độ bắt cặp ở các mức 64?C và 66?C nhằm cải thiện tính đặc hiệu và khả năng phân biệt alen.

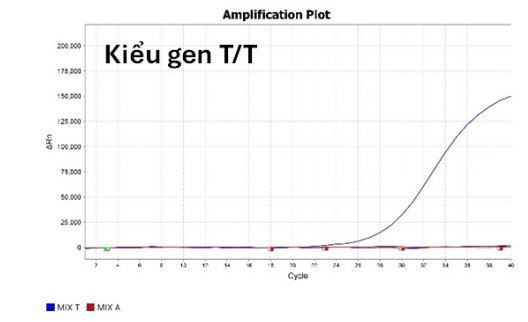
Bảng 3: Kết quả tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp của phản ứng ASO Real-time PCR

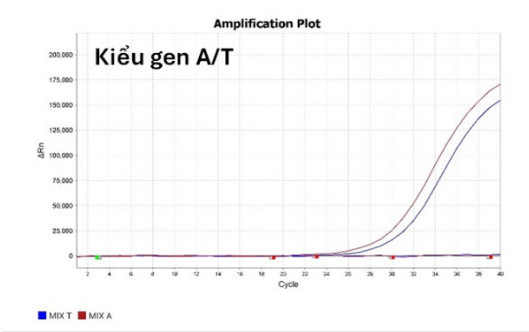
Nhiệt độ (?C)	Kiểu gen	$C_{t\ WT}$ (Mean ± SD)	$C_{t\ VAR}$ (Mean ± SD)	|ΔCt|
60	A/A	17,4 ± 0,1	19,55 ± 0,35	2,2
	T/T	30,4 ± 0,4	16,95 ± 0,25	13,5
	A/T	20,5 ± 0,3	18,2 ± 0,01	2,3
	Chứng âm (NTC)	Không xuất hiện	Không xuất hiện	
64	A/A	15,8 ± 0,1	18,4 ± 0,3	2,6
	T/T	30,0 ± 1	15,04 ± 0,22	15,0
	A/T	18,44 ± 0,19	16,7 ± 0,3	1,74
	Chứng âm (NTC)	Không xuất hiện	Không xuất hiện	
66	A/A	23,1 ± 1,6	32,3 ± 2,6	9,2
	T/T	Không xuất hiện	28,8 ± 0,1	Không áp dụng
	A/T	29,9 ± 0,7	29,0 ± 1,65	0,9
	Chứng âm (NTC)	Không xuất hiện	Không xuất hiện	

NTC: no template control – mẫu chứng không chứa khuôn mẫu

Ở nồng độ mồi 0,1 µM, việc nâng nhiệt độ bắt cặp từ 60°C lên 66°C giúp cải thiện khả năng phân biệt kiểu gen. Tại 60°C và 64°C, khả năng phân biệt kiểu gen A/A và A/T còn hạn chế do $|\Delta C_t| < 3,0$. Tuy nhiên, khi tăng lên 66°C, độ phân biệt giữa các kiểu gen có thay đổi ($|\Delta C_t|$ của A/A tăng lên 9,2, còn A/T là 0,9 và ở kiểu gen T/T chỉ còn tín hiệu của phản ứng đặc hiệu alen T). Cả ba mức nhiệt độ đều đảm bảo phản ứng không xuất hiện sản phẩm không đặc hiệu khi chứng âm (NTC) không xuất hiện tín hiệu. Như vậy, nhiệt độ 66°C được đề xuất làm điều kiện bắt cặp để tiếp tục tối ưu hóa phản ứng ASO real-time PCR.

