

BUỚC ĐẦU KHẢO SÁT ĐỘT BIẾN GEN BRCA1 VÀ BRCA2 TRONG QUẦN THỂ UNG THƯ BIỂU MÔ BUỒNG TRỨNG NGƯỜI VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI

Ngô Đại Phú¹, Ngô Vĩnh Tường^{1,6}, Phạm Huy Hoà², Bùi Thị Hồng Nhu², Võ Thanh Nhân²,
Lê Quang Thanh², Lê Thái Khương³, Hoàng Anh Vũ³, Nguyễn Duy Sinh⁴, Hoàng Thành Chí⁵,
Nguyễn Đăng Quân⁶, Nguyễn Trọng Bình^{6*}

¹ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4,
Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

² Bệnh viện Từ Dũ, 284 Cống Quỳnh, Phường Phạm Ngũ Lão, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³ Đại học Y dược TPHCM, 217 Hồng Bàng, Phường 11, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴ Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec Central Park, 208 Nguyễn Hữu Cảnh, Phường 22, Quận Bình Thạnh,
Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵ Công Ty TNHH Mekophar, Lô I-9-5, Đường D2, Khu Công Nghệ Cao, Phường Long Thạnh Mỹ, Quận 9,
Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁶ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, 2374 Quốc Lộ 1, Khu Phố 2, Phường Trung Mỹ Tây,
Quận 12, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Trọng Bình <nguyentrongbinhcns@yaho.com>

(Ngày nhận bài: 04-10-2019; Ngày chấp nhận đăng: 18-03-2020)

Tóm tắt. BRCA1 và BRCA2 là hai gen ức chế khối u quan trọng. Việc đột biến hai gen này ở bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng dòng mầm và dòng sinh dưỡng thì đáp ứng tốt hơn với thuốc ức chế enzyme poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor (PARPi). Gần đây, một vài thuốc PARPi, như Olaparib và Rucaparib, đã được chấp thuận dùng cho bệnh nhân ung thư buồng trứng với đột biến dòng mầm BRCA1/2 bởi Food and Drug Administration (FDA) và với đột biến dòng mầm và dòng sinh dưỡng đối với European Medicines Agency (EMA). Tuy nhiên, hiện nay Việt Nam chưa có dữ liệu nào đáng tin cậy về tình trạng đột biến hai gen này trong quần thể bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng nhằm hỗ trợ cho điều trị. Do đó, chúng tôi tiến hành giải trình tự nhằm khảo sát đột biến hai gen BRCA1/2 dòng mầm và dòng sinh dưỡng ở bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng người Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành giải trình tự hai gen này bằng Ion Torrent PGM. Đối tượng nghiên cứu là 11 mẫu mô vùi nên được thu nhận từ Bệnh viện Từ Dũ của 11 bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng. DNA từ các mẫu này và 2 mẫu đối chứng đã biết thông tin đột biến được tiến hành multiplex PCR với kit Oncomine BRCA Research Assay. Trong mười một mẫu được giải trình tự, một đột biến gây bệnh (1/11 bệnh nhân; 9,1%) đã được phát hiện trên gen BRCA1, là đột biến điểm đưa codon stop vào trình tự protein tại vị trí axit amin 1772. Tóm lại, quy trình giải trình tự của chúng tôi thành công trong việc xác định và khảo sát tỉ lệ đột biến BRCA1/2 trong một nhóm nhỏ bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng với mẫu sinh phẩm là mô vùi nên.

Từ khóa: BRCA1, BRCA2, Ion Torrent PGM, ung thư biểu mô buồng trứng người Việt Nam

Preliminary study of BRCA1 and BRCA2 mutations among Vietnamese ovarian carcinomas population by using ion personal genome machine platforms

Ngô Đại Phú¹, Ngô Vinh Tuông^{1,6}, Phạm Huy Hoa², Bùi Thị Hồng Nhu², Võ Thanh Nhân², Lê Quang Thanh², Lê Thái Khuông³, Hoàng Anh Vũ³, Nguyễn Duy Sinh⁴, Hoàng Thanh Chi⁵, Nguyễn Đăng Quan⁶, Nguyễn Trọng Bình^{6*}

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu St., Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Tu Du Hospital of Obstetrics and Gynecology, 284 Cong Quynh St., Phạm Ngũ Lão Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

³University of Medicine and Pharmacy, 217 Hong Bang St., Ward 11, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Vinmec International General Hospital, 208 Nguyen Huu Canh St., Ward 22, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Mekophar Chemical Pharmaceutical Joint Stock Company, D2 Street St., High Technology Park, Long Thanh My Ward, District 9, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁶Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

* Correspondence to Nguyễn Trọng Bình <nguyentrongbinhcsh@yahoo.com>

(Received: 04 October 2019; Accepted: 18 March 2020)

Abstract. BRCA1 and BRCA2 are two important tumor suppressor genes. The germline and somatic mutations of these two genes in ovarian carcinomas are sensitive for treatment with ADP-ribose polymerase enzyme inhibitor (PARPi). Recently, several PARPi drugs, such as Olaparib and Rucaparib, have been approved for ovarian cancer with BRCA1/2 germline mutations by Food and Drug Administration (FDA), and for both germline and somatic mutations by European Medicines Agency (EMA). However, there have no been reliable data about the prevalence of mutations of these two genes in ovarian carcinomas population for treatment in Vietnam so far. Therefore, we studied the prevalence of the BRCA1/2 germline and somatic mutations among ovarian carcinomas patients in the Vietnamese population. In this study, we sequenced these two genes by using Ion Torrent PGM. The subjects of the study are 11 formalin-fixed paraffin-embedded tumor (FFPE) samples from 11 patients with ovarian carcinomas obtained from Tu Du Hospital of Obstetrics and Gynecology (Vietnam). Multiplex PCR then was performed on the DNA samples and two controls containing known mutations by using Oncomine BRCA Research Assay. Of the sequenced 11 samples, a pathogenic mutation (1/11 patient, 9.1%) detected on the BRCA1 gene was a nonsense point mutation causing stop codon at the position of amino acid 1772. Consequently, our sequencing workflow shows the success in identifying and investigating the prevalence of BRCA1/2 mutation in a small group of ovarian carcinomas with FFPE tumor samples.

