

PCR ĐẶC HIỆU ALLELE TÍCH HỢP CÔNG NGHỆ AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (DSA-PCR- ARMS) PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN JAK2 V617F VÀ CARL TRÊN BỆNH NHÂN CỐ HỘI CHỨNG TĂNG SẢN TỦY

Ngô Tất Trung¹, Đào Thanh Quyên¹,
Phan Quốc Hoàn¹, Lê Hữu Song¹

DOI: 10.38103/jcmhch.2020.59.8

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Đột biến gen Jak2V617F và CARL được xác định là những dấu ấn có giá trị trong chẩn đoán hội chứng tăng sản tủy.

Mục tiêu: Thiết lập phương pháp xác định đột biến gen Jak2 V617F và CARL bằng cách phối hợp công nghệ PCR đặc hiệu hai hướng allele tích hợp công nghệ ARMS. **Đối tượng và phương pháp:** 64 bệnh phẩm máu ngoại vi thu thập từ các bệnh nhân có hội chứng tăng sản tủy, 02 mẫu chứng dương mang đột biến Jak2 V617F và 01 mẫu chứng mang đột biến CARL. Các mẫu chứng dương được pha vào mẫu ADN chân tóc người khỏe mạnh với các tỷ lệ giảm dần: 100, 50, 25, 5, 0,5 và 0% sau đó sử dụng DSA-PCR-ARMS để phát hiện xác định độ nhạy kỹ thuật và giải trình tự gene để xác định độ đặc hiệu của phương pháp.

Kết quả: Ngưỡng phát hiện Jak2V617F là 0,5% tế bào ung thư trong tổng số tế bào xét nghiệm, độ đặc hiệu là 100% sau khi giải trình tự gene. Đột biến gen Jak2 (V617F) xảy ra ở 32/50 (64%) các thể điển hình của hội chứng tăng sản tủy. Trong khi đó có 2/17 bệnh nhân tăng tiểu cầu nguyên phát và 1/13 bệnh nhân xơ tủy có mang gene CARL đột biến.

Kết luận: Phương pháp DSA-PCR-ARMS để phát hiện đột biến gene Jak2 V617F và CARL đã được xây dựng thành công và tỷ lệ các đột biến này ở bệnh nhân Việt Nam bước đầu đã được xác định.

Từ khóa: Jak2 V617F, CARL, hội chứng tăng sản tủy (MPN)

ABSTRACT

BIDIRECTIONAL ALLELE SPECIFIC PCR INTEGRATED WITH AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM –(DSA-PCR-ARMS) FOR ANALYZING CARL AND JAK2 V617F MUTATIONS IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM

Ngô Tất Trung¹, Đào Thanh Quyên¹,
Phan Quốc Hoàn¹, Lê Hữu Song¹

Background: Jak2 V617F and CARL mutation are recognized as essential molecular genetic markers in diagnostic definition of myeloid proliferative neoplasm (MPN).

Objective: To establish an income relevant Allele-specific-PCR-ARMS (DSA-PCR-ARMS) assays to identify Jak2 V617F, CARL mutations in MPN patients.

1. Bệnh viện TƯQĐ 108

- Ngày nhận bài (Received): 25/7/2019; Ngày phản biện (Revised): 27/01/2020;
- Ngày đăng bài (Accepted): 20/02/2020
- Người phản hồi (Corresponding author): Ngô Tất Trung
- Email: tatrungngo@gmail.com; SĐT: 0919119416

Subjects: 64 MPN patients' samples, one V617F positive reference samples and one CALR mutant positive sample.

Methods: Dilution series of 100%, 50%, 25%, 5%, 0.5% and 0% mutant alleles were created as pseudo-samples establish the detection limits and the technical specificity of DSA-PCR-ARMS assays in identifying the mentioned genetics markers.

Result: Our approach can detect presence of 0.5 % V617F mutant DNA fragment; beside that just by one gel-based PCR reaction, we can differentiate the deletion/insertion CARL carriers from the wild type counterpart. By applying our approach to a study cohort of 50 MPN cases, a sensitivity of 64% and specificity of 100% was recorded for our Jak2 V617F detection assay and we also detected 3 CARL mutation case amongst the 10 V617F negative cases.

Conclusion: The in-house of Jak2 V617F/CARL mutation detection protocols have been successfully established in our hospital.

