

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT ENZYME PFU-SSO7D TÁI TỔ HỢP VÀ ỨNG DỤNG SÀNG LỌC ĐỘT BIẾN H1047R GEN PIK3CA BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR

Nguyễn Phú Thành¹, Đinh Thị Thảo^{1,2}
Nguyễn Cẩm Thạch^{1*}, Trần Liên Hà³, Ngô Tất Trung¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Sản xuất enzyme Pfu-Sso7d tái tổ hợp cho ứng dụng phát hiện đột biến H1047R gen PIK3CA bằng kỹ thuật realtime PCR.

Vật liệu, phương pháp: Tế bào EQ458 *E. coli* chứa vector biểu hiện enzyme Pfu-Sso7d được tăng sinh, cảm ứng biểu hiện bằng IPTG, sau đó tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực. Enzyme thu được sau tinh sạch được đánh giá bằng điện di SDS-PAGE, đo nồng độ bằng phương pháp Bradford và hoạt tính bằng phản ứng PCR. Enzyme được sử dụng vào phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến điểm H1047R gen PIK3CA trên 50 mẫu huyết tương bệnh nhân ung thư vú.

Kết quả: Enzyme Pfu-Sso7d thu được có độ tinh sạch cao, ít tạp nhiễm với các protein của vi khuẩn. Phản ứng realtime PCR sử dụng enzyme Pfu-Sso7d phát hiện đột biến H1047R gen PIK3CA với ngưỡng phát hiện 0,01%.

Kết luận: Biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme Pfu-Sso7d và sử dụng trong phản ứng realtime PCR sàng lọc đột biến H1047R gen PIK3CA.

Từ khóa: Pfu-Sso7d, realtime PCR, đột biến H1047R, PIK3CA, ung thư vú.

ABSTRACT

Objectives: Establishing a protocol to produce recombinant Pfu-Sso7d polymerase enzyme and investigate its capability in realtime PCR assay to detect H1047R mutation in PIK3CA gene.

Material, methods: EQ458 *E. coli* containing the Pfu-Sso7d enzyme expression vector was grown. The Pfu-Sso7d enzyme was expressed using the IPTG inducer, then purified by affinity chromatography. The properties of the produced enzyme were evaluated by SDS-PAGE electrophoresis, concentration measurement by the Bradford assay and activity evaluation by PCR. The enzyme was applied to detect the H1047R point mutation in the PIK3CA gene using realtime PCR reaction. The test is performed on 50 plasma samples of breast cancer patients.

Results: The inhouse Pfu-Sso7d enzyme has high purity and little contamination with bacterial proteins. Realtime PCR reaction using Pfu-Sso7d enzyme detects H1047R mutation in PIK3CA gene with a detection threshold of 0.01% mutant allele fragment (MAF).

Conclusions: Successfully expressed and purified recombinant Pfu-Sso7d polymerase enzyme and application in realtime PCR reaction to screen H1047R mutation in PIK3CA gene.

Keywords: Pfu-Sso7d, realtime PCR, H1047R mutation, PIK3CA, breast cancer.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Cẩm Thạch, Email: nguyencamthach1973@yahoo.com

Ngày nhận bài: 06/10/2023; mời phản biện khoa học: 10/2023; chấp nhận đăng: 13/12/2023.

¹Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

²Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội.

³Đại học Bách khoa Hà Nội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ung thư là một thách thức lớn với y tế toàn cầu, đặc trưng bởi sự tích tụ các đột biến gen thúc đẩy sự khởi đầu và sự phát triển tế bào không kiểm soát của các khối u ác tính. Những thay đổi di truyền là nguyên nhân gây ra ung thư. Việc xét nghiệm tìm đột biến gen có vai trò quan trọng trong tiên lượng và lựa chọn phác đồ điều trị đích cho người bệnh. Hiện có nhiều phương pháp phát hiện đột biến gen như

Sanger Sequencing, giải trình tự gen thế hệ mới NGS, PCR... Trong đó, PCR được ứng dụng phổ biến trong các phòng xét nghiệm trên thế giới [1]. Với ưu điểm ổn định ở nhiệt độ cao, Taq polymerase là enzyme được sử dụng rộng rãi trong các phản ứng PCR. Tuy nhiên, Taq DNA polymerase có một số nhược điểm là độ đặc hiệu thấp; các nucleotide không khớp có thể được thêm vào trình tự bởi Taq polymerase trong quá trình tổng hợp chuỗi DNA mới; Taq polymerase

không có hoạt tính đọc sửa exonuclease 3'-5' nên không thể sửa được các nucleotide không khớp, làm cho enzym này có độ chính xác thấp [2].

