

hodgkin lan tỏa tế bào lớn Tạp chí Y học Việt Nam, tháng 12-2017 ập 461, số đặc biệt: 160-166.

4. **Phạm Văn Tuyên**, Nghiên cứu phân loại u lympho ác tính không Hodgkin tế bào B theo WHO 2008, luận án tiến sĩ, Trường Đại Học Y Hà Nội. Published online 2021.
5. **Fisher SG, Fisher RI**. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma Oncogene. 2004;23(38):6524-6534. doi:10.1038/sj.onc.1207843.
6. **Nguyễn Thị Thu Hương**, Ứng dụng kỹ thuật sắp xếp dây mô trong nghiên cứu các dấu ấn ER, PR, Her2, Ki67 ở bệnh nhân ung thư vú, Luận văn thạc sĩ, Đại học Y Hà Nội. Published online 2019.

THIẾT LẬP QUY TRÌNH ASO-PCR PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN TRÊN VÙNG KHỞI ĐỘNG GEN TERT Ở BỆNH NHÂN U THẦN KINH ĐỆM

Lương Bắc An¹, Dương Bích Trâm¹, Hoàng Anh Vũ¹

TÓM TẮT

Mở đầu: U thần kinh đệm là nhóm bệnh lí thường gặp trong u não ác tính nguyên phát tại hệ thần kinh trung tâm, chiếm khoảng 75% tổng số trường hợp u não ác tính nguyên phát. Những biến đổi di truyền trên vùng khởi động gen TERT xảy ra ở 70% - 80% bệnh nhân u thần kinh đệm, cho thấy vai trò then chốt của gen TERT trong quá trình phát sinh ung thư. Xác định đột biến trên gen TERT rất cần thiết và đang được tích hợp vào trong qui trình chẩn đoán phân loại u thần kinh đệm. **Mục tiêu:** Nghiên cứu quy trình ASO-PCR SYBR Green phát hiện đột biến c.-146C>T từ mẫu DNA của bệnh nhân u thần kinh đệm. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Thiết kế cặp mồi và thiết lập điều kiện phản ứng ASO-PCR SYBR Green phát hiện đột biến c.-146C>T. Giá trị của phương pháp được so sánh với phương pháp giải trình tự Sanger. **Kết quả:** Thiết kế cặp mồi và thiết lập được điều kiện tối ưu cho phản ứng ASO-PCR SYBR Green phát hiện đột biến c.-146C>T. Kết quả đột biến được kiểm chứng lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger có sự tương đồng là 100%. **Kết luận:** Nghiên cứu thiết lập thành công qui trình ASO-PCR SYBR Green xác định đột biến c.-146C>T. **Từ khóa:** U thần kinh đệm, TERT, c.-146C>T, ASO-PCR.

SUMMARY

ESTABLISHMENT OF THE DETECTION OF TERT PROMOTER MUTATIONS IN GLIOMAS BY USING ASO-PCR

Introduction: Gliomas is one of the most frequent types of primary malignant tumors in the central nervous system (CNS), accounting for 75% of all primary malignant brain tumors. The alterations in the TERT promoter have been reported in 70% to 80% of gliomas, suggesting a pivotal role in oncogenesis. The identification of TERT mutations is essential and is currently integrated into gliomas diagnostic procedures. **Objective:** To study the ASO-SYBR Green PCR procedure for detecting the c.-

