

CẬN LÂM SÀNG

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GENE KRAS BẰNG PCR ĐẶC HIỆU ALLELE TÍCH HỢP CÔNG NGHỆ BẮT MỖI 2 ĐOẠN

Ngô Tất Trung¹, Trần Thị Thanh Huyền¹, Lê Hữu Song¹

TÓM TẮT

Chỉ những bệnh nhân không mang đột biến gene Kras mới đáp ứng tốt với kháng thể kháng EGFR. Các dòng tế bào và plasmid mang 7 điểm đột biến khác nhau của Kras đã được sử dụng để xây dựng quy trình realtime PCR đặc hiệu allele có tích hợp giải pháp công nghệ bắt mỗi hai lần (dual – priming oligo – DPO). Bằng phương pháp này chúng tôi có thể xác định được các đột biến khác nhau của gene Kras khi có 1% DNA mang đột biến. Đồng thời số đầu xét nghiệm được giảm từ 7 xuống còn ba 3 phản ứng vì thế tiết kiệm được chi phí xét nghiệm. Như vậy, quy trình xác định đột biến gene Kras có độ nhạy, độ đặc hiệu cao đã được xây dựng thành công.

Từ khóa: EGFR, đột biến, PCR, DPO

ABSTRACT

SETTING UP A COST EFFECTIVE MOLECULAR ASSAY FOR KRAS GENE MUTATIONAL GENETICS TEST

Ngô Tất Trung¹, Trần Thị Thanh Huyền¹, Lê Hữu Song¹

Monoclonal anti – epithelial growth factor receptor (EGFR) antibodies has gained FDA's approval for colorectal cancer management, however, only those harbouring wild type Kras gene are clinically relevant to be immune-therapied by the drug. Colorectal cell lines and plasmids harbouring kras mutant gene are used for developing an allele specific – realtime PCR combined dual – priming oligo (DPO). It has been shown that our assay can detect any of the Kras gene mutations when the mutant DNA molecules account for more than 1% total DNA. Furthermore, PCR reaction number was dropped from 7 down to 3, therefore, reducing the laboratory cost accordingly. Thus, a new assay for detecting Kras gene mutation was successful established.

Key words: EGFR, mutation, PCR, DPO

1. BV TW Quân Đội 108

- Ngày nhận bài (received): 17/7/2013; Ngày phản biện (revised): 25/7/2013;
- Ngày đăng bài (accepted): 26/8/2013
- Người phản biện: PGS.TS Phạm Như Hiệp: BSKH. Đoàn Phước Thi
- Người phản hồi (Corresponding author): Ngô Tất Trung
- Email: ntatrung@yahoo.com ĐT: 0919119416

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (chương trình globalcan) và thống kê của viện ung thư thuộc viện sức khỏe quốc gia Mỹ: ung thư đại trực tràng (UTDTR) là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 2 sau ung thư phổi. Tuy nhiên tần suất của bệnh này thay đổi giữa các vùng địa lý khác nhau: cao nhất là ở bắc Mỹ, châu Âu sau đó đến khu vực châu Á. Ở nước ta, theo Nguyễn Bá Đức (2008), tỷ lệ tử vong do ung thư đại trực tràng đứng hàng thứ 4 trong số các bệnh lý ung thư, nó chiếm tỷ lệ từ 5-15% tùy từng khu vực dân cư [12].

