

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Nhật Tân và cs, "Đánh giá kết quả chẩn đoán và điều trị ung thư dạ dày sớm tại bệnh viện Trung Ương Huế", tạp chí Y học lâm sàng, tr 53-60, số 60, 2020.
2. Nhận xét kết quả chẩn đoán và điều trị ung thư sớm ống tiêu hóa tại Bệnh viện Bãi Cháy. BS. Lê Thị Kim Liên, Bệnh viện Bãi Cháy, Hội Nghị Nội Nội soi Tiêu hóa toàn quốc 2019.
3. Taga S. 3. Gastroscopy technique. A. Observation by panendoscopy. In: Tada M, Maruyama M and Fujino M (ed) I to Cho Handbook. Igakushoin, Tokyo, 1992, pp 132-139.
4. The committee for standardizing screening gastroscopy. Gastric cancer screening techniques. In: JSGCS (ed) I to Cho Handbook. Igakushoin, Tokyo 2010, pp 1-24.
5. Rey JF, Lambert R; ESGE Quality Assurance Committee. ESGE recommendations for quality control in gastrointestinal endoscopy: guidelines for image documentation in upper and lower GI endoscopy. Endoscopy 2001;33:901-903.
6. The JL, Hartman M, Lau L, et al. Duration of Endoscopic Examination Significantly Impacts Detection Rates of Neoplastic Lesions During Diagnostic Upper Endoscopy. Gastrointest Endosc 2011;73(4S): AB393.
7. Yagi K, Nakamura A, Sekine A. Comparison between magnifying endoscopy and histological, culture and urease test findings from the gastric mucosa of the corpus. Endoscopy 2002;34:376-381.
8. Anagnostopoulos GK, Yao K, Kaye P, et al. High-resolution magnification endoscopy can reliably identify normal gastric mucosa, Helicobacter pylori-associated gastritis, and gastric atrophy. Endoscopy 2007;39:202-207.

QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ SANGER MỘT SỐ BIẾN THỂ ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE TRÊN CÁC GEN PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 VÀ GCKR LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH GAN NHIỄM MỠ KHÔNG DO RƯỢU

Lê Dương Hoàng Huy^{1,2}, Nguyễn Minh Hà^{1,2}, Nguyễn Ước Nguyễn^{1,2}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình giải trình tự Sanger khảo sát năm biến thể trên các gen PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 và GCKR liên quan đến bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tối ưu hóa quy trình ly trích DNA có ly giải hồng cầu bằng dung dịch ACK, thiết kế 5 cặp đoạn mồi đặc hiệu cho các biến thể, tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp của phản ứng PCR và tối ưu hóa phản ứng giải trình tự Sanger trên hệ thống Applied Biosystems 3500 (ThermoFisher). Áp dụng toàn bộ quy trình giải trình tự Sanger đã tối ưu lên 4 mẫu máu của người tình nguyện nhằm đánh giá thông số kỹ thuật và đặc điểm của các biến thể. **Kết quả:** Xây dựng thành công quy trình giải trình tự Sanger bao gồm: tối ưu hóa được lượng thể tích (4 ml) và thời gian ly giải hồng cầu với ACK (10 phút) để thu được DNA có độ tinh khiết đạt chuẩn, thiết kế được năm cặp đoạn mồi khuếch đại đặt hiệu năm biến thể quan tâm. Khảo sát DNA 4 người tình nguyện khỏe mạnh, tất cả đều có ít nhất một trong năm biến thể quan tâm, với tất cả kết quả giải trình tự có tỉ lệ nucleotide có độ chính xác cao-QVB > 90%. **Kết luận:** Đã xây dựng và tối ưu quy trình giải trình tự Sanger xác định biến thể đa hình đơn nucleotide. Bước đầu áp dụng quy trình trên

người tình nguyện, làm cơ sở cho các khảo sát với cỡ mẫu đại diện giúp tiếp cận và quản lý ở phương diện phân tử NAFLD ở Việt Nam.

Từ khóa: Giải trình tự Sanger, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 và GCKR.

