



Original Article

## Development of a Standard Curve for Quantification of *LINE-1* Methylation on Real-time PCR Systems

Nguyen Thi Than, Tran Thi Quynh Trang, Pham The Tung, Vo Thi Thuong Lan\*

*VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam*

Received 25 June 2023

Revised 21 July 2023; Accepted 10 September 2023

**Abstract:** Real-time PCR is currently one of the most powerful molecular approaches and is widely used in molecular biology diagnostics. Today, many real-time PCR systems differ in the thermal block, the excitation source, the fluorescence detection system, and the data analysis software. Therefore, using different systems may affect the detection limit of biological samples. Our study aims to optimize the threshold to ensure the amplification efficiency (E) and correlation coefficient ( $R^2$ ) of the standard curve used to quantify *LINE-1* methylation on three real-time PCR systems, including: Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx; and abCyclerQ (AIT Biotech). We determined a proper threshold to build a standard curve on the three systems, which ensures the correlation coefficient ( $R^2$ ) and the amplification efficiency ( $R^2 > 0.999$ ,  $E \geq 95\%$ ). Therefore, it is possible to use interchangeably in Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx, and abCyclerQ (AIT Biotech) in *LINE-1* methylation analysis.

**Keywords:** Real-time PCR, Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx, abCyclerQ (AIT Biotech), Threshold, *LINE-1* methylation.

\* Corresponding author.

*E-mail address:* [vothithuonglan@hus.edu.vn](mailto:vothithuonglan@hus.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4532>

# Xây dựng đường chuẩn phục vụ định lượng tỷ lệ methyl hóa *LINE-1* trên các hệ thống máy real-time PCR

Nguyễn Thị Thân, Trần Thị Quỳnh Trang, Phạm Thế Tùng, Võ Thị Thương Lan\*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 25 tháng 6 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 21 tháng 7 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 9 năm 2023

**Tóm tắt:** Real-time PCR là kỹ thuật phổ biến trong chẩn đoán sinh học phân tử, được sử dụng trên nhiều hệ thống máy real-time khác nhau. Mỗi hệ thống có sự khác biệt về bộ phận gia nhiệt, nguồn sáng kích thích, hệ thống phát hiện huỳnh quang và phần mềm phân tích số liệu. Vì thế khi sử dụng các hệ thống máy khác nhau có thể ảnh hưởng đến giới hạn phát hiện của mẫu sinh phẩm. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm tối ưu hóa ngưỡng threshold để đảm bảo các thông số hiệu suất phản ứng (E) và hệ số tuyến tính ( $R^2$ ) của đường chuẩn sử dụng để định lượng methyl hóa *LINE-1* trên ba hệ thống real-time PCR Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx và abCyclerQ (AIT Biotech). Chúng tôi đã xác định ngưỡng threshold thích hợp để xây dựng đường chuẩn đảm bảo hệ số tuyến tính  $R^2$  và hiệu suất khuếch đại E tương đồng nhau trên ba hệ thống máy ( $R^2 > 0,999$ ,  $E \geq 95\%$ ). Áp dụng các thông số tối ưu cho ba hệ thống Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx, abCyclerQ (AIT Biotech) cho phép xác định tỷ lệ methyl hoá yếu tố vận động *LINE-1* ở 50 mẫu DNA tự do trong máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi đều có giá trị như nhau, chứng tỏ cả ba hệ thống máy đều có thể sử dụng thay thế lẫn nhau trong phân tích methyl hóa *LINE-1*.

**Từ khóa:** Real-time PCR, Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx, abCyclerQ (AIT Biotech), ngưỡng threshold, methyl hóa *LINE-1*.

## 1. Mở đầu

Long interspersed element-1 (*LINE-1*) là yếu tố vận động retrotransposon duy nhất còn có khả năng vận động ở người thông qua phiên mã (tổng hợp ARN) và phiên mã ngược (tổng hợp cDNA). *LINE-1* chiếm 17% trong hệ gen người với khoảng  $10^5$  bản sao trong khi gen đơn bản chỉ có 2 bản sao [1]. Trong tế bào bình thường, quá trình phiên mã *LINE-1* được kiểm soát chặt chẽ thông qua cơ chế methyl hóa DNA. Ngược lại, trong tế bào bất thường, đặc biệt là tế bào ung thư, *LINE-1* bị giảm methyl hóa và vận động,

gây mất ổn định hệ gen theo nhiều cơ chế khác nhau [2]. Vì thế, thay đổi methyl hóa *LINE-1* được xem là chỉ thị rất đáng quan tâm cho phép đánh giá trạng thái methyl hóa của toàn bộ hệ gen cũng như tình trạng bệnh của cơ thể. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy tình trạng methyl hóa *LINE-1* có thể được xem là một dấu chuẩn hỗ trợ chẩn đoán, tiên lượng các loại ung thư khác nhau [3, 4].