Keywords: BRCA1, BRCA2, Ion Torrent PGM, Vietnamese ovarian carcinomas

1 Mở đầu

Ung thư buồng trứng là một trong những ung thư thường gặp ở nữ giới. Ước tính thế giới có

295.414 ca mới được chẩn đoán và 184.799 ca tử vong vào năm 2018 [1]. Tại Việt Nam, theo ghi nhận quần thể ung thư 2004, ung thư buồng trứng

đứng hàng thứ 7 trong số các loại ung thư thường gặp ở nữ giới [2]. Ước tính Việt Nam có số ca mới được chẩn đoán là 1.500, số ca tử vong là 856 và số ca hiện hành là 3.736 [1]. Phần lớn những ca ung thư buồng trứng ác tính thuộc dạng biểu mô, thường được chẩn đoán ở giai đoạn tiến triển khi mà tỉ lệ sống 5 năm chỉ còn 29% [3].

Trong số những nhân tố làm gia tăng nguy cơ ung thư buồng trứng, phải kể đến nguyên nhân bệnh do di truyền, trong đó đột biến dòng mầm ở hai gen BRCA1 và BRCA2 chiếm phần lớn. Mặc dù tỉ lệ đột biến hai gen này trong quần thể chung là tương đối thấp (1/800–1/400), nhưng đáng lưu ý là tỉ lệ này trong quần thể bệnh nhân ung thư buồng trứng lại khá cao, khoảng 20% gồm cả dòng mầm và dòng sinh dưỡng [4]. Người mang đột biến dị hợp tử hai gen này có nguy cơ cao về phát triển ung thư buồng trứng với BRCA1 là 40–60% và BRCA2 là 11–30% [5] và một số loại ung thư khác như ung thư vú, tuyến tụy và tuyến tiền liệt.

BRCA1/2 là hai gen ức chế khối u quan trọng, giữ vai trò then chốt trong sửa chữa đứt gãy mạch đôi DNA. Hiện tượng đứt gãy mạch đôi DNA xảy ra khá phổ biến trong tế bào một khi đột biến mất chức năng xảy ra trên gen còn lại ở người mang đột biến dị hợp tử BRCA sẽ dẫn đến bất ổn bộ gen và do đó thường gây ra ung thư. Một lưu ý quan trọng khác là ung thư biểu mô buồng trứng mang đột biến BRCA1/2 thì nhạy với hóa trị liệu platinum và thuốc ức chế poly ADP-ribose polymerase inhibitors (PARPi). Vào tháng 12 năm 2014, European Medicines Agency (EMA) và Food and Drug Administration (FDA) đã chính thức chấp thuận olaparib cho điều trị trên những bệnh nhân ung thư buồng trứng có đột biến BRCA1/2 [6, 7]. Tiếp đó, vào tháng 12/2016, thuốc PARPi thế hệ thứ hai, rucaparib, được FDA chấp thuận và theo sau là sự chấp thuận từ phía EMA cho điều trị thuốc trên cả bệnh nhân với đột biến dòng mầm và dòng sinh dưỡng [8].

Tại Việt Nam hiện đã có một số cơ sở nghiên cứu chẩn đoán đột biến BRCA1/2 ở bệnh nhân ung

thư vú bằng phương pháp giải trình tự Sanger, nhưng vẫn còn nhiều hạn chế do kích thước hai gen này khá lớn và đột biến rải rác khắp toàn bộ hai gen [9, 10]. Bên cạnh đó, để phân tích tổng thể các đột biến xảy ra trên hai gen này, Sanger và phương pháp khuếch đại đầu dò nối đa mồi (multiplex ligation-dependent probe amplification – MLPA) cần được kết hợp, nhưng điều này không có lợi về mặt chi phí cũng như thời gian giữa các lần chẩn đoán để đưa ra quyết định điều trị kịp thời. Do đó, hiện chưa có dữ liệu nào đáng tin cậy tại Việt Nam về tình trạng đột biến BRCA1/2 trong quần thể ung thư buồng trứng nhằm hỗ trợ cho điều trị. Ngoài ra, các nghiên cứu chỉ dùng mẫu máu bệnh nhân để xét nghiệm. Như thế, chỉ ghi nhận được tỉ lệ đột biến dòng mầm mà bỏ sót tỉ lệ đột biến dòng sinh dưỡng và vật liệu di truyền từ những mẫu này thường có chất lượng cao. Trong khi đó, phần lớn mẫu sinh phẩm lâm sàng mô u dùng cho tầm soát đột biến dòng sinh dưỡng lại là những mẫu mô vùi nén (formalin-fixed paraffin-embedded – FFPE). DNA phân lập từ những mẫu này thường bị giới hạn do bị phân mảnh và có chất lượng không tốt do hiện tượng khử amin hóa cũng như hiện tượng liên kết chéo hình thành trong suốt giai đoạn cố định với formalin [15].

Với sự tiến bộ vượt bậc của khoa học và công nghệ, kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới được đề xuất như là phương án thay thế hữu hiệu và khả thi cho phát hiện biến thể ở hai gen này. Để vượt qua những hạn chế gặp phải trong khi phân tích với mẫu mô vùi nén, bộ kit Oncomine BRCA Research Assay được sử dụng kết hợp với xử lý DNA mẫu bằng uracil-DNA glycosylase sau tách chiết nhằm loại bỏ những biến thể giả (artifacts) xuất hiện do hiện tượng khử amin. Bên cạnh đó, kit Oncomine BRCA còn chứa các đoạn mồi chứng nội (internal control primer amplicons); những đoạn mồi này, cùng với thuật toán tin sinh, cho phép phân tích các biến thể thêm hoặc mất đoạn lớn (copy number variant – CNV) mà không cần tới hai phương pháp khác nhau như đã yêu cầu. Quy

trình chẩn đoán tích hợp hai trong một cho thấy lợi thế không những về mặt thời gian mà còn cả chi phí trong khi vẫn có thể phân tích tổng thể sự thay đổi xảy ra trên hai gen; gồm các đa hình đơn nucleotide (SNV), thêm hoặc mất đoạn nhỏ (indels) và thêm hoặc mất đoạn lớn (CNV) [14]. Xuất phát từ cách nhìn nhận đó, chúng tôi bước đầu tiến hành khảo sát tình trạng đột biến ở hai gen này trong quần thể bệnh nhân ung thư buồng trứng dạng biểu mô bằng máy giải trình tự personal genome machine (PGM).