SUMMARY

SANGER SEQUENCING PROCESS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS VARIANTS IN PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 AND GCKR GENES ASSOCIATED WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Objective: Develop Sanger sequencing and investigate five variants on PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 and GCKR genes related to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Materials and methods:** Optimized the DNA extraction process with erythrocyte lysis by ACK solution, designed 5 pairs of primers specific for variants, optimized the pairing temperature of the PCR reaction and optimized Sanger sequencing reaction on an Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer from Thermo Fisher. Apply the entire optimized Sanger sequencing process to 4 blood samples of volunteers to evaluate the specifications and characteristics of the variants. **Results:** Successfully built Sanger sequencing process including: optimization of erythrocyte volume and lysis time with ACK to obtain DNA of standard purity, designing 5 pairs of primers effectively amplifying the five variants of interest, optimizing the concentration of DNA participating in the sequencing reaction. Obtained 4/4 participants with at least one of the 5 variants of interest with all sequencing results having a QVB > 90%. **Conclusion:** Established and optimized Sanger sequencing to identify single nucleotide

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch,

²Trung Tâm Nghiên Cứu Y Sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Chịu trách nhiệm chính: Lê Dương Hoàng Huy

Email: huyldh@pnt.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.2.2022

Ngày phản biện khoa học: 4.4.2022

Ngày duyệt bài: 15.4.2022

polymorphisms. Initially applying the process on volunteers, as a basis for surveys with representative sample sizes to approach and manage NAFLD in molecular perspective in Vietnam.

Keywords: Sanger sequencing, non-alcoholic fatty liver disease, PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 and GCKR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) đang là một trong những vấn đề sức khỏe lớn toàn cầu vì (i) tỷ suất hiện mắc cao (25,24%) [1] và gia tăng theo thời gian, (ii) bệnh có thể diễn biến nặng ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân, thậm chí tử vong [2], và (iii) các liệu pháp điều trị có hiệu quả còn cách xa mong đợi và tạo nên một gánh nặng đáng kể cho hệ thống y tế.

Nhiều bằng chứng đến từ các nghiên cứu thực nghiệm, bao gồm những nghiên cứu về gen và cận gen, đã chỉ ra tính di truyền mạnh của lượng mỡ bị tích tụ trong gan, ảnh hưởng đến tính nhạy cảm, sự tiến triển và kết quả điều trị bệnh NAFLD của một cá thể [3]. Nhiều biến thể di truyền đa hình đơn nucleotid (SNP) như rs738409 trên gen PNPLA3, rs58542926 trên gen TM6SF2, rs641738 trên gen MBOAT7, rs780094 và rs1260326 trên gen GCKR đã được chứng minh có liên quan đến sự gia tăng nguy cơ mắc bệnh. Thông tin các SNP này sẽ góp phần vào tối ưu hóa quy trình chẩn đoán, hướng dẫn điều trị và các kế hoạch can thiệp cộng đồng. Từ đó, đặt ra nhu cầu về một công cụ chẩn đoán có độ tin cậy cao nhằm xác định giá trị lâm sàng của các SNPs, cũng như hoạt động chẩn đoán thường quy. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình chẩn đoán các SNPs trên gen PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, và GCKR bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: từ tháng 01/11/2021 đến tháng 15/04/2022, tại Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

Phương pháp nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu: Các đặc điểm kỹ thuật của thí nghiệm chẩn đoán các SNP bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger, bao gồm: kỹ thuật ly trích DNA từ bạch cầu lấy từ máu ngoại biên; đặc điểm phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen cần giải trình tự; kỹ thuật giải trình tự Sanger cho sản phẩm PCR. Mẫu máu được lấy từ những người tình nguyện đang làm việc tại Trung tâm Nghiên cứu Y sinh.

Các bước tiến hành nghiên cứu

1. Lấy máu tĩnh mạch người tình nguyện, tối ưu hóa quá trình ly trích DNA (TopPure Blood DNA Extraction Kit -ABT, Việt Nam) có sử dụng thêm dung dịch ly giải hồng cầu ACK (Ammonium Chloride, Potassium Bicarbonate) ở các thể tích và thời gian khác nhau, nhằm tăng lượng máu toàn phần sử dụng, từ đó tăng lượng DNA thu được. Tiêu chí chất lượng cần đạt: nồng độ DNA thu được > 500ng/ml; độ tinh khiết OD260/280 từ 1,8-2,0.

