



Original Article

Selection of Primer Location for qMSP Analysis of *Alu* Methylation Level in Vietnamese Patients with Breast Cancer

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

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

Received 10 July 2023

Revised 17 October 2023; Accepted 08 December 2023

Abstract: In the mammalian genome, DNA methylation occurs at the cytosine in CpG complexes. Changes in genomic DNA methylation status, reflected by the CpG methylation status of the retrotransposon *Alu* elements, are closely related to the initiation and development of cancer. Abnormalities in *Alu* methylation have been documented in many early-stage tumors where the *Alu* methylation level correlates with cellular malignancy. Therefore, the assessment of *Alu* methylation level as a biomarker for early diagnosis and prognosis has been of interest in many types of cancer. Our study aims to investigate the nucleotide positions on the CpG-rich sequence of *Alu* for the design of primers used for quantitative methylation-specific PCR reaction (qMSP). Using two primer pairs designed from the 5' *Alu* region for analysis of the *Alu* methylation level in 25 pairs of cancer/adjacent tissue samples of Vietnamese patients with breast cancer, we find out the primer pair that significantly distinguished the *Alu* methylation status between cancer and adjacent tissue samples. Selecting the right qMSP primer pair will facilitate the profiling of *Alu* methylation levels in breast cancer samples when compared with non-cancerous samples, thereby determining its potential in becoming an epigenetic marker for early diagnosis, prognosis as well as in supporting breast cancer treatment to be more effective in Vietnam.

Keywords: *Alu* methylation, breast cancer, primers of qMSP.

* Corresponding author.

E-mail address: vothithuonglan@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4536>

Lựa chọn vị trí thiết kế môi cho phản ứng qMSP để phân tích mức độ methyl hóa *Alu* ở bệnh nhân ung thư vú Việt Nam

Trần Thị Quỳnh Trang, Phạm Thế Tùng, Nguyễn Thị Thân, 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 10 tháng 7 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 17 tháng 10 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 08 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt: Trong bộ gen động vật có vú, methyl hoá ADN xảy ra ở cytosine trong phức CpG. Thay đổi trạng thái methyl hóa ADN hệ gen liên quan chặt chẽ đến sự phát sinh, phát triển của ung thư và được phản ánh thông qua tình trạng methyl hóa CpG của yếu tố vận động *Alu* do có đến 23% CpG của hệ gen có mặt trong yếu tố này. Bất thường methyl hóa *Alu* đã được ghi nhận ở nhiều khối u từ giai đoạn sớm, mức độ methyl hóa *Alu* tương quan với trạng thái ác tính của tế bào. Do đó, việc đánh giá mức độ methyl hóa *Alu* nhằm phục vụ cho chẩn đoán sớm và tiên lượng đã được quan tâm ở nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư vú. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm khảo sát vị trí thiết kế môi trên trình tự giàu CpG của *Alu* để sử dụng cho phản ứng real time PCR đặc hiệu methyl hóa (quantitative Methylation Specific PCR-qMSP) cho phép đánh giá được sự thay đổi methyl hóa *Alu* ở 25 cặp mẫu mô ung thư/liền kề của bệnh nhân ung thư vú tại Việt Nam. Với 2 cặp môi thiết kế ở vùng 5' *Alu*, chúng tôi lựa chọn được cặp môi cho phép xác định tình trạng methyl hóa *Alu* khác nhau giữa mẫu mô ung thư so với mẫu liền kề. Kết quả này tạo điều kiện để lập hồ sơ so sánh mức độ methyl hóa *Alu* trong mẫu ung thư vú với mẫu không ung thư, từ đó xác định tiềm năng trở thành dấu chuẩn di truyền ngoại gen của *Alu* trong sàng lọc, chẩn đoán sớm, tiên lượng cũng như hỗ trợ điều trị ung thư vú cách hiệu quả hơn ở nước ta.

Từ khóa: methyl hóa *Alu*, ung thư vú, cặp môi qMSP.