146C>T mutation in DNA obtained from patients with gliomas. **Methods:** A cross-sectional descriptive study. Designing specific primers and optimizing the ASO-PCR conditions to detect c.-146C>T mutation. The procedure were validated by the Sanger sequencing. **Results:** Successfully designed primers and optimized the ASO- SYBR Green PCR procedure to detect c.-146C>T mutation. The c.-146C>T mutation results showed 100% concordance with Sanger sequencing results. **Conclusion:** The successful optimization of the c.-146C>T mutation detection approach by ASO- SYBR Green PCR. **Keywords:** Glioblastoma, TERT, c.-146C>T, ASO-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U thần kinh đệm (gliomas) đứng thứ 3 trong các nguyên nhân ung thư gây tử vong ở lứa tuổi trung niên và là nguyên nhân gây tử vong thứ 2 ở trẻ em. Khối u não ác tính nguyên phát chiếm khoảng 2% ung thư các cơ quan khác nhưng để lại hậu quả rất lớn như di chứng nặng, tử vong cao. Tỷ lệ mắc u thần kinh đệm trong các khối u não là 2 – 3/100.000 người trưởng thành, và chiếm khoảng 52% tất cả các khối u não nguyên phát [1]. U thần kinh đệm có thể gặp ở mọi lứa tuổi, tuy nhiên 75% bệnh nhân được chẩn đoán bệnh dưới 20 tuổi (một số nghiên cứu có ngưỡng là 16 tuổi), tỷ lệ mắc bệnh cao nhất nằm ở độ tuổi từ 5 đến 9 tuổi. Thời gian sống thêm của bệnh nhân nếu không điều trị thường chỉ vài tháng kể từ khi chẩn đoán. Nếu được điều trị thích hợp thì 37% bệnh nhân sống sót sau 1 năm, 20% sống sót sau 2 năm và 13% sau 3 năm [2].

Những đột biến vùng khởi động gen TERT xảy ra chủ yếu ở vị trí -124 bp và -146 bp từ ATG tại vùng đầu của vùng khởi động gen TERT, tạo các liên kết với các yếu tố phiên mã gồm EST1/2, GABP, P52 (Nfkb2), dẫn đến tăng biểu hiện telomerase, có thể do sự sao chép các yếu tố di truyền [3]. Đột biến vùng khởi động gen TERT chiếm tỷ lệ cao trong u thần kinh đệm và trên nhiều loại ung thư, cho thấy vai trò quan trọng của telomerase trong sự phát triển của khối u và

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Lương Bắc An

Email: luongbacan1991@gmail.com

Ngày nhận bài: 5.2.2024

Ngày phản biện khoa học: 20.3.2024

Ngày duyệt bài: 10.4.2024

duy trì khối u. Tình trạng đột biến vùng khởi động gen TERT trong u thần kinh đệm trở thành một yếu tố tiên lượng quan trọng [4]. Trong khối u, nếu có sự hiện diện đột biến vùng khởi động gen TERT, tăng hoạt động quá trình phiên mã, làm thuốc temozolomide không có tác dụng điều trị u. Đột biến vùng khởi động gen TERT đồng thời với đột biến gen IDH1 xác định một kiểu hình u thần kinh ít nhánh, tiên lượng tốt nhất cho bệnh nhân có các khối u [5].

Đột biến gen TERT có thể phát hiện bằng các phương pháp giải trình tự. Tuy nhiên, những phương pháp này đòi hỏi qui trình kĩ thuật phức tạp, tốn nhiều thời gian và chi phí cao. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu thiết lập qui trình ASO-PCR. Sử dụng đoạn mã bắt đặc hiệu với vị trí đột biến, nghiên cứu còn bổ sung trình tự khoá là đoạn oligonucleotide chỉnh sửa đầu 3' được thiết kế khoá các đoạn trình tự không chứa đột biến. Khi phản ứng PCR xảy ra, các đoạn trình tự này khoá sẽ lai lên các phân tử DNA không chứa đột biến (wild type), từ đó phản ứng PCR sẽ tập trung khuếch đại các phân

tử DNA có mang đột biến và giảm được khả năng các cặp mồi bám không đặc hiệu vào các phân tử DNA không mang đột biến, giúp tăng khả năng phát hiện các đột biến có tần suất thấp.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

2.2. Đối tượng nghiên cứu:

