NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP RT-PCR SỬ DỤNG CHẤT NHUỘM HUỲNH QUANG SYBR GREEN ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG HPV-16

Đến tòa soạn 20-02-2023

Vũ Thị Tình[1], Nguyễn Bích Ngân[1], Tạ Văn Thạo[2]
1. Đại học Sư phạm Hà Nội
2. Đại học Y Hà Nội
*Email: tinhvt@hnue.edu.vn

SUMMARY

STUDY ON RT-PCR METHOD USING SYBR GREEN FLUORESCENT DYE TO QUANTIFY HPV-16

HPV16 is the most common high-risk human papillomavirus genotype causing over haft of all cervical cancer cases in women worldwide. The quantification of HPV-16 plays a key role in the diagnosis and treatment of cervical cancer. In this study, we investigated the specificity of primers and optimized the conditions of RT-PCR reaction for detection of HPV-16: temperature annealing 56^0C; primers concentration: 0,25 µM; thermal cycles: 35 cycles; SYBR Green concentration: 0,25x. Based on the optimal conditions of RT-PCR reaction established applied to determine HPV-16 in 23 real specimens. The results are similar to those of HPV-16 analysis on IVD standard kits.

***Keywords**: HPV-16, SYBR Green, method RT-PCR*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư cổ tử cung là khối u phổ biến thứ hai và gây tử vong nhiều nhất ở phụ nữ. Mỗi năm có hơn nửa triệu bệnh nhân được chuẩn đoán và hơn 300.000 ca tử vong do ung thư có liên quan đến ung thư cổ tử cung [1]. Tiêm vaccine và sàng lọc thường xuyên có thể phòng ngừa được căn bệnh này, bằng chứng là trong một nghiên cứu tại Ấn Độ tỉ lệ mắc ung thư cổ tử cung với phụ nữ ở các khu vực có thu nhập thấp và trung bình cao gấp 18 lần so với khu vực phát triển có thu nhập cao [2]. Hầu hết các ca ung thư cổ tử cung đều có liên quan đến virut Human papillomavirus (HPV). Hiện nay có hơn 140 loại virut HPV được xác định và được chia thành các nhóm nguy cơ cao và nguy cơ thấp [3]. Trong số 16 loại HPV nguy cơ cao thì HPV-16 và HPV-18 là thường gặp nhất chiếm 70% trong các ca ung thư cổ tử cung và HPV-16 là loại nguy cơ cao phổ biến nhất chiếm 90% [4]. Chính vì vậy mà việc tìm ra một phương pháp nghiên cứu có độ tin cậy cao, nhanh chóng, hiệu quả để xác định HPV-16 là rất cần thiết.

Hiện nay, hai phương pháp phổ biến để xác định virut nói chung và HPV-16 nói riêng là: PCR và RT- PCR. Trong đó, phương pháp RT-PCR được đánh giá là ưu việt hơn do có độ nhạy cao, độ lặp, thời gian phân tích ngắn hơn phương pháp PCR và có thể định tính, định lượng được virut [5]. Các nghiên cứu xác định HPV-16 bằng phương pháp RT-PCR sử dụng 2 nhóm tín hiệu huỳnh quang: đầu dò huỳnh quang (probe) và chất nhuộm huỳnh quang. Phương pháp sử dụng đầu dò huỳnh quang Taqman probe là khá phổ biến khi xác định các nhóm HPV nguy cơ cao bao gồm cả HPV-16, 18 cho kết quả nhanh, có độ tin cậy cao, tuy

nhiên chi phí xét nghiệm cao, có một số trường hợp kết luận dương tính là giả và không định lượng được HPV.

Những nghiên cứu sử dụng chất nhuộm huỳnh quang SYBR Green, SYTO9 trong phản ứng RT-PCR để xác định HPV-16 đã khắc phục được những nhược điểm khi sử dụng đầu dò huỳnh quang Taqman probe [6]–[11]. Hơn nữa, trong nghiên cứu [12] đã chứng minh có thể sử dụng chất nhuộm huỳnh quang SYBR Green để xác định HPV-18. Chính vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi đã xác định điều kiện tối ưu cho phản ứng RT-PCR sử dụng SYBR Green để định tính, định lượng HPV-16 và kết hợp với phân tích đường cong nóng chảy sản phẩm của phản ứng RT-PCR để tránh những kết luận dương tính giả. Kết quả nghiên cứu được áp dụng để phân tích HPV-16 trên 23 mẫu dịch phết cổ tử cung và được so sánh với kết quả phân tích HPV-16,18 khi sử dụng các kit thương mại IVD.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Tách DNA từ mẫu bệnh phẩm

Mẫu dịch phết cổ tử cung được thu thập từ các bệnh viện, phòng khám và tập hợp tại công ty cổ phần Chemedic, sau đó được tách chiết DNA bằng kit Body Fluids G-Spin Total DNA.