1. Mở đầu

Thay đổi trạng thái methyl hóa ADN là một cơ chế quan trọng cho sự khởi phát, duy trì và tiến triển của ung thư [1]. Quá trình methyl hóa ADN của động vật có vú chủ yếu xảy ra dưới dạng bổ sung cộng hóa trị nhóm methyl vào nguyên tử carbon số 5 của cytosine trong phức hai nucleotide 5' -CpG- 3' nhờ DNA Methyltransferase [2]. Methyl hóa CpG là cơ chế kiểm soát biểu hiện của gen [1]. Methyl hóa ADN có thể thay đổi các con đường truyền tín hiệu liên quan đến các quá trình như chu kỳ tế

bào, sửa chữa ADN, tăng trưởng và tăng sinh tế bào [1]. Do đó, rối loạn trong quá trình methyl hóa ADN có thể dẫn đến giảm biểu hiện của gen ức chế khối u hoặc tăng cường sự biểu hiện của gen gây ung thư, góp phần vào sự phát sinh và phát triển của ung thư [1].

Bên cạnh vai trò điều hòa biểu hiện gen, methyl hóa ADN còn tham gia vào duy trì tính ổn định của hệ gen. Methyl hóa CpG đã được chứng minh là cơ chế bất hoạt quá trình phiên mã của các yếu tố ADN vận động, qua đó ngăn cản chúng chuyển vị sau khi được phiên mã ngược [1]. Theo chú giải gần đây nhất của hệ gen người

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: vothithuonglan@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4536>

(hg19), yếu tố vận động *Alu* là trình tự lặp lại nhiều nhất, với hơn 1,2 triệu bản sao trong mỗi bộ gen lưỡng bội, tương ứng chiếm khoảng 10,7% ADN hệ gen [3]. Đáng chú ý là hơn 23% tổng số vị trí CpG của hệ gen nằm trong trình tự của *Alu* và *Alu* được phân bố ở cả trong cấu trúc gen và vùng ngoài gen [1, 3]. Do đó, tình trạng methyl hóa CpG của *Alu* có thể đại diện cho tình trạng methyl hóa ADN của toàn hệ gen và có liên quan mật thiết với trạng thái tế bào [3]. Cho đến nay, methyl hóa bất thường ở *Alu* đã được đề cập tới như một hiện tượng xảy ra sớm ở nhiều khối u và mức độ methyl hóa *Alu* có liên quan tới trạng thái ác tính của khối u [3-5]. Trên cơ sở đó, việc đánh giá mức độ methyl hóa *Alu* là một hướng tiếp cận quan trọng cho chẩn đoán sớm và tiên lượng ung thư [3]. Đặc biệt, *Alu* có hơn 10^6 bản sao trong khi gen đơn bản chỉ có 2 bản sao trong 1 tế bào. Vì vậy, chỉ cần một lượng rất nhỏ mẫu bệnh phẩm không xâm lấn, ví dụ chỉ cần 0,5 mL máu ngoại vi, cũng cho phép phát hiện *Alu* trong khi phải cần đến 8-10 mL máu để phát hiện sự có mặt của gen đơn bản [6]. Methyl hóa *Alu* hiện đã được nghiên cứu ở nhiều loại ung thư, như ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư biểu mô vòm họng. Kết quả cho thấy mối liên hệ đáng chú ý giữa mức độ methyl hóa *Alu* với nguy cơ ung thư [5, 7-9]. Vì vậy, xác định sự thay đổi mức độ methyl hoá *Alu* được xem là chỉ thị chẩn đoán ung thư có tính khả thi cao và quy trình chuẩn định lượng tỷ lệ methyl hoá *Alu* đang được hoàn thiện để sớm đưa vào xét nghiệm cận lâm sàng [6-8].

Hiện nay, ung thư vú là loại ung thư phổ biến nhất và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở phụ nữ trên toàn thế giới [10]. Dữ liệu khảo sát năm 2020 cho thấy tỷ lệ mắc ung thư vú của phụ nữ ở các nước phát triển cao hơn 88% so với phụ nữ ở các nước đang phát triển. Tuy nhiên, tỷ lệ tử vong do ung thư vú của phụ nữ sống ở nhóm nước đang phát triển lại cao hơn 17% so với những người sống ở nhóm nước phát triển [10]. Xu hướng trái ngược về hai tỷ lệ này liên quan tới khả năng tiếp cận với các chương trình sàng lọc để được phát hiện và điều trị ung thư kịp thời [10, 11]. Ở Việt Nam, tỷ lệ mắc ung thư vú đã tăng nhanh trong những thập kỷ gần đây. Theo