Nghiên cứu này được thực hiện trên 30 mẫu DNA của bệnh nhân được chẩn đoán u thần kinh đệm. Kết quả đột biến vùng khởi động gen TERT các mẫu DNA được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger, là tiêu chuẩn vàng được sử dụng xác định đột biến gen.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế mồi: Mồi được thiết kế nhận diện vị trí xác định đột biến c.-146C>T trên vùng khởi động của gen TERT (NG_009265). Gen chứng nội được chúng tôi sử dụng là gen G6PD (NG_009015). Đoạn oligo blocker được thiết kế nhằm khoá các phân tử trình tự DNA không chứa đột biến biến c.-146C>T. Tên và trình tự các cặp mồi được liệt kê chi tiết trong (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mồi phát hiện đột biến c.-146C>T

TT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Tm (oC)	Kích thước PCR (bp)
1	ANTERT-B	CTCCCGGGTCCCCGGC-PO4	71,4	100
2	ANTERT-F	GGACTGGGGACCCGGGCA	66,1	
3	ANTERT-R	CGCGCCGCGAGGAGAGGG	66,7	
4	ANTERT-146T	GCCCCGTCCCCGACCCCGT	64,3	
5	AN-G6PD-F	CATCTTCCACCAGCAGTGCAAGC	65,3	178
6	AN-G6PD-R	CCCACTGCTCCTTCTCTGTAGG	65,8	

Giải trình tự Sanger: Vùng khởi động gen TERT được chúng tôi khuếch đại bằng cặp mồi ANTERT-F và ANTERT-R với bộ kit Takara Taq™ HotStart Polymerase (TakaraBio, Nhật Bản). Vùng gen được khuếch đại thông qua chu trình nhiệt gồm biến tính ở 98°C trong 3 phút, 40 chu kỳ khuếch đại gồm: 98°C trong 10 giây, 62°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây, cuối cùng là 1 chu kỳ kéo dài tại 72°C trong 2 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên thạch agarose 2% có thuốc nhuộm GelRed và quan sát với hệ thống chụp ảnh điện di GelDoc-It™ (UVP, Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific, Mỹ) để loại bỏ các đoạn mồi còn dư sau phản ứng. Sản phẩm sau tinh sạch được tiến hành giải trình tự theo 2 chiều sử dụng bộ kit BigDye Terminator V3.1 và điện di mao quản trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer (ABI, Mỹ). Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Mainwork Bench (QIA, Đức) với trình tự gen tham chiếu TERT (NG_009265).

Quy trình multiplex ASO-PCR SYBR

Green: Qui trình ASO-PCR được thực hiện bằng bộ kit TB Green Premix Ex Taq II (TakaraBio, Nhật Bản).

Bảng 2. Thành phần phản ứng multiplex ASO-PCR SYBR Green

Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ phản ứng
SYBR Green 2X	10	1 X
Primer ANTERT-R (10µM)	0,6	300 nM
Primer ANTERT-146T (10µM)	0,6	300 nM
Primer AN-G6PD-F (10µM)	0,4	200 nM
Primer AN-G6PD-R (10µM)	0,4	200 nM
Blocker ANTERT-B	1	500 nM
DNA	2	50-100 ng
H ₂ O	3,4	Vừa đủ 20ul

Chu trình luân nhiệt và đọc tín hiệu huỳnh quang được thực hiện trong hệ thống máy QuantStudio 5 Realtime PCR system (Applied Biosystem, Mỹ). Chu kỳ nhiệt: khởi đầu tại 95°C trong 1 phút; tiếp theo với 40 chu kỳ lặp lại các bước: 95°C trong 15 giây, 62°C trong 50 giây, ghi

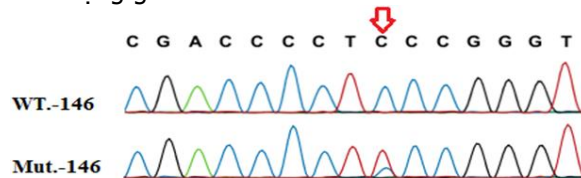
nhận tín hiệu huỳnh quang ngay sau bước này. Nhiệt độ melting curve: 98°C trong 15 giây, nhiệt độ từ 65°C trong 15 giây sau tăng dần lên 98°C trong vòng 20 phút. Cuối cùng là bước 98°C trong 15 giây.