2.2. Nghiên cứu điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR đối với HPV-16

Sử dụng phương pháp PCR kết hợp với phương pháp điện di sản phẩm sau phản ứng khuếch đại để khảo sát độ đặc hiệu của mồi, nồng độ mồi (**C= 1,5; 1,25; 1,00; 0,75; 0,50; 0,25 và 0.125 µM)**, nhiệt độ ủ mồi (**T_a= 43, 45, 48, 51 và 56 ^oC)**, số chu kỳ của phản ứng (**V= 30, 35, 40, 45, 50 vòng**). Trong đó mỗi phản ứng PCR đều có thành phần là: 10 µL dung dịch đệm 2X; 5 µLprimer C và 5 µL HPV – 16 theo chu trình nhiệt là: biến tính ở nhiệt độ là 95^{o}C; nhân bản V chu kỳ trong đó nhiệt độ gắn mồi là T_a và nhiệt độ kéo dài mạch là 72^{o}C; kết thúc ở nhiệt độ 72^{o}C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose nồng độ 2% trong thời gian 30 phút với hiệu điện thế 130V và cường độ dòng 300 mA. Tinh sạch sản phẩm sau khi điện di bằng bộ tinh lọc DNA tổng đoạn Megaquick-spinTM Plus thu được dung dịch chứa DNA HPV-16. Xác định DNA bằng phương pháp nanodrop.

2.3. Nghiên cứu nồng độ SYBR Green tối ưu cho phản ứng RT-PCR để xác định HPV-16

Tiến hành 6 phản ứng RT-PCR với nồng độ SYBR Green (C_1) trong 10 mL dung dịch đệm lần lượt là: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 µM.

Thành phần dung dịch đệm RT-PCR là 0,2 µL Taq polymerase; 2 µL dNTPs; 2 µL đệm; a µL SYBR 10X có nồng độ pha loãng là C_1 µM; DEPC b µL. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như mục 2.2.

2.4. Xây dựng đường chuẩn định lượng HPV-16

Từ các điều kiện tối ưu đã được thiết lập tiến hành 9 phản ứng RT-PCR để xây dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của chu kỳ ngưỡng vào nồng độ HPV-16. Nồng độ HPV-16 ($C_{gốc}$ = 8,67x10^6 copies/µL) trong mỗi phản ứng được pha loãng từ 0 - 10^8 lần.

2.5. Xác định HPV-16 trên mẫu bệnh phẩm

Tiến hành xác định HPV-16 trên 23 mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp RT-PCR sử dụng chất nhuộm huỳnh quang SYBR Green. So sánh kết quả phân tích với kết quả của phản ứng RT-PCR sử dụng kít chuẩn IVD.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Độ đặc hiệu của mồi

Mồi dùng cho phản ứng RT-PCR để xác định HPV- 16 bao gồm mồi xuôi ATA TAT GTT AGA TTT GCA ACC AGA GAC ACC có nhiệt độ nóng chảy (Tm) 55,9^{0}C; mồi ngược GTC TAC GTG TGT GCT TTG TAC GCAC có nhiệt độ nóng chảy 54,2^{0}C. So sánh trên thư viện ngân hàng gen thế giới NCBI, cặp mồi này có khả năng khuếch đại được một đoạn gen E7 của HPV-16 có kích thước khoảng 196 bp. Kết quả điện di sản phẩm sau phản ứng PCR cho 1 vạch đơn sáng tại vị trí xấp xỉ 200 bp so với thang Ladder, điều này cho thấy cặp mồi sử dụng là phù hợp, đặc hiệu để xác định HPV-16 (Hình 1a).

3.2. Điều kiện tối ưu của phản ứng PCR xác định HPV- 16

3.2.1. Nhiệt độ gắn mồi

Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR với 5 ngưỡng nhiệt độ gắn mồi khác nhau trong hình 1b cho thấy đều xuất hiện một băng duy nhất có chiều dài xấp xỉ 200 bp so với thang Ladder. Tuy nhiên nếu nhiệt độ gắn mồi quá thấp sẽ ảnh hưởng đến khả năng phát huỳnh quang của SYBR Green. Thông thường nhiệt độ gắn mồi thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của mồi và nằm trong khoảng 50 - 60^{o}C. Do đó lựa chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR xác định HPV-16 là 56^{o}C.