2. Sử dụng thông tin từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia – NCBI. Trích xuất ra đoạn trình tự gen quan tâm trên bộ gen người (phiên bản GRCh38), từ đó thiết kế các cặp đoạn mồi chứa các biến thể rs738409 trên gen PNPLA3, rs58542926 trên gen TM6SF2, rs641738 trên gen MBOAT7, rs780094 và rs1260326 trên gen GCKR với chiều dài đoạn khuếch đại trong khoảng 600 – 1000bp.

3. Xác định nhiệt độ bắt cặp tối ưu của các cặp mồi vừa thiết kế và số chu kỳ nhiệt tối ưu bằng phản ứng PCR (AmpliTaq GoldTM 360 kit, ThermoFisher, Hoa Kỳ). Nhiệt độ và số chu kỳ nhiệt được xem là tối ưu khi: (1) chỉ có 1 sản phẩm PCR có độ dài bằng với độ dài đoạn gen được khuếch đại, (2) sản phẩm PCR trên gel điện di rõ nét, (3) không có sản phẩm phụ hoặc tín hiệu nhiễu (smear).

4. Tinh sạch sản phẩm PCR (ExoSAP-IT PCRproduct Cleanup Reagent, Thermo, Hoa Kỳ).

5. Giải trình tự sản phẩm bước 4 với máy SeqStudio Genetic Analyzer 3500; BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ).

6. Tinh sạch sản phẩm bước 5 bằng ethanol và tái huyền phù với dung dịch Hi-Di™ Formamide. Điện di mao quản bằng SeqStudio Genetic Analyzer 3500.

7. Sử dụng phần mềm Sequencing Analysis Software v6.0 và Variant Reporter™ Software v2.0 để đánh giá chỉ số QVB% (Quality value of Base)(là tỉ lệ nucleotide có QVB ≥ 20 trong tổng số nucleotide đọc được trình tự) và LOR (Length of Read) (khoảng chiều dài dài nhất đọc được không bị gián đoạn của nucleotide với giá trị trung bình QVB đang chạy ≥ 20). Kết quả được xem là đạt khi QVB% ≥ 90 và LOR ≥ 500.

8. Đánh giá lại toàn bộ quy trình với các điều kiện thử nghiệm đã tối ưu từ bước 1 đến bước 7 trên 4 mẫu DNA của người tình nguyện.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, phần mềm Sequencing Analysis Software v6.0 và phần mềm Variant

Reporter™ Software v2.0.

Đạo đức trong nghiên cứu: Chứng nhận chấp thuận đạo đức trong nghiên cứu y sinh, số 516/HĐĐĐ-TĐHYKPNT ngày 13/09/2021 của Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chuẩn hóa quy trình ly trích DNA máu

Bảng 1. Kết quả tối ưu hoá thể tích ACK pH 7,2-7,4 để ly giải hiệu quả

Thể tích máu toàn phần và thể tích ACK	Nồng độ DNA thu được (ng/μL); (OD 260/280)		
	Ủ ACK 10 phút	Ủ ACK 15 phút	Ủ ACK 20 phút
0 mL ACK + 200 μl máu	67,0 (1,788)	64,0 (1,808)	73,0 (1,765)
10 ml ACK + 2 mL máu	887,0 (1,852)	793,0 (1,798)	858,0 (1,839)
8 ml ACK + 2 mL máu	946,3 (1,843)	911,0 (1,826)	939,0 (1,833)
6 ml ACK + 2 mL máu	790,0 (1,846)	805,0 (1,861)	812,0 (1,802)
4 ml ACK + 2 mL máu	838,0 (1,853)	864,0 (1,844)	824,0 (1,821)
2 ml ACK + 2 mL máu	0,00 (0,000)	0,00 (0,000)	0,00 (0,000)

(*) điều kiện thử nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Nhận xét: Việc ly giải máu bằng dung dịch ACK pH 7,2-7,4 giúp làm tăng đáng kể lượng DNA thu được mà vẫn đảm bảo độ tinh khiết (OD260/280 1,8-2,0). Tăng thời gian ủ (bắt đầu từ 10 phút) và tăng thể tích ACK (bắt đầu từ 4mL) không làm thay đổi lượng DNA thu được.