2.4. Ý đức của nghiên cứu. Nghiên cứu được chấp thuận của hội đồng ý đức Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (316/HĐĐĐ-ĐHYD Ngày 14 tháng 3 năm 2022).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả thiết kế mồi. Cặp mồi được chúng tôi thiết kế bằng phần mềm CLC Main Workbench 5.5. Mồi ANTERT-146T được thiết kế và chỉnh sửa đầu 3' thành nucleotide T nhằm bắt đặc hiệu cho đột biến c.-146C>T, ngoài ra để giảm khả năng bắt không đặc hiệu tại vị trí khác, chúng tôi cũng thay đổi nucleotide ở vị trí c.-147C thành nucleotide G. Kích thước khuếch đại là 100bp. Do có sự khác biệt về nucleotide tại đầu 3' của mỗi mồi nên khi mẫu DNA không có đột biến c.-146C>T sẽ không xuất hiện sản phẩm PCR. Ngoài ra, để tăng độ nhạy của phản ứng, chúng tôi cũng thiết kế thêm trình tự oligo blocker giúp khoá các trình tự DNA không mang đột biến tại vị trí c.-146C>T. Trình tự blocker ANTERT-B có đặc điểm tại đầu 3' được xử lí gắn gốc PO₄, khiến enzyme Polymerase không kéo dài được. Ngoài ra, chúng tôi thiết kế thêm cặp mồi AN-G6PD-F/R làm chứng nội chạy trong cùng 1 phản ứng; kích thước khuếch đại là 178bp.

3.2. Kết quả giải trình tự Sanger. Trong 30 mẫu DNA của bệnh nhân u thần kinh đệm được tiến hành giải trình tự Sanger, chúng tôi ghi nhận được 9 mẫu có mang đột biến c.-146C>T. Mẫu có xuất hiện sóng T tại vị trí c.-146 là các mẫu mang đột biến (hình 1). Ngoài ra, chúng tôi có ghi nhận 3 trường hợp mang đột biến c.-124C>T (không trình bày số liệu). Các mẫu DNA còn lại không mang đột biến trên vùng khởi động gen TERT.

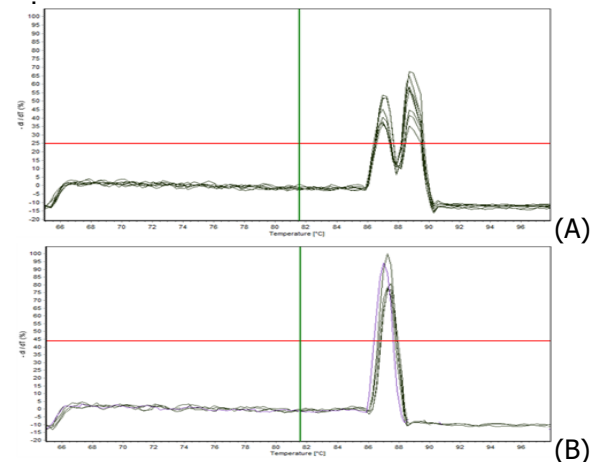


Hình 1. Kết quả giải trình tự vùng khởi động gen TERT

3.3. Kết quả multiplex ASO-PCR SYBR Green. Thiết kế mồi cho thấy sản phẩm ở các mẫu mang đột biến c.-146C>T cho 2 đỉnh nhiệt độ chảy của 2 sản phẩm khuếch đại khác nhau. Trong khi đó, các mẫu không mang đột biến sẽ

