

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHTT.2026.007>

TỐI ƯU QUY TRÌNH ALLELE SPECIFIC REAL TIME PCR ĐỊNH LƯỢNG ĐỘ BIẾN *JAK2 V617F*

Vũ Thị Hải Yến^{1,*}, Hà Thị Anh¹, Nguyễn Tuấn Anh², Huỳnh Thị Thu Thảo¹, Ngô Thị Sa Ly¹

¹Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

²Trung tâm Đào tạo và Chẩn đoán Y Sinh học Phân tử - Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Độ biến *JAK2 V617F* là tiêu chuẩn quan trọng trong chẩn đoán và tiên lượng các bệnh tăng sinh dòng tủy, việc phát hiện đột biến ở tần suất alen thấp vẫn còn gặp nhiều khó khăn, đòi hỏi các kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. **Mục tiêu nghiên cứu:** Tối ưu hóa quy trình allele-specific real-time PCR (AS-qPCR) nhằm định lượng chính xác độ biến *JAK2 V617F*. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Phản ứng AS-qPCR sử dụng môi và mẫu dò Taqman để phân biệt ba kiểu gen: hoang dại, đột biến, và hỗn hợp. **Các điều kiện phản ứng:** nhiệt độ lai, nồng độ môi và nồng độ mẫu dò được tối ưu lần lượt. **Kết quả:** Điều kiện tối ưu với nhiệt độ lai 65°C, nồng độ môi 400 nM và mẫu dò 150 nM, độ nhạy bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của allele hoang dại, cho thấy hiện tượng cạnh tranh khuếch đại. **Kết luận:** Quy trình AS-qPCR sau tối ưu là kỹ thuật tin cậy và có thể ứng dụng trong định lượng độ biến *JAK2 V617F*. Cần tiếp tục đánh giá trên mẫu lâm sàng.

Từ khóa: Allele specific realtime PCR, *JAK2 V617F*, đa hồng cầu, tăng sinh tủy

OPTIMIZATION OF ALLELE-SPECIFIC REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION OF *JAK2V617F* MUTATION

Vu Thi Hai Yen, Ha Thi Anh, Nguyen Tuan Anh, Huynh Thi Thu Thao, Ngo Thi Sa Ly

ABSTRACT

Background: *JAK2V617F* mutation is a critical criterion for the diagnosis and prognosis of myeloproliferative neoplasms. Detecting this mutation at low variant allele frequencies remains challenging, necessitating techniques with high sensitivity and specificity. **Objectives:** To optimize an allele-specific real-time PCR (AS-qPCR) assay for the accurate quantification of the *JAK2V617F* mutation. **Materials and Methods:** The AS-qPCR assay utilized specific primers and TaqMan probes to differentiate between three genotypes: wild-type, mutant, and heterozygous/mixed. Reaction conditions, including annealing temperature, primer concentration, and probe concentration, were systematically optimized. **Results:** The optimal reaction conditions were established at an annealing temperature of 65°C, with primer and probe concentrations of 400 nM and 150 nM, respectively. The analytical sensitivity was influenced by the presence of the wild-type allele, indicating a competitive amplification phenomenon between the two templates. **Conclusion:** The optimized AS-qPCR protocol is a reliable technique suitable for the quantification of the *JAK2V617F* mutation. Further validation using clinical samples is required to confirm its diagnostic utility.

Keywords: Allele specific realtime qPCR, *JAK2V617F*, polycythemia vera, myeloproliferative neoplasms

* Tác giả liên hệ: Vũ Thị Hải Yến, Email: yenvth@hiu.vn

(Ngày nhận bài: 04/4/2026; Ngày nhận bản sửa: 10/4/2026; Ngày duyệt đăng: 14/4/2026)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tăng sinh tủy (Myeloproliferative neoplasms - MPN) là nhóm rối loạn ác tính mạn tính phát sinh từ tế bào gốc tạo máu, đặc trưng bởi sự tăng sinh không kiểm soát của một hoặc nhiều dòng tế bào máu trong tủy xương. Các thể bệnh của MPN bao gồm đa hồng cầu (Polycythemia Vera - PV), tăng tiểu cầu nguyên phát (Essential Thrombocythemia - ET), và xơ tủy nguyên phát (Primary Myelofibrosis - PMF). Dù khác nhau về biểu hiện lâm sàng, cả ba thể đều có liên quan mật thiết đến các đột biến gen mắc phải, trong đó phổ biến nhất là đột biến *JAK2* V617F.