Key words: Jak2 V617F, CARL, myeloid proliferative neoplasm (MPN).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng tăng sản tủy là một dạng rối loạn di dòng của hệ huyết học, bao gồm các bệnh lý: bạch cầu tủy mạn (BCTM), đa hồng cầu (polycythemia vera - ĐHC), hội chứng xuất huyết tăng tiểu cầu nguyên phát (essential thrombocythosis-XHTTCNP) và hội chứng xơ tủy (idiopathic myelofibrosis-XT). Ngoài ra còn có các thể bệnh loạn sản tủy không điển hình khác như: hội chứng tăng bạch cầu ái toan (TBCAT), tăng bạch cầu ái kiềm (TBCAK) và các hội chứng tăng bạch cầu hạt khác.

Tuy có tên chung là hội chứng tăng sản tủy nhưng các phân típ khác nhau mang các đặc điểm di truyền học khác nhau và phác đồ điều trị cũng khác nhau. Ngoài các thông số huyết học đặc trưng của từng phân típ như sự gia tăng huyết sắc tố (ĐHC), sự tăng sản tiểu cầu (XHTTCNP), hay sự gia tăng quá mức tế bào megakaryocyte (XT), đột biến gene Jak2 là một đặc điểm di truyền học nổi bật của 3 phân típ bệnh này. Các nghiên cứu dịch tễ học cho thấy khoảng 90-100% bệnh nhân ĐHC, trên 50% XHTTCNP và trên 65% XT mang đột biến Jak2 tại vị trí V617F[1].

Theo hướng dẫn mới nhất của mạng lưới bạch cầu châu Âu, đột biến gen Jak2 là chỉ tiêu chính trong chẩn đoán các hội chứng tăng sản tủy thuộc các phân type: ĐHC, XHTTCNP và XT[2]. Tuy nhiên trong thực tế chẩn đoán và điều trị bệnh này tại Việt Nam, cũng như trên thế giới ghi nhận một

tỷ lệ khoảng 20-40% bệnh nhân không mang đột biến gen này, vì thế gây khó khăn trong chẩn đoán và điều trị.

Trong những năm gần đây người ta phát hiện thấy sự xuất hiện của đột biến gen CARL trên các nhóm hội chứng tăng sản tủy không mang đột biến JAK2 vì thế đột biến CARL nhanh chóng trở thành một tiêu chí chẩn đoán bệnh này[3, 4]. Trong khi đó các bộ kit để xét nghiệm tìm kiếm đột biến CARL chưa được phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam.

Đứng trước tình hình đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình xét nghiệm phát hiện đột biến gen Jak2 V617F, đột biến CARL ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị hội chứng tăng sản tủy.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

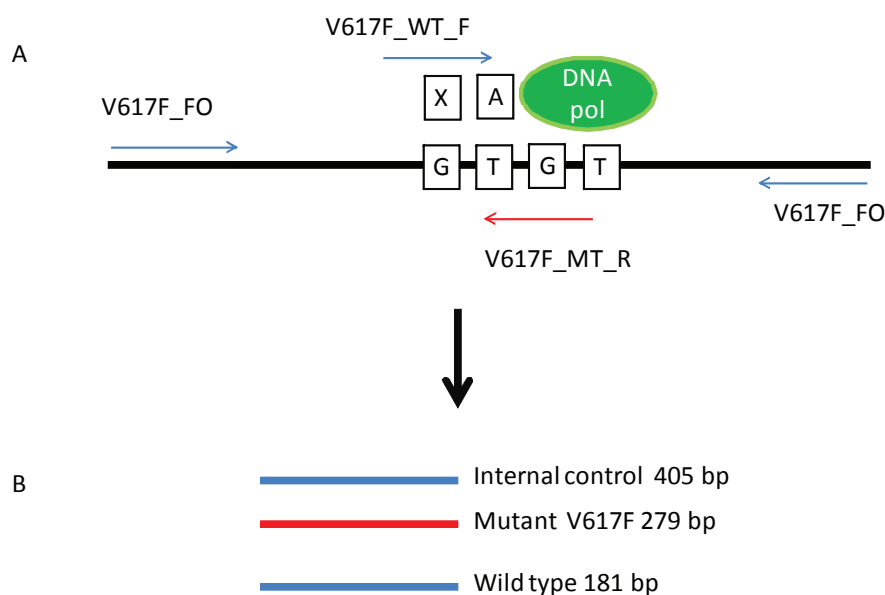
2.1. Đối tượng: 64 bệnh phẩm máu ngoại vi thu thập từ các bệnh nhân nghi ngờ mắc hội chứng tăng sản tủy tại Bệnh viện TƯQĐ108; 02 mẫu chứng dương đột biến Jak2 V617F do Bệnh viện đa khoa quốc gia Singapore cung cấp, 01 mẫu chứng dương CARL do Đại học tổng hợp Cambridge (Vương Quốc Anh) cung cấp.