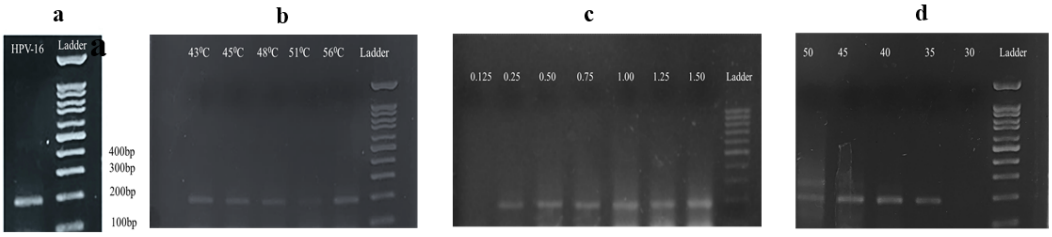
3.2.2. Nồng độ mồi

Kết quả điện di sản phẩm PCR trong hình 1c cho thấy khi nồng độ mồi là 0,125 µM thì hầu như không nhìn thấy băng vạch của sản phẩm. Ở các giá trị nồng độ mồi còn lại đều xuất hiện băng vạch có kích thước gần 200bp. Tuy nhiên ở các nồng độ cao từ 1,00 -1,50 µM xuất hiện vạch dimer của mồi do mồi còn dư sau phản ứng. Tại các nồng độ 0,50 µM và 0,75 µM sản phẩm PCR chưa thật đặc hiệu. Kết quả điện di tại nồng độ mồi là 0,25 µM xuất hiện 1 băng vạch DNA duy nhất, sang, rõ nét. Do đó lựachọn nồng độ mồi tối ưu cho phản ứng PCR xác định HPV-16 là 0,25 µM.

3.2.3. Số chu kỳ phản ứng

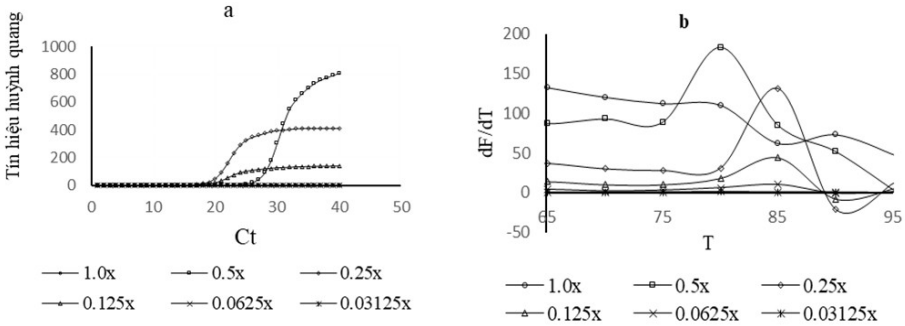
Để xác định chu kỳ phản ứng PCR tối ưu cho việc phát hiện HPV-16, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dung 05 chu kỳ khác nhau. Kết quả ở hình 1d cho thấy ở chu kỳ 35 và 40 cho ra 01 băng vạch duy nhất, đúng kích thước còn ở chu kỳ 45 và 50 vẫn xuất hiện những băng phụ không đặc hiệu; chu kỳ 30 không thấy xuất hiện băng vạch của sản phẩm. Do đó để tiết kiệm thời gian phân tích, chu kỳ tối ưu của phản ứng PCR xác định HPV-16 được lựa chọn là 35.

Như vậy các điều kiện tối ưu của phản ứng PCR xác định HPV-16 là: nhiệt độ gắn mồi: 56^{o}C; nồng độ mồi: 0,25 µM; số chu kỳ phản ứng: 35.



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR: a. Khảo sát độ đặc hiệu của mồi; b. Khảo sát nhiệt độ gắn mồi; c. Khảo sát nồng độ mồi; d. Khảo sát số chu kỳ phản ứng Nồng độ của SYBR Green cho phản ứng RT-PCR xác định HPV- 16