báo cáo năm 2020 của Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế, ước tính có khoảng 21.555 ca mắc mới với 9345 trường hợp tử vong ở Việt Nam, khiến ung thư vú trở thành loại ung thư phổ biến nhất và là nguyên nhân thứ tư gây tử vong liên quan đến ung thư ở phụ nữ Việt Nam [10, 11]. Bởi vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt mục tiêu khảo sát mức độ methyl hóa *Alu* ở bệnh nhân ung thư vú Việt Nam bằng kỹ thuật định lượng đặc hiệu methyl qMSP. Dựa trên lịch sử tiến hóa, các yếu tố *Alu* được phân loại thành ba phân họ chính là *AluJ*, *AluS* và *AluY*. Trong số đó, *AluY* là phân họ trẻ nhất vẫn hoạt động và có tỷ lệ chuyển vị cao nhất trong hệ gen người [3]; vì vậy nghiên cứu này đặt mục đích lựa chọn vị trí thiết kế môi dựa vào trình tự bảo thủ của *AluY*. Các môi phải thiết kế ở vùng giàu CpG, đảm bảo tính đặc hiệu phân biệt trình tự *Alu* bị methyl hoá với không bị methyl hoá, phản ánh được sự biến động về mức độ methyl hóa *Alu* giữa mẫu mô ung thư vú so với mẫu mô liền kề. Lựa chọn được cặp môi qMSP phù hợp sẽ tạo điều kiện cho việc lập hồ sơ so sánh mức độ methyl hóa *Alu* trong mẫu mô ung thư vú với mô không ung thư, từ đó xác định tiềm năng của *Alu* trở thành dấu chuẩn di truyền ngoại gen (epi-biomarkers) trong sàng lọc, chẩn đoán sớm, tiên lượng cũng như hỗ trợ điều trị ung thư vú một cách hiệu quả hơn ở nước ta.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Thu mẫu

Mẫu mô ung thư và liền kề được thu nhận từ 25 bệnh nhân mắc ung thư vú đã được phân loại mô bệnh học tại Bệnh viện Quân y 175 trong năm 2022. Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Ủy ban Đạo đức của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (03-2020/NCHG-HDDD).

2.2. Tách ADN tổng số và xử lý ADN với bisulfite

ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Nồng độ ADN được đo bằng máy đo Qubit4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) và 0,5 ng ADN tổng

số được xử lý với bisulfite bằng bộ kit EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research). Hóa chất này cho phép chuyển đổi các cytosine không bị methyl hóa thành uracil trong khi các cytosine bị methyl hóa được giữ nguyên [12].

2.3. Thiết kế môi

Các môi đặc hiệu cho *Alu* bị methyl hóa được thiết kế để nhận biết trình tự khuôn chứa các CpG sau xử lý bisulfite. Các môi được thiết kế dựa vào trình tự bảo thủ của *AluY* [2]. Hai môi xuôi được thiết kế để nhận biết cùng một vùng trình tự bảo thủ ở vùng 5' của yếu tố *Alu*, chỉ khác nhau về độ dài của môi. Hai môi xuôi này được kết hợp riêng rẽ với một môi ngược thiết kế cách 2 môi xuôi 20-24 nucleotide. Trình tự môi, kích thước sản phẩm khuếch đại và điều kiện qMSP được trình bày trong Bảng 1.

2.4. Xác định tính đặc hiệu của các môi khuếch đại *Alu* bị methyl hóa

Để đảm bảo các cặp môi thiết kế đặc hiệu với *Alu* sau xử lý bị methyl hoá (chứa CpG có C bị methyl hoá) không bắt cặp nhầm với *Alu* chưa xử lý (giàu CpG), 0,5 ng ADN tổng số chưa xử lý bisulfite được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR với GoTaq G2 Colorless Mastermix (Promega) và các cặp môi thiết kế ở mục 2.3. Đối chứng âm không sử dụng ADN, đối chứng dương sử dụng khuôn là plasmid pAlu-Me mang đoạn chèn là trình tự *Alu* bị methyl hoá.

2.5. Xây dựng mẫu chuẩn sử dụng các plasmid tái tổ hợp

Mức độ methyl hóa *Alu* được tính bằng công thức Pfaffl với yêu cầu phải có một mẫu chuẩn đã biết tỷ lệ *Alu* bị methyl hóa [13]. Mẫu chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu trộn của plasmid tái tổ hợp có mang đoạn chèn của trình tự tham chiếu *LINE-1* (pLINE-Ref) và plasmid mang trình tự *Alu* bị methyl hoá (pAlu-Me). Plasmid pLINE-Ref 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]. Trình tự *Alu* bị methyl hóa đã được tách dòng

bằng CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Đường chuẩn được xây dựng từ dải pha loãng bậc 10 của mẫu chuẩn cho phép xác định hiệu suất khuếch đại (E value), hệ số tuyến tính (R^2 value) của từng cặp môi và xác định các giá trị Ct ngưỡng. Mẫu bệnh phẩm có giá trị Ct nằm ngoài giới hạn sẽ không được sử dụng.