Đột biến *JAK2* V617F xảy ra tại vị trí 1849G>T trên exon 14 của gene *JAK2*, dẫn đến thay thế valine bằng phenylalanine tại vị trí amino acid 617. Biến đổi này gây hoạt hóa liên tục con đường truyền tín hiệu JAK/STAT, từ đó thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào máu và mất kiểm soát quá trình biệt hóa [1]. Đột biến này được phát hiện với tần suất rất cao ở bệnh nhân PV khoảng 94.7 - 98%, khoảng 50% - 74% trong ET và PMF khoảng 50%. Sự hiện diện của *JAK2*V617F không chỉ đóng vai trò thiết yếu trong chẩn đoán mà còn có giá trị tiên lượng và định hướng điều trị. Hiện nay, xét nghiệm phát hiện *JAK2* V617F đã trở thành một tiêu chuẩn cận lâm sàng quan trọng trong quy trình chẩn đoán MPN theo hướng dẫn của WHO 2022 và Phân loại đồng thuận Quốc tế 2022 (International Consensus Classification - ICC 2022) [2]. Tuy nhiên, xét nghiệm này chủ yếu được thực hiện dưới dạng định tính. Trong khi đó, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy việc định lượng tải lượng đột biến *JAK2* V617F có thể cung cấp thông tin sâu hơn về đặc điểm sinh học của bệnh, mức độ hoạt hóa bệnh lý và tiên lượng. Nhiều nghiên cứu ghi nhận tải lượng đột biến cao có liên quan đến nguy cơ huyết khối, mức độ xơ hóa tủy và khả năng tiến triển thành bạch cầu cấp. Ngược lại, sự suy giảm tải lượng đột biến có thể phản ánh đáp ứng với điều trị, đặc biệt ở bệnh nhân được điều trị bằng interferon- α hoặc thuốc ức chế JAK [3].

Kỹ thuật Real-time PCR đặc hiệu alen (Allele-Specific Real-time PCR - AS-qPCR) hiện là phương pháp phổ biến cho phép định lượng tải lượng đột biến *JAK2* V617F trong mẫu bệnh phẩm, với độ nhạy cao, chi phí hợp lý và phù hợp triển khai trong điều kiện xét nghiệm tiêu chuẩn tại các cơ sở y tế tuyến trên. So với các kỹ thuật đắt đỏ như giải trình tự thế hệ mới (NGS) hoặc phương pháp PCR kỹ thuật số, mặc dù hai phương pháp này cho độ nhạy và độ chính xác cao hơn nhưng AS-qPCR có ưu thế về chi phí, thời gian thực hiện và tính ứng dụng cao hơn trong thực hành lâm sàng thường quy.

Tại Việt Nam, việc định lượng *JAK2* V617F chưa được triển khai rộng rãi, chủ yếu do thiếu chuẩn hóa quy trình và hạn chế về mặt kỹ thuật. Trong bối cảnh đó, việc xây dựng một quy trình AS-qPCR định lượng *JAK2* V617F tối ưu, có độ nhạy và độ chính xác cao, là yêu cầu cấp thiết nhằm ứng dụng hiệu quả trong công tác chẩn đoán và theo dõi điều trị cho bệnh nhân MPN.

Từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Tối ưu quy trình Allele-Specific Real-time PCR định lượng đột biến *JAK2* V617F” nhằm tối ưu các điều kiện phản ứng làm tiền đề cho việc đánh giá và ứng dụng trong thực hành lâm sàng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Plasmid pUC-GW-Kan chứa đoạn gen vùng exon 14 của gen *JAK2*, bao gồm hai loại trình tự đại diện cho alen hoang dại (*wild-type*) và alen mang đột biến *JAK2* V617F (*mutant-type*) có độ tinh sạch cao ($\geq 95\%$) với độ dài 160bp (6.55×10^{11} bản sao) được cloning và tổng hợp bởi công ty Azenta (Azenta Life Sciences, Hoa Kỳ) với clone ID lần lượt là HB18853-1/Q1236400 và HB18853-2/Q1236403.