Kỹ thuật qMSP (quantitative - Methylation Specific PCR) là phương pháp phổ biến, dựa trên kỹ thuật định lượng real-time PCR, để định lượng tỉ lệ methyl hóa DNA. Kỹ thuật này khuếch đại

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: vothithuonglan@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4532>

DNA đích đã được xử lý với bisulfite. Bisulfite biến đổi các cytosine không bị methyl hóa thành uracil trong khi các cytosine bị methyl hóa được giữ nguyên [5]. Sử dụng DNA khuôn đã xử lý và các môi được thiết kế đặc hiệu ở vùng giàu CpG, chỉ có trình tự DNA bị methyl hóa (có các vị trí CpG được giữ nguyên) sẽ được khuếch đại [5].

Real-time PCR (qPCR) là kỹ thuật định lượng cho phép hiển thị kết quả khuếch đại DNA đích ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt [6]. Lượng sản phẩm PCR tăng tỉ lệ thuận với tín hiệu huỳnh quang thu được. Hai thông số quan trọng trong kỹ thuật qPCR là hiệu suất phản ứng E và hệ số tuyến tính  $R^2$ . Hiệu suất phản ứng E được phép dao động trong khoảng từ 90% đến 110% và hệ số tuyến tính  $R^2 \geq 0,999$  [6]. Giá trị của hai thông số được tính toán dựa vào đường hồi quy tuyến

tính (gọi là đường chuẩn) biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng và lượng khuôn DNA. Đường chuẩn được xây dựng dựa vào các mẫu chuẩn chứa trình quan tâm đã biết nồng độ. Từ hiệu suất phản ứng, người làm thực nghiệm sẽ lựa chọn mô hình tính toán phù hợp với điều kiện thí nghiệm của mình.

Hiện nay tại Việt Nam các hệ thống máy real-time PCR phổ biến gồm Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx và abCyclerQ (AIT Biotech). Mỗi loại khác nhau về hệ thống gia nhiệt, nguồn ánh sáng kích thích và hệ thống phát hiện huỳnh quang có thể dẫn đến kết quả khác nhau [7, 8]. Vì vậy khi sử dụng máy real-time PCR chúng ta cần quan tâm các thông số gia nhiệt, số kênh màu, công nghệ đọc và phần mềm phân tích dữ liệu (Bảng 1).

Bảng 1. So sánh các đặc điểm chính trên ba hệ thống real-time Applied Biosystems™ 7500 (ABI 7500), QuantStudio™5 Dx và abCyclerQ (AIT Biotech) [9–11]

| Tiêu chí so sánh                 | ABI 7500                        | QuantStudio5 Dx                  | abCyclerQ                               |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| <b>1. Bộ phận gia nhiệt</b>      |                                 |                                  |   |
| Thể tích mẫu chạy                | 20-100 $\mu$ L                  | 10-100 $\mu$ L                   | 10-100 $\mu$ L                          |
| Tốc độ gia nhiệt/hạ nhiệt tối đa | 2,5 $^{\circ}$ C/s              | 6,5 $^{\circ}$ C/s               | 6,1 $^{\circ}$ C/s – 5,0 $^{\circ}$ C/s |
| Tốc độ gia nhiệt đến mẫu         | $\pm 1,1$ $^{\circ}$ C/s        | Trung bình: 3,66 $^{\circ}$ C/s  | --                                      |
| Dải nhiệt độ                     | 4-100 $^{\circ}$ C              | 4-99,9 $^{\circ}$ C              | 0-100 $^{\circ}$ C                      |
| Độ chính xác nhiệt độ            | $\pm 0,25$ $^{\circ}$ C         | $\pm 0,25$ $^{\circ}$ C          | $\pm 0,1$ $^{\circ}$ C                  |
| Độ đồng đều nhiệt độ             | $\pm 0,5$ $^{\circ}$ C          | $\pm 0,5$ $^{\circ}$ C           | $\pm 0,1$ $^{\circ}$ C                  |
| Chức năng khác                   | Không                           | Gradient PCR                     | Gradient PCR, long PCR, touch down PCR  |
| <b>2. Hệ thống quang học</b>     |                                 |                                  |   |
| Nguồn ánh sáng                   | Đèn halogen vonfram             | Bright-white LED                 | 6 đèn LED                               |
| Phương pháp thu nhận ánh sáng    | 5 bộ lọc ánh sáng và CCD camera | 6 bộ lọc ánh sáng và CMOS camera | 6 kênh được quét cùng lúc và Photodiode |
| Số kênh màu phát hiện tối đa     | 5 kênh                          | 6 kênh                           | 6 kênh                                  |
| Mẫu huỳnh quang hiệu chuẩn       | Yêu cầu ROX                     | Yêu cầu ROX                      | Yêu cầu ROX                             |

Ba hệ thống Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx và abCyclerQ (AIT Biotech) đều giống nhau về phương pháp gia nhiệt là khối nhiệt được điều chỉnh bằng bom nhiệt (peltier-controlled blocks). Sự khác biệt giữa các máy là nguồn ánh sáng kích thích và hệ thống phát hiện huỳnh quang được phát ra từ các ống phản ứng. Đối với Applied Biosystems™ 7500, nguồn sáng bắt nguồn từ đèn halogen vonfram, ánh sáng này đi qua năm bộ lọc ánh sáng kích thích trước khi đến các giếng mẫu.

