

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *BRAFT1799A* TRONG UNG THƯ TUYẾN GIÁP THỂ NHÚ BẰNG KỸ THUẬT ASB REALTIME PCR

*Hoàng Quốc Trường**; *Trần Thị Thanh Huyền**
*Nguyễn Linh Toàn***; *Lê Hữu Song**

TÓM TẮT

Đột biến gen *braf* T1799A là dấu ấn phân tử đặc hiệu trong ung thư tuyến giáp (UTT) thể nhú. Việc xác định chính xác đột biến này có vai trò hết sức quan trọng trong chẩn đoán bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng kỹ thuật ASB RealTime PCR để phát hiện đột biến gen *braf*T1799A. Kết quả cho thấy: bằng kỹ thuật ASB RealTime PCR cho phép phát hiện đột biến T1799A với tỷ lệ 1 đột biến trong quần thể 100 alen kiểu dại. Như vậy, đã xây dựng thành công kỹ thuật ASB RealTime PCR phát hiện đột biến T1799A.

* Từ khóa: Ung thư tuyến giáp thể nhú; Đột biến gen *BRAF*.

ASB REALTIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF *BRAFT1799A* MUTATION IN PAPILLARY THYROID CANCER

SUMMARY

BRAF mutation T1799A is a specific marker in papillary thyroid cancer. Therefore, the identification of this mutation play an important role in diagnosis of this disease. The aim of this study was to establish a ASB RealTime PCR for detecting *braf* mutation T1799A. This assay allowed us to detect T1799A mutation in samples containing 1 mutated DNA in populations of the 100 wild type allele. Thus, the ASB RealTime assays for detection of mutation *braf* has been successfully established.

* Key words: Papillary thyroid cancer; Mutation of *BRAF*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tuyến giáp là bệnh ác tính thường gặp nhất, chiếm 90% số bệnh ung thư tuyến nội tiết và khoảng 1% các loại ung thư. Trong đó, UTTG thể nhú (UTTGTN) chiếm 80%, cao nhất trong các thể UTTG. Kỹ thuật

chọc hút tế bào bằng kim nhỏ (FNAC) là xét nghiệm tế bào học thường quy trong chẩn đoán trước phẫu thuật đối với u tuyến giáp. Độ nhạy và độ đặc hiệu của FNAC trong xét nghiệm tương ứng đạt 70 - 98% và 55 - 100% [1]. Có tới 15 - 40% trường hợp không xác định được chẩn đoán và 10 - 12%

* Bệnh viện TWQĐ 108

** Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Trần Văn Khoa

mẫu bệnh phẩm chọc hút không đủ tiêu chuẩn chẩn đoán [2]. Do vậy, có đến 50% trường hợp chẩn đoán bị bỏ sót, ảnh hưởng rất lớn đến kết quả điều trị. Do đó, nhu cầu cần có các phương pháp hỗ trợ chẩn đoán UTTGTN rất lớn.

Qua nghiên cứu cho thấy đột biến gen *braf* T1799A là dấu ấn phân tử có giá trị trong chẩn đoán UTTGTN. Đột biến T1799A chỉ xuất hiện ở những tế bào UTTGTN mà không tìm thấy ở tế bào tuyến giáp lành tính hoặc ở tế bào tiền ung thư [3]. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới cho thấy, khi kết hợp FNAC với các kỹ thuật sinh học phân tử sẽ giúp chẩn đoán 50% trường hợp bị bỏ sót khi chẩn đoán tế bào [4].

Hiện nay, nhiều kỹ thuật RealTime PCR đã và đang được nghiên cứu ứng dụng trong phát hiện đột biến gen như: allele-specific competitive blocker PCR, blocker-PCR, RealTime genotyping with locked nucleic acid. Trong đó, kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker (ASB RealTime PCR, Allele-Specific Blocker RealTime PCR) ưu việt hơn cả về độ nhạy, độ đặc hiệu, đặc biệt là khả năng phát hiện các đột biến trên những mẫu mô với số lượng ít tế bào ung thư [5]. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen *braf* T1799A bằng kỹ thuật ASB RealTime PCR và định hướng ứng dụng dấu ấn phân tử trong hỗ trợ chẩn đoán UTTGTN tại Bệnh viện TƯQĐ 108.

□□I TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Mẫu chuẩn dương: Dòng tế bào ung thư đại trực tràng HT-29 mang đột biến gen *Brat* T1799A thể dị hợp (ATCC, Mỹ) [6].