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Nghiên cứu này đã nhận được “Chấp thuận của Hội Đồng Đạo Đức trong nghiên cứu y sinh học – Đại học Y Dược TPHCM – số 247/ĐHYD-HĐ ngày 31/07/2017”. Đối tượng nghiên cứu gồm 11 mẫu mô vùi nén (formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples) của 11 bệnh nhân có độ tuổi trên 18, được thu nhận từ bệnh viện Từ Dũ từ năm 2014 đến 2018 và được chẩn đoán giải phẫu bệnh theo tiêu chuẩn của WHO. Số mẫu này sau đó đã được một bác sĩ giải phẫu bệnh độc lập và có uy tín kiểm chứng lại.

2.2 Phương pháp

Tách chiết DNA và xử lý với UDG

DNA bộ gen được phân lập từ 11 mẫu mô vùi nén bằng kit GenJET FFPE DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Những lát cắt từ mẫu mô vùi nén được loại bỏ paraffin bằng cách đưa lên nhiệt độ cao (65 °C) và được ủ cùng với enzymes proteinase K để ly giải DNA bộ gen ra khỏi tế bào. Liên kết ngang của DNA tiết ra được phá vỡ (giữa DNA-DNA, DNA-protein, DNA-paraffin) bằng cách gia nhiệt lên 90 °C. Các thành phần không mong muốn sau đó được loại bỏ ở bước rửa; DNA bộ gen còn lại trên cột được thu nhận bằng dung dịch rửa giải. Sau khi tinh sạch,

nồng độ DNA được xác định bằng Qubit® 4.0 fluorometer.

DNA sau khi thu nhận được xử lý với uracil-DNA glycosylase (New England Biolabs) để loại bỏ những đột biến dương tính giả gây ra do hiện tượng khử amin ở cytosine. Mẫu được ủ với enzyme này ở 37 °C trong một giờ, sau đó enzyme được loại bỏ bằng phương pháp phenol/chloroform/isoamyl alcohol theo tỉ lệ 25:24:1 và được thu nhận lại bằng phương pháp tủa với ethanol và muối.

Xây dựng thư viện DNA và giải trình tự

Sau khi tinh sạch DNA, mẫu được pha loãng về 5 ng/μL và tiến hành multiplex PCR cùng với hai mẫu đối chứng bằng Oncomine BRCA Research Assay (Thermo Fisher Scientific). Hai mẫu đối chứng, một đại diện cho dòng mầm (BRCA Germline I (gDNA)) và một đại diện cho dòng sinh dưỡng (BRCA Somatic Multiplex I (gDNA)), là DNA bộ gen có nguồn gốc từ những dòng tế bào mang những biến thể đã biết với những tần suất khác nhau mua từ Horizon (Cambridge, UK). Assay này gồm hai hỗn hợp mồi (pool 1 và pool 2) tách biệt, tức là có hai phản ứng multiplex PCR cho mỗi mẫu. Phản ứng multiplex PCR với mồi của pool 1 gồm: 2 μL 5X Ion Ampliseq HiFi Mix, 2 μL Oncomine BRCA Pool 1, 2 μL DNA bộ gen và 4 μL nước; và pool 2 gồm: 2 μL 5X Ion Ampliseq HiFi Mix, 2 μL Oncomine BRCA Pool 2, 2 μL DNA bộ gen và 4 μL nước. Chương trình chu kỳ luân nhiệt cho phản ứng multiplex PCR: 99 °C trong 2 phút, theo sau là 21 chu kỳ ở 99 °C trong 15 giây và 60 °C trong 4 phút; sau cùng mẫu được giữ ở 10 °C. Amplicon (những đoạn DNA) thu được từ phản ứng multiplex được xử lý với FuPa reagent để cắt bỏ đi một phần trình tự primer và phosphoryl hóa amplicon khi ủ ở 50 °C trong 10 phút, tiếp đến là 55 °C trong 10 phút và sau cùng là 60 °C trong 20 phút. Để giải trình tự cùng lúc nhiều mẫu trên cùng một chip, thư viện DNA của

mỗi mẫu được gắn với một trình tự nhận biết (barcode) được cung cấp trong kit Ion Xpress Barcode Adaptor 1 to 16 Kit (Thermo Fisher Scientific). Amplicon nối P1 Adaptor và Ion Xpress Barcode theo chương trình nhiệt là 22 °C trong 30 phút, 68 °C trong 5 phút và 72 °C trong 5 phút. Thư viện amplicon sau khi nối adaptor/barcode được tinh sạch bằng AMP XP Reagent (Thermo Fisher Scientific). Thư viện tinh sạch được định lượng bằng Qubit® 4.0 fluorometer sử dụng kit Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific), sau đó pha loãng mẫu về 100 pmol/L và kết hợp thư viện theo tỉ lệ tương đương cho mỗi mẫu.

Tiếp theo, mẫu được tiến hành PCR hệ phân tán (emulsion PCR) với máy Ion OneTouch 2 và bộ kit Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit – 200 (Thermo Fisher Scientific), vận hành máy theo sự chỉ dẫn của hãng. Hạt ISP dương tính (Template-positive Ion Sphere Particles) được làm giàu bằng hạt Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads trên máy OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific). Hạt ISP tinh sạch sau đó được đưa lên chip 318. Giải trình tự gen được tiến hành trên máy Personal Genome Machine (PGM) sử dụng kit Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sử dụng dòng chảy 500 lần (500-flow runs).