Trong số các enzyme DNA polymerase, *Pfu*-polymerase là enzyme có độ ổn định, độ chính xác cao do có hoạt tính exonuclease 3'-5' (proofreading). Điều này cho phép nó sửa các lỗi trong quá trình tổng hợp DNA mà enzyme *Taq* polymerase bình thường không có và khiến nó trở nên lí tưởng cho các ứng dụng đòi hỏi độ chính xác cao như giải trình tự DNA hoặc sử dụng trong phản ứng PCR phát hiện đột biến gen. Tuy nhiên, *Pfu*-polymerase lại có nhược điểm là tốc độ tổng hợp DNA chậm hơn so với một số DNA polymerase khác và khá nhạy cảm với các điều kiện phản ứng. Để khắc phục những nhược điểm nêu trên, biến thể mới mà nghiên cứu này đề cập có sự kết hợp giữa enzyme này và protein Sso7d. Sự kết hợp đó mang lại nhiều lợi ích, bao gồm cải thiện khả năng ổn định nhiệt, tăng cường khả năng xử lí, tăng khả năng liên kết DNA và hiệu suất tổng thể vượt trội để đáp ứng yêu cầu chính xác trong xét nghiệm xác định đột biến điểm [3].

Gen *PIK3CA* mã hóa tiểu đơn vị xúc tác p110 α của phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) là một chất điều hòa chính của con đường truyền tín hiệu nội bào. Các đột biến gen *PIK3CA* được xác định liên quan đến nhiều loại ung thư, như ung thư vú, đại trực tràng, phổi, não, buồng trứng, dạ dày... Đáng chú ý, đột biến H1047R (đặc trưng bởi sự thay thế histidine thành arginine ở vị trí 1047 trong protein PI3K) có vai trò quan trọng dẫn đến sự kích hoạt cấu thành con đường PI3K/AKT, thúc đẩy sự tăng sinh và sống sót của tế bào phổ biến ở nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư vú. Trên cơ sở dữ liệu về đột biến ClinVar (NCBI), đột biến H1047R gen *PIK3CA* được FDA ghi nhận và phân loại là đột biến gây bệnh (pathogenic) [4]. Các bệnh nhân ung thư vú tiến triển, HR-positive/HER2-negative mang đột biến gen *PIK3CA* có thời gian sống không bệnh dài hơn khi được điều trị kết hợp Fulvestrant với Alpelisib (một thuốc ức chế chọn lọc con đường PI3K). Do vậy, xét nghiệm đột biến gen *PIK3CA* được khuyến cáo thực hiện cho các bệnh nhân ung thư vú để có lựa chọn phác đồ thuốc đích cho họ [5].

Góp phần nâng cao tính chính xác và hiệu suất của xét nghiệm PCR phát hiện đột biến gen, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm sản xuất enzyme *Pfu*-Sso7d tái tổ hợp và ứng dụng sàng lọc đột biến H1047R gen *PIK3CA* bằng kĩ thuật realtime PCR.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng EQ458 *E. coli* chứa vector biểu hiện enzyme *Pfu*-Sso7d polymerase và DNA tách từ dòng tế bào

HCT-116 mang đột biến H1047R gene *PIK3CA*, mẫu DNA của tế bào không mang đột biến gene *PIK3CA* (HT-29) do Trung tâm Tư vấn và sàng lọc ung thư, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 cung cấp. Các hóa chất phục vụ xét nghiệm do hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ) cung cấp; bộ môi trong phản ứng do công ty Phù Sa Genomics sản xuất.

2.2. Sản xuất enzyme *Pfu*-Sso7d tái tổ hợp

EQ458 *E. coli* được tăng sinh trong môi trường LB (1% peptone; 1% NaCl; 0,5% cao nấm men) có bổ sung kháng sinh CAM và KAN (50 ug/mL) qua đêm. Chuyển dịch tăng sinh qua đêm EQ458 *E. coli* vào bình môi trường LB có bổ sung kháng sinh CAM và KAN (50 ug/mL). Chủng được nuôi ở 37°C trong tủ nuôi, lắc 165 rpm đến khi OD600 đạt 0,4-0,6 thì tiến hành cảm ứng IPTG 1 mM. Enzyme được biểu hiện ở nhiệt độ lạnh (15-18°C) qua đêm. Dịch nuôi biểu hiện enzyme được thu hồi vào ống Falcon 50, sau đó li tâm (5.000g, 10 phút, 4°C) thu sinh khối. Một phần sinh khối được sử dụng để tinh chế enzyme, một phần còn lại được bảo quản ở âm 80°C.