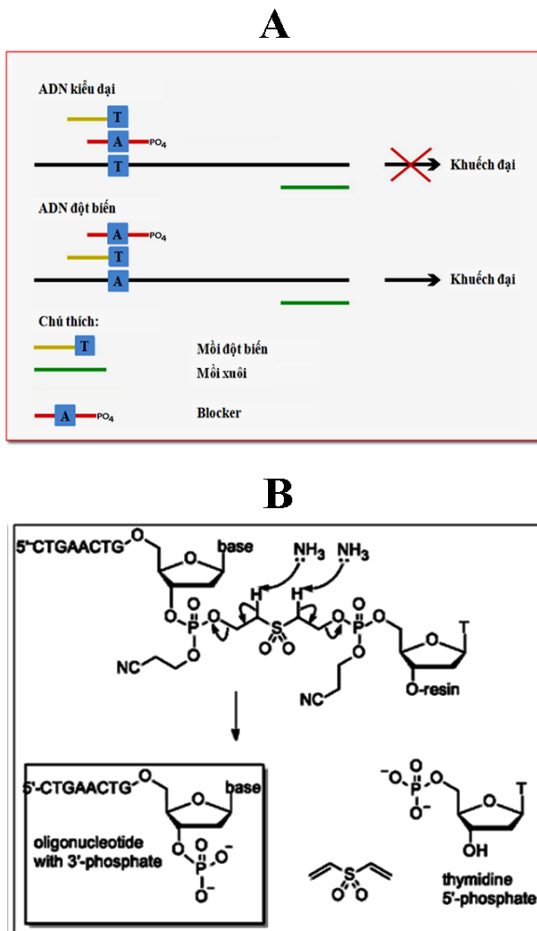
2. Phương pháp nghiên cứu.

** Nuôi cấy dòng tế bào HT-29:*

Nuôi cấy dòng tế bào HT-29 trong môi trường RPMI có bổ sung 10% FBS, 1X penicillin/dtreptomycin. Quy trình nuôi cấy, bảo quản và làm stock tế bào được tiến hành theo hướng dẫn của ATCC (Mỹ) [<http://www.atcc.org>].

** Phương pháp phát hiện đột biến gen B *Brat* T1799A bằng kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker:*

Trình tự primer và blocker đặc hiệu phát hiện đột biến gen *braf* T1799A được thiết kế dựa trên các công trình đã công bố [5, 7], để khuếch đại đặc hiệu đoạn gen mang đột biến trực tiếp từ những mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật RealTime PCR kết hợp blocker. Phản ứng tiến hành với thể tích 20 µl, tỷ lệ thành phần như sau: 2X PCR master mix SYBR green (ABI), mỗi No.1: 5'-CTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGAT-3' (0,375 pM), mỗi đặc hiệu alen No.2: 5'-CCCACTCCATCGAGATTTCT-3' (0.375 pM) và 300 pM blocker: 5'-CATCGAGATTTCACGTAGCTAGA-PO4-3'. 2,5 µl ADN tổng số và 0,5 µl nước cho phản ứng RealTime PCR. Phản ứng khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker thực hiện trên máy RealTime PCR 7500 (Mỹ) với chu kỳ nhiệt như sau: 50°C/5 phút; 95°C/10 phút, 45 chu kỳ (95°C/15 giây, 60°C/phút). Do việc thiết kế trình tự mỗi đặc hiệu alen kết hợp sử dụng blocker, phản ứng khuếch đại gen chỉ xảy ra trên mạch khuôn ADN mang điểm đột biến và hiển thị ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng qua việc ghi nhận tín hiệu huỳnh quang của SYBR Green. Trong khi các mẫu không có tín hiệu huỳnh quang là những mẫu kiểm đại không chứa đột biến gene *braf* T1799A.



Hình 1: Phương pháp phát hiện đột biến bằng kỹ thuật ASB RealTime PCR. (A) Mô phỏng kỹ thuật ASB phát hiện đột biến điểm và (B) Cấu trúc phân tử của blocker, trình tự nucleotide kiểu dại với đầu 3' gắn với gốc phosphate.