2.2. Phương pháp: PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ amplification refractory mutation system (DSA-PCR-ARMS) được sử dụng trong nghiên cứu này. Bộ mồi xác định đột biến G2343T(V617F) được thiết kế bao gồm hỗn hợp 4 mồi (hình 1): cặp mồi V617F-FO/V617F-RO cho

Bệnh viện Trung ương Huế

phép nhân lên bằng nội chuẩn (kích thước 405 bp) đặc hiệu cho sự có mặt của gen Jak2 trong ADN mẫu bệnh phẩm, cặp mồi V617F_WT_F/V617F_RO_TR

cho phép nhân lên bằng kiểu dại (Wild-type – 181 bp) trong khi đó cặp mồi V617F_MT_R/V617F_FO sẽ nhân lên bằng đột biến với kích thước là 279 bp.



Hình 1: Mô hình thiết kế mồi và phương pháp DSA-PCR-ARMS.

Thông thường để thực hiện PCR đặc hiệu allele thì mồi đặc hiệu sẽ bắt cặp bổ sung chính xác với nucleotide đầu tận cùng 3' tại vị trí nghi ngờ có đột biến. Tuy nhiên, việc thay đổi 1 nucleotide chỉ làm giảm ái lực đặc hiệu của mồi và không triệt tiêu hoàn toàn tính chất bắt mồi của oligo. Vì vậy, chúng tôi thay đổi một số vị trí tận đầu 3' của chuỗi mồi đặc hiệu theo quy luật Amplification refractory mutation system – ARMS [7]. Việc thay đổi này một mặt làm giảm ái lực không đặc hiệu của mồi đột biến với khuôn thể dại nhưng lại không thay đổi tính đặc hiệu của mồi với đoạn ADN đột biến. Bộ mồi của chúng tôi được đặt tên là SHPT108@V617F (Trình tự cụ thể các mồi này sẽ được cung cấp nếu bạn đọc quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả).

2.3. Đánh giá độ nhạy kỹ thuật: Để khẳng định độ nhạy kỹ thuật của phương pháp chẩn đoán, chúng tôi tiến hành pha loãng các mẫu ADN mang đột biến Jak2 V617F chuẩn dương do Bệnh viện Đa khoa quốc gia Singapore cung cấp vào mẫu ADN chân tóc người khỏe mạnh với các tỷ lệ giảm dần (100,

50, 25, 5, 0,5 và 0% đột biến so với gen không đột biến) và thực hiện phản ứng PCR đặc hiệu allele.

2.4. Đánh giá độ đặc hiệu kỹ thuật: Để khẳng định độ đặc hiệu của phương pháp chẩn đoán đột biến G2343T(V617F) bằng kỹ thuật DSA-PCR-ARMS, chúng tôi lựa chọn giải trình tự ngẫu nhiên một số bệnh phẩm đã được chẩn đoán dương tính với đột biến G2343T(V617F).

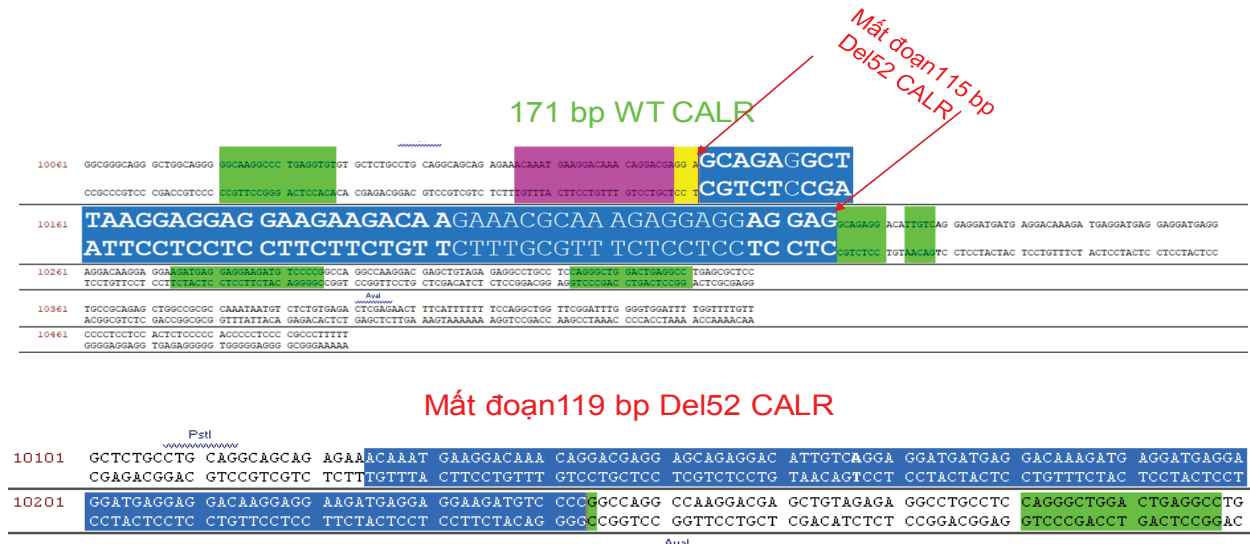
2.5. Giải trình tự gen: Kết quả DSA-PCR-ARMS được khẳng định lại bằng giải trình tự gen trên hệ thống giải trình tự gen trực tiếp CEQ8800 (Beckman Coulter – USA).