Số lượng bản sao của plasmid trong mẫu chuẩn được xác định theo hướng dẫn tại website scienceprimer.com

Một cặp mồi đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại đoạn gen chứa đột biến *JAK2* V617F, kèm theo hai mồi dò TaqMan mang chất phát huỳnh quang khác nhau: FAM cho allele hoang dại và VIC cho allele đột biến 1849G>T. Thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu trình tự chuẩn và khuyến nghị tối ưu phản ứng qPCR của Thermo Fisher Scientific, nhằm đảm bảo độ đặc hiệu và hiệu suất khuếch đại. Trình

tự môi và mẫu dò được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu

Ký hiệu	Trình tự
Môi xuôi	5' - AGCTTTCTCACAAGCATTGGTT - 3'
Môi ngược	5' - CAAAAACAGATGCTCTGAGAAAGG - 3'
Mẫu dò hoang dại	5'-FAM-TAAATTATGGAGTATGTGTCTGT-MGB-3'
Mẫu dò đột biến	5'-VIC-AATTATGGAGTATGTTTCTGTGGA-MGB-3'

Enzym **TaqPath™ qPCR Master Mix** (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) và các nguyên vật liệu, hoá chất, thiết bị phù hợp.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Đây là nghiên cứu thực nghiệm cơ bản nhằm phát triển kỹ thuật mới.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tối ưu phản ứng allele-specific real-time PCR: Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ sinh phẩm TaqPath™ qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ), trong đó các thành phần cơ bản của phản ứng real-time PCR như enzyme Taq polymerase, Mg²⁺, đệm và dNTP đã được nhà sản xuất tối ưu sẵn theo hướng dẫn sử dụng. Trên cơ sở đó, quá trình tối ưu hóa tập trung vào các thông số không được cố định trong bộ kit thương mại, gồm: nhiệt độ lai, nồng độ môi và nồng độ mẫu dò. Việc tối ưu được tiến hành tuần tự theo từng yếu tố, với nguyên tắc thay đổi một thông số trong khi giữ nguyên các yếu tố khác, nhằm đạt được độ đặc hiệu cao cùng hiệu suất khuếch đại tối ưu. Các điều kiện phản ứng và chu trình nhiệt được điều chỉnh phù hợp để xác định tổ hợp thông số tối ưu nhất cho phản ứng real-time PCR định lượng đột biến *JAK2* V617F. Toàn bộ kết quả tối ưu về thành phần và chương trình nhiệt được trình bày tại Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Thành phần phản ứng real-time PCR và các thông số được chọn để tối ưu

Thành phần phản ứng			
STT	Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
1	Môi xuôi	200/300/400	nM
2	Môi ngược	200/300/400	nM
3	Mẫu dò hoang dại	50/100/150	nM
4	Mẫu dò đột biến	50/100/150	nM
5	Ezym TaqPath	5 µL	
6	Nuclease free water	Vừa đủ cho 15µL	
	DNA amplicon	5 µL	

Bảng 3. Chu trình luân nhiệt real time PCR được khảo sát

Chu trình luân nhiệt			
STT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95°C	15:00	1
2	95°C	00:10	40
3	63°C/65°C/66°C	00:10	

Đánh giá tần suất allele đột biến tối thiểu có thể phát hiện được của quy trình: Sử dụng các tổ hợp amplicon hoang dại và đột biến nồng độ khác nhau. Amplicon đột biến được pha loãng bậc 10 thành các nồng độ nhỏ hơn bao gồm 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴. Tương tự, amplicon hoang dại cũng được pha loãng bậc 10 thành các nồng độ 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵. Tiến hành kết hợp từng nồng độ của amplicon đột biến và hoang dại theo tỷ lệ 1:1. Các mẫu hỗn hợp sau đó được đưa vào phản ứng real-

time PCR sử dụng điều kiện tối ưu đã được thiết lập trong các thí nghiệm trước đó. Mỗi phản ứng được lặp lại hai lần để kiểm soát sai số ngẫu nhiên và đánh giá độ lặp lại của quy trình. Tần suất alen đột biến tối thiểu có thể phát hiện được xác định là mức tần suất thấp nhất tại đó đầu dò đặc hiệu cho alen đột biến cho tín hiệu phát hiện được ở tất cả các mức nồng độ DNA đầu vào. Đây là ngưỡng nhạy phân biệt có ý nghĩa để ứng dụng trong phát hiện các dạng đột biến ở trạng thái dị hợp hoặc tỉ lệ thấp trong mẫu lâm sàng.