Như vậy, đã xác định các thông số tối ưu cho quá trình ly trích DNA bộ gen từ máu toàn phần bằng kit cột lọc TopPure Blood DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam) là: tăng lượng máu toàn

ngoại biên bằng phương pháp cột lọc. Kết quả ly trích DNA bộ gen từ 1 mẫu máu toàn phần bằng kit TopPure Blood DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam), với sự thay đổi lượng máu toàn phần sử dụng, thời gian ủ và thể tích dung dịch ACK pH 7,2-7,4 được thêm vào so với hướng dẫn của nhà sản xuất.

phần sử dụng là 2 mL (thay vì 200 μL); thêm dung dịch ACK pH 7,2-7,4 ở bước ly giải hồng cầu với thể tích 4 mL và thời gian ủ 10 phút cho mỗi mẫu.

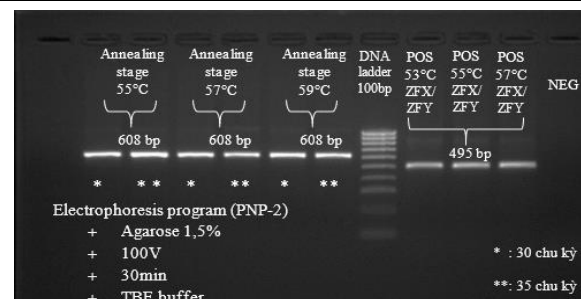
Trình tự các đoạn môi được thiết kế để xác định các biến thể gen

Trình tự các cặp môi thiết kế được trình bày trong bảng 2, thoả các tiêu chí ban đầu. Sau khi tiến hành các phản ứng tiếp sau, cặp môi nào đặc hiệu tốt sẽ được thiết kế lại.

Bảng 2. Trình tự và đặc điểm các cặp môi đã thiết kế cho 5 SNP quan tâm

Tên gen và tên biến thể	Tên cặp môi	Trình tự (5' – 3')	Độ dài (nu)	Tm	GC %	Độ dài đoạn khuếch đại (nu)
Gen PNPLA3 rs738409	PNP-2-F	GTCCGAGGGTGTATGTTAGTTC	22	62	50	608
	PNP-2-R	TCAAGTGATCTGCCTGCTTC	20	62	50	
Gen TM6SF2 rs58542926	TM6-1-F	GTGACAAAGGAGAACCTTCCA	21	62	47,6	622
	TM6-1-R	AATCAAGATGTCCAGCCAGAG	21	62	47,6	
Gen MBOAT7 rs641738	MBO7-5-F	AAGCGTGGAACCCTCCTACT	20	61	55,0	780
	MBO7-5-R	TCGCTTGGCCTATGACAGGT	20	61	55,0	
Gen GCKR rs1260326	G26-1-F	CGGAAATCGATACTGTGGTCTT	22	62	45,5	623
	G26-1-R	GTCAGAGAGGTCTCCAAACTTTC	23	62	47,8	
Gen GCKR rs780094	G94-2-F	GACATAGTCTCACTCTGTTGCC	22	59	50,0	656
	G94-2-R	CCCTGTTATCAGACAGGAAACC	22	59	50,0	

Tối ưu hóa phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen chứa các biến thể. Thực hiện 6 phản ứng, thay đổi 3 mức nhiệt độ bắt cặp (nhiệt độ nóng chảy Tm trừ đi 3°C, 5°C và 7°C) và 2 số chu kỳ nhiệt (30 và 35 chu kỳ). Chúng là đoạn gen ZFX/ZFY có độ dài 495 bp. Kết quả điện di gel sản phẩm PCR khuếch đại của 1 biến thể được minh họa ở hình 1. Tổng hợp các điều kiện tối ưu hoá PCR của các cặp môi được liệt kê trong bảng 3.