Việc hệ thống bao gồm bộ lọc ánh sáng kích thích giúp nâng cao khả năng khuếch đại của thuốc nhuộm có bước sóng dài như ánh sáng đỏ (640-760 nm), dẫn đến tăng độ nhạy và độ đặc hiệu. Phát xạ huỳnh quang sau đó được phát hiện thông qua năm bộ lọc phát xạ đến CCD camera (charge-coupled device) [12]. Hệ thống quang học của QuantStudio™5 Dx cũng mang cấu trúc tương tự như Applied Biosystems™ 7500 nhưng nguồn sáng kích thích xuất phát từ ánh sáng trắng của đèn LED và bộ phận thu nhận tín hiệu

là CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) camera [10]. Riêng hệ thống abCyclerQ, thiết bị không sử dụng bộ lọc ánh sáng kích thích mà sử dụng trực tiếp sáu bóng đèn LED, 6 kênh màu được quét cùng lúc, không có hiệu ứng góc và thu nhận tín hiệu huỳnh quang bằng cảm biến Photodiode [11].

Những yếu tố khác biệt trên các hệ thống máy real-time có thể ảnh hưởng đến ngưỡng phát hiện của mẫu sinh phẩm. Thật vậy, nghiên cứu của Lu và cộng sự (2010) đã kết luận có sự khác nhau về mức độ biểu hiện của 12 gen khi phân tích trên hai hệ thống Applied Biosystems™ 7500 và Roche Applied Science (LC 480) [7]. Trong khi nghiên cứu gần đây của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế cho kết quả trái ngược khi nhóm tác giả so sánh giới hạn phát hiện mẫu sinh phẩm, thông qua việc sử dụng cùng mẫu chuẩn và hóa chất qPCR chạy trên bốn hệ thống máy real-time Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5, hệ thống real-time PCR CFX96 Touch Bio- Rad và abCyclerQ (AIT biotech) [8]. Nhóm tác giả thu được giới hạn phát hiện của mẫu sinh phẩm tương đồng nhau trên 4 hệ thống máy [8]. Từ những mâu thuẫn đó, đường chuẩn sử dụng để định lượng cần được khảo sát và chuẩn hoá trên từng hệ thống qPCR. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ methyl hoá *LINE-1*, được xem là dấu chuẩn tiềm năng hỗ trợ chẩn đoán sớm ung thư, cần được định lượng chính xác trên các hệ thống máy real-time PCR khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung so sánh các thông số của đường chuẩn sử dụng định lượng tỷ lệ methyl hoá *LINE-1* trên ba hệ thống Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio™5 Dx và abCyclerQ (AIT biotech).

## 2. Nguyên liệu, phương pháp

### 2.1. Nguyên liệu

#### Mẫu nghiên cứu

Năm mươi mẫu huyết tương từ bệnh nhân ung thư phổi được cung cấp bởi Bệnh viện Quân Y 175 (thành phố Hồ Chí Minh). DNA tự do

trong huyết tương (cfDNA) được tách từ 500 µL huyết tương bằng kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolate Kit (ThermoFisher).

#### Các cặp mồi

Tỷ lệ methyl hóa *LINE-1* được định lượng theo phương pháp  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  của Livak [13]. Phương pháp này yêu cầu có trình tự tham chiếu cùng với trình tự đích. Trình tự tham chiếu là một đoạn nằm trên promoter *LINE-1* được khuếch đại bởi cặp mồi *LINE-Ref-F/R*; cặp mồi này thiết kế dựa vào trình tự không có CpG. Trình tự đích là trình tự *LINE-1* bị methyl hóa sau xử lý được khuếch đại bởi cặp mồi đặc hiệu methyl hóa *LINE-Me-F/R*. Trình tự nucleotide các cặp mồi được tổng hợp bởi hãng IDT được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

| Tên mồi           | Trình tự mồi (5' - 3')    | Kích thước |
|-------------------|---------------------------|------------|
| <i>LINE-Me-F</i>  | cggttaagaacggcgattata     | 82 bp      |
| <i>LINE-Me-R</i>  | acaatcaacgaaattccgtaaacg  |            |
| <i>LINE-Ref-F</i> | gtaaggggttagggagttttt     | 78 bp      |
| <i>LINE-Ref-R</i> | aataaaaataaccggattttccaaa |            |

#### Các plasmid tái tổ hợp sử dụng để xây dựng mẫu chuẩn

Các mẫu chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu trộn của plasmid tái tổ hợp có mang đoạn chèn của trình tự *LINE-1* bị methyl hóa (p*LINE-Me*) và plasmid mang trình tự đại diện cho tất cả *LINE-1* sau xử lý (p*LINE-Ref*). Các plasmid được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Sinh Y, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, được mô tả trong nghiên cứu trước đây [14].