Một trong những đặc điểm nổi bật của UTDTR là có sự biểu hiện cao của thụ thể tăng trưởng biểu mô (epidermal growth factor receptor-EGFR). Nghiên cứu cho thấy có hơn 85% trường hợp mô UTDTR được chẩn đoán bằng hóa mô miễn dịch có kết quả dương tính với EGFR [13]. Đây là một đích rất quan trọng trong điều trị UTDTR. Nghiên cứu cũng cho thấy việc điều hòa quá trình truyền tín hiệu từ thụ thể EGFR tới nhân bào có sự tham ra rất tích cực của một nhóm protein mang hoạt tính GTPase mà nổi bật là Kras [6]. Nghiên cứu dịch tễ học cho thấy có khoảng 40-45% bệnh nhân UTDTR mang đột biến gene kras [4], [14]. Đồng thời các thử nghiệm lâm sàng đã khẳng định cetuximab và panitumumab (những thuốc được chỉ định điều trị UTDTR hiện nay) chỉ thật sự có tác dụng kéo dài thời gian sống (overall survival) và thời gian sống không bệnh (disease free survival) cho các bệnh nhân không mang đột biến gene Kras [2], [7]. Hướng dẫn thực hành lâm sàng mới nhất do hiệp hội y khoa ung thư Châu Âu – ESMO và hiệp hội ung thư Hoa Kỳ cũng khuyến cáo chỉ định cetuximab và panitumumab cho những bệnh nhân không mang đột biến gene Kras [1], [16]. Điều này có nghĩa xét nghiệm chẩn đoán đột biến gene Kras là điều kiện bắt buộc trước khi cân nhắc chỉ định các phác đồ điều trị đích sử dụng biệt dược ức chế EGFR (cetuximab và panitumumab) cho bệnh nhân UTDTR.

Các đột biến trên gene Kras xảy ra tại nhiều vị trí khác nhau, nhưng tập trung chủ yếu ba điểm **G34**,

G35 và **G38** tại 2 codon 12, 13 của exon 2, chúng hình thành 7 thể đột biến chủ yếu sau: **34G>T**, **34G>C**, **34G>A**, **35G>T**, **35G>C**, **35G>A**, **38G>A** [14]. Do đó, xét nghiệm đột biến phải được thiết kế sao cho có khả năng xác định được cả 7 đột biến nói trên.

Hiện nay có nhiều phương pháp phát hiện đột biến khác nhau: được biết đến nhiều nhất là phương pháp đọc trình tự trực tiếp (sanger sequencing) nhưng đây là phương pháp tốn kém và mất thời gian cũng như trang thiết bị đắt tiền, trong khi đó độ nhạy kỹ thuật không cao (cần ít nhất 20-30% số phân tử đột biến có mặt trong mẫu phân tích).

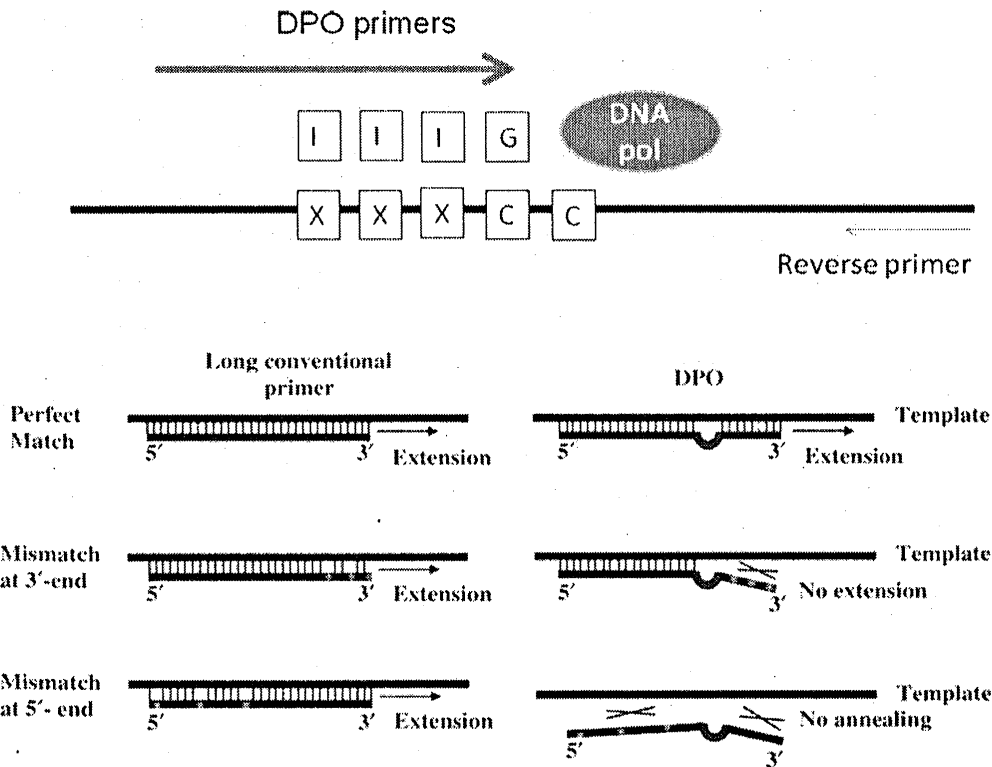
Trên thị trường vật tư phục vụ chẩn đoán có các Kit Taqman scorpion, với đầu dò phân tử đặc hiệu cho từng vị trí đột biến. Với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, được ứng dụng không chỉ trong chẩn đoán đột biến Kras mà còn được dùng trong xác định đột biến của nhiều gene khác như EGFR [3], [8]. Tuy nhiên, các kit này rất đắt (chỉ tính riêng giá thành vật tư tiêu hao mỗi bệnh nhân phải trả 400 USD cho một lần xét nghiệm) vì thế giá thành của cả xét nghiệm sẽ rất cao không dễ được chấp nhận tại các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam.