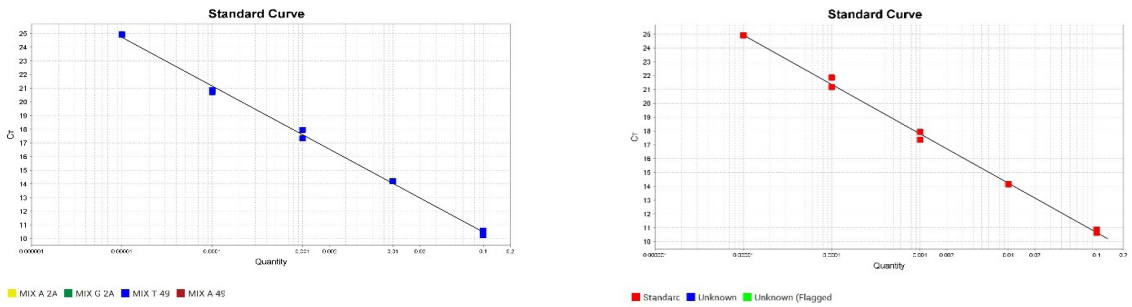






Hình 3: Biểu đồ đường cong khuếch đại của các kiểu gen biến thể rs67376798

Kết quả xây dựng đường chuẩn cho thấy cả hai hệ mồi đều đạt tiêu chuẩn tối ưu với độ tuyến tính cao ($R^2 \geq 0,997$) và hiệu suất phản ứng nằm trong khoảng từ 90,7% đến 90,8% (Hình 4A với phản ứng đặc hiệu alen A: Slope = -3,57, R^2= 0,998, E= 90,7%; Hình 4B phản ứng đặc hiệu alen T: Slope = -3,56, R^2= 0,997, E = 90,8%).



(A) **(B)**

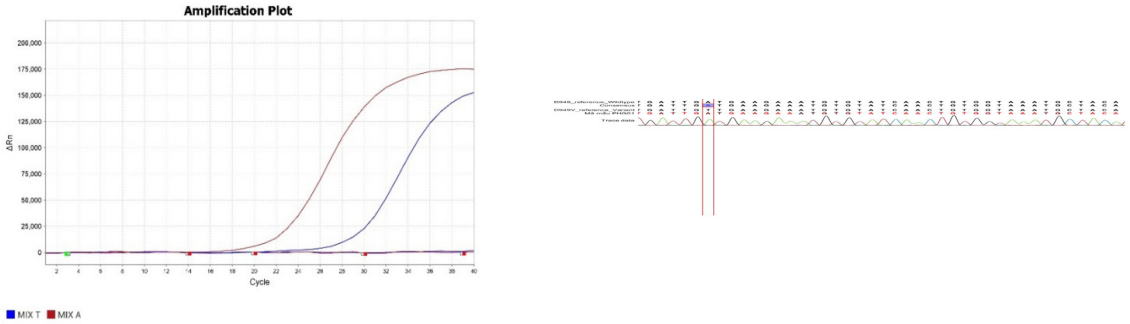
Hình 4: Đường chuẩn ở hai hệ mồi đặc hiệu alen A và alen T

3.5. Kết quả đánh giá độ tương đồng

Bảng 4: Kết quả đánh giá độ tương đồng giữa SGS và ASO real-time PCR

SGS	ASO real-time PCR				Độ tương đồng
Kiểu gen (N=23)	Kiểu gen (N=23)	$C_{t\ WT}$ (Mean ± SD)	$C_{t\ VAR}$ (Mean ± SD)	$\|\Delta C_t\|$ (Mean)	
A/A (23)	A/A (23)	28,3 ± 1,02	33,2 ± 1,26	4,9	100% (23/23)
A/T (0)	A/T (0)	N/A	N/A	N/A	N/A
T/T (0)	T/T (0)	N/A	N/A	N/A	N/A

Ở các mẫu có kiểu gen A/A, giá trị C_t của phản ứng đặc hiệu alen A và alen T lần lượt là 28,3 ± 1,02 và 33,2 ± 1,26, với giá trị $|\Delta C_t|$ 4,9 ± 0,8 và toàn bộ mẫu có $|\Delta C_t| \geq 3$. Điều này bước đầu cho thấy khả năng phân biệt tín hiệu đặc hiệu và tín hiệu nền rõ ràng khi phân tích trên mẫu DNA bộ gen người tình nguyện. Kết quả xác định kiểu gen A/A đạt độ tương đồng (23/23) 100% so với SGS. Tuy nhiên, do chưa ghi nhận mẫu mang kiểu gen A/T hoặc T/T, chưa thể hoàn toàn đánh giá khả năng phân biệt các kiểu gen mang alen biến thể di truyền của quy trình ASO Real-time PCR trên mẫu lâm sàng.