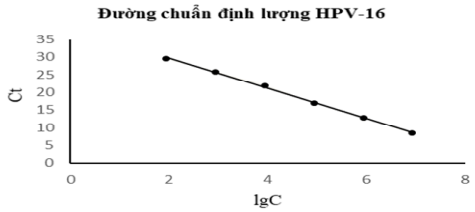
Kết quả được thể hiện trong hình 2 cho thấy không thu được tín hiệu RT-PCR và không xác định được nhiệt nóng chảy khi nồng độ SG là: 1x, 0,0625x và 0,0312x. Tại nồng độ SG: 0,5x; 0,25x; 0,125x thu được tín hiệu C_t lần lượt là 26; 20 và 19,8 với T_m lần lượt là 80,1; 85,1 và 84,6 ^{0}C. Ở nồng độ 0,5x SG ức chế đáng kể đến enzyme Taq nên C_t trễ hơn và T_m của sản phẩm khác khá nhiều so với lý thuyết (T_m lý thuyết có giá trị 88^{o}C được tính bằng phần mềm uMelt). Tại nồng độ 0,25x; 0,125x có C_t và T_m chênh lệnh không đáng kể; T_m gần với lý thuyết, tuy nhiên chiều cao của pic T_m ở nồng độ 0,25x so với 0,125x rõ ràng và đặc trưng hơn. Do vậy nồng độ SYBR-Green 0,25x đã được lựa chọn cho phản ứng RT-PCR xác định HPV-16.



Hình 2. a. Kết quả phản ứng RT-PCR khảo sát ảnh hưởng nồng độ SG;
b. Kết quả vi phân đường cong nóng chảy sản phẩm sau PCR

3.3. Đường chuẩn định lượng HPV- 16

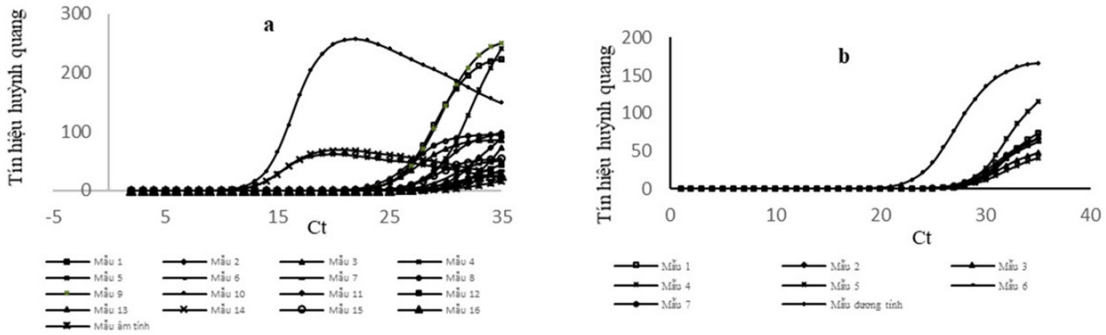
Tiến hành 9 phản ứng RT-PCR với mẫu chuẩn p0- p8 có nồng độ từ $8,67.10^8$ – 8,67 copies ở điều kiện tối ưu được thiết lập ở trên. Tuy nhiên không thu được tín hiệu huỳnh quang ở mẫu p0 và p1; không xác định được nhiệt độ nóng chảy của mẫu p8. Do đó tiến hành xây dựng đường chuẩn dựa trên số liệu phản ứng RT-PCR của các mẫu từ p2-p7. Kết quả chu kỳ ngưỡng trung bình của các mẫu từ p2-p7 lần lượt là: 8,40; 12,90; 16,96; 21,93; 25,86; 29,63. Sử dụng hàm tính linest trên excel với 6 mẫu chuẩn ta thu được phương trình đường chuẩn có dạng: $C_t = -(4,28666 \pm 0, 08235)\ lgC + (38,30972 \pm 0,39162)$ với hệ số $R^2 = 0,9985$ với LOQ = 6,36 copies tương đương với lượng DNA ban đầu là 25,4 copies (Hình 3).



Hình 3. Đường chuẩn định lượng HPV-16

3.4. Xác định HPV- 16 trên mẫu bệnh phẩm

Sử dụng chất nhuộm huỳnh quang SYBR Green trong phương pháp RT-PCR để xác định HPV-16 trong 23 mẫu bệnh phẩm cho kết quả định tính tương đồng với khi sử dụng kit chuẩn IVD. Trong đó có 16 mẫu là dương tính được thể hiện trong hình 4a và 7 mẫu là âm tính được thể hiện trong hình 4b. Điều này cho thấy độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu. Do đó có thể sử dụng phương pháp RT-PCR để định tính HPV-16. Từ kết quả Ct của 16 phản ứng RT-PCR với các mẫu dương tính, thay vào phương trình đường chuẩn để xác định nồng độ của HPV-16 trong mẫu bệnh phẩm. Kết quả được thống kê trong bảng 1. Kết quả định lượng HPV-16 đóng góp ý nghĩa lớn trong việc chuẩn đoán và điều trị HPV-16: Các mẫu 3,4,10 có nguy cơ cao ung thư cổ tử cung; các mẫu còn lại có khả năng cao gây loạn sản cổ tử cung.