Phân tích dữ liệu

Dữ liệu trình tự được xử lý bằng phần mềm Ion Torrent Software vận hành trên Ion Torrent Server (Thermo Fisher Scientific). Sơ đồ vận hành gồm xử lý tín hiệu, phát hiện base (base calling), ấn định chỉ số chất lượng, cắt adaptor, loại bỏ sản phẩm trùng lặp (PCR duplicate removal, hoặc demultiplexing), sắp giống cột các trình tự (read) thu được đến bộ gen tham khảo H19 (human genome 19 reference), kiểm soát chất lượng sắp giống cột, phân tích độ phủ và phát hiện biến thể (variant calling). Phân tích độ phủ và phát hiện biến thể được thực hiện bằng phần mềm Torrent Variant Caller plugin software (Thermo Fisher

Scientific). Thông số được thiết lập cho phần mềm Variant Caller với mức độ nghiêm ngặt cao cho phát hiện đột biến dòng sinh dưỡng. Phần phân tích biến thể tiếp tục được thực hiện bằng phần mềm Ion Reporter software (Thermo Fisher Scientific). Phần mềm này phân loại biến thể thành những loại: thay thế một nucleotide (single nucleotide variation – SNV), thay thế đồng thời nhiều nucleotide kế cận nhau (multiple nucleotide polymorphism – MNP), thêm hoặc mất đoạn nhỏ (insertions hoặc deletions – Indels), thêm hoặc mất đoạn lớn với ít nhất 1 exon trở lên (copy number variation – CNV), hoặc không đột biến (No calls). Dữ liệu giải trình tự tại những vị trí nghi ngờ được kiểm tra trực quan nhờ công cụ Integrative Genomics Views – IGV (Broad Institute). Biến thể được chú thích theo danh pháp được sử dụng bởi Human Genome Variation Society và được xem là biến thể có hại (deleterious) nếu chúng được ghi nhận là gây bệnh (pathogenic) hoặc rất có thể gây bệnh (likely pathogenic) như trong cơ sở dữ liệu ClinVar (đối với đột biến dòng mầm) và cơ sở dữ liệu COSMIC (đối với đột biến dòng sinh dưỡng). Những đột biến missense, nonsense và frameshift indels, mặc dù không được ghi nhận hoặc được chú thích chưa rõ ý nghĩa (uncertain significance), được coi là gây bệnh nếu chúng cắt ngắn những domain chức năng của protein.

Giải trình tự Sanger

Đột biến gây bệnh được xác nhận lại bằng giải trình tự Sanger. DNA mẫu có đột biến được khuếch đại với cặp mồi thích hợp tại những vị trí đột biến gây bệnh. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự được thực hiện với BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies) và đem phân tích sau đó trên máy ABI 3500 (Applied Biosystems).

3 Kết quả

3.1 Mẫu mô do một bác sĩ độc lập kiểm chứng

Việc sử dụng tất cả mẫu mô vùi nén cho nghiên cứu này đều có sự đồng thuận từ phía bệnh nhân. Mẫu mô được nhuộm với hematoxylin – eosin (HE) và được một bác sĩ giải phẫu bệnh thứ hai xác nhận các khối mô vùi nén đều chứa từ 70% tế bào ung thư trở lên.

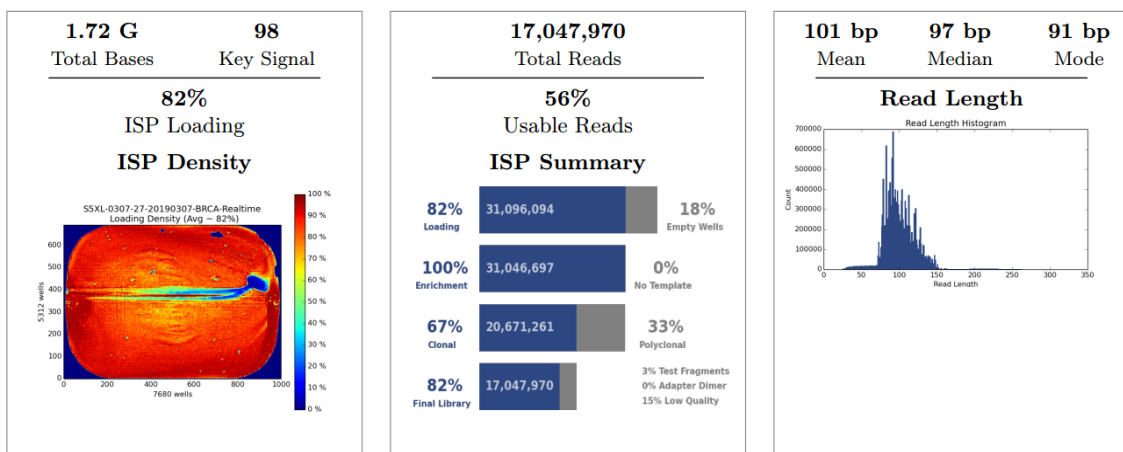
3.2 Tách chiết và xây dựng thư viện

Tách chiết DNA thành công ở cả 11 mẫu. Sau khi có nồng độ DNA, mỗi mẫu được pha loãng về 5 ng để chạy multiplex PCR. DNA từ 11 mẫu cùng với hai mẫu đối chứng được khuếch đại thành công với phản ứng multiplex PCR và lượng DNA thư viện thu được sau tinh sạch đủ dùng để giải trình tự.