Sinh khối thu được hòa vào 2 mL đệm Lysis Buffer (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole) và 10 uL PMSF. Hỗn dịch được siêu âm theo chương trình: 4 ON - 4 OFF, 10 phút, Amp 40%, sau đó ủ 70°C trong 15 phút. Tiếp đó, hỗn hợp được li tâm (10.000g, 30 phút, 4°C), bỏ cặn, thu dịch nổi (lysate). 200 uL Ni-NTA Resin được chuyển vào ống Epp 1.5 mới. Rửa và cân bằng hạt trong đệm Lysis buffer (li tâm 700g, 2 phút). Toàn bộ dịch lysate còn lại được chuyển vào ống Ni-NTA Resin đã cân bằng, đảo trộn nhẹ nhàng bằng tay trong 15 phút, sau đó li tâm 700g, 2 phút. Hạt có gắn enzyme được rửa 1 lần với 200 uL Lysis Buffer và 1 lần với 1.000 uL đệm Wash Buffer (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazole). Enzyme được rửa giải trong 500 uL đệm Elute Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,2% Tween 20, 2 mM DTT). Dịch enzyme thu được bổ sung 500 uL Glycerol, đảo trộn đều bằng tay. Enzyme được bảo quản trong tủ âm 20°C. Nồng độ enzyme thu được xác định bằng phương pháp Bradford. Enzyme thu được được điện di SDS-PAGE.

Hoạt tính enzyme được thử nghiệm bằng phản ứng khuếch đại gen *PIK3CA* exon20 kích thước 524 bp và 188 bp. Thành phần phản ứng bao gồm Buffer PCR1 10X inhouse, MgCl₂ (2 mM), dNTP 0,25 mM, môi xuôi và môi ngược (0,4 uM), 1 uL enzyme pha loãng 100 lần. Với khuếch đại amplicon 524 bp, mỗi *PIK3CA*-E20-F0 và *PIK3CA*-E20-R0 được sử dụng, phản ứng được thực hiện ở 98°C trong 2 phút, 42 chu kì (98°C, 30s; 57°C; 30s; 72°C, 30s), kéo dài cuối ở 72°C trong 10 phút. Với khuếch đại amplicon 188 bp, mỗi *PIK3CA*-

H1047R-F0 và *PIK3CA*-H1047R-R0 được sử dụng, phản ứng thực hiện ở 98°C trong 2 phút, 42 chu kì (98°C, 15s; 60°C, 20s; 72°C, 20s), kéo dài cuối ở 72°C trong 10 phút.

Kết quả được đối chiếu với enzyme *Taq* polymerase. Thành phần phản ứng bao gồm Buffer PCR 10X inhouse, dNTP 0,25 mM, mỗi xuôi và mỗi ngược (0,4 uM), 0,1 uL enzyme *Taq* polymerase. Với khuếch đại amplicon 524 bp, mỗi *PIK3CA*-E20-F0 và *PIK3CA*-E20-R0 được sử dụng, phản ứng thực hiện ở 95°C trong 3 phút, 42 chu kì (95°C, 30s; 57°C, 30s; 72°C, 30s), kéo dài cuối ở 72°C trong 10 phút. Với khuếch đại amplicon 188 bp, mỗi *PIK3CA*-H1047R-F0 và *PIK3CA*-H1047R-R0 được sử dụng, phản ứng thực hiện ở 95°C trong 3 phút, 42 chu kì (95°C, 15s; 60°C, 20s; 72°C, 20s), kéo dài cuối ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được thực hiện điện di agarose để kiểm tra.

2.3. Phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến H1047R gen *PIK3CA*

Trong nghiên cứu này, kĩ thuật phát hiện đột biến H1047R bằng công nghệ realtime Allele-specific PCR được tiếp tục phát triển để tăng khả năng phát hiện những mẫu có tỉ lệ đột biến thấp. Cụ thể, chúng tôi sử dụng kết hợp sự bất cặp đặc hiệu giữa mỗi đặc hiệu đột biến với mẫu đột biến và sự ngăn chặn quá trình khuếch đại của oligonucleotide chặn với mẫu thể đại. Sản phẩm PCR được nhận biết bằng tín hiệu SYBR green. Giá trị Ct được tính toán cho sản phẩm khuếch đại phản ứng PCR, giá trị $\Delta Ct = Ct1 - Ct2$; ΔCt là hiệu số của Ct của phản ứng có sử dụng oligonucleotide chặn (Ct1) và Ct của phản ứng không dùng oligonucleotide chặn (Ct2) với cùng một mẫu DNA. Khi mẫu bệnh phẩm có $\Delta Ct < \Delta Ct$ của mẫu chứng âm (DNA thể hoang dại) thì mẫu đó được coi là có đột biến.