2.6. Phát hiện đột biến CARL: Các nghiên cứu gần đây nhất đều cho thấy đột biến gen CARL xuất hiện ở khoảng 67-70% bệnh nhân XHTTCNP và 84-88% bệnh nhân XT không mang đột biến gen JAK2. Tổng tần suất đột biến CARL chiếm khoảng 8-10% tổng số các ca tăng sinh tủy [3, 8]. Cho đến nay đã có trên 19 thể đột biến khác nhau của CARL được ghi nhận, trong số này thể đột biến CARL type 1 mất đoạn 52bp chiếm tỷ lệ cao nhất (khoảng 60%) vì thế trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi chỉ

PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ Amplification Refractory...

tập trung vào việc xây dựng quy trình phát hiện biến thể CARL 52-bp deletion: sơ đồ PCR chẩn đoán được thể hiện trên hình 2: cặp mồi Q-CARL-F/ Q-CARL-R bắt cặp không đặc hiệu vào thể đại và thể đột biến. Tuy nhiên, sản phẩm nhân lên của thể

đại sẽ là 167bp trong khi đó sản phẩm PCR thể đột biến CARL 52-bp Deletion sẽ là 115 pb. Hai sản phẩm này dễ dàng được phân biệt trên gel agarose 2%. (Trình tự mồi sẽ được cung cấp nếu bạn đọc quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả).



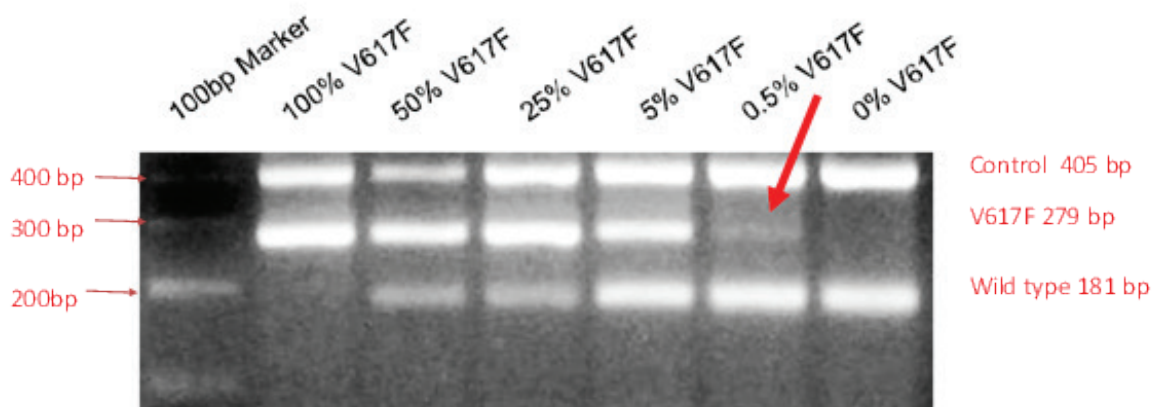
PCR điện di



Hình 2: Trình tự gene CARL thường xảy ra đột biến mất đoạn (del52).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Độ nhạy kỹ thuật của phương pháp DSA-PCR-ARMS phát hiện đột biến Jak2V617F



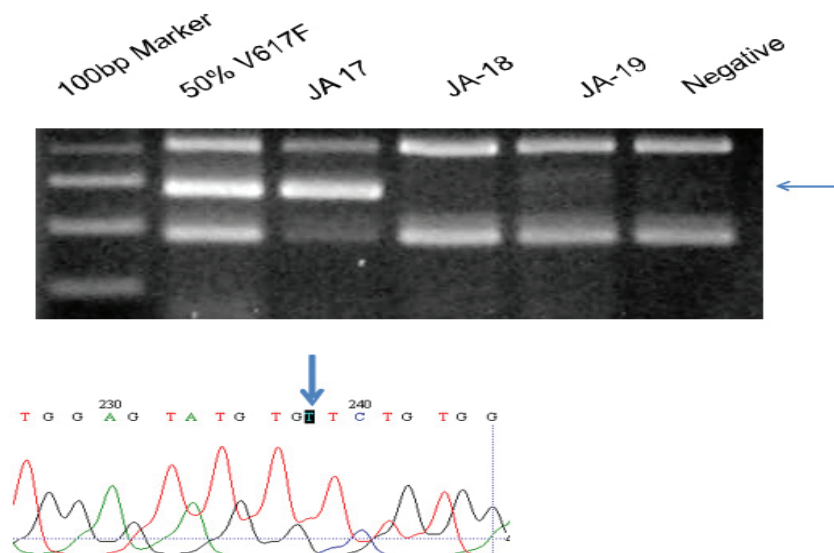
Hình 3: Kết quả điện di trên thạch Agarose 3% sau khi nhân gene bằng DSA-PCR-ARMS ở tỷ lệ % mang gene đột biến V617F.