### 2.2. Phương pháp

#### Xử lý bisulfite DNA

Xử lý DNA với bisulfite nhằm mục đích biến đổi C không bị methyl hóa thành U trong khi các C bị methyl hóa sẽ giữ nguyên. Genomic DNA được xử lý bisulfite với kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### Tạo mẫu chuẩn

Xác định số bản sao của plasmid sử dụng cho mẫu chuẩn: nồng độ plasmid được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ trên máy NanoDrop 2000 (Invitrogen), sau đó sẽ được tính toán số bản sao/ $\mu\text{L}$  theo công thức:

$$\text{Số bản sao} = \frac{6,23 \times 10^{23} \left( \frac{\text{bản sao}}{\text{mol}} \right) \times \text{lượng DNA (ng)}}{\text{kích thước đoạn DNA (bp)} \times 660 \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \times 10^9}$$

Sau đó các plasmid p.LINE-Me và p.LINE-Ref sẽ được pha loãng bậc 10 và phối trộn với nhau tạo thành một dải nồng độ có tỉ lệ methyl hóa 10% và trộn cùng 5 ng DNA tổng số tách từ mẫu máu thường được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Tỉ lệ phối trộn plasmid để tạo mẫu chuẩn

| Plasmid          | Số bản sao/ $\mu\text{L}$ |        |        |        |
|------------------|---------------------------|--------|--------|--------|
|                  | PC1                       | PC2    | PC3    | PC4    |
| p.LINE-Ref       | $10^6$                    | $10^5$ | $10^4$ | $10^3$ |
| p.LINE-Me        | $10^5$                    | $10^4$ | $10^3$ | $10^2$ |
| gDNA             | 5 ng                      | 5 ng   | 5 ng   | 5 ng   |
| Tỷ lệ methyl hóa | 10%                       | 10%    | 10%    | 10%    |

Xác định tỉ lệ methyl hóa theo công thức Livak [13]

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct mẫu bệnh phẩm} - \Delta\text{Ct mẫu chuẩn.}$$

Trong đó:

$\Delta\text{Ct mẫu bệnh phẩm} = \text{Ct (trình tự đích mẫu bệnh phẩm)} - \text{Ct (trình tự tham chiếu mẫu bệnh phẩm)}$ ;  $\Delta\text{Ct mẫu chuẩn} = \text{Ct (trình tự đích mẫu chuẩn)} - \text{Ct (trình tự tham chiếu mẫu chuẩn)}$

Trình tự đích là *LINE-1* bị methyl hóa, trình tự tham chiếu là toàn bộ số bản sao của *LINE-1* sau xử lý (bao gồm trình tự bị methyl hóa và không bị methyl hóa).

Phần trăm methyl hóa của mẫu bệnh phẩm được tính:

$$\% \text{ Methyl hóa mẫu bệnh phẩm} = \% \text{ methyl hóa mẫu chuẩn} \times 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

### Phân tích thống kê

Dữ liệu được tổng hợp, xử lý bằng Excel, sau đó phần mềm Graphpad Prism v9.0.0 (GraphPad Software LLC) được sử dụng để lập đồ thị và phân tích số liệu. Đường hồi quy tuyến tính được

### Kỹ thuật real-time PCR

Phản ứng real-time PCR khuếch đại trình tự đích *LINE-Me* và trình tự tham chiếu *LINE-Ref* lần lượt được thực hiện trên ba hệ thống máy real-time PCR khác nhau: QuantStudio™5 Dx, Applied Biosystems™ 7500 và abCyclerQ (AIT Biotech). Thể tích phản ứng PCR là 20  $\mu\text{L}$  sử dụng GoTaq qPCR Mastermix (Promega). Nồng độ môi sử dụng cho mỗi phản ứng là 0,4  $\mu\text{M}$ , lượng khuôn sử dụng là 5  $\mu\text{L}$ . Điều kiện phản ứng [95 °C 2 phút, 40 chu kỳ (95 °C 15 giây, 59 °C 30 giây, 72 °C 30 giây)], tín hiệu huỳnh quang đọc ở bước 72 °C 30 giây.

biểu diễn thông qua các giá trị Ct trung bình của dải nồng độ plasmid được pha loãng bậc 10 để tìm ra giá trị  $R^2$  và hiệu suất phản ứng. So sánh mức độ methyl hóa *LINE-1* của mẫu bệnh phẩm chạy trên ba hệ thống máy được kiểm định bằng phương pháp Friedman test dành cho phép đo lặp lại, không tuân theo phân phối chuẩn. Đồ thị được biểu diễn dưới dạng Boxplot. Giá trị  $p < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

## 3. Kết quả

### 3.1. Xây dựng đường chuẩn trên ba hệ thống real-time PCR (qPCR)

Để xác định hiệu quả khuếch đại của phản ứng trên ba hệ thống real-time PCR, phản ứng qPCR khuếch đại *LINE-Me* và *LINE-Ref* với các cặp môi tương ứng (Bảng 2) ở các nồng độ khác nhau được tiến hành độc lập, đồng thời trên ba hệ thống. Tốc độ gia nhiệt và threshold đã được