Phương pháp PCR đặc hiệu allele cũng có độ nhạy cao (có thể phát hiện được đột biến khi mật độ của chúng trong mẫu phân tích chiếm 0,1-1%), thiết kế đơn giản, tuy nhiên bản chất phương pháp này dễ tạo ra các tín hiệu dương tính giả.

Để giải quyết những hạn chế của các phương pháp trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình phát hiện đột biến gene Kras ứng dụng trong thực hành lâm sàng tại các Bệnh viện.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu: dòng tế bào ung thư phổi có mang các đột biến tại codon 12 của gene Kras (dòng H460), dòng ung thư đại trực tràng HCT116, HT29 và bộ plasmid mang các đột biến khác nhau của gene Kras do GS Axel Muendlein (Institute for Vascular Investigation and Treatment, Cộng hòa Áo [9] gửi tặng Khoa Sinh Học Phân Tử BV TW Quân Đội 108.



Hình 1: Cơ sở lý thuyết của phương pháp PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ bắt mỗi 2 đoạn do Jong-Kee Kim và đồng nghiệp đề xuất: mỗi một dual-priming-oligo (DPO) bao gồm 2 đoạn nối với nhau bởi một chuỗi deoxyinosine. Các deoxyinosine có khả năng tạo cầu hydro không đặc hiệu và rất yếu với tất cả các nucleotide trong tự nhiên (A,T,G,C) vì thế chuỗi deoxyinosine sẽ làm bất hoạt sự bắt mỗi không đặc hiệu của primer. Phần 5' của DPO quyết định nhiệt độ bắt mỗi (stabilizer) trong khi đó phần 3' với nucleotide tận cùng bắt cặp chính xác với các vị trí đột biến sẽ quyết định tính đặc hiệu của primer. Phản ứng PCR chỉ diễn ra khi cả 2 phần stabilizer và determiner bắt cặp đặc hiệu với trình tự đột biến (Chun, Kim et al. 2007).