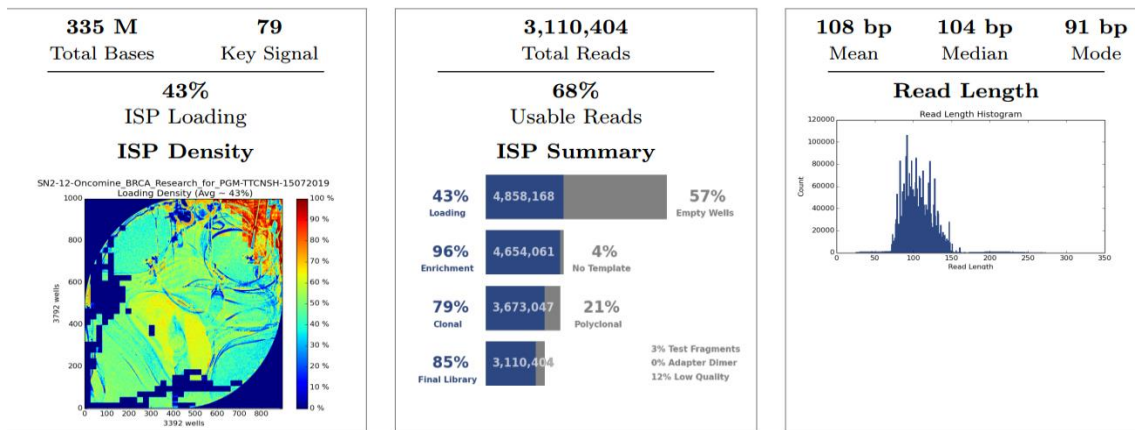
3.3 Thông số giải trình tự

Mười một mẫu được chạy giải trình tự trên chip 318 kèm hai mẫu đối chứng (somatic,

germline). Vì số lượng mẫu lớn hơn tám trong khi một chip chỉ chạy được tối đa tám mẫu theo khuyến cáo của hãng nên chúng tôi chia làm hai lần chạy. Chip 1 gồm các mẫu: HGOC-2, HGOC-3, HGOC-5, HGOC-13, HGOC-14 và HGOC-16; và chip 2 gồm: HGOC-7, HGOC-23, HGOC-24, HGOC-25 và HGOC-26. Trong đó đối với chip 1, phần trăm đưa mẫu lên chip là 82% (ISP loading), tức có 31.096.094 giếng chứa hạt ISP. Số lượng read có thể được sử dụng cho phân tích là 17.047.970 read và kích thước trung bình (mean) của read là 101 bp, trung vị (median) là 97 bp và yếu vị (mode) là 91 bp – yếu vị là những read với kích thước 91 bp có số lượng nhiều nhất trong bộ dữ liệu thu được (Hình 1). Đối với chip 2, phần trăm đưa mẫu lên chip là 43%, gồm 4.858.168 giếng chứa hạt ISP, số lượng read có thể sử dụng cho phân tích 3.110.404 và kích thước trung bình (mean) là 108 bp, trung vị (median) là 104 bp và yếu vị (mode) là 91 bp (Hình 2).



Hình 1. Tóm tắt thông số lần chạy trên chip 1



Hình 2. Tóm tắt thông số lần chạy trên chip 2

Ở chip 1, mẫu HGOC-2, HGOC-3, HGOC-5, HGOC-13, HGOC-14, HGOC-16, mẫu đối chứng dòng mầm và mẫu đối chứng dòng sinh dưỡng đều được gắn với barcode với tên lần lượt tương ứng với IonXpress-002, IonXpress-003, IonXpress-005, IonXpress-006, IonXpress-007, IonXpress-009, IonXpress-011 và IonXpress-012. Trên chip 2, HGOC-7, HGOC-23, HGOC-24, HGOC-25, HGOC-26 và đối chứng dòng sinh dưỡng được gắn barcode với tên IonXpress-004, IonXpress-008, IonXpress-009, IonXpress-010, IonXpress-011 và IonXpress-012 tương ứng. Các mẫu đều có độ phủ 20× đạt 100% (không có trong hình) và độ sâu trung bình (mean depth) mỗi mẫu đều từ 1000× trở lên ở cả hai chip. Các mẫu có phần trăm sắp giống cột trùng mục tiêu (on target) đều trên 85%, phù hợp theo khuyến cáo của hãng đưa ra. Tuy nhiên, mẫu HGOC-3 có độ đồng nhất (uniformity) thấp với chỉ

68,05% và mẫu HGOC-7 (264.130), HGOC 16 (349.509) và HGOC-24 (263.994) có số lượng read được sắp giống cột đến trình tự tham khảo (mapped read) thấp trong khi theo khuyến cáo là trên 500.000 read. Hai mẫu đối chứng có chất lượng tốt với độ phủ trùng mục tiêu và độ đồng nhất đều lớn hơn 98% (Hình 3 và Hình 4).

Trong số các biến thể thu được như trong phụ lục 1 (chip 1) và phụ lục 2 (chip 2), mẫu HGOC-26 có một biến thể gây bệnh, nonsense, được phát hiện nằm trên gen BRCA1. Biến thể này theo Clinvar được xem là biến thể có hại, c.5314C>T; p.Arg1772Ter, là đột biến điểm đưa codon stop vào vị trí axit amin 1772 cắt ngắn protein (Genbank: NM_007300.3, exon 20). Độ phủ (coverage) tại vị trí này là 1773× và tần suất xuất hiện của biến thể này là 62,89%.

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
IonXpress_002	Sample 2	4,811,656	97.74%	19,246	88.96%
IonXpress_003	Sample 3	2,417,448	87.45%	8,318	68.05%
IonXpress_005	Sample 5	934,300	97.54%	3,646	75.57%
IonXpress_006	Sample13	2,048,596	92.77%	7,586	75.69%
IonXpress_007	Sample 14	1,092,572	97.93%	4,381	87.34%
IonXpress_009	Sample 16	349,509	96.92%	1,356	77.47%
IonXpress_011	Germline control	2,747,182	99.28%	12,286	99.79%
IonXpress_012	somatic control	2,373,005	99.22%	10,599	99.54%

Hình 3. Thông số kết quả cho mỗi mẫu có trên chip 1

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
lonXpress_004	Sample 7	264,130	96.70%	1,083	94.36%
lonXpress_008	Sample 23	953,085	99.00%	4,167	99.46%
lonXpress_009	Sample 24	263,994	97.52%	1,101	98.62%
lonXpress_010	Sample 25	486,944	98.87%	2,086	98.51%
lonXpress_011	Sample 26	490,995	98.72%	2,111	98.43%
lonXpress_012	Somatic	606,059	98.75%	2,745	99.99%