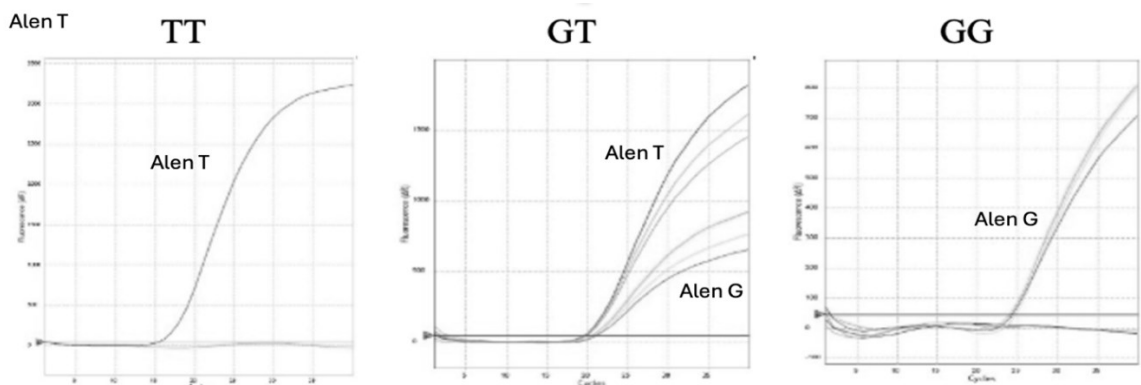
Xử lý số liệu: Số liệu thu thập từ các kết quả nghiên cứu được phân tích thống kê mô tả trên phần mềm Excel 2013, với các giá trị được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD. Phân tích độ nhạy, độ đặc hiệu và độ ổn định của quy trình được thực hiện bằng các phần mềm tích hợp sẵn của hệ thống QUANTGENE 9600 Real-Time PCR Detection System sử dụng trong nghiên cứu.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả tối ưu phản ứng allele specific realtime PCR

3.1.1. Kết quả xác định nhiệt độ lai tối ưu

Sau khi đánh giá kết quả khảo sát nhiệt độ lai của phản ứng AS-qPCR cho thấy khoảng nhiệt độ từ 63°C đến 66°C đều tạo ra tín hiệu khuếch đại phù hợp với kiểu gen. Trong khoảng này, các đường cong khuếch đại thể hiện hình dạng đặc trưng, giá trị Ct ổn định và sự phân tách tín hiệu giữa kiểu gen hoang dại và đột biến được duy trì rõ rệt ở hình 1. Đặc biệt, ở nhiệt độ lai 65°C, tín hiệu khuếch đại đạt giá trị Ct thấp nhất đối với cả allele đột biến và allele hoang dại, đồng thời đảm bảo độ đặc hiệu và độ lặp lại cao giữa các lần thử nghiệm. Trên cơ sở này, 65°C được lựa chọn làm nhiệt độ lai tối ưu cho các phản ứng real-time PCR trong nghiên cứu, nhằm tối đa hóa hiệu suất khuếch đại và khả năng phân biệt chính xác các kiểu gen.



Hình 1. Hình ảnh tín hiệu hoang dại và đột biến thu được ở Ta 65°C

TT: Kiểu gene đồng hợp đột biến, GT: Kiểu gene dị hợp, GG kiểu gene đồng hợp hoang dại

Bảng 4. Kết quả Ct tối ưu nhiệt độ

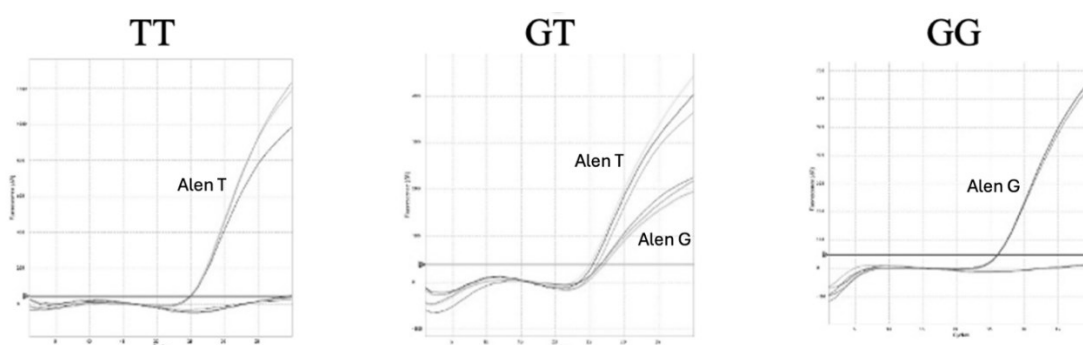
Kiểu gen	63°C		65°C		66°C	
	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
TT	-	16.2	-	15.6	-	18
GT	22.7	21.7	21.1	19.9	28.6	26.3
GG	25.3	-	24.5	-	26.8	-