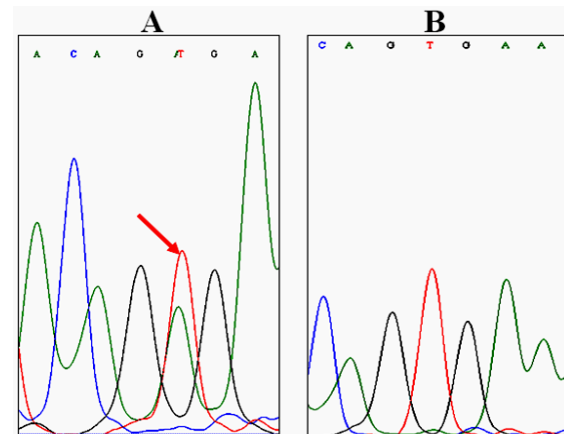
Độ nhạy của kỹ thuật phát hiện đột biến gen *braf* T1799A được xác định bằng cách sử dụng ADN tổng số tách chiết từ dòng tế bào chuẩn dương HT-29 với nồng độ 25 - 2,5 - 0,25 và 0,025 ng/ μ l trộn với 250 ng mẫu ADN kiểu dại tương ứng với mỗi nồng độ để tạo thành tỷ lệ pha loãng ADN đột biến/ADN kiểu dại là 10 - 1 - 0,1 và 0,01%, sau đó, tiến hành phản ứng ASB RealTime PCR SYBR Green.

* Phương pháp xác định trình tự axit nucleic:

Để kiểm định độc lập sự có mặt đột biến gen *braf* T1799A trong mẫu chuẩn dương HT-29 và các mẫu bệnh phẩm FNAC, phản ứng PCR sử dụng cặp mồi (mồi No.1: 5'-CTGTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGAT-3', mồi No.3: 5'-CAACTGTTCAAACCTGATGGG-3') để khuếch đại đoạn gen kích thước 126 bp và giải trình tự trực tiếp trên hệ thống máy CEQ 8800 sequencer (Beckman Coulter, Mỹ). Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit và công cụ so sánh trình tự trực tuyến Blast search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xác định đột biến gen BRAF (T1799A) bằng kỹ thuật giải trình tự.



Hình 2: Hình ảnh trình tự của đột biến gen *braf* tại vị trí 1799.

Mẫu tế bào ung thư đại trực tràng HT-29 cho thấy: có đột biến điểm dạng dị hợp tử tại vị trí 1799 (T1799A/T) (A). Trong khi đó trên mẫu tế bào u tuyến giáp lành tính không có đột biến này (B). Mũi tên đánh dấu vị trí thay đổi nucleotide T>A.

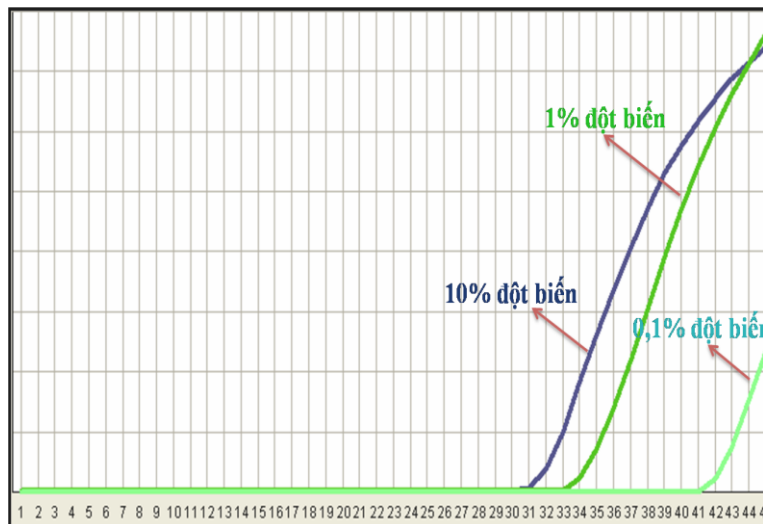
2. Xác định đột biến gen *braf*T1799A bằng kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker sử dụng SYBR green.



Hình 3: Kết quả xác định đột biến gen *braf* T1799A bằng kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker sử dụng SYBR green.

Mẫu dương tính với đột biến gen *braf* T1799A phát hiện qua việc ghi nhận tín hiệu khuếch đại của thiết bị tại chu kỳ 38, trong khi khả năng khuếch đại alen kiểu dại bị ức chế hoàn toàn trên mẫu âm tính với đột biến T1799A.

3. Độ nhạy của kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker sử dụng SYBR green trong phát hiện đột biến gen *braf* T1799A.



Hình 4: Tín hiệu huỳnh quang của phản ứng ASB RealTime PCR phát hiện đột biến gen *braf* T1799A sử dụng thang pha loãng ADN đột biến/ADN kiểu dại.

Kết quả cho thấy độ nhạy phát hiện đột biến T1799A của kỹ thuật ASB RealTime PCR là 0,25 ng, tương ứng với 1% tỉ lệ pha loãng ADN đột biến/ADN kiểu dại.