- Khảo sát một số điều kiện tối ưu thí nghiệm: thành phần phản ứng gồm Buffer qPCR2 10X, dNTP 0,2 mM, mỗi xuôi và mỗi ngược (0,4 uM), oligonucleotide chặn, enzyme pha loãng 100 lần, Evagreen 20X, DNA khuôn (10 ng/uL với DNA). Trong phản ứng, khảo sát các thành phần như sau: sử dụng các cặp môi (chạy Ta = 55°C), oligonucleotide chặn và lượng oligonucleotide chặn: 0-0,8-1,2-1,6 uM. Phản ứng thực hiện ở 98°C trong 2 phút, 60 chu kì (98°C, 15s; Ta°C, 20s; 72°C, 20s), kênh màu SYBR trên máy LightCycler 96 (Roche). Nhiệt độ gắn mỗi Ta được khảo sát trong khoảng 51-55°C.

- Xác định độ nhạy kĩ thuật: để xác định độ nhạy kĩ thuật của xét nghiệm này, DNA đột biến được phân lập từ các tế bào chuẩn dương tính HTC-116 mang đột biến ở exon 20 của gen *PIK3CA*, pha loãng trong DNA của tế bào không mang đột biến

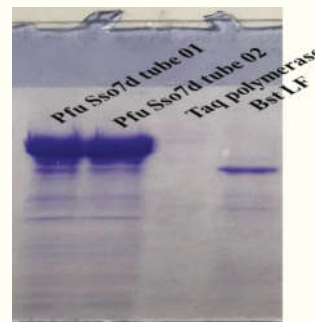
này tuân theo chuỗi tỉ lệ pha loãng của đột biến: 10%-1%-0,1%-0,01%-0,001%.

2.4. Quy trình tách cfDNA từ huyết tương

Mẫu máu toàn phần lưu trong ống K2-EDTA. cfDNA tách từ huyết tương theo phương pháp PCI, sử dụng phenol, chloroform và isoamyl alcohol, theo tỉ lệ tương ứng là 25:24:1. DNA được rửa bằng Ethanol 70% để loại bỏ tạp chất còn sót lại. DNA sau đó được làm khô và phân tán lại trong dung dịch đệm TE (20uL). DNA được bảo quản nhiệt độ âm 35°C.

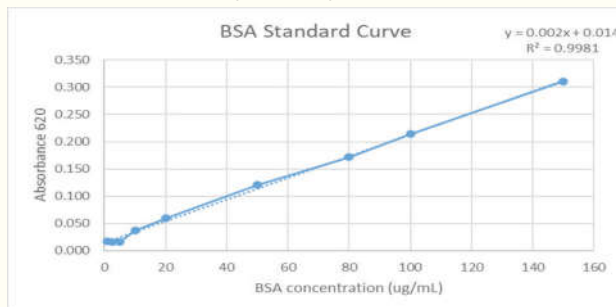
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Biểu hiện và tinh sạch enzyme *Pfu-Sso7d* tái tổ hợp



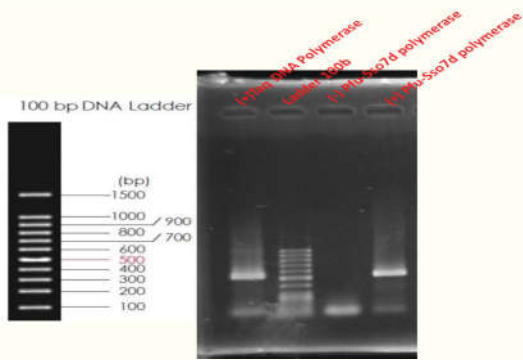
Hình 1. Điện di SDS-PAGE enzyme *Pfu-Sso7d* polymerase.

Kết quả điện di SDS-PAGE enzyme *Pfu-Sso7d* polymerase thu được được (hình 1) cho thấy một băng sáng rõ và rất ít băng tạp, chứng tỏ enzyme thu được lượng lớn và khá sạch. Các enzyme điện di cùng bao gồm *Taq* polymerase (inhouse) kích thước 94 kDa, *Bst* LF (inhouse) kích thước 67 kDa. Theo lí thuyết, kích thước enzyme *Pfu-Sso7d* polymerase khoảng 97 kDa. Như vậy, kết quả cho thấy băng của giếng điện di enzyme này là hợp lí, ngang với enzyme *Taq* polymerase (94 kDa) và ở trên so với *Bst* LF (67 kDa).