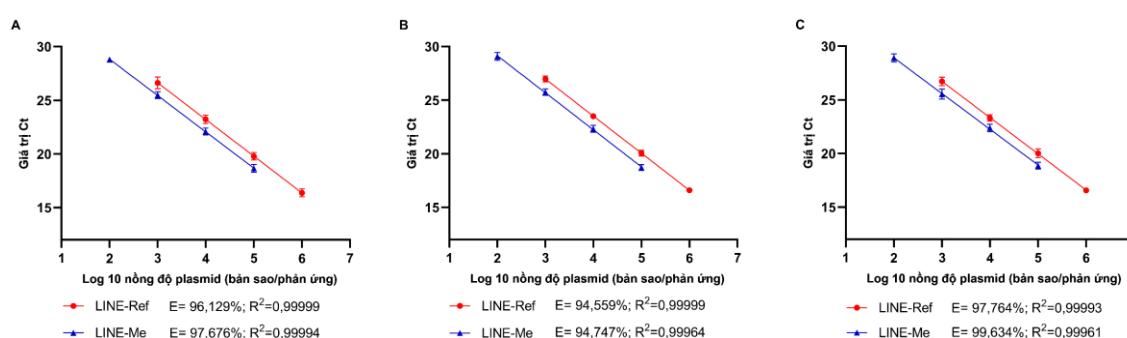
tối ưu hóa cho từng hệ thống được trình bày trong Bảng 4.

Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 10 lần để đánh giá độ tin cậy. Giá trị trung bình của các lần lặp lại được sử dụng để dựng đường chuẩn tương

ứng với trình tự đích và trình tự tham chiếu (Bảng 5). Các đường chuẩn đều có hiệu suất (E) cao nằm trong khoảng 90%-110% và hệ số tuyến tính  $R^2 > 0,999$  (Hình 1).

Bảng 4. Thông số tốc độ gia nhiệt, ngưỡng threshold trên ba hệ thống máy real-time PCR

| Hệ thống máy     | ABI 7500                             | QuantStudio™5 Dx                     | abCyclerQ(AIT Biotech)                        |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Tốc độ gia nhiệt | Tốc độ chuẩn                         | 1,6 °C/s                             | 1,6 °C/s                                      |
| Threshold        | 1-2% x tín hiệu huỳnh quang cao nhất | 1-2% x tín hiệu huỳnh quang cao nhất | 3-4% x tín hiệu tín hiệu huỳnh quang cao nhất |



Hình 1. Đường chuẩn *LINE-Me* và *LINE-Ref* lần lượt trên các hệ thống Applied Biosystems™ 7500 (A), QuantStudio™5 Dx (B), abCyclerQ (AIT Biotech) (C).

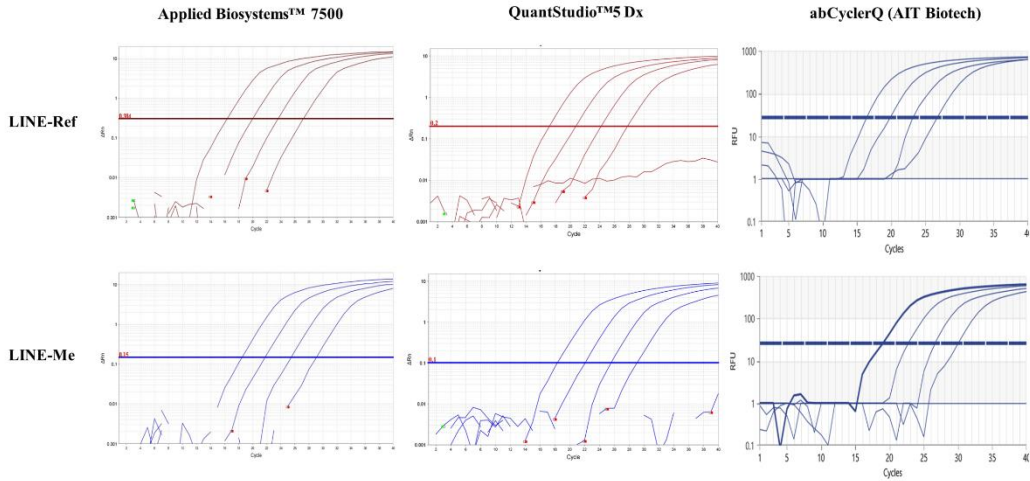
Đường chuẩn biểu diễn giá trị Ct và nồng độ các trình tự đích được trình bày trên Hình 1. Các đường chuẩn đều có hiệu suất cao nằm trong khoảng 90%-110% và giá trị  $R^2 > 0,999$ , chứng tỏ hiệu suất khuếch đại tốt và ổn định [6]. Như vậy, chúng tôi đã tối ưu được tốc độ gia nhiệt và xác định threshold cho từng hệ thống máy để đảm bảo các thông số  $R^2$  và E đúng như yêu cầu.

