

Xây dựng quy trình kỹ thuật xác định đột biến Val617Phe (V617F) của gene *JAK2* tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

Nguyễn Thị Mai Ngân¹, Đoàn Thị Duyên Anh¹, Lê Phan Tường Quỳnh¹, Ngô Thị Diệu Hương¹,
Nguyễn Quỳnh Châu¹, Võ Tự Hiếu¹, Đặng Trần Hữu Hiếu², Tôn Thất Minh Trí², Hà Thị Minh Thi^{1*}

(1) Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Bệnh viện Trung ương Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đột biến *JAK2* V617F là một trong những tiêu chí chính được sử dụng để chẩn đoán bệnh lý tăng sinh tủy ác tính (Myeloproliferative neoplasms - MPNs). Nghiên cứu này nhằm mục tiêu sau: (1) Thiết lập và so sánh các quy trình chẩn đoán đột biến V617F gene *JAK2* bằng các kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP; (2) Bước đầu xác định tỷ lệ đột biến V617F của gene *JAK2* trong nhóm bệnh nhân tăng sinh tủy ác tính. **Đối tượng và phương pháp:** Tách chiết DNA từ máu ngoại vi của 31 bệnh nhân được bác sĩ lâm sàng theo dõi chẩn đoán MPNs và 10 người khỏe mạnh. Xác định đột biến V617F gene *JAK2* bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP. Giải trình tự Sanger ngẫu nhiên 15% mẫu để đối chiếu. **Kết quả:** Nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR đặc hiệu allele là 55°C. Phản ứng cắt trong kỹ thuật PCR-RFLP sử dụng 300 ng sản phẩm PCR. Tất cả các mẫu được kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger đều cho kết quả tương đồng. Có sự phù hợp hoàn toàn trong kết quả phát hiện đột biến giữa PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP. **Kết luận:** Thiết lập được quy trình xác định đột biến *JAK2* V617F bằng hai phương pháp PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP, trong đó kỹ thuật PCR đặc hiệu allele có nhiều ưu điểm hơn. Tỷ lệ đột biến V617F của gene *JAK2* trong nhóm bệnh nhân là 61,3%.

Từ khóa: MPNs, V617F, *JAK2*, PCR đặc hiệu allele, PCR-RFLP.

Determining the *JAK2* V617F mutation at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

Nguyen Thi Mai Ngan¹, Doan Thi Duyen Anh¹, Le Phan Tuong Quynh¹, Ngo Thi Dieu Huong¹,
Nguyen Quynh Chau¹, Vo Tu Hieu¹, Dang Tran Huu Hieu², Ton That Minh Tri², Ha Thi Minh Thi^{1*}

(1) University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Hue Central Hospital

Abstract

Background: *JAK2* V617F mutation is one of the major criteria in diagnosing MPNs. This study aimed to: (1) Establish a procedure and compare Allele specific-PCR and PCR-RFLP techniques in identifying *JAK2* V617F mutation; (2) Primarily evaluate the prevalence of V617F mutation of *JAK2* gene in patients with MPNs. **Materials and methods:** DNA extraction was isolated from peripheral blood of 31 patients with MPNs followed by clinicians and 10 healthy individuals. Determining V617F mutation of *JAK2* gene by AS-PCR and PCR-RFLP techniques. Sanger sequencing randomly 15% of samples for comparison. **Results:** The optimal annealing temperature for AS-PCR is 55°C. Conditions of restriction digest in PCR-RFLP uses 300 ng of PCR product. All samples identified by AS-PCR and PCR-RFLP showed similar results. **Conclusion:** Established a procedure to identify the V617F mutation in *JAK2* gene by allele-specific PCR and PCR-RFLP, in which the AS-PCR technique showed more advantages. The frequency of V617F mutation of *JAK2* gene in patients was 61.3%.

Keywords: MPNs, V617F, *JAK2*, allele-specific PCR, PCR-RFLP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Protein *JAK2* là một enzyme tyrosine kinase bào tương, đóng vai trò quan trọng trong dẫn truyền tín hiệu từ các receptor của yếu tố tăng trưởng tế bào

tạo máu [1]. Từ năm 2008, Tổ chức Y tế thế giới đã xem đột biến gene *JAK2* là một trong những tiêu chuẩn chẩn đoán chính của nhóm bệnh lý tăng sinh tủy ác tính (Myeloproliferative neoplasm - MPNs).