2.2. Hóa chất: Sybr green I master mix và các vật tư cần thiết khác cho chạy realtime PCR

2.3. Phương pháp: realtime PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ bắt mỗi 2 lần (dual-priming-oligo – DPO): Mỗi chẩn đoán mỗi vị trí đột biến gene Kras được thiết kế bao gồm 2 phần: phần 5' là một primer bình thường, nó có các tính chất bắt mỗi như một primer, phần này được nối với phần 3' nhờ một chuỗi deoxyinosine. Số lượng các deoxyinosine thay đổi tùy tính chất mỗi DPO. Phần 5'(stabilizer) quyết định điểm tan chảy của DPO, còn phần 3 (determiner) được thiết kế sao cho đầu tận cùng 3' bắt cặp chính xác với nucleotide đột biến vì thế nó quyết định tính đặc hiệu của DPO. Phản ứng PCR chỉ diễn ra khi cả phần 5' và 3' của DPO bắt cặp chính xác với khuôn mang đột biến. Trong

trường hợp chỉ hoặc khu vực 5' hoặc 3' bắt cặp với khuôn DNA, phản ứng PCR sẽ không thể diễn ra (hình 1).

Trình tự cụ thể của các DPO trong nghiên cứu này sẽ được cung cấp nếu độc giả quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả.

Như đã đề cập các đột biến thường xảy ra tại 3 vị trí 34G, 35G hoặc 38G và hình thành 7 đột biến khác nhau: 34G>T, 34G>C, 34G>A, 35G>T, 35G>C, 35G>A, 38G>A vì thế ngoài phương pháp giải trình tự trực tiếp hoặc phương pháp phân tích điểm tan chảy, đa số các kit thương mại đều thiết kế các primer riêng lẻ cho cả 7 vị trí đột biến nói trên việc làm này làm tăng số phản ứng PCR. Trong thiết kế của chúng tôi vị trí đột biến (34G>T, 34G>C, 34G>A) được xác định bởi 1 phản ứng realtime

PCR tương tự như vậy (35G>T, 35G>C, 35G>A) cũng được xác định bởi 1 phản ứng realtime PCR và đột biến (38G>A) cũng được thực hiện bởi một DPO riêng lẻ. Để khẳng định các DPO do chúng tôi thiết kế có khả năng nhận lên đặc hiệu các thể đột biến khác nhau trên gene Kras chúng tôi tiến hành tạo dựng các chuỗi pha loãng 10%, 1% 0.1% và 0% của 7 đột biến đơn lẻ từ đó thực hiện phản ứng realtime dùng các DPO được thiết kế.

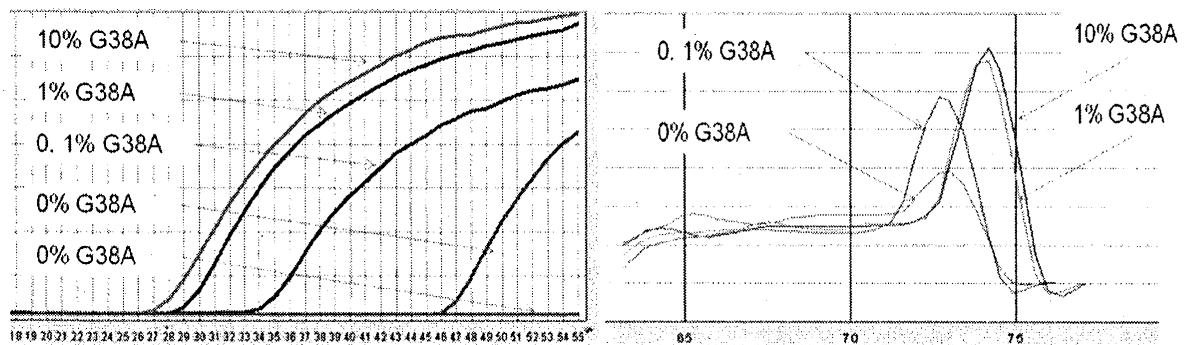
Do vị trí G35 có thể xảy ra 3 đột biến (35G>T, 35G>C, 35G>A), theo các cách thiết kế thông thường ta cần 3 primer đặc hiệu allele tương ứng

với 3 phản ứng PCR độc lập cho các vị trí đột biến này. Tuy nhiên, tính chất lâm sàng của 3 vị trí đột biến này là như nhau vì thế không cần thiết phải phân biệt cụ thể từng đột biến đơn lẻ, do vậy trong thiết kế của chúng tôi, phát hiện 3 vị trí này được thực hiện cùng trong một phản ứng.