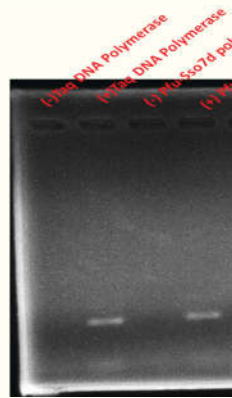


Hình 2. Đồ thị nồng độ BSA theo OD620.

Đo nồng độ enzyme thu được bằng phương pháp Bradford. Nồng độ chuẩn BSA được đo và thể hiện trên hình 2. Từ kết quả đo nồng độ trên, chúng tôi tính được công thức xác định nồng độ protein: $y = 0,002x + 0,014$ (với $R^2 = 0,9981$).



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR 514 bp kiểm tra hoạt tính enzyme.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR 218 bp kiểm tra hoạt tính enzyme.

Bảng giá trị đo OD620 và nồng độ của mẫu enzyme *Pfu-Sso7d* polymerase

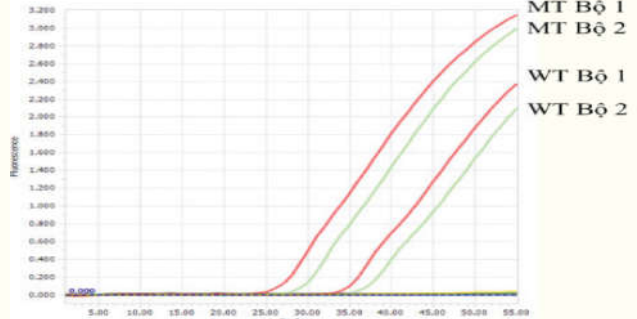
OD620	Blank (đệm hòa enzyme)	<i>Pfu-Sso7d</i> polymerase
Lần 1	0,335	0,685
Lần 2	0,337	0,668
Lần 3	0,336	0,678
Trung bình	0,336	0,677
Nồng độ (ng/uL)	0	654

Enzyme được kiểm tra hoạt động bằng phản ứng PCR gen *PIK3CA*. Kết quả khuếch đại mảnh amplicon 514 bp và 218 bp được thể hiện lần lượt trên hình 3 và hình 4. Hai hình trên cho thấy sự tương đồng kích thước sản phẩm khuếch đại giữa hai enzyme *Pfu-Sso7D* polymerase và *Taq* polymerase, cho thấy enzyme có hoạt tính và có thể tham gia vào phản ứng khuếch đại DNA.

3.2. Khảo sát một số điều kiện thích hợp cho phản ứng realtime PCR xác định đột biến H1047R gen *PIK3CA*

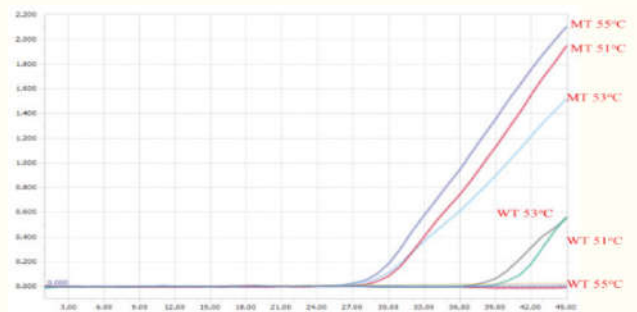
- Khảo sát bộ môi phản ứng: các bộ môi khảo sát có chung môi ngược (môi R), các môi xuôi khác nhau được sử dụng. Kết quả khảo sát các bộ môi thể hiện tại hình 5. Trong 4 bộ môi được khảo sát,

2 bộ môi theo nguyên tắc AS và 2 bộ môi theo nguyên tắc ARMS. Bộ môi 1 cho kết quả tốt nhất (CT của mẫu WT là 35,97, của mẫu MT 100% là 27,81). Các môi khác thiết kế theo kỹ thuật ARMS không có khả năng khuếch đại (không lên tín hiệu). Nghiên cứu lựa chọn bộ môi 1: *PIK3CA*-1047R-F1 và *PI3CA*-1047R-R cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 5. Khảo sát các bộ môi cho phản ứng RT-PCR phát hiện đột biến H1047R.