### 3.2. So sánh đường chuẩn *LINE-Ref* và *LINE-Me* trên ba hệ thống real-time PCR

Ba hệ thống máy khác biệt ở một số điểm như phần mềm phân tích, nguồn ánh sáng và cách tiếp cận để thu thập tín hiệu huỳnh quang nên mỗi hệ thống sử dụng các hóa chất qPCR riêng và có thể ảnh hưởng đến giới hạn phát hiện của các mẫu sinh phẩm [7, 8]. Mục tiêu của chúng tôi mong muốn sử dụng một loại mastermix cho qPCR trên ba hệ thống nên cần

đưa ra các thông số tối ưu, chính xác của ngưỡng threshold trong phần mềm phân tích số liệu ở cả ba hệ thống. Các tiêu chí cho phép đánh giá ngưỡng threshold cho các thiết bị real-time PCR gồm: i) Hình dạng của đường cong huỳnh quang; ii) Giá trị Ct của đối chứng dương đã biết trước số bản sao cụ thể của *LINE-Me* và *LINE-Ref*; và iii) Giá trị tuyến tính  $R^2$  và hiệu suất E nhận được từ kết quả phân tích đường hồi quy tuyến tính.

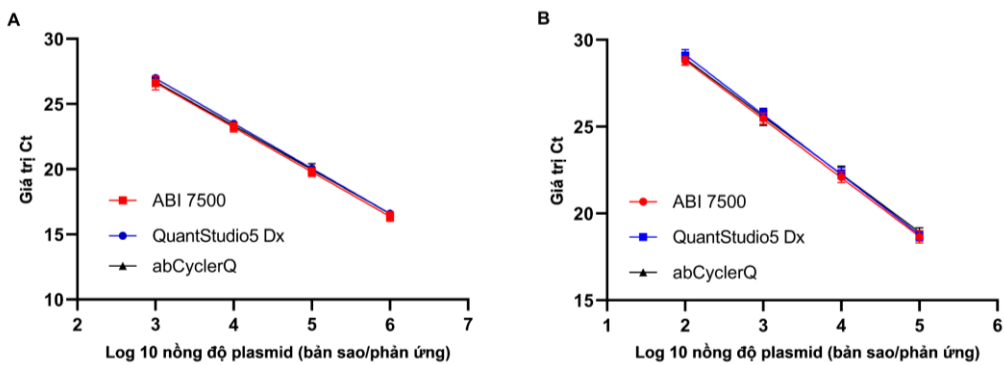
Đầu tiên, chất lượng của các đường tín hiệu huỳnh quang SYBR Green (đã hiệu chỉnh với ROX Dye) được kiểm tra trên ba hệ thống. Hình 2 cho thấy đường cong khuếch đại ở ba hệ thống đều ở dạng điển hình. Mỗi hệ thống đều thể hiện được sự phân tách riêng biệt rõ ràng các đường tín hiệu huỳnh quang tương ứng với các bậc pha loãng khác nhau của *LINE-Ref* và *LINE-Me*. Đường threshold được sử dụng cao hơn tín hiệu nền, dưới pha bão hòa và thuộc vào pha lũy thừa của đường tín hiệu huỳnh quang.



Hình 2. Đường cong tín hiệu huỳnh quang của *LINE-Ref* và *LINE-Me* được khuếch đại lần lượt trên ba thiết bị Applied Biosystems™ 7500 , QuantStudio™5 Dx, abCyclerQ (AIT Biotech).

Bảng 5. Giá trị Ct trung bình của đường chuẩn *LINE-Me* và *LINE-Ref* trên các hệ thống real-time PCR

| Target          | Số bản sao      | ABI 7500 |       |    | QuantStudio5 Dx |       |    | abCyclerQ |       |    |
|-----------------|-----------------|----------|-------|----|-----------------|-------|----|-----------|-------|----|
|                 |                 | Ct       | SD    | N  | Ct              | SD    | N  | Ct        | SD    | N  |
| <i>LINE-Ref</i> | 10 <sup>6</sup> | 16,377   | 0,363 | 12 | 16,595          | 0,166 | 12 | 16,570    | 0,246 | 15 |
|                 | 10 <sup>5</sup> | 19,799   | 0,343 | 12 | 20,064          | 0,269 | 28 | 20,017    | 0,403 | 16 |
|                 | 10 <sup>4</sup> | 23,233   | 0,379 | 12 | 23,494          | 0,195 | 30 | 23,308    | 0,304 | 25 |
|                 | 10 <sup>3</sup> | 26,620   | 0,538 | 12 | 26,984          | 0,278 | 29 | 26,728    | 0,392 | 23 |
| <i>LINE-Me</i>  | 10 <sup>5</sup> | 18,654   | 0,357 | 10 | 18,706          | 0,270 | 19 | 18,867    | 0,314 | 18 |
|                 | 10 <sup>4</sup> | 22,088   | 0,316 | 12 | 22,320          | 0,332 | 33 | 22,381    | 0,350 | 19 |
|                 | 10 <sup>3</sup> | 25,473   | 0,318 | 12 | 25,753          | 0,300 | 33 | 25,534    | 0,462 | 28 |
|                 | 10 <sup>2</sup> | 28,789   | 0,244 | 12 | 29,076          | 0,364 | 31 | 28,919    | 0,379 | 23 |



Hình 3. So sánh các giá trị Ct trung bình của đường chuẩn *LINE-Ref* và *LINE-Me* trên ba hệ thống real-time khác nhau.