BÀN LUẬN

Hiện nay, đột biến gen *braf* là một trong những dấu ấn phân tử giúp chẩn đoán phát hiện UTTGTN với độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng 80% và 99.7% khi kết hợp với kỹ thuật chẩn đoán tế bào [4]. Xác định được đột biến gen *braf* T1799A sẽ giúp hạn chế chẩn đoán UTTGTN bị bỏ sót của kỹ thuật FNAC, nâng cao chất lượng chẩn đoán, theo dõi và quản lý bệnh nhân. Tuy nhiên, do tính không đồng nhất của tế bào tại các u tuyến giáp nên đột biến gen *braf* T1799A thường hiện diện với tỷ lệ thấp trong quần thể gen kiểu dại, việc phát hiện đột biến này vẫn đang là thách thức trong chẩn đoán khi sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử. Bên cạnh đó, đột biến T1799A được xếp vào nhóm SNP lớp IV hay còn gọi là alen hiếm (rare allele), do nhiệt độ nóng chảy của thymine và adenine tương đối gần nhau, việc phát hiện thể đột biến này trở nên vô cùng khó khăn [8].

Một số phương pháp được nghiên cứu ứng dụng để phát hiện đột biến bằng kỹ thuật RealTime PCR, bao gồm: khuếch đại đặc hiệu alen cạnh tranh blocker, blocker-PCR, ARMS-PCR, TaqMAMA và FLAG PCR. Tuy nhiên, đây là những phương pháp đắt tiền, do phải biến đổi hóa học các nucleotid trên trình tự của môi, enzym, thuốc thử đi kèm và quy trình thí nghiệm do các hãng sinh phẩm cung cấp độc quyền, nên rất khó triển khai tại Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker từ những công trình đã công bố trên thế giới về phát hiện đột biến gen *KRAS* để vận dụng thiết kế xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen *braf* T1799A [5, 7]. Với việc tối ưu các điều kiện cho phản ứng khuếch đại đặc hiệu alen và nồng độ Oligo blocker sử dụng trong kỹ thuật, kết quả cho thấy đã thành công trong việc khuếch đại alen đột biến T1799A và ức chế hoàn toàn tín hiệu khuếch đại alen kiểu dại.

Việc sử dụng các mẫu chuẩn dương trong phản ứng RealTime PCR khuếch đại đặc hiệu alen rất cần thiết để kiểm soát thí nghiệm và đánh giá kết quả. Dòng tế bào HT-29 là dòng tế bào chứa đột biến dị hợp tử T1799A đã được công bố, chúng tôi xác nhận bằng kỹ thuật giải trình tự trước khi tiến hành các bước thí nghiệm tiếp theo. Kết quả cho thấy tính đặc hiệu của phản ứng khuếch đại đặc hiệu alen trong trường hợp có và không có blocker đều khuếch đại tín hiệu đột biến T1799A đối với dòng tế bào HT-29. Sử dụng dòng tế bào này đã xác định độ nhạy của kỹ thuật ASB RealTime PCR. Kỹ thuật ASB RealTime PCR có thể phát hiện đột biến T1799A ở nồng độ 0,25 ng tương ứng với 1% tỷ lệ pha loãng ADN đột biến/ADN kiểu dại. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả Anne Jarry và CS đã công bố [9].

KẾT LUẬN

Kỹ thuật khuếch đại gen đặc hiệu alen kết hợp blocker được xây dựng thành công để phát hiện đột biến gen *braf* T1799A trong UTTGTN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Annals of Internal Medicine*. 1993, pp.282-289.
2. Sclabas GM, Staerke GA, Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, Lee JE, Evans DB. Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg*. 2003, 186, pp.702-709.
3. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K & Takenoshita S. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogen*. 2003, 22, pp.6455-6457.
4. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith T, Haugen BR, Klopper J, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN. Molecular testing for mutations in improving the fine needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009, 94, pp.2092-2098.
5. Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation Detection by Real Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. *PLoS ONE*. 2009, 4 (2), e4584. doi:10.1371/journal.pone.0004584.
6. Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002, 417, pp. 949-954.
7. Alois H. Lang et. al. Optimized Allele-Specific RealTime PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2011, 13 (1), pp.23-28.
8. Venter JC, et al. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 2001, 291, pp.1304-1351.
9. Anne Jarry. RealTime allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Molecular and Cellular Probes*. 2004, 18, pp.349-352.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