Hình 3. Kết quả điện di gel sản phẩm PCR

khuếch đại biến thể rs738409 trên gen PNPLA3 bằng cặp mỗi PNP-2

Nhận xét: Trong mẻ chạy, chứng âm và dương cho kết quả phù hợp. Ở mỗi phản ứng, sản phẩm khuếch đại đều dài 608 bp, và thoả các tiêu chí đặt ra. Để tiết kiệm thời gian phân tích, chọn số chu kỳ nhiệt là 30 chu kỳ. Để tương đồng nhất về nhiệt độ bắt cặp mỗi so với các SNP, chọn nhiệt độ bắt cặp tối ưu là 55°C.

Bảng 3. Nhiệt độ bắt cặp và số chu kỳ nhiệt trong phản ứng PCR cho mỗi cặp mỗi

Tên cặp mỗi	Nhiệt độ bắt cặp tối ưu	Số chu kỳ nhiệt tối ưu
PNP-2-F và PNP-2-R	55°C	30
TM6-1-F và TM6-1-R	55°C	30
MBO7-5-F và MBO7-5-R	56°C	30
G26-1-F và G26-1-R	55°C	30
G94-2-F và G94-2-R	56°C	30

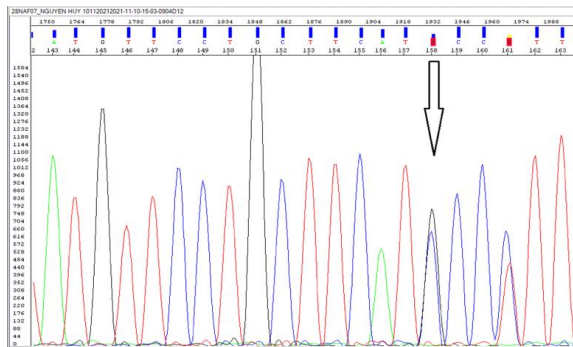
PNP-2-F và PNP-2-R	55°C	30
TM6-1-F và TM6-1-R	55°C	30
MBO7-5-F và MBO7-5-R	56°C	30
G26-1-F và G26-1-R	55°C	30
G94-2-F và G94-2-R	56°C	30

Đánh giá quy trình giải trình tự trên 4 mẫu DNA người tình nguyện. Thực hiện giải trình tự với các thông số thí nghiệm tối ưu đã xác định để phân tích 5 biến thể quan tâm trên mẫu DNA của 4 người tình nguyện, dựa trên các tiêu chí đã mô tả. Kết quả giải trình tự được thể hiện qua bảng 4. Một số hình ảnh minh họa giải trình tự được thể hiện ở các hình 2 và 3.

Bảng 4. Kết quả giải trình tự trên 04 người tình nguyện bằng quy trình đã tối ưu

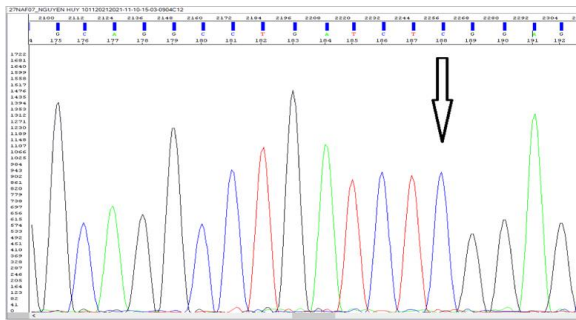
Tên biến thể và gen	Kết quả			
	Kiểu gen	LOR	QVB%	Đánh giá
Người tình nguyện 1				
rs738409, gen PNPLA3	CC	565	97,17%	Đạt
rs58542926, gen TM6SF2	CC	574	97,56%	Đạt
rs641738, gen MBOAT7	CT	740	97,43%	Đạt
rs1260326, gen GCKR	CC	586	96,59%	Đạt
rs780094, gen GCKR	CC	609	95,40%	Đạt
Người tình nguyện 2				
rs738409, gen PNPLA3	GG	563	97,51%	Đạt
rs58542926, gen TM6SF2	CC	561	97,50%	Đạt
rs641738, gen MBOAT7	CT	735	97,69%	Đạt
rs1260326, gen GCKR	CT	583	95,88%	Đạt
rs780094, gen GCKR	CT	613	97,88%	Đạt
Người tình nguyện 3				
rs738409, gen PNPLA3	GG	553	97,11%	Đạt
rs58542926, gen TM6SF2	CC	578	97,58%	Đạt
rs641738, gen MBOAT7	CC	701	96,15%	Đạt
rs1260326, gen GCKR	CC	581	96,56%	Đạt
rs780094, gen GCKR	CC	656	94,97%	Đạt
Người tình nguyện 4				
rs738409, gen PNPLA3	CG	550	95,94%	Đạt
rs58542926, gen TM6SF2	CC	571	96,53%	Đạt
rs641738, gen MBOAT7	CC	740	97,60%	Đạt
rs1260326, gen GCKR	CT	585	90,73%	Đạt
rs780094, gen GCKR	CC	615	96,35%	Đạt