Về giá trị Ct của đường chuẩn *LINE-Ref* và *LINE-Me* hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) được trình bày trong Bảng 5. Các giá trị Ct của dải nồng độ pha loãng từ plasmid *LINE-Ref* và từ plasmid *LINE-Me* tương tự như nhau trên ba hệ thống, do đó đồ thị biểu diễn đường chuẩn *LINE-Ref* cũng như đường chuẩn *LINE-Me* trên ba hệ thống gần như trùng nhau (Hình 3A, B).

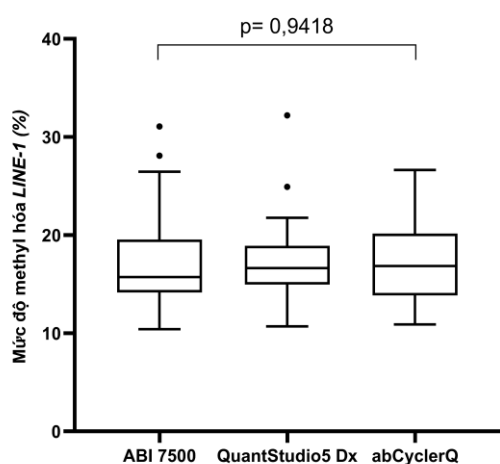
Cuối cùng, để xác nhận việc điều chỉnh ngưỡng threshold có ảnh hưởng đến hiệu quả khuếch đại PCR hay không, chúng tôi tiến hành

so sánh giá trị R<sup>2</sup>, hiệu suất (E), Y-intercept. Trên cả ba hệ thống máy, tất cả các giá trị R<sup>2</sup> đều cho kết quả tốt và giống nhau (R>0,999). Hiệu suất khuếch đại *LINE-Me* và *LINE-Ref* trên ba máy có sự khác nhau nhưng không chênh lệch quá 5%; Delta Intercept cũng không có sự khác biệt quá lớn (Bảng 6). Như vậy, hiệu suất khuếch đại trong qPCR không bị ảnh hưởng và thay đổi ở các giá trị ngưỡng threshold tương thích với từng hệ thống đảm bảo giá trị Ct của hai đường chuẩn giống nhau trên ba hệ thống.

Bảng 6. So sánh ngưỡng Threshold, Hiệu suất, Y-Intercept của đường chuẩn trên ba hệ thống (1) Applied Biosystems™ 7500, (2) QuantStudio™5 Dx, (3) abCyclerQ

|                 | Ngưỡng Threshold |    |    | Hiệu suất phản ứng |       |       | Y-Intercept |       |       | Delta Intercept |      |      |
|-----------------|------------------|----|----|--------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-----------------|------|------|
|                 | 1                | 2  | 3  | 1                  | 2     | 3     | 1           | 2     | 3     | 1               | 2    | 3    |
| <i>LINE-Ref</i> | 2%               | 2% | 4% | 96,13              | 94,56 | 97,76 | 36,88       | 37,35 | 36,35 | 1,31            | 1,30 | 1,27 |
| <i>LINE-Me</i>  | 1%               | 1% | 3% | 97,68              | 94,75 | 99,63 | 35,58       | 36,05 | 35,58 |                 |      |      |

### 3.3. Ứng dụng vào chạy mẫu bệnh phẩm



Hình 4. Đồ thị thể hiện sự phân bố tỉ lệ methyl hóa *LINE-1* của 50 mẫu cfDNA trên ba hệ thống máy.

Hiệu suất khuếch đại của đường chuẩn *LINE-Me* và *LINE-Ref* chênh lệch không vượt quá 5%. Vì thế đây là cơ sở khi để chúng tôi áp dụng mô hình Livak để xác định tỉ lệ methyl hoá *LINE-1* của mẫu bệnh phẩm với điều kiện phản ứng real-time PCR như đã nêu.

Qua khảo sát 50 mẫu cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi đã xử lí bisulfite và được chạy lặp lại trên ba hệ thống, chúng tôi nhận thấy giá trị Ct *LINE-Ref* trung bình lần lượt là 24,085 ± 1,136, 23,579 ± 2,076 và 23,751 ± 2,318 tương ứng trên ABI 7500, QuantStudio5 Dx và abCyclerQ. Giá trị Ct *LINE-Ref* của mẫu tương đương với 10<sup>4</sup> bản sao của plasmid *LINE-Ref*. Do vậy, chúng tôi quyết định sử dụng mẫu chuẩn PC3 để tính tỉ lệ methyl hóa của các mẫu bệnh phẩm.