Phiên bản mới nhất (năm 2016) của Tổ chức Y tế thế giới xếp nhóm bệnh lý này gồm có bảy bệnh, trong đó ba bệnh liên quan đột biến các gene *JAK2/CALR/MPL*, gồm đa hồng cầu, tăng tiểu cầu nguyên phát, xơ tuỷ vô căn. Đột biến Val617Phe (V617F) được phát hiện trong phần lớn (97%) bệnh nhân đa hồng cầu. Trong các bệnh tăng tiểu cầu nguyên phát và xơ tuỷ vô căn, tỷ lệ đột biến gene này là 50% [2, 3].

Về phương diện chẩn đoán, đột biến V617F có thể được xác định bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR đặc hiệu allele, PCR-RFLP, hoặc giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, theo tác giả Frantz và Didone, mặc dù giải trình tự Sanger được xem là tiêu chuẩn vàng trong xác định đột biến điểm, nhưng đối với đột biến V617F thì phương pháp này có độ nhạy phân tích tuỳ thuộc tỷ lệ đột biến trong mẫu [1, 4]. Bên cạnh đó, kỹ thuật giải trình tự Sanger cũng không phù hợp cho xét nghiệm chẩn đoán thường quy, vì đòi hỏi trang thiết bị hiện đại hơn, hoá chất đắt tiền, cần tập trung nhiều mẫu để đạt hiệu quả kinh tế, nên khó áp dụng cho hầu hết các cơ sở y tế. Vì vậy, các kỹ thuật PCR đặc hiệu allele hoặc PCR-RFLP được sử dụng trong hầu hết các phòng xét nghiệm sinh học phân tử cơ bản để xác định đột biến V617F gene *JAK2*.

Hiện nay, ở nước ta hầu như rất ít cơ sở y tế có thể triển khai được kỹ thuật chẩn đoán đột biến V617F trên gene *JAK2*. Đặc biệt, ở miền Trung chưa có cơ sở nào thực hiện thường quy. Vì vậy, để có cơ sở xây dựng quy trình kỹ thuật xác định đột biến V617F gene *JAK2* chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm hai mục tiêu sau:

(1) Thiết lập và so sánh các quy trình chẩn đoán đột biến V617F gene *JAK2* bằng các kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP.

(2) Bước đầu xác định tỷ lệ đột biến V617F của gene *JAK2* trong nhóm bệnh nhân tăng sinh tuỷ ác tính.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

31 mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được bác sĩ lâm sàng theo dõi chẩn đoán tăng sinh tuỷ ác tính (gồm đa hồng cầu, tăng tiểu cầu nguyên phát, xơ tuỷ vô căn) và 10 mẫu máu của người khỏe mạnh tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế và Bệnh viện

Trung ương Huế, từ tháng 4 năm 2022 đến tháng 8 năm 2023.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Các thí nghiệm sinh học phân tử được thực hiện tại Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

2.2.2. Tách chiết DNA

- DNA được tách chiết từ mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi (chống đông EDTA) bằng bộ hoá chất Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Quy trình tách chiết được thực hiện theo protocol hướng dẫn của hãng sản xuất.

- Mẫu DNA sau khi tách chiết được đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch bằng máy NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), lưu trữ ở -20°C.

2.2.3. Thực hiện kỹ thuật PCR đặc hiệu allele xác định đột biến *JAK2 V617F*.

* Bộ mồi xác định đột biến được mô tả bởi Batex [5]:

AS-R (mồi chung):

5'-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCCTCAGTTTCA-3'

AS-F (đặc hiệu allele đột biến):

5'-AGCATTGTTGTTTAAATTATGGAGTATATT-3'

IC-F (mồi chứng nội):

5'-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3'

- Thành phần phản ứng PCR: 12,5 µl GoTaq Green Master Mix (2X), 20 pmol mồi AS-R, 10 pmol mồi mỗi xuôi (AS-F, IC-F), 100 ng DNA khuôn mẫu và nước cất vô trùng đã khử nuclease cho đủ 25 µl.

- Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), với điều kiện nhiệt độ: biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó thực hiện 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi (thí nghiệm ở ba mức 55°C, 58°C và 61°C) trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và tiếp tục kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

- Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 2%, có bổ sung thuốc nhuộm DNA SafeView™ Classic (abm, Canada). Dựa vào số lượng và kích thước sản phẩm PCR để xác định đột biến V617F gene *JAK2* (Bảng 1).

Bảng 1. Nhận định kết quả xác định đột biến V617F gene *JAK2* bằng PCR đặc hiệu allele

Kết quả	Số bệnh	Kích thước
Có đột biến <i>JAK2 V617F</i>	2	364 bp (chứng nội), 203 bp (đột biến)
Không có đột biến <i>JAK2 V617F</i>	1	364 bp (chứng nội)

So sánh kết quả PCR giữa các thí nghiệm với nhiệt độ gắn mồi khác nhau: 55°C, 58°C và 61°C. Chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu.

2.2.4. Thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP xác định đột biến JAK2 V617F.

Kỹ thuật này được thực hiện gồm hai bước:

Bước 1: Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn gene JAK2 chứa vị trí đột biến V617F (bước PCR)

- Cặp mồi đặc hiệu gene JAK2 chứa vị trí đột biến V617F có trình tự như sau (Frantz) [4]:

JAK2-RFLP-F (mồi xuôi):

5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3'.

JAK2-RFLP-R (mồi ngược):

5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT-3'.

- Thành phần phản ứng: 12,5 µl GoTaq Green Master Mix (2X), 10 pmol mỗi mồi (mồi xuôi và mồi ngược), 100 ng DNA khuôn mẫu và nước cất vô trùng đã khử nuclease cho đủ 25 µl.

- Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), với điều kiện nhiệt độ: biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó thực hiện 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 57°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và tiếp tục kéo dài ở 72°C trong 10 phút nữa.

- Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%, có bổ sung thuốc nhuộm DNA SafeView™ Classic (abm, Canada). Kích thước sản phẩm dự kiến là 453 bp.

- Đo nồng độ sản phẩm PCR bằng máy đo huỳnh quang Quantus™ Fluorometer (Promega).

Bước 2: Thực hiện cắt sản phẩm PCR bằng enzyme cắt hạn chế (bước RFLP)

- Enzyme BsaXI được sử dụng cho phản ứng cắt để xác định đột biến JAK2 V617F.

Trình tự nhận biết: 5'...[↓]9(N)AC(N)5CTCC(N)10[↓]...3'
3'...[↑]12(N)TG(N)5GAGG(N)7[↑]...3'

- Thành phần phản ứng cắt: sản phẩm PCR (thí nghiệm với các lượng sản phẩm 100 ng, 300 ng và 500 ng), 1 µl enzyme cắt hạn chế (10 U/µl), 2 µl đệm

(10X), nước cất vô trùng đã khử nuclease đủ 20 µl tổng phản ứng.

- Ủ nhiệt độ 37°C trong bể ổn định nhiệt, thời gian 2 giờ.

- Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 2%, hiệu điện thế 80 V, thời gian 1 giờ 30 phút.

- Kiểu gene tương ứng vị trí đột biến được xác định theo bảng 2:

Bảng 2. Nhận định kết quả xác định đột biến V617F gene JAK2 bằng PCR-RFLP

Kiểu gene	Số băng	Kích thước (bp)
GG	2	201, 252
GT	3	201, 252, 453
TT	1	453

2.2.5. Đối chiếu kết quả xác định đột biến với giải trình tự Sanger

- Sản phẩm PCR tương ứng với các kiểu gene khác nhau (được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP) được chọn ngẫu nhiên để giải trình tự tại Công ty 1st BASE (Malaysia) trên máy ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Nhận kết quả dưới dạng file .ab1 và .seq.