Hình 4. a. Kết quả phản ứng RT-PCR trên 16 mẫu dương tính;
b. Kết quả phản ứng RT-PCR trên 7 mẫu âm tính

Bảng 1. Kết quả định lượng HPV- 16 trên mẫu bệnh phẩm dương tính

Mẫu	Ct	Nồng độ DNA (copies)
1	25,9	$7,85x10^2$
2	26,9	$4.59x10^2$
3	12,9	$8,46x10^5$
4	12,7	$9,42x10^5$
5	21,5	$8,34x10^3$
6	23,7	$2,56x10^3$
7	20,0	$1,86x10^4$
8	25,6	$9,22x10^2$
9	29,7	$1,02x10^2$
10	13,3	$6,82x10^5$
11	29,6	$1,08x10^2$
12	28,1	$2,41x10^2$
13	26,7	$5,11x10^2$
14	24,2	$1,95x10^3$
15	27,3	$3,70x10^2$
16	25,3	$1,08x10^3$

4. KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu của phản ứng RT-PCR định lượng HPV-16 là: Nhiệt độ gắn mồi: 56^{o}C; nồng độ mồi: 0,25 µM; số chu kỳ phản ứng: 35; nồng độ SYBR Green: 0,25x. Phương pháp RT-PCR sử dụng SYBR Green cho kết quả tin cậy khi định tính và định lượng HPV-16.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện dưới sự tài trợ của đề tài cấp trường ĐHSP Hà Nội năm 2020 mã số: SPHN20-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R. S. Akram Husain, R. Rajakeerthana, A. Sreevalsan, P. Prema Jayaprasad, S. S. S. J. Ahmed, and V. Ramakrishnan, Aug. (2018). Prevalence of human papilloma virus with risk of cervical cancer among south Indian women: A genotypic study with meta-analysis and molecular dynamics of HPV E6 oncoprotein. *Infect. Genet. Evol*, **vol. 62**, pp. 130–140

[2] B. Han et al., Feb. (2023). The clinical course of untreated CIN2 (HPV16/18+) under active monitoring: A protocol of systematic reviews and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, **vol. 102**, no. 6, p. e32855.

[3] D. Shanis et al., Oct. (2017). Risks factors and timing of genital human papillomavirus (HPV) infection in female stem cell transplant survivors: a longitudinal study. *Bone Marrow Transplant, 2018 531*, **vol. 53**, no. 1, pp. 78–83.

[4] H. F. Xu et al., Oct. (2021). The Risk Stratification for Cervical Cancer and Precursors of Domestic HPV Testing With HPV 16/18 Genotyping in Women With NILM Cytology in CentralChina: A Cohort Study. *Front. Oncol*, **vol. 11**.

[5] M. A. Oyervides-Muñoz *et al.*, (2020). Multiple HPV Infections and Viral Load Association in Persistent Cervical Lesions in Mexican Women. *Viruses*, **vol. 12**, no. 4.

[6] J. Cuzick *et al.*, (2010). Performance of the Abbott RealTime high-risk HPV test in women with abnormal cervical cytology smears. *J. Med. Virol,*, **vol. 82**, no. 7, pp. 1186–1191.

[7] F. Sahiner, A. Kubar, M. Yapar, K. Sener, M. Dede, and R. Gümral, Feb. (2014). Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. *J. Microbiol. Methods*, **vol. 97**, no. 1, pp. 44–50.

[8] M. R. de Araujo et al., Jun. (2009). GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. *J. Clin. Virol,*, **vol. 45**, no. 2, pp. 90–95.

[9] F. Moreau et al., (2013). Detection and genotyping of human papillomavirus by real-time PCR assay. *J. Clin. Virol.*, **vol. 56**, no. 3, pp. 328–333.

[10] D. Tsakogiannis et al., Feb. (2015). Duplex Real-time PCR assay and SYBR green I melting curve analysis for molecular identification of HPV genotypes 16, 18, 31, 35, 51 and 66. *Mol. Cell. Probes*, **vol. 29**, no. 1, pp. 13–18.

[11] L. B. Twiggs and M. Hopkins, Jul. (2011). High-risk HPV DNA testing and HPV-16/18 genotyping: What is the clinical application?. *J. Low. Genit. Tract Dis*, **vol. 15**, no. 3, pp. 224–230.

[12] T. V. T. B. T. B. Vũ Thị Tình, Nguyễn Bích Ngân, (2021). Nghiên cứu định lượng HPV-18 bằng phương pháp RT-PCR sử dụng chất nhuộm huỳnh quang SYBR- Green. *Tạp chí phân tích lý hóa sinh*, **vol. 26**, no. 4B, pp. 129–134.