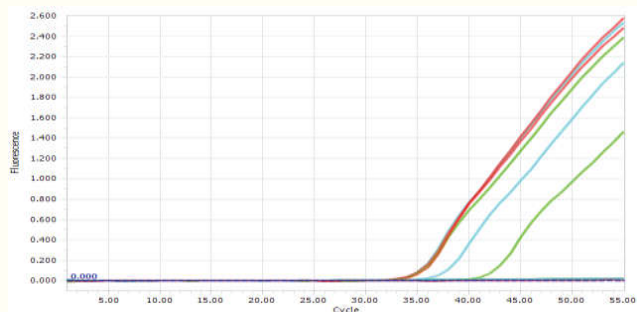
- Khảo sát nhiệt độ gắn môi:



Hình 6. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi cho phản ứng RT-PCR phát hiện đột biến H1047R.

Nhiệt độ gắn môi trong chu trình nhiệt phản ứng realtime PCR được khảo sát ở các giá trị 51-53-55. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi được thể hiện trong hình 6, trong đó, nhiệt độ gắn môi được lựa chọn là 55°C, mẫu WT bị ngăn cản khuếch đại hoàn toàn. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ gắn môi là 55°C cho các thử nghiệm tiếp theo.

- Lựa chọn oligonucleotide chặn:

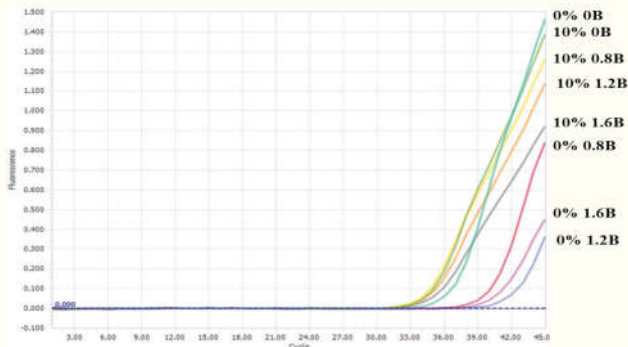


Hình 7. Kết quả lựa chọn oligonucleotide chặn cho phản ứng RT-PCR phát hiện đột biến H1047R (đỏ: *PIK3CA*-1047R-BL3; xanh lá: *PIK3CA*-1047R-BL1; xanh da trời: *PIK3CA*-1047R-BL2).

Ba oligonucleotide chặn được lựa chọn thông qua phản ứng realtime PCR dùng mồi *PIK3CA-1047R-F1* và *PI3CA-1047R-R* với các điều kiện lựa chọn ở trên. Kết quả thể hiện (hình 7) cho thấy oligonucleotide chặn *PIK3CA-1047R-BL1* cho kết quả giảm tín hiệu mẫu WT tốt nhất ($\Delta Ct = 6,97$). Oligonucleotide *PIK3CA-1047R-BL1* được nghiên cứu chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

- Khảo sát nồng độ oligonucleotide chặn:

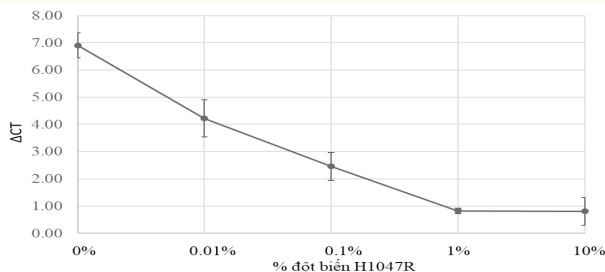
Nồng độ oligonucleotide được khảo sát tại các giá trị 0-0,8-1,2-1,6 μM . Kết quả khảo sát (hình 8) thể hiện khả năng hạn chế tín hiệu tốt nhất khi sử dụng 1,2 μM oligonucleotide chặn ($\Delta Ct = 6,04$).



Hình 8. Khảo sát lượng oligonucleotide chặn sử dụng cho phản ứng RT-PCR phát hiện đột biến H1047R (nồng độ đột biến 0% và 10%; lượng oligonucleotide chặn sử dụng 0-0,8-1,2-1,6 μM tương ứng với kí hiệu 0B-0.8B-1.2B-1.6B).

3.3. Xác định độ nhạy phản ứng RT-PCR phát hiện đột biến H1047R

Pha loãng DNA thành các dải nồng độ 0,01%-0,1%-1%-10%. Sau đó, dải DNA trên tham gia đánh giá độ nhạy kĩ thuật của phản ứng realtime PCR xác định đột biến H1047R gen *PIK3CA*. Kết quả (hình 9) cho thấy phương pháp realtime PCR đặc hiệu đột biến kết hợp với oligonucleotide chặn này có thể phát hiện được các đột biến ở độ nhạy kĩ thuật 0,01 với cut-off $\Delta Ct = 4,22 \pm 0,68$.