Nhận xét: Quy trình chuẩn hóa sau khi áp dụng lên các mẫu DNA tình nguyện đều cho kết quả giải trình tự đạt chất lượng, tại vị trí các biến thể quan tâm, kiểu gen được xác định rõ.



Hình 2. Kết quả trình tự nucleotide ở vùng biến thể rs738409 trên gen PNPLA3

Nhận xét: Đây là mẫu DNA của người tình nguyện thứ 4, hình ảnh các đỉnh tín hiệu rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu. Tại vị trí nucleotid 158 của đoạn gen PNPLA3 được khuếch đại (vị trí mũi tên), có 2 đỉnh tín hiệu chồng lấp, đại diện cho nucleotide C và G, cho thấy với biến thể rs738409 này, người tình nguyện này có kiểu gen dị hợp tử CG.



Hình 3. Kết quả trình tự nucleotide ở vùng biến thể rs58542926 trên gen TM6SF2

Nhận xét: Đây là mẫu DNA của người tình nguyện thứ 4, hình ảnh các đỉnh tín hiệu rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu. Tại vị trí nucleotid 188 của đoạn gen TM6SF2 được khuếch đại (vị trí mũi tên), chỉ có 1 đỉnh tín hiệu duy nhất, đại diện cho nucleotide C, cho thấy với biến thể rs58542926 này, người tình nguyện này có kiểu gen đồng hợp tử CC.

IV. BÀN LUẬN

Trong các kỹ thuật có thể phát hiện các biến đổi đa hình đơn nucleotide, giải trình tự Sanger được xem là tiêu chuẩn vàng. Kỹ thuật này cung cấp một kết quả tin cậy về trình tự của chính đoạn gen hoặc đoạn trình tự đang quan tâm. Đối với những biến thể đa hình đơn nucleotide mới hoặc vừa được mô tả vai trò trên y văn thì việc lựa chọn một kỹ thuật có độ chính xác cao được xem là thiết yếu. Điều này vừa có ý nghĩa về mặt khoa học, vừa được xem là thước đo để phát triển và đánh giá các kỹ thuật khác như qPCR. Quá trình ly trích và tách chiết DNA có sử dụng thêm dung dịch ACK pH 7,2-7,4 để tăng hiệu quả ly giải hồng cầu. Đã xác định được lượng ACK tối ưu là 4ml ACK cho 2 ml máu toàn phần thay vì 10-20ml cho 1ml máu như nhà sản xuất Thermo [4] hoặc 10ml ACK cho 1ml máu như hãng Ebioscience [5]. Ngoài minh chứng từ số liệu về độ tinh khiết DNA, chất lượng của mẫu DNA còn được minh chứng bằng việc các phản ứng sau dòng như PCR và giải trình tự đều diễn ra đạt yêu cầu, không xuất hiện hiện tượng ức chế phản ứng hoặc giảm hiệu suất phản ứng so với việc ly trích DNA trực tiếp từ 200ml máu toàn phần.

Nghiên cứu đã tự thiết kế các cặp mồi cho mỗi SNP quan tâm, có tính đặc hiệu cao thể hiện qua kết quả PCR và giải trình tự. Ưu điểm của việc sử dụng đoạn mồi tự thiết kế là có thể điều chỉnh chiều dài đoạn khuếch đại theo nhu cầu, từ đó có thể tạo ra các phản ứng PCR đa mồi. Mặt khác, các đoạn mồi tự thiết kế sau khi đã kiểm tra chất lượng và xây dựng đúng quy trình chuẩn

có thể được sử dụng mà không lo ngại vấn đề bản quyền so với các đoạn mồi đã được công bố trước. Cuối cùng, một quy trình thiết kế mồi chung, với các bước hướng dẫn cụ thể, có thể sử dụng để áp dụng cho các vùng gen hay trình tự quan tâm về sau.