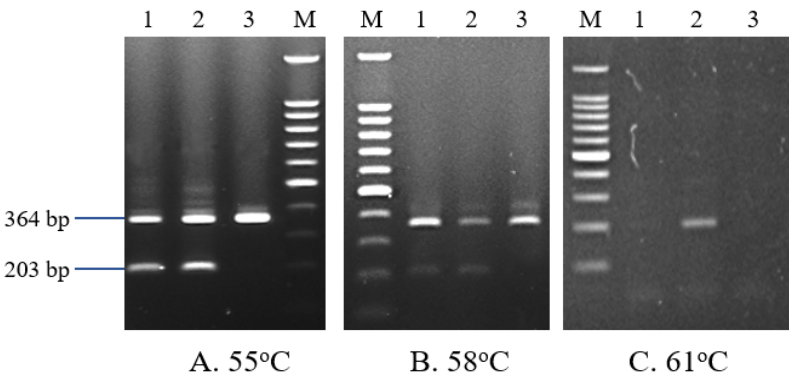
- Sử dụng phần mềm BioEdit để đọc trình tự nucleotide từ các file trên.

- Sử dụng công cụ BLAST của NCBI để đối chiếu trình tự nucleotide với các trình tự chuẩn trên GenBank để phân tích kết quả.

- Đối chiếu kết quả xác định đột biến JAK2 V617F bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP với kết quả giải trình tự.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

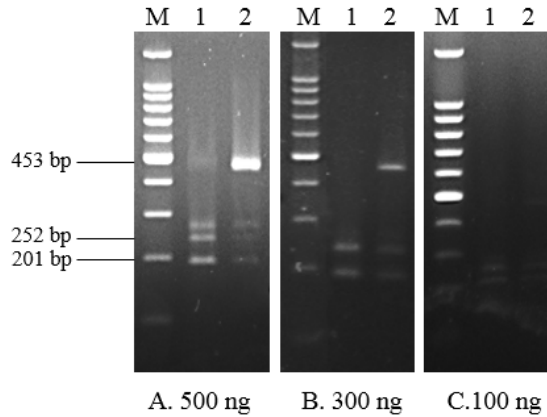
Qua quá trình chuẩn hóa quy trình xác định đột biến V617F gene JAK2 bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP chúng tôi thu được những kết quả như sau:



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm thực hiện bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele ở các nhiệt độ gắn mồi khác nhau.

M: Thang chuẩn 100bp. Mẫu 1, 2: có đột biến V617F. Mẫu 3: không có đột biến V617F

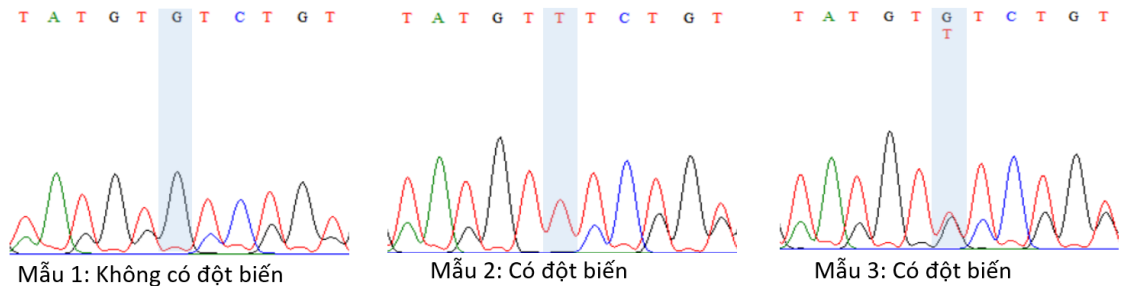
Nhận xét: Ở 55°C, các sản phẩm PCR xuất hiện rõ nét, cho phép xác định các mẫu có hay không có đột biến V617F. Ở 58°C, có xuất hiện sản phẩm nhưng đậm độ của các băng sản phẩm không rõ ràng. Ở 61°C, hầu như không quan sát thấy băng sản phẩm PCR.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm thực hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP ở các lượng sản phẩm PCR đầu vào khác nhau.

M: Thang chuẩn 100 bp. Mẫu 1: không có đột biến V617F. Mẫu 2: có đột biến V617F.

Nhận xét: Với lượng sản phẩm PCR cho vào phản ứng cắt là 100 ng cho hình ảnh băng không rõ ràng. Với 300 ng sản phẩm, kết quả cho thấy các băng sản phẩm rõ nét, phù hợp với kích thước dự kiến, dựa vào kích thước và số lượng sản phẩm cắt cho phép xác định đột biến. Với 500 ng sản phẩm PCR, enzyme không cắt hết mặc dù mẫu thử nghiệm không có đột biến.