Bệnh viện Trung ương Huế

Chỉ cần có hơn 5% gene Jak2 đột biến G2343T (V617F) so với gene Jak2 kiểu dại thì có thể phát hiện được một cách dễ dàng bằng phương pháp DSA-PCR-ARMS. Ngay cả khi trong mẫu chỉ có 0,5% gene Jak2 đột biến G2343T(V617F) so với

gene Jak2 kiểu dại thì cũng có thể phát hiện được bằng DSA-PCR-ARMS (mũi tên chỉ). Chú thích: băng có kích thước 405 bp là gene nội chuẩn; băng có kích thước 181 bp là gene kiểu dại và băng có kích thước 279bp là gene đột biến.

3.2. Độ đặc hiệu kỹ thuật của phương pháp phát hiện đột biến Jak2 V617F

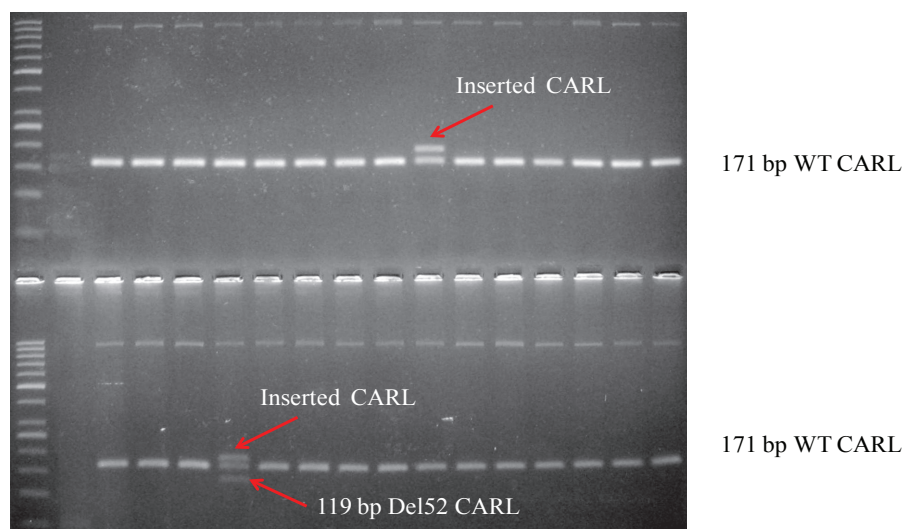


Hình 4: So sánh độ đặc hiệu kỹ thuật giữa DSA-PCR-ARMS và giải trình tự gen.

Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen Jak2 (hình 3 panel dưới) tại vị trí nghi ngờ đột biến trên mẫu bệnh phẩm JA-17 (TGGAGTATGTGTTCTGTGG) khác hoàn toàn với trình tự hoang dại lưu giữ trên ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)(TGGAGTATGTGTCTGTGG). Như vậy nucleotide G của 1 trong 2 allele gene Jak2 đã đột biến chuyển thành T. Điều này hoàn toàn phù hợp với hình ảnh PCR điện di.