Kết quả thử nghiệm trên 50 mẫu cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi cho thấy phần trăm methyl hóa *LINE-1* của mẫu bệnh phẩm trên ba hệ thống lần lượt là 15,73, 16,65, 16,87 (giá trị median). Kết quả thu được cho thấy sự chênh lệch phần trăm methyl hóa *LINE-1* của mẫu bệnh phẩm trên ba hệ thống máy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,9418) (Hình 4). Cả ba hệ thống máy đều thích hợp đối với việc định lượng tỷ lệ methyl hoá *LINE-1*.

### 4. Kết luận

Chúng tôi đã xác định ngưỡng threshold phù hợp trên ba hệ thống máy real-time PCR đảm bảo



hiệu suất khuếch đại và hệ số tuyến tính của phản ứng qPCR với cặp môi LINE-Me và LINE- Ref trên ba hệ thống máy là tương đồng với nhau (hệ số tuyến tính  $R^2 > 0,999$ , hiệu suất phản ứng đạt 95%). Như vậy, với ngưỡng threshold cụ thể, chính xác, tỷ lệ methyl hoá *LINE-1*, dấu chuẩn tiềm năng cho chẩn đoán ung thư, đều có thể phân tích trên cả ba thiết bị Applied Biosystems™ 7500, QuantStudio 5Dx, abCyclerQ (AIT Biotech).

### Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của dự án VINIF.2022.DA00036, cảm ơn Bệnh viện Quân Y 175 (thành phố Hồ Chí Minh) đã cung cấp mẫu bệnh phẩm và Bệnh viện K đã chia sẻ trang thiết bị để thực hiện nghiên cứu này.

### Tài liệu tham khảo

- [1] R. E. Mills, E. A. Bennett, R. C. Iskow, S. E. Devine, Which Transposable Elements Are Active in the Human Genome?, Trends Genet, Vol. 23, No. 4, 2007, pp. 183-191, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.006>.
- [2] M. A. Kerachian, M. Kerachian, Long Interspersed Nucleotide Element-1 (LINE-1) Methylation in Colorectal Cancer, Clin. Chim. Acta, Vol. 488, 2019, pp. 209-214, <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2018.11.018>.
- [3] E. Sunami, M. D. Maat, A. Vu, R. R. Turner, D. S. B. Hoon, LINE-1 Hypomethylation During Primary Colon Cancer Progression, PLoS One, Vol. 6, 2011, <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0018884>.
- [4] S. L. Anwar, B. Hasemeier, E. Schipper, A. Vogel, H. Kreipe, U. Lehmann, LINE-1 Hypomethylation in Human Hepatocellular Carcinomas Correlates with Shorter Overall Survival and CIMP Phenotype, PLoS One, Vol. 14, No. 5, 2019, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216374>.
- [5] L. Sigalotti, A. Covre, F. Colizzi, E. Fratta, Quantitative Methylation-Specific PCR: A Simple Method for Studying Epigenetic Modifications of Cell-Free DNA, Methods Mol. Biol, Vol. 1909, 2019, pp. 137-162, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_11).
- [6] Thermo Fisher Scientific - US, Realtime PCR Handbook, pp. 6-7, <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> (accessed on: June 1<sup>st</sup>, 2023).
- [7] S. Lu, A. P. Smith, D. Moore, N. M. Lee, Different Real-time PCR Systems Yield Different Gene Expression Values, Mol. Cell. Probes. Vol. 24, No. 5, 2010, pp. 315-320, <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.04.002>.
- [8] D. T. P. Thao, P. T. H. Thuy, V. T. T. Huong, N. T. T. An, V. T. Phuong, Assessment of comparisons Between Realtime PCR Devices Used in the Quality of Diagnostic Products, J. Sci. Control Vaccine Biol, Vol. 3, No. 1, 2023, <https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i1.77>.
- [9] Thermo Fisher Scientific - VN, 7500 Real-Time PCR System for Human Identification with Dell Notebook D520, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4366605?SID=srch-srp-4366605> (accessed on: June 6<sup>th</sup>, 2023).
- [10] Thermo Fisher Scientific - VN, QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System, 96-well, 0.2 mL, Laptop, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/brochures/Brochure> (accessed on: May 16<sup>th</sup>, 2023).
- [11] Aitbiotech, abCyclerQ, <https://www.aitbiotech.com/abcyclerq> (accessed on: May 16<sup>th</sup>, 2023).
- [12] Reference in qPCR [www.Gene-Quantification.info](http://www.Gene-Quantification.info), Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System and Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, <https://www.gene-quantification.de/abi7500.pdf> (accessed on: June 6<sup>th</sup>, 2023).
- [13] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods, Vol. 25, 2001, pp. 402-408, <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>.
- [14] P. A. T. Duong, P. T. Tung, T. T. Q. Trang, L. T. Phuong, V. T. T. Lan, Development of a Standard Control for qMSP to Analyze the Methylation Status of LINE-1, VNU J. Sci. Med. Pharm. Sci, Vol. 38, No. 1, 2022, pp. 65-73, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4314>.