TT: Kiểu gene đồng hợp đột biến, GT: Kiểu gene dị hợp, GG kiểu gene đồng hợp hoang dại

3.1.2. Kết quả xác định nồng độ môi tối ưu

Kết quả khảo sát nồng độ môi cho thấy, ở cả 3 nồng độ 200 nM, 300 nM và 400 nM đều ghi nhận tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng nền và xác định kiểu gene chính xác cho tất cả các mẫu. Trong đó, nồng độ 400 nM cho giá trị Ct trung bình thấp nhất ở cả hai kênh VIC và FAM, đồng thời duy trì độ ổn định Ct cao hơn so với các nồng độ còn lại trong cả 3 lần thử nghiệm. Do đó, nồng độ 400 nM

được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho phản ứng.



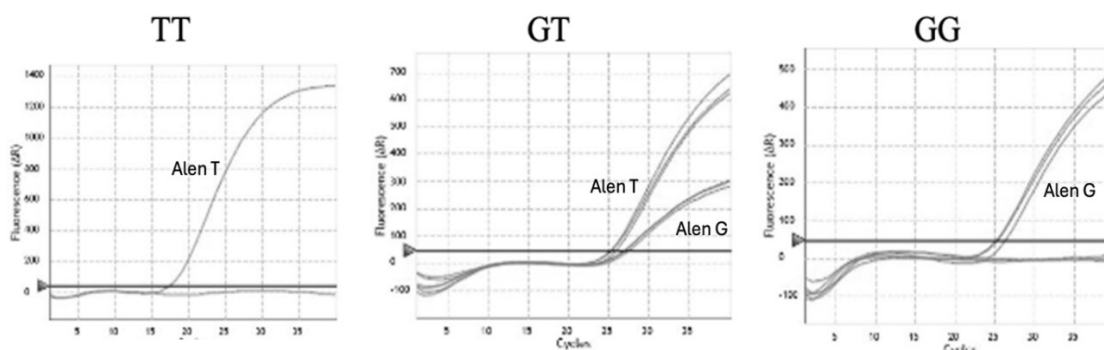
Hình 2. Hình ảnh tín hiệu hoang dại và đột biến thu được ở nồng độ môi 400nM
 TT: Kiểu gene đồng hợp đột biến, GT: Kiểu gene dị hợp, GG kiểu gene đồng hợp hoang dại

Bảng 5. Kết quả Ct tối ưu nồng độ môi

Kiểu gen	200 nM		300 nM		400 nM	
	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
TT	-	18.0	-	17.7	-	18.1
GT	32.5 ± 1.5	25.2 ± 0.2	32.4 ± 1	25.6 ± 0.1	30.5 ± 0.6	25.1 ± 0.1
GG	26.4 ± 0.3	-	26.7 ± 0.1	-	26.1 ± 0.1	-

3.1.3. Kết quả xác định nồng độ probe tối ưu

Kết quả khảo sát nồng độ mẫu dò cho thấy, ở cả hai mức 150 nM và 200 nM, phản ứng real-time PCR đều tạo ra tín hiệu huỳnh quang vượt rõ rệt đường nền và phân biệt chính xác kiểu gen của tất cả các mẫu phân tích. Đường cong khuếch đại thu được ở cả hai nồng độ đều có hình dạng đặc trưng, với giá trị Ct trung bình ổn định giữa các lần lặp lại. So sánh chi tiết cho thấy sự khác biệt về giá trị Ct giữa hai mức nồng độ này không đáng kể, trong khi mức 150 nM vẫn đảm bảo duy trì hiệu suất khuếch đại tương đương với 200 nM. Do vậy, nồng độ 150 nM được lựa chọn làm điều kiện tối ưu, vừa đáp ứng yêu cầu về độ ổn định và đặc hiệu của phản ứng, vừa giúp giảm chi phí tiêu hao sinh phẩm trong quá trình thực hiện xét nghiệm.