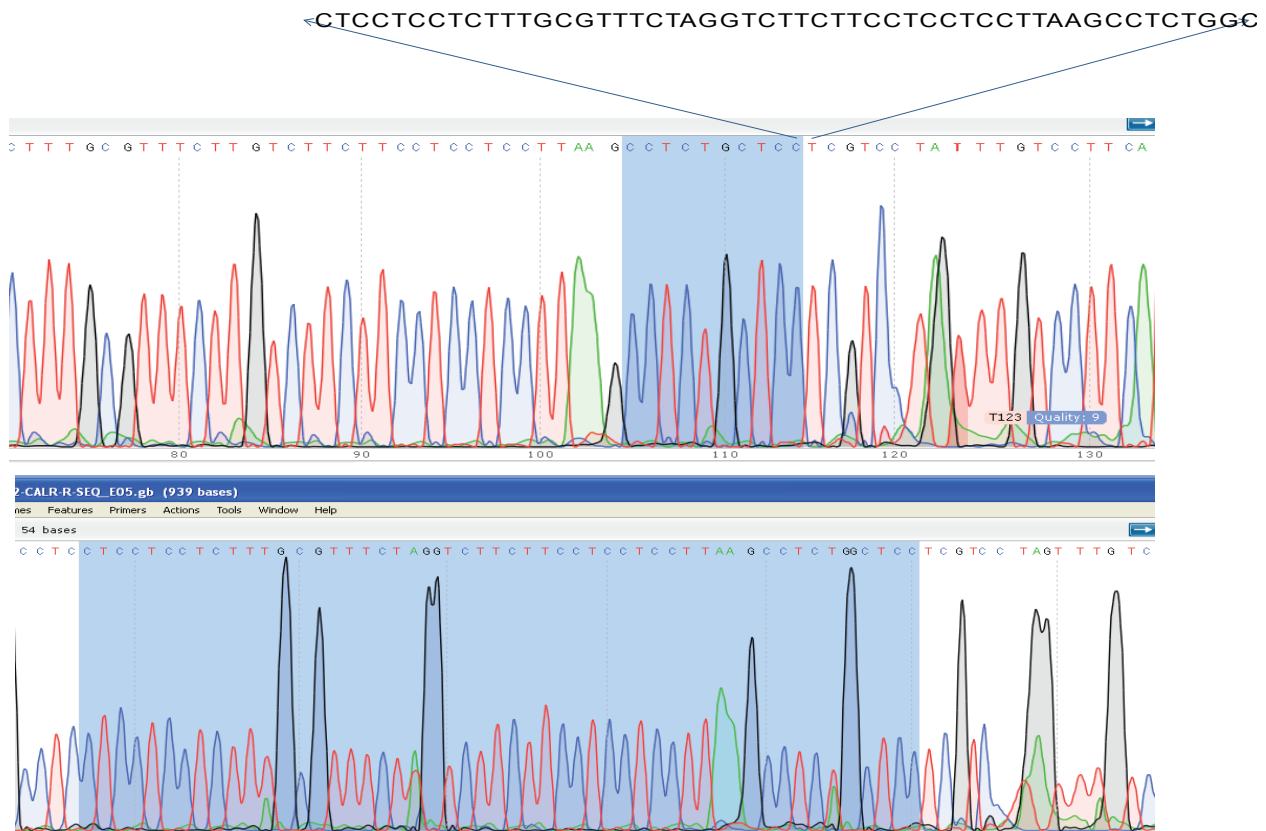
3.3. Phát hiện đột biến thêm đoạn/mất đoạn gen CARL



Hình 5: Hình ảnh điện di trên thạch agarose 3% để xác định đột biến gene CARL (thêm đoạn/mất đoạn) Hình ảnh nhận diện đột biến thêm đoạn và mất đoạn rất rõ nét (mũi tên chỉ).

3.4. Giải trình tự mẫu bệnh phẩm mang đột biến CARL 52 Del

Hình ảnh phổ sắc ký (Sanger sequencing) của mẫu bệnh phẩm thể đại và thể đột biến Del 52bp được ghi nhận trên hình 6.



Hình 6: Phổ sắc ký (Sanger sequencing) của mẫu bệnh phẩm thể đột biến Del 52bp (hình trên) và thể đại (hình dưới)

3.5. Đối chiếu kết quả phát hiện đột biến gene Jak2 với chẩn đoán lâm sàng trên 50 bệnh nhân nghi ngờ mắc hội chứng tăng sản tủy

Bảng 1. Kết quả ứng dụng DSA-PCR-ARMS xác định đột biến Jak2 V617F và CARL trên bệnh nhân nghi ngờ mắc hội chứng tăng sinh tủy

Hội chứng tăng sinh tủy	Đa hồng cầu (n=20)	Tăng tiểu cầu nguyên phát (n=17)	Hội chứng xơ tủy (n=13)
Jak2 V617F(n, %)	12(60)	14(82,3)	6(46)
Đột biến CARL (n, %)	0 (0)	2 (11,76)	1 (7,7)

Mặc dù số mẫu chưa nhiều, nhưng kết quả cho thấy đột biến gen Jak2 (V617F) xảy ra ở 32/50 (64%) các thể diễn hình của hội chứng tăng sản tủy (Đa hồng cầu, tăng tiểu cầu nguyên phát và hội chứng xơ tủy). Trong khi đó có 2/17 bệnh nhân tăng tiểu cầu nguyên phát và 1/13 bệnh nhân xơ tủy có mang gene CARL đột biến.