Hình 4. Thông số kết quả cho mỗi mẫu có trên chip 2

Để tăng độ tin cậy cho quy trình, hai mẫu đối chứng được tiến hành chạy cùng bắt đầu từ bước khuếch đại đa mồi với Oncomine BRCA Research Assay. Hai mẫu đối chứng này chứa những biến thể đã được xác định trước với tần suất xuất hiện nhất định như hãng cung cấp. Mẫu đối chứng đại diện cho dòng sinh dưỡng gồm 13 biến thể đã biết với những tần suất khác nhau, gồm 7,5; 10; 15; 32,5; 40 và 100%; và 13 biến thể đại diện cho dòng mầm với tần suất là 0, 50 và 100% (Bảng 1&2).

Kết quả giải trình tự cho thấy tất cả các biến thể trong mẫu chứng đều được xác định ở tần suất quan sát thực nghiệm. Trong mẫu chứng dòng mầm, năm biến thể trên gen BRCA1 và bốn biến thể trên gen BRCA2 đều được phát hiện trong khi bốn biến thể với tần suất 0% không được phát hiện như trong Bảng 1. Tương tự, ở mẫu chứng dòng sinh dưỡng, 13 biến thể với sáu biến thể trên gen BRCA1 và bảy biến thể trên gen BRCA2 tất cả đều được phát hiện ở tần suất thực nghiệm như trong Bảng 2.

Bảng 1. Mẫu chứng đại diện cho dòng mầm

Nhiễm sắc thể	Tọa độ trên bộ gen	Gen	Biến thể	Tần suất alen theo hãng, %	Tần suất quan sát thực nghiệm, %
17	41223094	BRCA1	S1613G	50	56,48
17	41244000	BRCA1	K1183R	50	53,96
17	41245090	BRCA1	K820E	50	50,8
17	41234451	BRCA1	R1443STOP	0	0
17	41246245	BRCA1	D435Y	50	45,35
17	41244936	BRCA1	P871L	100	100
13	32906480	BRCA2	N289H	50	61,29
13	32929387	BRCA2	V2466A	100	100
13	32911463	BRCA2	N991D	50	41,18
13	32913558	BRCA2	K1691fs	0	0
13	32913836	BRCA2	N1784fs	50	52
13	32912750	BRCA2	D1420Y	0	0
13	32937354	BRCA2	I2675fs	0	0

Chú thích: Cột “nhiễm sắc thể – NST” chỉ ra NST 17 là nơi tồn tại của gen BRCA1 và NST 13 là của gen BRCA2. Cột “Tọa độ trên bộ gen” chỉ vị trí biến thể trên bộ gen tham chiếu; cột “Gen” là tên gen mục tiêu. Cột “Biến thể” liệt kê các biến thể khác nhau có trong mẫu chứng, với phương thức mã hóa ‘axit amin tham chiếu – vị trí của axit amin – axit amin biến đổi thành’. “Tần suất alen theo hãng” là tần suất biến thể về mặt lý thuyết do hãng cung cấp. Cuối cùng, “Tần suất quan sát thực nghiệm” là tần suất mà chúng tôi quan sát được cho mỗi biến thể sau khi giải trình tự.

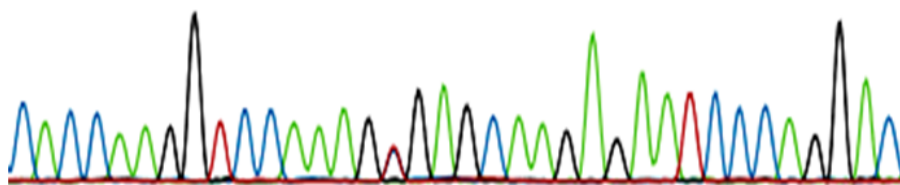
Bảng 2. Mẫu chứng đại diện cho sinh dưỡng

Nhiễm sắc thể	Tọa độ trên bộ gen	Gen	Biến thể	Tần suất alen theo hăng, %	Tần suất quan sát thực nghiệm, %
17	41223094	BRCA1	S1613G	7,5	5,4
17	41244000	BRCA1	K1183R	7,5	7,1
17	41245090	BRCA1	K820E	7,5	5
17	41234451	BRCA1	R1443STOP	32,5	23,5
17	41246245	BRCA1	D435Y	7,5	6,4
17	41244936	BRCA1	P871L	15	13,6
13	32906480	BRCA2	N289H	7,5	6,4
13	32929387	BRCA2	V2466A	100	100
13	32911463	BRCA2	N991D	7,5	4,7
13	32913558	BRCA2	K1691fs	32,5	28,7
13	32913836	BRCA2	N1784fs	40	33,8
13	32912750	BRCA2	D1420Y	32,5	27,9
13	32937354	BRCA2	I2675fs	10	8,6

Chú thích: Cột “nhiễm sắc thể – NST” chỉ ra NST 17 là nơi tồn tại của gen BRCA1 và NST 13 là của gen BRCA2. Cột “Tọa độ trên bộ gen” chỉ vị trí biến thể trên bộ gen tham chiếu; cột “Gen” là tên gen mục tiêu. Cột “Biến thể” liệt kê các biến thể khác nhau có trong mẫu chứng, với phương thức mã hóa ‘axit amin tham chiếu – vị trí của axit amin – axit amin biến đổi thành’. “Tần suất alen theo hăng” là tần suất biến thể về mặt lý thuyết do hăng cung cấp. Cuối cùng, “Tần suất quan sát thực nghiệm” là tần suất mà chúng tôi quan sát được cho mỗi biến thể sau khi giải trình tự.

3.4 Xác nhận kết quả bằng giải trình tự Sanger

Biến thể c.5314C>T; p.Arg1772Ter đã được xác minh lại bằng giải trình tự Sanger (Hình 5).