Hình 3. Hình ảnh tín hiệu hoang dại và đột biến thu được ở nồng độ mẫu dò 150nM
 TT: Kiểu gene đồng hợp đột biến, GT: Kiểu gene dị hợp, GG kiểu gene đồng hợp hoang dại

Bảng 6. Kết quả Ct tối ưu nồng độ mẫu dò

Kiểu gen	100 nM		150 nM		200 nM	
	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
TT	-	17.7	-	17.62	-	16.8
GT	29.4 ± 0.3	26.5 ± 0.2	27.1 ± 0.3	25.5 ± 0.3	26.5 ± 0.5	25.6 ± 0.1
GG	26.2 ± 0.4	-	25.2 ± 0.1	-	29.1 ± 6.2	-

3.2. Kết quả đánh giá tần suất allele tối thiểu có thể phát hiện của phản ứng

Kết quả Bảng 7 cho thấy tín hiệu FAM (hoang đại) và VIC (đột biến) được ghi nhận rõ ràng và biến thiên Ct phù hợp theo mức độ pha loãng, chứng tỏ phản ứng allele-specific real-time PCR có độ nhạy và độ lặp lại tốt. Ở các nồng độ cao, cả hai tín hiệu đều được phát hiện ổn định với Ct thấp; trong khi ở các mức pha loãng cao, tín hiệu giảm dần hoặc mất, phản ánh giới hạn phát hiện của phương pháp. Đáng chú ý, xuất hiện hiện tượng cạnh tranh giữa hai loại amplicon: khi nồng độ hoang đại cao, tín hiệu đột biến (VIC) có xu hướng tăng Ct hoặc bị ức chế; ngược lại, tín hiệu hoang đại (FAM) ít bị ảnh hưởng hơn khi đột biến chiếm ưu thế. Điều này cho thấy sự hiện diện của allele hoang đại có thể làm giảm độ nhạy phát hiện đột biến, đặc biệt trong các mẫu có tỷ lệ đột biến thấp.

Bảng 7. Kết quả đánh giá tần suất allele đột biến V617F tối thiểu có thể phát hiện của phản ứng

Tín hiệu	Mẫu	MT 10 ⁻¹	MT 10 ⁻²	MT 10 ⁻³	MT 10 ⁻⁴
FAM	WT 10 ⁻⁵	13.7 ± 0.2	14.1 ± 0.2	14.5 ± 0.3	13.6 ± 0.2
	WT 10 ⁻⁶	15.7 ± 0.3	17.4 ± 0.1	16.9 ± 0.1	16.0 ± 0.2
	WT 10 ⁻⁷	20.37 ± 0.2	21.2 ± 0.2	20.8 ± 0.2	20.4 ± 0.3
	WT 10 ⁻⁸	-	24.2 ± 0.2	24.1 ± 0.1	24.7 ± 0.5
	WT 10 ⁻⁹	-	28.7 ± 0.4	27.6 ± 0.5	27.5 ± 0.3
	WT 10 ⁻¹⁰	-	-	-	-
VIC	WT 10 ⁻⁵	-	-	-	-
	WT 10 ⁻⁶	-	-	-	-
	WT 10 ⁻⁷	22.2 ± 0.3	-	-	-
	WT 10 ⁻⁸	21.2 ± 0.1	-	-	-
	WT 10 ⁻⁹	21.1 ± 0.2	27.1 ± 0.2	-	-
	WT 10 ⁻¹⁰	20.3 ± 0.1	25.4 ± 0.3	27.8 ± 0.2	30.3 ± 0.3

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật allele-specific real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan cho thấy khả năng phát hiện hiệu quả đột biến *JAK2* V617F, với độ đặc hiệu cao và thời gian thực hiện ngắn, phù hợp với yêu cầu ứng dụng trong thực hành lâm sàng.