Hình 9. Kết quả độ nhạy kĩ thuật phản ứng RT-PCR xác định đột biến H1047R gen *PIK3CA*.

3.4. Thử nghiệm trên mẫu máu bệnh nhân ung thư vú

Nghiên cứu này khảo sát đột biến H1047R gen *PIK3CA* trên 50 mẫu plasma của bệnh nhân ung

thư vú. Kết quả thu được có 11/50 mẫu (22%) dương tính với đột biến H1047R.

4. BÀN LUẬN

Sự kết hợp giữa *Pfu*-polymerase và protein *Sso7d* mang lại nhiều lợi ích, bao gồm cải thiện khả năng ổn định nhiệt, tăng cường khả năng xử lí, tăng khả năng liên kết DNA và hiệu suất tổng thể. Cụ thể, *Sso7d* có nguồn gốc từ vi khuẩn cổ ưa nhiệt *Sulfolobus solfataricus* và được biết đến với ái lực liên kết mạnh mẽ với DNA sợi đôi. Khi hợp nhất với *Pfu* DNA polymerase, sự liên kết này có thể giúp ổn định phức hợp DNA khuôn - enzyme polymerase. Từ đó, có thể tăng cường khả năng tổng hợp, tính ổn định và hiệu suất của enzyme polymerase, đặc biệt trong các điều kiện PCR khó khăn (như nhiệt độ cao).

Nghiên cứu này thành công trong việc biểu hiện và tinh sạch enzyme *Pfu-Sso7d* polymerase với nồng độ cao, có độ tinh khiết và hoạt tính polymerase khuếch đại amplicon kích thước bé (218 bp) hoặc trung bình (514 bp). Tuy nhiên, nghiên cứu chưa có điều kiện khảo sát những đặc điểm ưu việt của enzyme tái tổ hợp này như độ chính xác (high fidelity), độ ổn định, sự khuếch đại những amplicon có kích thước lớn (> 1000 bp).

Phát hiện đột biến điểm trên các phân tử DNA là kĩ thuật cơ bản trong sinh học phân tử và chẩn đoán lâm sàng, có ý nghĩa sâu rộng trong các lĩnh vực nghiên cứu ung thư, chẩn đoán bệnh di truyền, y học cá nhân hóa... Nhiều nghiên cứu trước đây đã sử dụng kĩ thuật PCR để phân tích đột biến H1047R trong gen *PIK3CA* và các phương pháp hiện tại phát hiện đột biến này vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu, phát triển. Các phương pháp độ nhạy cao sử dụng digital PCR được phát triển đến độ nhạy thấp nhất đạt 0,085% [6]. Một phương pháp sinh học phân tử khác dựa trên hệ thống enzyme mới CRISPR/Cas12a đang được phát triển và chỉ có 1 nghiên cứu liên quan đến phát hiện đột biến này, song độ nhạy của phương pháp thấp (đạt 0.036%) [7]. Một phương pháp phát hiện khác sử dụng kĩ thuật PCR và locked nucleic acid kết hợp giải trình tự Sanger chỉ đạt độ nhạy đến 1,3% [8]. Một nghiên cứu gần đây sử dụng phương pháp allele-specific PCR (AS-PCR) kết hợp phân tích đường cong nóng chảy đã đạt đến độ nhạy 0,05% [9]. Với phương pháp realtime AS-PCR, hầu hết các công bố đều dựa trên công nghệ mẫu dò Taqman. Ưu điểm chủ yếu của công nghệ này so với SYBR Green real-time PCR là có tính đặc hiệu cao hơn. Tuy nhiên, việc thiết kế đầu dò là khó khăn khi kết hợp mồi đặc hiệu đột biến với đoạn trình tự DNA ngắn để xác định đột biến điểm. Như

vậy, chúng tôi đã phát triển phương pháp Realtime PCR đạt độ nhạy rất sâu, hơn hẳn các báo cáo trước đây.