Hình 3. Kết quả giải trình tự Sanger các mẫu DNA ngẫu nhiên.

Những mẫu có sự xuất hiện của allele T (màu đỏ) tại vị trí đánh dấu được xác định là có đột biến V617F.

Nhận xét: Có sự phù hợp hoàn toàn về kết quả xác định đột biến gene *JAK2* V617F của PCR đặc hiệu allele, PCR-RFLP và giải trình tự Sanger.

Bảng 3. So sánh kết quả xác định đột biến bằng hai kỹ thuật PCR đặc hiệu allele (nhiệt độ gắn mồi 55°C) và PCR-RFLP (300 ng sản phẩm PCR)

		PCR RFLP		Cohen's kappa
		V617F (+)	V617F (-)	
PCR đặc hiệu allele	V617F (+)	19	0	Cohen's kappa = 1
	V617F (-)	0	22 ^(*)	

Chú thích: (*) Bao gồm 12 bệnh nhân MPNs và 10 người khỏe mạnh.

Nhận xét: Có sự phù hợp hoàn toàn trong kết quả xác định đột biến V617F của hai kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP.

Bảng 4. So sánh quy trình xác định đột biến bằng hai kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP

Kỹ thuật	PCR đặc hiệu allele	PCR-RFLP
Tách chiết và đo nồng độ DNA	+	+
PCR	+	+
Điện di kiểm tra sản phẩm	+	+
Đo nồng độ sản phẩm PCR	-	+
Ủ với enzyme cắt hạn chế	-	+
Điện di kiểm tra sản phẩm cắt	-	+

Nhận xét: kỹ thuật PCR-RFLP đòi hỏi nhiều bước kỹ thuật hơn so với PCR đặc hiệu allele

Bảng 5. Tỷ lệ đột biến *JAK2* V617F ở các bệnh nhân nghi ngờ và mắc rối loạn sinh tủy ác tính

Chẩn đoán	N	Số ca đột biến	Tỷ lệ (%)	95%CI
Đa hồng cầu	14	9	64,3	38,8 - 83,7
Tăng tiểu cầu	5	3	60	23,7 - 88,2
Xơ tủy	2	2	100	34,2 - 100
Nghi ngờ MPNs	10	5	50	20 - 79,9
Tổng	31	19	61,3	42,3 - 77,6

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến gene *JAK2* V617F là 61,3%. Tỷ lệ này ở các bệnh nhân đa hồng cầu, tăng tiểu cầu và xơ tủy lần lượt là 64,3%, 60% và 100%. 50% bệnh nhân nghi ngờ mắc MPNs có mang đột biến.

4. BÀN LUẬN

Gene *Janus Kinase 2* (*JAK2*) mã hóa cho protein *JAK2*, đây là một tyrosine kinase có liên quan đến việc kiểm soát sự phát triển và tăng sinh tế bào [5, 6]. Chính vì vai trò quan trọng đó, một số đột biến trên *JAK2* trở thành nguyên nhân của nhiều loại ung thư khác nhau, đặc biệt trong các bệnh lý ác tính về huyết học như đa hồng cầu, tăng tiểu cầu nguyên phát và xơ tủy vô căn. Năm 2005, đột biến *JAK2* V617F được mô tả bởi bốn nhóm nghiên cứu độc lập, đột biến này xuất hiện ở phần lớn các bệnh nhân MPNs Ph-âm tính [7]. Những phát hiện này đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh các nhóm bệnh lý tăng sinh tủy ác tính [3, 8]. Từ năm 2008, WHO đã xác định đột biến gene *JAK2* là một trong những tiêu chuẩn chẩn đoán chính của nhóm bệnh lý này [2].