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay việc điều trị bệnh lý máu đã được chuyên biệt và cá thể hóa dựa trên nhiều khía cạnh trong đó đặc biệt là yếu tố di truyền. Vì vậy, mặc dù được chẩn đoán là hội chứng tăng sản tủy tuy nhiên các phác đồ điều trị là khác nhau cho từng phân típ [2]. Do đó, việc làm chủ các công nghệ chẩn đoán đột biến gene,

phát hiện các dấu ấn phân tử là nhu cầu cấp thiết hiện nay trong chẩn đoán, điều trị các bệnh lý máu ác tính.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy trên 90% bệnh nhân ĐHC và trên 50% bệnh nhân có TTCNP hoặc XT có đột biến gen Jak2 tại vị trí V617F[1]. Đột biến này cũng xuất hiện với tần suất rất thấp ở nhóm bệnh bạch cầu tủy cấp và hầu như không xuất hiện ở các bệnh lý máu ác tính khác. Vì thế đột biến V617F của Jak2 là đặc trưng cho 3 phân típ điển hình của hội chứng tăng sản tủy (ĐHC, TTCNP và XT)[9]. Đồng thời 3 phân típ này có phác đồ điều trị tương đối giống nhau và hoàn toàn khác với phác đồ áp dụng cho hội chứng tăng bạch cầu ái toan hoặc bạch cầu tủy mạn. Vì vậy việc phát hiện trạng thái đột biến gen Jak2 V617F có giá trị hỗ trợ chẩn đoán phân biệt và định hướng điều trị những thể bệnh này [2]. Tuy nhiên, có khoảng 30-40% bệnh nhân mắc hội chứng tăng sản tủy không mang đột biến JAK2 – một yếu tố chẩn đoán chính của bệnh này và vì thế bác sỹ điều trị sẽ gặp khó khăn trong việc ra quyết định điều trị. Điều may mắn là có một tỷ lệ nhất định bệnh nhân xuất huyết TTCNP hoặc XT tuy không mang đột biến JAK2 nhưng lại mang đột biến CARL và vì vậy đột biến CARL trong những năm gần đây được công nhận như là một tiêu chuẩn chẩn đoán hội chứng tăng sản tủy[4]. Vì vậy, chúng tôi tập trung xây dựng quy trình công nghệ để xét nghiệm 2 đột biến này.

Cũng giống như nhiều đột biến khác, Jak2 V617F hoặc đột biến CARL có thể được phát hiện bằng giải trình tự gene trực tiếp (Sanger sequencing), tuy nhiên phương pháp này có độ nhạy kỹ thuật thấp: cần ít nhất 20% ADN mang đột biến trong bệnh phẩm cần phân tích, vì thế có thể bỏ qua những trường hợp bệnh nhân có số lượng tế bào mang đột biến thấp trong máu ngoại vi. Ngoài ra, giá thành của giải trình tự gen vẫn còn là một vấn đề khó khăn cho nhiều bệnh nhân.

Bằng thiết kế công nghệ phối hợp DSA-PCR-ARMS, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp chẩn đoán đột biến Jak2 với độ nhạy kỹ thuật 0,5%. Điều đó có nghĩa là kỹ thuật này có thể cho phép

phát hiện đột biến V617F khi trong máu ngoại vi xuất hiện 1 tế bào mang đột biến trong số 200 tế bào khỏe mạnh. Phương pháp này nhạy hơn 40 lần so với giải trình tự trực tiếp, đồng thời có giá thành thấp hơn (900 000/bệnh nhân/lần xét nghiệm), thời gian phân tích kết quả ngắn hơn (4h) so với giải trình tự gen. Trong khi đó chỉ bằng 01 phản ứng PCR và điện di ở nồng độ agarose 3%, chúng tôi cũng phân biệt được bệnh nhân mang đột biến CARL thêm đoạn (hoặc mất đoạn - hình 4).

Để áp dụng dấu ấn V617F/CARL trong thực hành lâm sàng, chúng tôi tiến hành xét nghiệm cho 50 bệnh nhân nghi ngờ là hội chứng tăng sinh tủy điều trị tại Bệnh viện TƯQĐ 108. Kết quả cho thấy có 32 trường hợp được xác định có đột biến gen Jak2 V617F (tỷ lệ 64%). Trong số 18 trường hợp âm tính với Jak2 V617F, có 4 bệnh nhân bạch cầu tủy mạn, 1 bệnh nhân ung thư gan, 1 bệnh nhân nhồi máu lách sau chấn thương, 1 trường hợp dị ứng (da đỏ róc vảy toàn thân), 2 trường hợp tăng bạch cầu ái toan, 1 trường hợp tăng bạch cầu ưa acid 1 trường hợp tăng tiểu cầu nguyên phát và 2, trường hợp đa hồng cầu, 6 trường hợp tăng tiểu cầu nguyên phát và 2 trường hợp sơ tủy nhưng chúng tôi không phát hiện được đột biến V617F. Điều này cũng có thể lý giải được bởi lẽ ngoài vị trí V617F, các đột biến gen Jak2 có thể xảy ra ở một số vị trí khác (ví dụ như 1 trong 10 vị trí khác nhau của exon 12)[2]. Tuy nhiên, trong số 10 ca mang hội chứng tăng sinh tủy và không mang Jak2V617F, chúng tôi phát hiện 03 trường hợp mang CARL đột biến: 02 trường hợp TTCNP và 01 trường hợp XT.