xuất hiện 1 đỉnh nhiệt độ chảy của sản phẩm chứng nội. Phân tích biểu đồ đường cong nóng chảy cho thấy, đối với phản ứng sử dụng DNA mang đột biến c.-146C>T, cặp mồi ANTERT-146T/R cho sản phẩm khuếch đại có kích thước là 100 bp và thành phần %GC trong trình tự khuếch đại là 81,3%; tương đương với điểm nóng chảy là 88,8°C. Cặp mồi AN-G6PD-F/R cho sản phẩm khuếch đại có kích thước là 178 bp và thành phần %GC trong trình tự khuếch đại là 58,4%; tương đương có điểm nóng chảy tại 87,1°C. Kết quả phân tích đường cong chảy xuất hiện 2 đỉnh chảy tương ứng với 2 sản phẩm PCR xuất hiện trong phản ứng. Tuy 2 điểm nóng chảy gần nhau, kết quả hình đường cong chảy vẫn cho 2 đỉnh sóng rõ ràng.

Tương tự, đối với mẫu DNA âm tính với kiểu gen đột biến c.-146C>T. Kết quả chỉ xuất hiện duy nhất 1 đỉnh chảy duy nhất tại 87,1°C ứng với sản phẩm khuếch đại từ cặp mồi chứng nội. Kết luận, cặp mồi chứng nội hoạt động tốt, cặp mồi ANTERT-146T/R không bắt nhầm vào vị trí khác trong bộ gen người và phân biệt được chính xác đột biến c.-146C>T.



Hình 2. Các mẫu DNA mang đột biến (A) và không mang đột biến (B) c.-146C>T

Khi thực hiện chạy đồng thời 30 mẫu DNA, kết quả phân tích đường cong nóng chảy cho kết quả gồm nhiều đỉnh sóng khác nhau chồng lên nhau tại nhiệt độ 88,8°C và 87,1°C (hình 2A). Ngược lại, các mẫu DNA không mang đột biến c.-146C>T thì các đỉnh sóng sẽ hội tụ tại một đỉnh duy nhất tại nhiệt độ 87,1°C (hình 2B). Ngoài ra, kết quả đột biến của 30 mẫu DNA bằng qui trình ASO- PCR SYBR Green và phương pháp giải trình tự Sanger cho kết quả tương đồng 100%.

IV. BÀN LUẬN

Trong u thần kinh đệm, đột biến vùng khởi

động gen TERT được phát hiện với tỷ lệ cao và là một yếu tố tiên lượng độc lập hoặc kết hợp với các yếu tố khác như đột biến gen IDH1 và tình trạng đồng mất đoạn nhiễm sắc thể 1p/19q để phân bệnh nhân thành 5 nhóm bệnh với tiên lượng khác nhau. Hơn nữa đột biến vùng khởi động gen TERT cũng ảnh hưởng đến kết quả đáp ứng với điều trị [5]. Trong khối u, nếu có sự hiện diện đột biến vùng khởi động gen TERT, tăng hoạt động quá trình phiên mã, làm thuốc temozolomide không có tác dụng điều trị [6].

Đột biến gen trên vùng promoter của gen TERT có thể xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau như giải trình tự Sanger, giải trình tự thế hệ mới và dPCR (digital PCR). Trong đó, giải trình tự Sanger được xem là tiêu chuẩn vàng để phát hiện đột biến. Tuy nhiên, các phương pháp này tốn nhiều chi phí và cần nhiều thời gian thực hiện. Hiện nay, phương pháp PCR (với các biến thể của PCR) được xem là tối ưu về chi phí và thời gian. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã cho thấy được độ nhạy của phương pháp PCR có thể phát hiện được các đột biến có tần suất thấp. Cụ thể, nghiên cứu của Barbano và cộng sự đã khảo sát được khả năng phát hiện đột biến V600 của gen BRAF tại tần suất 1% [7]. Trong nghiên cứu của Cristin và cộng sự cũng phát hiện các đột biến của gen EGFR tại ngưỡng tần suất 0,5% [8]. Ngoài ra, đột biến của TERT promoter còn phát hiện bằng phương pháp ASO-PCR trong mẫu nước tiểu của bệnh nhân ung thư bàng quang [9].