Đột biến *JAK2* V617F là một dấu hiệu phân tử quan trọng trong chẩn đoán MPNs. Trong những thập kỷ qua, một số xét nghiệm phát hiện đột biến dựa trên PCR với độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau đã được phát triển như PCR đặc hiệu allele, PCR-RFLP, giải trình tự Sanger...[1]. Tuy nhiên, với tiêu chí chọn những kỹ thuật có thể triển khai thường quy ở hầu hết các phòng xét nghiệm sinh học phân tử cơ bản nhưng vẫn đảm bảo độ nhạy phát hiện đột biến cao, chúng tôi đã xây dựng quy trình xác định đột biến V617F gene *JAK2* bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các trình tự mồi được mô tả bởi Baxter, trong đó tác giả đặt nhiệt độ gắn mồi là 58°C [5]. Tuy nhiên, trong

thí nghiệm của chúng tôi, ở nhiệt độ này, kết quả cho thấy các băng sản phẩm xuất hiện không rõ ràng. Chúng tôi nhận thấy, nhiệt độ nóng chảy của các mồi AS-R, AS-F và IC-F lần lượt là 66°C, 61°C và 66°C. Vì vậy chúng tôi thử nghiệm thêm hai điều kiện phản ứng với nhiệt độ gắn mồi là 55°C và 61°C. Kết quả ở Hình 1 cho thấy 55°C là nhiệt độ gắn mồi tối ưu nhất với các sản phẩm của phản ứng PCR xuất hiện rõ ràng, sự hiện diện của sản phẩm đặc hiệu allele đột biến (203 bp) cho phép xác định có hay không có đột biến V617F, bên cạnh đó sự có mặt của sản phẩm kích thước 364 bp ở cả allele hoang dại và đột biến đóng vai trò làm chứng nội, giúp tăng độ tin cậy của kết quả chẩn đoán. Ở 58°C, mặc dù có xuất hiện sản phẩm chứng nội và đột biến, nhưng đậm độ của các băng sản phẩm không rõ ràng. Với nhiệt độ gắn mồi 61°C, hầu như không có sản phẩm PCR được khuếch đại. Điều này chứng tỏ, nhiệt độ gắn mồi ở 58°C và 61°C làm hiệu suất phản ứng PCR đã giảm đi đáng kể.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đồng thời thực hiện PCR-RFLP cho tất cả các mẫu DNA. Đây là kỹ thuật sinh học phân tử có khả năng xác định chính xác các đột biến hoặc đa hình đơn nucleotide liên quan vị trí nhận biết của enzyme cắt hạn chế. Sản phẩm sau bước PCR được điện di kiểm tra và đo nồng độ bằng máy đo huỳnh quang Quantus™ Fluorometer (Promega) để cho phép sử dụng lượng sản phẩm PCR đầu vào thích hợp ở phản ứng cắt. Đối với phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme hạn chế, theo khuyến cáo số lượng DNA đầu vào khoảng

100-500 ng cho phản ứng 20 µl. Vì vậy, chúng tôi thử nghiệm với ba lượng sản phẩm khác nhau là 100 ng, 300 ng và 500 ng. Kết quả điện di sản phẩm cắt ở hình 2 cho thấy với lượng sản phẩm PCR cho vào phản ứng cắt 100 ng quá ít dẫn đến hình ảnh băng không rõ ràng, khó kết luận chính xác. Với lượng sản phẩm PCR đầu vào là 300 ng, kết quả kiểm tra sản phẩm cắt cho thấy các băng sản phẩm rõ nét, phù hợp kích thước dự kiến, dựa vào kích thước và số lượng sản phẩm cắt cho phép xác định đột biến V617F. Khi thử nghiệm với lượng sản phẩm PCR là 500 ng thì enzyme không cắt hết sản phẩm mặc dù mẫu thử nghiệm không có đột biến (Hình 2).

Như vậy, chúng tôi đã thiết lập thành công các quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP để chẩn đoán đột biến V617F gene *JAK2*. Khi so sánh kết quả chẩn đoán của hai phương pháp, chúng tôi ghi nhận sự tương đồng 100%, với hệ số Cohen's kappa bằng 1. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của Frantz khi so sánh giá trị chẩn đoán của hai kỹ thuật nói trên (2007) [4]. Tuy nhiên, như bảng 4 cho thấy, kỹ thuật PCR-RFLP đòi hỏi nhiều bước kỹ thuật, dẫn đến kéo dài thời gian trả kết quả cũng như chi phí sinh phẩm và công lao động. Do đó, kỹ thuật AS-PCR cho thấy ưu thế hơn so với PCR-RFLP.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng thành công xét nghiệm chẩn đoán đột biến V617F trên 31 bệnh nhân và 10 người khỏe mạnh. Kết quả cho thấy ở nhóm người khỏe mạnh không phát hiện đột biến gene *JAK2* V617F. Tỷ lệ đột biến V617F chung trong nhóm bệnh nhân MPNs là 61,3%. Khi khảo sát theo nhóm bệnh lý được chẩn đoán lâm sàng, tỷ lệ đột biến được ghi nhận là 64,3% (95%CI: 38,8 - 83,7) ở