Trong quá trình giải trình tự Sanger trên hệ thống Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer của hãng Thermo Fisher, chất lượng của sản phẩm giải trình tự được đánh giá thông qua thông số QV hay còn gọi là Phred quality score. Đây là điểm chất lượng, là thước đo chất lượng của việc xác định các nucleobase được tạo ra bằng cách giải trình tự DNA tự động. QV > 20 có nghĩa là khả năng nucleotide này được đọc không chính xác là 1%. Chúng tôi đã sử dụng thêm chỉ số QVB%, được tính dựa trên số nucleotide được đọc liên tục có QV cao trong tổng số các nucleotide đọc được, làm thước đo cho chất lượng chuỗi tổng thể. Việc kết hợp nhiều tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng kết quả giải trình tự được xem là thiết yếu. Trong nghiên cứu này ở tất cả các mẫu, chỉ số QVB% đều lớn hơn 90%.

Áp dụng toàn bộ quy trình sau khi chuẩn hóa lên 04 mẫu DNA của người tình nguyện, kết quả về các thông số kỹ thuật đều đạt các tiêu chí đã đặt ra và không có sự khác biệt với các tiêu chuẩn mà nhà sản xuất khuyến cáo. Cụ thể, đối với chiều dài đoạn khuếch đại, số lượng nucleotide có QVB >20 luôn chiếm hơn 90% các nucleotide được gọi, phần nucleotide có chất lượng QVB thấp thường tập trung ở đoạn đầu và đoạn cuối của phần giải trình tự, không có tình trạng nằm rải rác, không gây mất tính liên tục của chiều dài đoạn trình tự. Điều này phù hợp với nguyên tắc giải trình tự Sanger và khuyến cáo nhà sản xuất [6, 7]. Về cường độ tín hiệu thì các nucleotide có chất lượng QVB cao đều có cường độ tín hiệu khá tương đồng nhau, dao động trong khoảng 600-1300. Kết hợp với việc tinh sạch mẫu tốt để khử các tín hiệu nhiễu, từ đó làm tăng chất lượng của mỗi nucleotide được xác định. Tín hiệu tại ngay vị trí SNP quan tâm luôn rõ ràng, nếu là đồng hợp thì có 1 loại tín hiệu duy nhất, nếu là dị hợp thì hai đỉnh có độ cao tương đồng, đỉnh đồng vị trí. Hiện chưa thấy thông tin nào về các biến thể này tại Việt Nam cũng như trong khu vực, Trong tương lai, việc ứng dụng kỹ thuật này sẽ hỗ trợ thu thập các thông tin di truyền dạng SNP trên bệnh nhân NAFLD nói riêng và các bệnh chuyển hoá khác.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và tối ưu quy trình giải trình tự

Sanger để xác định biến thể đa hình đơn nucleotide: rs738409 trên gen PNPLA3, rs58542926 trên gen TM6SF2, rs641738 trên gen MBOAT7, rs780094 và rs1260326 trên gen GCKR. Bước đầu áp dụng quy trình trên người tình nguyện, làm cơ sở cho các khảo sát với cỡ mẫu đại diện giúp tiếp cận và quản lý ở phương diện phân tử NAFLD ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Younossi, Z.M., et al.**, Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016. **64**(1): p. 73-84.
2. **European Association for the Study of the L.,**
3. **Eslam, M. and J. George**, Genetic and epigenetic mechanisms of NASH. *Hepatology Int*, 2016. **10**(3): p. 394-406.
4. <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/red-blood-cell-lysis-using-ack-lysing-buffer.html>.
5. **eBioscience, Flow Cytometry**—BestProtocols. 2013.
6. **Phred**-Quality Base Calling. Retrieved 2011. **02**:p. 24.
7. **Ledergerber, C. and C. Dessimoz**, Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Briefings in bioinformatics*, 2011. **12**(5): p. 489-497.