Trong nghiên cứu này được chúng tôi thiết lập một qui trình ASO-PCR có bổ sung trình tự đoạn khoá (blocker) các trình tự DNA wild type sẽ giúp phát hiện các đột biến có tần suất thấp và hạn chế sự bắt không đặc hiệu của môi. Với thiết kế phản ứng realtime PCR dưới dạng multiplex kết hợp môi chứng nội và môi phát hiện đột biến c.146C>T, điều đó giúp tránh trường hợp âm tính giả do thao tác kỹ thuật hoặc chất lượng hoá chất sử dụng trong phản ứng, tiết kiệm được chi phí hoá chất. Từ đó, khiến chi phí phù hợp để có thể triển khai rộng rãi trong môi trường xét nghiệm của bệnh viện hoặc các đơn vị xét nghiệm sinh học phân tử. Ngoài ra, kĩ thuật ASO-PCR không chỉ phục vụ phát hiện đột biến TERT trong bệnh lí u thần kinh đệm mà còn có thể sử dụng trong các bệnh lí ung thư khác.

Hạn chế của nghiên cứu là quy trình mới được thiết lập và tối ưu các thông số cơ bản, chưa thực hiện chạy trên lượng mẫu lớn để đánh giá tính ổn định của qui trình. Ngoài ra, nghiên

cứu còn chưa khảo sát được ngưỡng tần suất đột biến thấp nhất có thể mà qui trình có thể phát hiện được.

Tuy nhiên, nghiên cứu đã bước đầu tối ưu hoá thành công được quy trình ASO-PCR phát hiện đột biến c.-146C>T góp phần nâng cao tiền đề chăm sóc sức khoẻ cho bệnh nhân, hạn chế phụ thuộc vào các bộ kit nước ngoài, giảm giá thành sản phẩm, đáp ứng được nhu cầu làm xét nghiệm di truyền sinh học phân tử tại Việt Nam hiện nay.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế cặp môi phát hiện đúng đột biến c.-146C>T và cặp môi gen chứng nội G6PD. Chúng tôi thiết lập được điều kiện phản ứng multiplex ASO-PCR SYBR Green nhằm phát hiện đột biến c.-146C>T. Sự tương đồng về xác định kết quả đột biến giữa phương pháp multiplex ASO-PCR SYBR Green và giải trình tự Sanger là 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yuan Y., Qi C., Maling G., et al. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *J Clin Neurosci*, 26, 57–62.
2. Janssens G.O., Jansen M.H., Lauwers S.J., et al. (2013). Hypofractionation vs Conventional Radiation Therapy for Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Matched-Cohort Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 85(2), 315–320.
3. Huse J.T. (2015). TERT promoter mutation designates biologically aggressive primary glioblastoma. *Neuro-Oncol*, 17(1), 5–6.
4. Otsuji K., Sasaki T., Tanabe M., et al. (2021). Droplet-digital PCR reveals frequent mutations in TERT promoter region in breast fibroadenomas and phyllodes tumours, irrespective of the presence of MED12 mutations. *Br J Cancer*, 124(2), 466–473.
5. Eckel-Passow J.E., Lachance D.H., Molinaro A.M., et al. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*, 372(26), 2499–2508.
6. Mosrati M.A., Malmström A., Lysiak M., et al. (2015). TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*, 6(18), 16663–16673.
7. Barbano R., Pasculli B., Coco M., et al. (2015). Competitive allele-specific TaqMan PCR (Cast-PCR) is a sensitive, specific and fast method for BRAF V600 mutation detection in Melanoma patients. *Sci Rep*, 5.
8. Roma C., Esposito C., Rachiglio A.M., et al. (2013). Detection of EGFR Mutations by TaqMan Mutation Detection Assays Powered by Competitive Allele-Specific TaqMan PCR Technology. *BioMed Res Int*, 2013.
9. Wang K., Liu T., Ge N., et al. (2014). TERT promoter mutations are associated with distant metastases in upper tract urothelial carcinomas and serve as urinary biomarkers detected by a sensitive castPCR. *Oncotarget*, 5(23), 12428–12439.