2.6. Phản ứng định lượng đặc hiệu methyl (qMSP)

qMSP sử dụng 2 µL ADN sau xử lý bisulfite làm khuôn và SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad) với tổng thể tích 20 µl cho một phản ứng. Mỗi mẫu ADN được thực hiện 3 phản ứng, gồm 2 phản ứng với 2 cặp môi đặc hiệu cho *Alu* bị methyl hoá và 1 phản ứng khuếch đại trình tự lặp *LINE-1* đại diện cho ADN sau xử lý bisulfite. Trình tự *LINE-1* đã được chọn làm trình tự tham chiếu để tính định lượng tương đối tỷ lệ methyl hoá *Alu* theo công thức Pfaffl [2, 13, 15].

2.7. Định lượng tỷ lệ methyl hóa *Alu* theo công thức Pfaffl [13]

Mức độ methyl hóa *Alu* được tính toán bằng công thức Pfaffl như sau:

$$\%Me_{\text{sample}} = \%Me_{\text{control}} * \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Trong đó, $\%Me_{\text{sample}}$ và $\%Me_{\text{control}}$ lần lượt là phần trăm methyl hóa *Alu* ở mẫu bệnh phẩm và đối chứng, E_{target} và E_{ref} lần lượt là hệ số khuếch đại trong phản ứng qMSP khi sử dụng cặp môi đặc hiệu cho *Alu* bị methyl hóa và trình tự tham chiếu *LINE-1*. Giá trị $\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample}) = Ct$ ở mẫu chuẩn - Ct ở mẫu bệnh phẩm, khi sử dụng cặp môi đặc hiệu cho trình tự *Alu* bị methyl hóa. Tương tự, $\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample}) = Ct$ ở mẫu chuẩn - Ct mẫu bệnh phẩm, khi sử dụng cặp môi đặc hiệu với trình tự tham chiếu *LINE-1*.

2.8. Phân tích thống kê

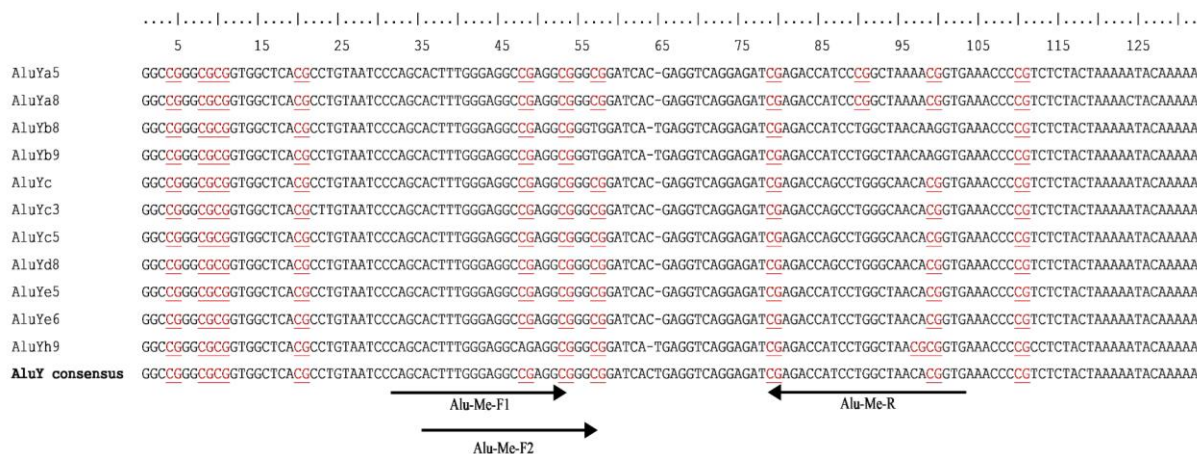
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office 365 (Microsoft), sau đó được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software LLC). Trong tất cả biểu đồ