Bình thường	<u>CAC</u>	<u>CAA</u>	<u>GGT</u>	<u>CCA</u>	<u>AAG</u>	<u>CGA</u>	<u>GCA</u>	<u>AGA</u>	<u>GAA</u>	<u>TCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GAC</u>
	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778
	His	Gln	Gly	Pro	Lys	Arg	Ala	Arg	Glu	Ser	Gln	Asp
Đột biến	<u>CAC</u>	<u>CAA</u>	<u>GGT</u>	<u>CCA</u>	<u>AAG</u>	<u>TGA</u>	<u>GCA</u>	<u>AGA</u>	<u>GAA</u>	<u>TCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GAC</u>
	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778
						Stop						

Hình 5. Kết quả đột biến c.5314C>T; p.Arg1772Ter được xác nhận lại bằng giải trình tự Sanger. Đột biến này làm thay đổi axit amin arginine thành codon stop, như được đóng khung, tại vị trí axit amin 1772.

4 Thảo luận

BRCA1/2 là hai gen ức chế khối u, đóng vai trò quan trọng trong con đường sửa chữa đứt gãy mạch đôi DNA. Người mang đột biến một trong hai gen này ở trạng thái dị hợp tử thường có nguy cơ cao mắc ung thư buồng trứng cùng các loại ung thư khác do dễ phát sinh đột biến mất chức năng trên gen còn lại. Một điều đáng lưu ý là bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng với đột biến BRCA1/2 có lợi khi điều trị với thuốc PARPi. Bên cạnh tình trạng hiện chưa có cơ sở dữ liệu nào đáng tin cậy để hướng dẫn cho điều trị với thuốc PARPi, nhiều nền tảng công nghệ giải trình tự gần đây liên tục được đưa ra thị trường với nhiều tính năng ưu việt về tốc độ, độ chính xác, giá thành, thông lượng giải trình tự, cũng như độ phân giải đến từng base làm cho nó ngày càng trở nên phù hợp hơn với những ứng dụng cho chẩn đoán và điều trị. Ngoài ý nghĩa về mặt điều trị, việc phát hiện đột biến dòng mầm ở người bệnh còn có ý nghĩa về mặt phòng ngừa đối với các thân nhân của họ. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành khảo sát tỉ lệ đột biến BRCA1/2 trong quần thể ung thư biểu mô buồng trứng ở người Việt Nam. Dữ liệu chúng tôi xác nhận quy trình giải trình tự dựa vào Oncomine BRCA Research Assay kết hợp với nền tảng giải trình tự Ion Torrent PGM có hiệu quả cao cho phát hiện đột biến ở hai gen BRCA1/2 sử dụng DNA có nguồn gốc từ mẫu mô vùi nén trong thực hành lâm sàng thường quy.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm panel giải trình tự thương mại sẵn trên một lượng DNA nhỏ được tinh sạch từ mẫu mô vùi nén FFPE để đánh giá công nghệ này trong các ứng dụng lâm sàng. Phân tích được tiến hành trên 11 mẫu mô vùi nén và đã xác định được một đột biến gây bệnh (1/11 bệnh nhân, 9,1%), c.5314C>T; p.Arg1772Ter, xảy ra trên gen BRCA1 ở mẫu HGOC-26. Đột biến này còn được biết đến với cái tên BRCA1:c.5251C>T (p.Arg1751Ter) (Genbank: NM_007294.3), là đột biến điểm thay thế arginine

thành codon stop (CGA>TGA) và được cho là gây mất chức năng protein thông qua cơ chế cắt ngắn protein hoặc thông qua thoái hóa mRNA do đột biến vô nghĩa (nonsense-mediated mRNA decay). Nó đã được xác định ở hơn 50 bệnh nhân (Breast Cancer Information Core – BIC) mắc các loại ung thư khác nhau như ung thư buồng trứng, ung thư vú (PMID: 9361038, 21324516, 24010542, 21232165, 25428789) và ung thư tuyến tiền liệt (PMID: 27433846) [11]. Tần suất của đột biến này trong quần thể chung là khá thấp, ở mức 0,00001 (3/251492, GnomAD_exome) [12]. Đối với các mẫu HGOC-3, HGOC-7, HGOC-16, HGOC-24, mặc dù các thông số kết quả không đạt tiêu chí như đã đề ra, nhưng chúng tôi xem xét độ phủ 100× ở mỗi mẫu (lớn hơn 90% cho bốn mẫu (không có trong hình)) và tạm chấp thuận kết quả với độ phủ thấp cho các phân tích biến thể sau đó.

Để đánh giá độ tin cậy của quy trình, chúng tôi dựa trên khả năng phát hiện các biến thể dòng mầm và dòng sinh dưỡng có trong hai mẫu chúng được giải trình tự kèm theo mỗi chip. Kết quả là tất cả các biến thể đều được phát hiện (Bảng 1 và 2). Hơn nữa, các biến thể âm tính thuộc hai mẫu chúng (không được liệt kê trong bảng) cũng hoàn toàn không được phát hiện như hãng Horizon đã khai báo.

Phạm Duy Hiến và cs. đã phát hiện ra ba biến thể trên gen BRCA1 trong quần thể ung thư vú gồm: NG_005905:g.160920C>G, NG_005905:g.93957T>C và 5382insC (NM_007294:c.5266dupC) và không biến thể nào được phát hiện trên gen BRCA2 [9]. Trong một nghiên cứu khác khảo sát trên 259 bệnh nhân mắc ung thư vú người Việt Nam, Ginsburg và cs. đã tìm thấy hai biến thể gây bệnh BRCA1:185insA (NM_007294.3:c.66dupA) và BRCA2:4706delAAAG (NM_000059.3:c.4474_4477AAAG) [13]. Tất cả những biến thể này đều không giống với biến thể chúng tôi phát hiện, do đó chúng tôi có thể kết luận hiện nay chưa công bố nào tại Việt Nam về đột biến này, BRCA1:c.5251C>T (p.Arg1751Ter), trong quần thể người Việt Nam

nói chung và trong quần thể bệnh nhân ung thư buồng trứng nói riêng.