Cũng giống như đột biến G35, vị trí G34 có thể xảy ra 3 trạng thái đột biến là (34G>T, 34G>C, 34G>A), các đột biến này không có giá trị lâm sàng khác nhau do đó chúng tôi thiết kế một hỗn hợp DPO đặc hiệu cho cả ba thể đột biến.

III. KẾT QUẢ

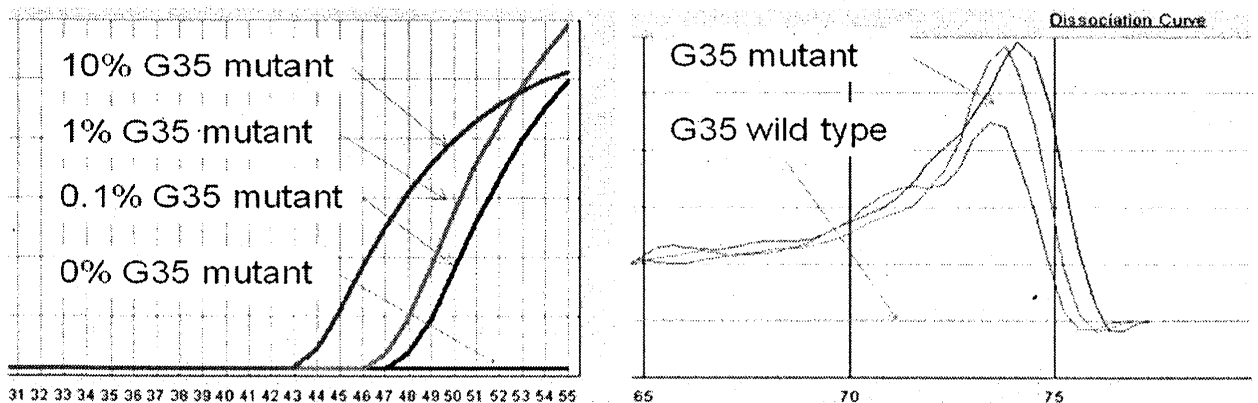
3.1. Độ nhạy kỹ thuật của thiết kế DPO với đột biến G38A



Hình 2: Độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng xác định đột biến Kras G38A

Kết quả hình 2 cho thấy phương pháp do chúng tôi thiết kế có khả năng phát hiện đặc hiệu đột biến G38A ngay cả khi tỷ lệ đột biến này ở mức 1%. Mặc dù ở tỷ lệ thấp hơn (0.1% hoặc 0%) DPO này vẫn cho tín hiệu huỳnh quang, nhưng kết quả phân tích điểm tan chảy cho thấy đó là tín hiệu giả. Do đó, chúng tôi xác định ngưỡng phát hiện đột biến G38A là 1%.

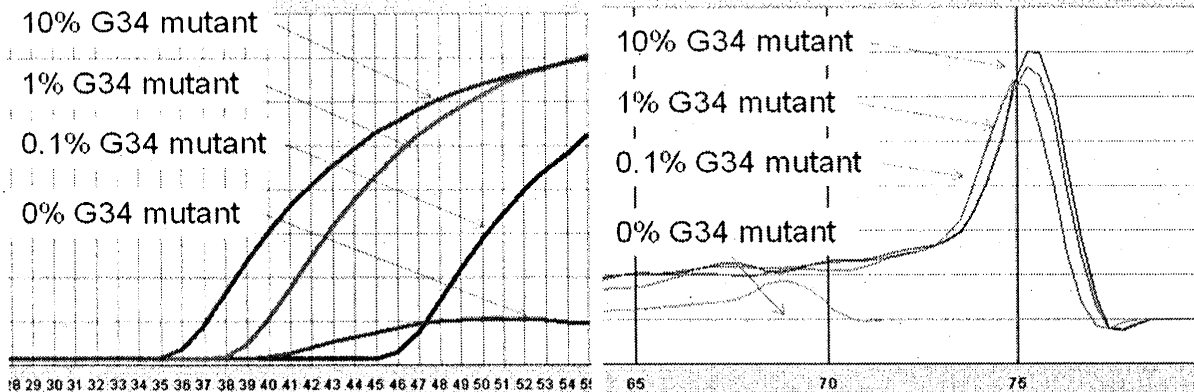
3.2. Độ nhạy kỹ thuật của thiết kế DPO với đột biến G35.