nhóm đa hồng cầu, 60% (95%CI: 23,7 - 88,2) ở nhóm tăng tiểu cầu nguyên phát, và 100% (95%CI: 34,2 - 100) ở nhóm xơ tủy vô căn. Nhiều nghiên cứu trên thế giới ghi nhận đột biến này hiện diện ở ít nhất 95% bệnh nhân đa hồng cầu, và khoảng 50% ở các trường tăng tiểu cầu tiên phát và xơ tủy vô căn [3]. Chúng tôi chỉ mới bước đầu nghiên cứu trên cỡ mẫu tương đối nhỏ (31 bệnh nhân và 10 người khỏe mạnh), tuy nhiên tỷ lệ đột biến được phát hiện cũng không có sự khác biệt đáng kể so với các nghiên cứu khác. Đối với nhóm bệnh nhân có các dấu hiệu nghi ngờ nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính trên lâm sàng thì chúng tôi phát hiện được 5/10 trường hợp có đột biến V617F (Bảng 5). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã giúp cho các bác sĩ lâm sàng chẩn đoán 5 trường hợp nghi ngờ MPNs này.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu áp dụng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP trên 31 bệnh nhân được bác sĩ lâm sàng theo dõi chẩn đoán bệnh lý tăng sinh tủy ác tính và 10 người khỏe mạnh, chúng tôi có một số kết luận như sau:

- Đã thiết lập được quy trình xác định đột biến *JAK2* V617F bằng hai kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và PCR-RFLP, trong đó kỹ thuật PCR đặc hiệu allele có nhiều ưu điểm hơn.
- Tỷ lệ đột biến V617F của gene *JAK2* trong nhóm bệnh nhân MPNs là 61,3% (95%CI: 42,3 - 77,6).

Lời cảm ơn : Đề tài này được hỗ trợ kinh phí từ Quỹ nghiên cứu khoa học của Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, mã số đề tài 33BV/22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Didone A, Nardinelli L, Marchiani M, Ruiz ARL, de Lima Costa AL, Lima IS, Santos NM, Sanabani SS, et al. (2016) Comparative study of different methodologies to detect the *JAK2* V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Pract Lab Med* 4:30–37
2. Pizzi M, Croci GA, Ruggeri M, Tabano S, Dei Tos AP, Sabattini E, Gianelli U (2021) The classification of myeloproliferative neoplasms: Rationale, historical background and future perspectives with focus on unclassifiable cases. *Cancers (Basel)* 13:
3. Gnanasambandan K, Sayeski PP (2011) A Structure-Function Perspective of *Jak2* Mutations and Implications for Alternate Drug Design Strategies: The Road not Taken. *Curr Med Chem* 18:4659–4673
4. Frantz C, Sekora DM, Henley DC, Huang CK, Pan Q, Quigley NB, Gorman E, Hubbard RA, et al. (2007) Comparative evaluation of three *JAK2*V617F mutation detection methods. *Am J Clin Pathol* 128:865–874
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061
6. Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH (2019) Roles of *JAK2* in aging, inflammation, hematopoiesis and malignant transformation. *Cells* 8:1–19
7. Tremblay D, Yacoub A, Hoffman R (2021) Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am* 35:159–176
8. Tavares RS, Nonino A, Pagnano KBB, Nascimento ACKV do, Conchon M, Fogliatto LM, Funke VAM, Bendit I, et al. (2019) Guideline on myeloproliferative neoplasms: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Cellular: Project guidelines: Associação Médica Brasileira – 2019. *Hematol Transfus Cell Ther* 41:1–73.