Với bộ kit Oncomine BRCA Research Assay, quy trình phân tích bao phủ 100% trình tự mã hóa cho các exome của hai gen BRCA1/2 cộng thêm trung bình 63 bp intron tại vị trí giáp biên giữa exome-intron. Assay này mang lại hiệu suất cao, cho kết quả nhất quán, đáng tin cậy và nhanh chóng với chất lượng cao từ mỗi mẫu. Quy trình giải trình tự của chúng tôi đạt hiệu quả cao đối với những biến thể SNV, indels và MNP [14]. Đối với những biến thể homopolymer nằm trong khu vực mã hóa cho protein, biến thể 8-mer không được phát hiện và khả năng phát hiện biến thể 6-mer thấp, trong khi đó khả năng phát hiện biến thể 7-mer lại cao [14]. Để phát hiện những biến thể CNV, một thuật toán tin sinh học mới, phiên bản w3.0, được dùng để phát hiện mất đoạn hoặc lặp đoạn lớn xảy ra trong vùng của hai gen BRCA (large intragenic rearrangement) – độ nhạy cho phiên bản này là 94% theo như khảo sát [14]. Để có thể phát hiện đột biến mất đoạn và lặp đoạn lớn một cách toàn vẹn hơn, phương pháp khuếch đại đầu dò nối đa môi hiện nay là tiêu chuẩn vàng cho mục đích này, nhưng trong giới hạn của nghiên cứu chúng tôi không sử dụng phương pháp này.

Dữ liệu hiện tại của chúng tôi vẫn còn ít để có thể khẳng định quy trình của chúng tôi có đủ độ chuyên biệt và độ đặc hiệu và nó phù hợp cho những ứng dụng trong lâm sàng. Chúng tôi kiến nghị gia tăng số lượng mẫu, xác nhận lại kết quả bằng ngoại kiểm và khảo sát thêm về độ tái lập kết quả thí nghiệm. Ngoài ra, việc giải trình tự mẫu máu từ các bệnh nhân là cần thiết để xác minh liệu biến thể có nguồn gốc dòng mầm hay dòng sinh dưỡng.

5 Kết luận

Chúng tôi đã ứng dụng thành công phương pháp giải trình tự gen Ion Torrent trong xác định và khảo sát tỷ lệ đột biến BRCA1/2 trên một nhóm

nhỏ bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng. Quy trình của chúng tôi, với bộ kit Oncomine BRCA Research Assay và xử lý DNA mẫu bằng Uracil DNA glycosylase, có thể vượt qua những mặt hạn chế gặp phải trong phân tích mẫu mô vùi nén. Phương thức này thì hiệu quả về mặt thời gian cũng như chi phí cho sàng lọc toàn bộ những biến thể di truyền trên hai gen BRCA, nhưng cần xác minh thêm về độ nhạy, độ đặc hiệu và độ tái lập trước khi có thể đưa vào lâm sàng. Chúng tôi cũng đề xuất gia tăng số lượng mẫu cũng như xác nhận thêm nhằm tăng cường độ tin cậy cho bộ dữ liệu trước khi có thể áp dụng quy trình này cho chẩn đoán và điều trị bệnh.

Thông tin tài trợ: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Tp. HCM, Việt Nam theo hợp đồng số 223/2017/HĐ-SKHHCN

Tài liệu tham khảo

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Nguyễn Chấn Hùng, Lê Hoàng Minh, Phạm Xuân Dũng, Đặng Huy Quốc Thịnh. Giải Quyết Gánh Nặng Ung Thư Cho Thành Phố Hồ Chí Minh. *Y Học Tp Hồ Chí Minh*. 2008:12.
3. Brett MR, Jennifer BP, Thomas AS. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine*. 2017;14(1):9-32.
4. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
5. Moschetta M, George A, Kaye S, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27(8):1449-1455..
6. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1382-1392.

7. Lee J, Hays JL, Annunziata CM, Noonan AM, Minasian L, Zujewski JA, et al. Phase I/Ib Study of Olaparib and Carboplatin in BRCA1 or BRCA2 Mutation-Associated Breast or Ovarian Cancer With Biomarker Analyses. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(6).
8. Balasubramaniam S, Beaver JA, Horton S, Fernandes LL, Tang S, Horne HN, et al. FDA Approval Summary: Rucaparib for the Treatment of Patients with Deleterious BRCA Mutation-Associated Advanced Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(23): 7165-7170.
9. Hiền PD, Tờ TV, Định NV/Việt Nam. Nghiên cứu xác định đột biến gen BRCA1 và BRCA2 trong ung thư vú ở phụ nữ Việt Nam. Hà Nội: Bộ Khoa học Công nghệ, Bệnh viện K; 2010.
10. Chính LTM, Ban ĐD, Châu HMC. Kết quả nghiên cứu đột biến gen BRCA1/BRCA2 ở 24 bệnh nhân ung thư vú. Trường Đại học Dược Hà Nội; 2004.
11. National Center for Biotechnology Information. ClinVar [internet]; [VCV000055480.4]; 2016 [cited 2019 Sept 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000055480.4>
12. National Center for Biotechnology Information. sbSNP [internet]; [rs80357123]. [cited 2019 Sep 12]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs80357123#seq_hash
13. Ginsburg O, Dinh N, To T, Quang L, Linh N, Duong B, Royer R, Llacuachqui M, Tulman A, Vichodez G, Li S, Love R, Narod S. Family history, BRCA mutations and breast cancer in Vietnamese women. *Clinical Genetics*. 2010;80(1):89-92.
14. OncoPrint BRCA Research Assay. Evaluation of the OncoPrint BRCA Research Assay for variant detection by next-generation sequencing [internet]. [cited 2019 Sep 12]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/Reference-Materials/brca-assay-variant-detection-white-paper.pdf>
15. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization. *Clinical Chemistry*. 2015;61(1):64-71.