Hình 3: Độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng xác định đột biến Kras G35

Kết quả hình 3 cho thấy tín hiệu huỳnh quang có được khi đột biến G35 có mặt ở mức 0.1% trong mẫu cần phân tích. Hình ảnh phân tích điểm tan chảy cũng cho thấy tín hiệu huỳnh quang hoàn toàn đặc hiệu cho các mức pha loãng khác nhau của đột biến G35.

3.3. Độ nhạy kỹ thuật của thiết kế DPO với đột biến G34



Hình 4: Độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng xác định đột biến Kras G34

Kết quả hình 4 cho thấy hỗn hợp DPO do chúng tôi thiết kế hoàn toàn có thể ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang khi mật độ đột biến tại vị trí G34 trên ngưỡng 0.1%. Mặc dù hình ảnh phổ huỳnh quang có ghi nhận tín hiệu bắt cặp lệch của mỗi DPO và đoạn DNA thể đại (0% G34 – hình 4 panel phải) nhưng nhờ có hình ảnh phân tích điểm tan chảy mà ta biết được đó chính xác là tín hiệu giả. Như vậy, hỗn hợp DPO do chúng tôi thiết kế hoàn toàn đặc hiệu cho các mức pha loãng của đột biến Kras G34.

3.4. So sánh hiệu quả kinh tế của các phương pháp xác định đột biến gene Kras:

Hiện có ở Việt Nam (để tiện việc thảo luận chúng tôi gọi phương pháp mà chúng tôi thiết lập là Kras[®] DPO[®] SHPT108)

Bảng 1. Hiệu quả kinh tế của các phương pháp xác định đột biến gene Kras

Tiêu chí đánh giá	Giải trình tự gene	Kit Taqman scopion	Kras [®] DPO [®] SHPT108
Thời gian xét nghiệm	16h	3h	3h
Vật tư tiêu hao	750 nghìn	400 US dollar	300 nghìn
Độ nhạy kỹ thuật	20%	1%	1%

Phương pháp Kras@DPO@SHPT108 do chúng tôi thiết kế rõ ràng có ưu điểm hơn hẳn các phương pháp khác đang tồn tại ở Việt Nam.

IV. BÀN LUẬN

Y học các thế mà ở đó các phác đồ điều trị đích được áp dụng một cách có lựa chọn đã và đang được cộng đồng chấp nhận trong điều trị ung thư [10]. Tuy nhiên các bệnh nhân khác nhau sẽ có các mức đáp ứng khác nhau với từng phác đồ biệt dược hay phác đồ điều trị đích cụ thể. Điều cần thiết là phải tiên lượng được mức độ đáp ứng của mỗi bệnh nhân tham gia điều trị.

Riêng với ung thư đại trực tràng, ngoài phác đồ kinh điển là điều trị hóa chất 5-fluorouracil, một số bệnh nhân đặc biệt là bệnh nhân di căn giai đoạn muộn, có mức độ biểu hiện cao EGFR còn có thể được chỉ định sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng EGFR như cetuximab và panitumumab. Tuy nhiên các biệt dược này một mặt chỉ thật sự kéo dài thời gian sống cho những bệnh nhân không mang đột biến gene Kras [1], [2], [7], mặt khác nó tiềm ẩn nhiều tác dụng phụ và đặc biệt rất đắt tiền do đó đòi hỏi cần phải làm xét nghiệm chẩn đoán trạng thái đột biến gene Kras trước khi chỉ định các dược phẩm ức chế EGFR cho bệnh nhân [1], [16]. Thông thường ta có thể áp dụng phương pháp giải trình tự trực tiếp (Sanger sequencing) trong tìm kiếm các vị

trí đột biến khác nhau trên gene Kras, tuy nhiên giải pháp này chỉ có thể chỉ ra được các thể đột biến khi nó có nồng độ của nó vượt quá ít nhất 20% trong mẫu DNA cần phân tích [13].