Trong nghiên cứu của chúng tôi mặc dù ở quy mô mẫu nhỏ (50 bệnh phẩm) đã có 12/20 trường hợp mang hội chứng ĐHC (60%), 14/17 trường hợp TTCNP (82,%), 6/13 trường hợp XT (46%) mang đột biến Jak2 V617; đây là số liệu tương đương với các công bố của những đồng nghiệp quốc tế thực hiện trên các cộng đồng dân cư khác [10] và cũng cao hơn so với công bố của các đồng nghiệp tại khoa Huyết học truyền máu, Bệnh viện Bạch Mai Hà Nội [11]. Nghiên cứu của Bệnh viện Bạch Mai chỉ tìm ra 56,6% số bệnh nhân đa hồng cầu nguyên phát và 0% số ca xơ

tủy mang đột biến V617F. Đặc biệt nhóm nghiên cứu này không công bố phép thử độ nhạy kỹ thuật vì thế không chắc chắn các trường hợp âm tính trong nghiên cứu của bệnh viện Bạch Mai là do Bệnh nhân thật sự không mang đột biến V617F hay phương pháp sử dụng không đủ độ nhạy để phát hiện sự tồn tại của các tế bào mang đột biến này.

Ở một khía cạnh khác, chúng tôi phát hiện 3/10 bệnh phẩm mang đột biến CARL, tỷ lệ này chưa cao so với số liệu của các đồng nghiệp quốc tế (là 67-80%)[3, 8]. Điều này có thể được lý giải bởi xét nghiệm của chúng tôi chỉ tập trung phát hiện thể mất đoạn 52bp và thêm đoạn 67bp mà chưa thể phát hiện được các kiểu đột biến mất đoạn hoặc thêm đoạn với kích thước ngắn hơn, ngoài ra quy mô mẫu

của chúng tôi (n=10) chưa đủ ý nghĩa thống kê cần thiết. Tuy nhiên, chúng tôi đã phát hiện đột biến CARL trên nhóm TTCNP và XT, điều này hoàn toàn hợp lý với các công bố trước đây [3, 8].

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình xác định đột biến gen Jak2 V617F và đột biến CARL bằng DSA-PCR-ARMS với ngưỡng phát hiện là 0,5% tế bào ác tính trong số tế bào khỏe mạnh.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Bộ khoa học công nghệ, chương trình KC10/16-20 đã tài trợ cho đề tài KC10.13/16-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Levine, R.L., et al., *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(9); pp. 673-83.
2. Barbui, T., et al., *Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet*. J Clin Oncol, 2011. 29(6); pp. 761-70.
3. Nangalia, J., et al., *Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2*. N Engl J Med, 2013. 369(25); pp. 2391-405.
4. Tefferi, A., et al., *An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms*. Leukemia, 2014. 28(7); pp. 1407-13.
5. Baccarani, M., et al., *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2006. 108(6); pp. 1809-20.
6. Cools, J., et al., *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome*. N Engl J Med, 2003. 348(13); pp. 1201-14.
7. C.R.Newton, A.G., L.E.Heptinstall, S.J.Powell, C.Summers, N.Kalshekerl, J.C.Smith and A.F.Markham, *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Research, 1989. Volume 17 Number 7.
8. Klampfl, T., et al., *Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms*. N Engl J Med, 2013. 369(25); pp. 2379-90.
9. Tefferi, A., *Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1*. Leukemia, 2010. 24(6); pp. 1128-38.
10. Jones, A.V., et al., *Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders*. Blood, 2005. 106(6); pp. 2162-8.
11. Nguyễn Thiên Lữ, P.q.V., Võ Quốc Vinh, Nguyễn Tuấn Hùng, Nguyễn Thị Lan Hương *Triển khai kỹ thuật ASO-PCR xác định đột biến gen Jak2 V617F ở bệnh nhân tăng sinh tủy mạn tính tại Khoa Huyết học - Truyền máu Bệnh viện Bạch Mai*. Tạp chí Y học Việt Nam, 2012. tr 329.