Hình 5: Kết quả tương đồng của phương pháp ASO Real-time và SGS

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình ASO Real-time PCR sử dụng SYBR Green để phát hiện biến thể *DPYD* c.2846A>T. Hai plasmid chứng mang alen A (kiểu hoang dại) và alen T (alen biến thể) đã được tạo thành công và xác nhận bằng giải trình tự Sanger. Điều kiện phản ứng tối ưu được xác định tại nồng độ mồi 0,1 µM và nhiệt độ bắt cặp 66°C. Hai hệ mồi đạt hiệu suất khuếch đại 90,7–90,8%, với hệ số xác định R^2 từ 0,997 đến 0,998. Trên 23 mẫu DNA người tình nguyện, kết quả định kiểu gen bằng ASO real-time PCR tương đồng hoàn toàn với giải trình tự Sanger (23/23 mẫu, 100%).

Kết quả bước đầu cho thấy quy trình có tiềm năng ứng dụng trên các hệ thống Real-time PCR thông dụng. Tuy nhiên, do cả 23 mẫu khảo sát đều mang kiểu gen A/A, mức độ tương đồng 100% mới phản ánh sự phù hợp của phương pháp trên nhóm mẫu này, chưa đủ để khẳng định khả năng phát hiện alen T hoặc phân biệt chính xác cả ba kiểu gen A/A, A/T và T/T trên mẫu lâm sàng. Bên cạnh đó, các đặc tính hiệu năng như độ lặp lại, độ tái lập, độ đặc hiệu phân tích và khả năng phát hiện alen biến thể trên nền DNA người chưa được đánh giá đầy đủ.

Trong các nghiên cứu tiếp theo, cần bổ sung mẫu A/T và T/T đã được xác nhận bằng Sanger, kiểm chứng ngưỡng phân loại kiểu gen trên mẫu thực tế. Về lâu dài, quy trình có thể được mở rộng để phát hiện các biến thể *DPYD* khác có ý nghĩa dược di truyền, hướng đến phát triển phương pháp xét nghiệm hỗ trợ đánh giá nguy cơ độc tính do fluoropyrimidine sau khi hoàn tất thẩm định phân tích và xác nhận tính phù hợp lâm sàng.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình ASO Real-time PCR sử dụng SYBR Green để phát hiện biến thể rs67376798 trên gen *DPYD*, thông qua thử nghiệm trên plasmid chứng và bước đầu đánh giá trên mẫu DNA người tình nguyện khỏe mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Thompson, J. T., Wood, D. M., & Dargan, P. I.** (2025). Review of the fluoropyrimidine antidote uridine triacetate. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *91*(3), 615-627.
2. **Otero-Torres, S., Rodríguez-Mauriz, R., Fort-Casamartina, E., Clopés-Estela, A., Soler-Rotllant, F., Fontanals-Martínez, S., & Montero-Pérez, O.** (2025). DPYD genotyping, fluoropyrimidine dosage and toxicity: an umbrella review of systematic reviews. *Pharmaceuticals*, *18*(5), 727.
3. **Amstutz, U., Henricks, L. M., Offer, S. M., Barbarino, J., Schellens, J. H., Swen, J. J., ... & Schwab, M.** (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *103*(2), 210-216.
4. **gnomAD. (n.d.).** *gnomAD: Genome Aggregation Database*. Truy cập Tháng 10 2026, from https://gnomad.broadinstitute.org/
5. **Nguyễn, Ư. N., Nguyễn, Đ. K., & Nguyễn, H. N. T.** (2026). Xây dựng quy trình giải trình tự Sanger chẩn đoán các biến thể di truyền trên gen *DPYD* liên quan đến tích lũy độc tính thuốc fluoropyrimidines. *Tạp chí Y học Việt Nam*, *558*(2).