Để tăng độ nhạy của xét nghiệm rất nhiều giải pháp công nghệ đã được triển khai trong đó nổi bật hơn cả là công nghệ Scorpion probe có tích hợp bộ môi được thiết kế theo nguyên lý amplification refractory mutation system do hãng Kit Therascreen Kras mutation test kit do hãng DxS limited Manchester cung cấp. Kit này có một yếu điểm là người sử dụng phải tiến hành đồng thời cả 7 phản ứng chẩn đoán tương ứng với 7 vị trí đột biến thường gặp trên gene Kras. Hơn nữa khi tăng số vòng chạy PCR đến một ngưỡng nhất định nó sẽ tạo ra tín hiệu giả vì thế nhà sản xuất Kit này có đưa ra các ngưỡng giới hạn (Ct cut off), tuy nhiên các ngưỡng giới hạn cho từng vị trí đột biến là khác nhau, nó sẽ gây ra tính bất tiện nhất định trong thực hành lâm sàng.

Để hạn chế hiện tượng dương tính giả, ngoài việc tích hợp công nghệ amplification refractory mutation system, người ta có thể đưa vào phản ứng realtime PCR các blocker có tính năng ức chế sự nhân lên của các phân tử DNA thể hoang dại [11] hoặc sửa đổi bộ môi thành hai khu vực theo nguyên lý bắt mỗi hai lần (dual – priming – oligo) [5]. Việc thiết kế primer theo nguyên lý bắt mỗi 2 lần sẽ đảm

bảo mỗi này chỉ được kéo dài (phản ứng PCR diễn ra) khi cả 2 khu vực 5' – stabilizer và 3' determiner bắt cặp chính xác với khuôn DNA đột biến. Với thiết kế này tăng tính đặc hiệu của mỗi lên rất nhiều.

Với trường hợp đột biến gene Kras: các vị trí đột biến khác hoàn toàn không mang sự khác biệt trong tiên lượng điều trị ung thư đại trực tràng vì thế bằng cách nào đó ta chỉ cần chỉ ra có bệnh nhân có mang đột biến gene Kras hay không là đủ. Vì thế chúng tôi thiết kế 3 DPO riêng lẻ đặc hiệu cho 3 nhóm đột biến tại các vị trí **G38, (38G>A), G35(35G>T, 35G>C, 35G>A) G34 (34G>T, 34G>C, 34G>A)**. Thiết kế này một mặt vẫn giữ được độ nhạy kỹ thuật ở mức cao đáng kể (có thể xác định được bất cứ 1 trong 7 đột biến gene Kras khi mật độ của nó vượt quá 1%) mặt khác làm giảm số đầu phản ứng realtime PCR từ 7 xuống 3 phản ứng vì thế lẽ hiển nhiên tiết kiệm được chi phí xét nghiệm cũng như làm cho quá trình phân tích kết quả sau xét nghiệm đỡ phức tạp hơn.

V. KẾT LUẬN

Quy trình chẩn đoán đột biến gene Kras đã được xây dựng thành công. Với quy trình này chúng tôi đã giảm số đầu phản ứng PCR từ 7 xuống còn 3 phản ứng nhưng vẫn đảm bảo xác định được đột biến gene Kras khi quần thể đột biến chiếm quá 1% DNA bệnh phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Có 16 tài liệu tham khảo, nếu có nhu cầu xin đọc giả liên hệ với tác giả