Hiện nay, nhiều phương pháp đã được sử dụng để phát hiện đột biến *JAK2*V617F, bao gồm các kỹ thuật định tính như AS-PCR, ASO-PCR, PCR-ARMS và PCR-RFLP, với độ nhạy dao động từ 0,01% đến 5% và cần thực hiện thêm các bước sau PCR như điện di để phân tích kết quả [4]. Nghiên cứu của Nguyễn Thy Ngọc và cộng sự cho thấy PCR-RFLP có hiệu năng tốt hơn PCR-ARMS và tương đương với giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, theo J. Poody và cộng sự (2006), real-time PCR có độ nhạy vượt trội hơn PCR-RFLP, với khả năng phát hiện đột biến ở mức 0.8% [5]. Real-time PCR được xem là kỹ thuật đáng tin cậy trong phát hiện đột biến nhờ độ nhạy cao và không yêu cầu các bước xử lý sau PCR, từ đó giảm nguy cơ nhiễm chéo. Đặc biệt, các hệ thống real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan đã được phát triển với độ nhạy phân tích đạt khoảng 0.01 - 0.05% [6, 7] và đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận như một phương pháp chẩn đoán trong phòng xét nghiệm [8]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, kỹ thuật này vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi trong khảo sát và định lượng đột biến *JAK2* V617F.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và tối ưu hóa quy trình allele-specific real-time PCR trên mẫu amplicon trước khi triển khai trên mẫu lâm sàng. Trong quá trình tối ưu hóa, chúng tôi nhận thấy phản ứng PCR chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nhiệt độ lai, nồng độ mồi và nồng độ mẫu dò. Về nhiệt độ lai, kết quả thực nghiệm cho thấy 65°C là điều kiện tối ưu cho phản ứng trong nghiên cứu này. Kết quả này có sự khác biệt so với một số nghiên cứu trước, có thể do sự khác nhau về hệ thống thiết bị, hóa chất và thiết kế mồi. Theo Phạm Hùng Vân, phản ứng real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan thường gồm hai giai đoạn chính: Biến tính ở 94 - 95°C và kéo dài ở 60°C [9]. Trong khi đó, E. C. Wolstencroft và cộng sự sử dụng chương trình gồm 50 chu kỳ với nhiệt

độ gắn mỗi 60°C [10], còn Shixiang Zhao và cộng sự áp dụng nhiệt độ lai 55°C [11]. Nồng độ mỗi là yếu tố quan trọng quyết định tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Nồng độ quá cao có thể gây khuếch đại không đặc hiệu và hình thành primer-dimer, trong khi nồng độ quá thấp làm giảm hiệu suất phản ứng. Theo các nghiên cứu trước, nồng độ mỗi thường được khuyến cáo trong khoảng 100 - 500 nM hoặc 100 - 1,000 nM. Trong nghiên cứu này, nồng độ tối ưu được xác định là 400 nM cho mỗi, phù hợp với các nghiên cứu của Wolstencroft (360 nM), Shixiang Zhao (150 nM) và Denys (300 nM). Đối với mẫu dò, nồng độ tối ưu được lựa chọn là 150 nM, nằm trong khoảng khuyến cáo 80 - 200 nM. Các nghiên cứu trước cũng ghi nhận nồng độ mẫu dò dao động từ 80 nM đến 150 nM. Về độ nhạy, kết quả cho thấy khả năng phát hiện đột biến phụ thuộc vào tỷ lệ giữa allele đột biến và allele hoang dại. Khi không có DNA hoang dại, phản ứng có thể phát hiện đột biến ở nồng độ thấp. Tuy nhiên, khi nồng độ DNA hoang dại tăng, độ nhạy giảm đáng kể, cho thấy sự cạnh tranh trong phản ứng khuếch đại. So với các nghiên cứu trước, độ nhạy của phương pháp trong nghiên cứu này chưa đạt mức tối ưu; Wolstencroft ghi nhận khả năng phát hiện ở mức 2.5%, trong khi Lippert báo cáo độ nhạy lên đến 0.2% với hệ thống TaqMan [12]. Từ góc độ ứng dụng, quy trình được tối ưu trong nghiên cứu này có ưu điểm về thời gian thực hiện ngắn (khoảng 2 giờ), quy trình đơn giản và khả năng triển khai trong điều kiện phòng xét nghiệm thường quy. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán và theo dõi các bệnh tăng sinh tủy liên quan đến đột biến *JAK2* V617F.

Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế. Thứ nhất, phương pháp chưa được so sánh trực tiếp với các kỹ thuật có độ nhạy cao hơn như digital PCR. Thứ hai, nghiên cứu mới thực hiện trên mẫu amplicon, do đó cần đánh giá thêm trên mẫu lâm sàng. Cuối cùng, việc định lượng allele burden chưa được thực hiện.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập và tối ưu hóa thành công kỹ thuật allele-specific real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan nhằm phát hiện đột biến *JAK2* V617F trên mẫu amplicon nhân tạo. Quy trình cho thấy độ đặc hiệu cao, thời gian thực hiện ngắn (dưới 2 giờ) và có khả năng phát hiện đột biến ở tần suất alen thấp, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sàng lọc các trường hợp mang đột biến ở mức thấp. Các điều kiện phản ứng tối ưu bao gồm nhiệt độ lai 65°C , nồng độ mỗi 400 nM và nồng độ mẫu dò 150 nM.

Tuy nhiên, độ nhạy của phương pháp bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ giữa allele đột biến và allele hoang dại, cho thấy sự cạnh tranh khuếch đại trong phản ứng. Ngoài ra, nghiên cứu mới được thực hiện trên mẫu amplicon nhân tạo và chưa đánh giá trên mẫu lâm sàng, cũng như chưa phân tích mối liên quan giữa tỷ lệ alen đột biến với đặc điểm bệnh học hoặc đáp ứng điều trị.

Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được triển khai trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng, đồng thời so sánh với các kỹ thuật có độ nhạy cao hơn như digital PCR. Bên cạnh đó, việc tối ưu thêm các chiến lược nâng cao độ nhạy, bao gồm ứng dụng các chất ức chế allele hoang dại (PNA hoặc LNA), cũng như xây dựng quy trình định lượng allele burden là cần thiết nhằm nâng cao giá trị ứng dụng của phương pháp trong chẩn đoán và theo dõi bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng tài trợ kinh phí thực hiện với mã số đề tài GVTC18.16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] X. Hu, J. Li, M. Fu, X. Zhao, and W. Wang, "The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1, p. 402, 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.

[2] U. Gianelli, J. Thiele, A. Orazi, N. Gangat, A. M. Vannucchi, A. Tefferi, and H. M. Kvasnicka, "International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: Myeloproliferative

- neoplasms,” *Virchows Archiv*, vol. 482, no. 1, pp. 53-68, 2023, doi: 10.1007/s00428-022-03430-4
- [3] J.-J. Kiladjian *et al.*, “Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera,” *Blood*, vol. 112, no. 8, pp. 3065-3072, 2008.
- [4] N. T. Ngọc, B. B. Hậu, P. H. Nam, T. T. Anh, Đ. T. Trang, and N. T. Xuân, “Đánh giá một số phương pháp xác định đột biến JAK2 V617F phục vụ việc dự đoán nguy cơ mắc bệnh đa hồng cầu và một số căn bệnh tăng sinh tuỷ ác tính khác,” 2021.
- [5] J. Poodt, R. Fijnheer, I. Walsh, and M. Hermans, “A sensitive and reliable semi-quantitative real-time PCR assay to detect JAK2 V617F in blood,” *Hematological Oncology*, vol. 24, no. 4, pp. 227-233, 2006.
- [6] E. Hammond, K. Shaw, B. Carnley, S. P’ng, I. James, and R. Herrmann, “Quantitative determination of JAK2 V617F by TaqMan: An absolute measure of averaged copies per cell that may be associated with the different types of myeloproliferative disorders,” *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 9, no. 2, pp. 242-248, 2007.
- [7] N. Kröger *et al.*, “Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis,” *Blood*, vol. 109, no. 3, pp. 1316-1321, 2007.
- [8] S. A. Bustin, *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 2009.
- [9] P. H. Vân, *PCR và các vấn đề cơ bản trong y sinh học phân tử*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản Y học, 2009.
- [10] E. C. Wolstencroft, K. Hanlon, L. W. Harries, G. R. Standen, A. Sternberg, and S. Ellard, “Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the detection of the JAK2 V617F mutation,” *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 9, no. 1, pp. 42-46, 2007.
- [11] S. Zhao *et al.*, “Impact of JAK2V617F mutation burden on disease phenotype in Chinese patients with JAK2V617F-positive polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET),” *International Journal of Medical Sciences*, vol. 13, no. 1, p. 85, 2016, doi: 10.7150/ijms.13457.
- [12] E. Lippert *et al.*, “Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: A multicenter study,” *Haematologica*, vol. 94, no. 1, p. 38, 2009.