Sử dụng phương pháp AS-PCR inhouse, chúng tôi khảo sát đột biến H1047R trong 50 mẫu cfDNA từ huyết tương của bệnh nhân ung thư vú. Kết quả có 22% mẫu dương tính với đột biến H1047R gen *PIK3CA*. Theo số liệu công bố từ một nghiên cứu trước đây, đột biến gen *PIK3CA* chiếm khoảng 32-38% các khối ung thư vú [4]. Tuy nhiên, tỉ lệ đột biến *PIK3CA* trong ung thư vú có thể khác nhau tùy thuộc vào một số yếu tố, bao gồm loại ung thư vú, số bệnh nhân khảo sát và khu vực địa lí. Tỉ lệ 22% trong nghiên cứu này thấp hơn tỉ lệ dương tính H1047R (là 56,5%) trong hơn 1000 phụ nữ ở phía Bắc Trung Quốc [10]. Trong khi đó ở Tunisia, tỉ lệ này chỉ đạt 7,4% (4/54 ca) [11]. Đột biến *PIK3CA* thường gặp ở nhóm ung thư vú HR+/HER2- và chiếm tỉ lệ thấp hơn ở nhóm ung thư vú bộ 3 âm tính [12]. Do đó, nghiên cứu cần phân tích thêm, kết hợp các đặc điểm lâm sàng và tăng cỡ mẫu để có tỉ lệ đại diện cho phụ nữ Việt Nam chính xác hơn.

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp realtime PCR có thể phát hiện đột biến soma trên mẫu huyết tương của bệnh nhân ung thư, cung cấp một xét nghiệm ít xâm lấn, hầu như không ảnh hưởng tới người bệnh, đồng thời hỗ trợ định hướng điều trị, nhất là điều trị hướng đích.

5. KẾT LUẬN

Biểu hiện thành công enzyme *Pfu-Sso7d* có độ tinh sạch cao, ít tạp nhiễm với các protein của vi khuẩn. Phản ứng realtime PCR sử dụng enzyme *Pfu-Sso7d* phát hiện đột biến H1047R gen *PIK3CA* với ngưỡng phát hiện 0,01%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Elazezy M, Joosse, S.A (2018), "Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management", *Comput Struct Biotechnol J.*, 2018. 16: p.370-378.
- Ricardo P.C, Franoso E, Arias M.C (2019), "Fidelity of DNA polymerases in the detection of intraindividual variation of mitochondrial DNA", *Mitochondrial DNA B Resour.*, 2019 Dec 12; 5(1): 108-112. doi: 10.1080/23802359.2019.1697188.
- Yan Wang, Dennis E Prosen, Li Mei, John C Sullivan, Michael Finney, Peter B Vander Horn (2004), "A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*", *Nucleic Acids Research*, Vol 32, Issue 3, 1 February 2004, p. 1197-207, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>.
- Samuels Y, Waldman T (2010), "Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers", *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 347:21-41. doi:10.1007/82_2010_68.
- Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H.S, Iwata H, Conte P, Mayer I.A, Kaufman B, Yamashita T, Lu Y.S, Inoue K, Takahashi M, Papai Z, Longin A.S, Mills D (2019), "Solar-Study Group, Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer", *N Engl J Med*, 2019, 380 (20): p.1929-1940.
- Yu Q, Jiang H, Su X, et al. (2023), "Development of Multiplex Drop-Off Digital PCR Assays for Hotspot Mutation Detection of KRAS, NRAS, BRAF, and *PIK3CA* in the Plasma of Colorectal Cancer Patients", *J Mol Diagnostics.* 2023; 25(6): 388-402. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.002.
- Cao G, Chen X, Deng Y, et al. (2021), "Single-nucleotide variant of *PIK3CA* H1047R gene assay by CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification", *Anal Chim Acta.* 2021; 1182: 338943. doi:10.1016/j.aca.2021.338943.
- Ang D, O'Gara R, Schilling A, et al. (2013), "Novel method for *PIK3CA* mutation analysis: Locked nucleic acid-PCR sequencing". *J Mol Diagnostics.* 2013; 15(3): 312-318. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.12.005.
- Markou A, Farkona S, Schiza C, Efstathiou T, Kounelis S, Malamos N, Georgoulis V (2014), "PIK3CA mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer", *Clin Cancer Res*, 2014. 20(22): p. 5823-34.
- Lv W, Du C, Zhang Y, et al. (2022), "Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of *PIK3CA* mutation in breast cancer patients in Northwest China". *Pathol - Res Pract.* 2022; 238(12): 154063. doi:10.1016/j.prp.2022.15406.
- Ben Rekaya M, Sassi F et al. (2023), "PIK3CA mutations in breast cancer: A Tunisian series". Murugan AK, ed. *PLoS One.* 2023;1 8(5): e0285413. doi:10.1371/journal.pone.0285413.
- Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, Le Tourneau C, Sablin MP, Lacroix L, Enrico D, Miran I, Jovelet C, Bièche I, Soria JC, Bertucci F et al. (2020), "Outcome and molecular landscape of patients with *PIK3CA*-mutated metastatic breast cancer". *Ann Oncol.* 2020 Mar; 31(3):377-386. doi: 10.1016/j.annonc.2019.11.006. □