MỐI LIÊN QUAN GIỮA KIỂU HÌNH MIỄN DỊCH CD44, ALDH VỚI ĐẶC ĐIỂM NỘI SOI VÀ MÔ BỆNH HỌC TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN DẠ DÀY

Nguyễn Khắc Tấn¹, Lưu Thị Bình², Phan Quốc Hoàn³, Nguyễn Phú Hùng⁴

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân tích mối liên quan giữa kiểu hình miễn dịch CD44, ALDH với đặc điểm lâm sàng, nội soi và mô bệnh học trong ung thư biểu mô tuyến dạ dày. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang; thiết kế tiến cứu trên 121 bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư biểu mô tuyến dạ dày và được phẫu thuật cắt bỏ khối u tại Bệnh viện K. Phân tích mối liên quan giữa CD44, ALDH và các thông số. **Kết quả:** Bệnh nhân có u thể loét có tỷ lệ biểu hiện CD44 cao hơn với 86,7%, $p > 0,05$. Bệnh nhân có u thể ruột có tỷ lệ biểu hiện CD44 cao hơn với 67,5%, $p > 0,05$. Bệnh nhân có u kích thước từ 2- < 5 cm có tỷ lệ biểu hiện ALDH cao nhất với 77,0%, $p < 0,05$. Bệnh nhân có u biệt hóa kém có tỷ lệ biểu hiện ALDH cao nhất với 58,1%, $p < 0,05$. Bệnh nhân có u giai đoạn III có tỷ lệ biểu hiện ALDH cao nhất với 71,6%, $p < 0,05$. **Kết luận:** Sự biểu hiện CD44 có xu hướng cao hơn ở thể loét và thể ruột. Sự biểu hiện ALDH có sự khác biệt theo kích thước khối u trên nội soi, độ biệt hóa và giai đoạn bệnh.

Từ khóa: Dấu ấn miễn dịch CD44, ALDH, hóa mô miễn dịch, tế bào gốc ung thư.

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN CD44, ALDH

¹Phòng khám đa khoa các cơ quan Đảng ở Trung ương

²Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên

³Bệnh viện trung ương quân đội 108

⁴Trường Đại học Khoa học-Đại học Thái Nguyên

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Khắc Tấn

Email: drtanvptw@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.2.2022

Ngày phản biện khoa học: 4.4.2022

Ngày duyệt bài: 15.4.2022

IMMUNE PHENOTYPES AND ENDOSCOPIC AND HISTOPATHOLOGIC FEATURES IN GASTRIC ADENOCARCINOMA

Objective: To analyze the relationship between CD44 ALDH immunophenotype, with endoscopic and histopathological characteristics in gastric adenocarcinoma. **Subject and Method:** This was cross-sectional descriptive study; prospective design on 121 patients with confirmed diagnosis of gastric adenocarcinoma and surgical resection of the tumor at K Hospital. Analysis of the relationship between CD44, ALDH and parameters. **Result:** Patients with ulcerative tumors had a higher CD44 expression rate with 86.7%, $p > 0.05$. Patients with intestinal tumor had a higher CD44 expression rate with 67.5%, $p > 0.05$. Patients with tumor size from 2 to < 5 cm had the highest ALDH expression rate with 77.0%, $p < 0.05$. Patients with poorly differentiated tumors had the highest ALDH expression rate with 58.1%, $p < 0.05$. Patients with stage III tumor had the highest ALDH expression rate with 71.6%, $p < 0.05$. **Conclusions:** CD44 expression tends to be higher in ulcerative and intestinal forms. ALDH expression differs according to endoscopic tumor size, differentiation, and disease stage. **Keyword:** Immunomarker CD44, ALDH, immunohistochemistry, cancer stem cells.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày là một trong các loại ung thư phổ biến nhất và xếp hàng thứ 4 về nguyên nhân gây tử vong trên thế giới. Tỷ lệ mắc ung thư dạ dày vẫn rất cao ở các nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Trong đó ung thư biểu mô tuyến dạ dày (UTBMTDD) là một bệnh có tiên lượng xấu, các phương pháp điều trị như phẫu thuật và