hộp, tỉ lệ methyl hóa *Alu* được biểu thị dưới dạng Turkey, gồm giá trị trung vị và các khoảng tứ phân vị của tập dữ liệu. Phép phân tích hồi quy tuyến tính đơn giản được dùng để dựng đường thẳng tương ứng qua các giá trị Ct, từ đó xác định giá trị độ dốc của đường chuẩn và các giá trị Ct ngưỡng phù hợp nhất. So sánh mức độ methyl hóa *Alu* khi sử dụng hai cặp mồi giữa hai nhóm

mẫu theo cặp (nhóm mẫu ung thư và nhóm mẫu liền kề) được thực hiện nhờ kiểm định Wilcoxon matched-pair signed rank test khi các nhóm mẫu không tuân theo phân phối chuẩn hoặc kiểm định Paired t test khi các nhóm mẫu đều tuân theo phân phối chuẩn. Với tất cả các phân tích thống kê, giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa.

Bảng 1. Các mồi và điều kiện qMSP sử dụng cho mục đích xác định tỉ lệ methyl hóa *Alu*

Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Kí hiệu cặp mồi và kích thước sản phẩm PCR tương ứng	Điều kiện phản ứng
Alu-Me-F1	tagtattttgggaggtcgaggc	Cặp mồi P1 72 bp	95 °C 2 phút, (95 °C 15 giây, 59 °C 30 giây, 72 °C 30 giây) x 40 chu kỳ. Đọc tín hiệu ở 72 °C.
Alu-Me-R	caacgtattaacaaaataatctcg		
Alu-Me-F2	atnttgggaggtcgaggcgggc	Cặp mồi P2 68 bp	



Hình 1. Vị trí của các cặp mồi đặc hiệu cho CpG bị methyl hoá ở trình tự bảo thủ của phân họ *AluY*. Thông tin các trình tự của phân họ *AluY* được tổng hợp và tạo ra trình tự consensus thông qua công cụ ClustalW. Cặp mồi methyl được thiết kế bổ sung gần như hoàn toàn với trình tự đại diện của các trình tự *AluY*, đảm bảo phân tích được phần lớn các biến thể của *AluY* bên trong hệ gen.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tính đặc hiệu của các cặp mồi

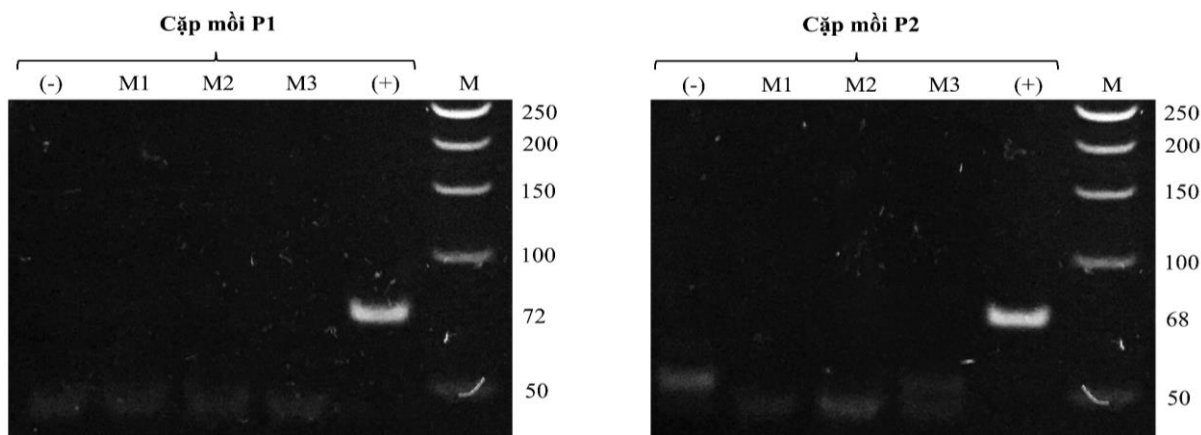
Để thiết kế các mồi đặc hiệu cho phân họ *AluY*, phân họ trẻ nhất vẫn hoạt động và có tỷ lệ chuyển vị cao nhất trong hệ gen người [3], các trình tự *AluY* trong Ngân hàng dữ liệu được so sánh để tìm ra các vùng bảo thủ, từ đó làm cơ sở thiết kế các mồi như trình bày trong Bảng 1 (Hình 1). Các mồi này có C biến đổi thành T

nhưng C trong phức CG được giữ nguyên, như vậy đặc hiệu cho *AluY* sau xử lý bisulfite và bị methyl hoá.

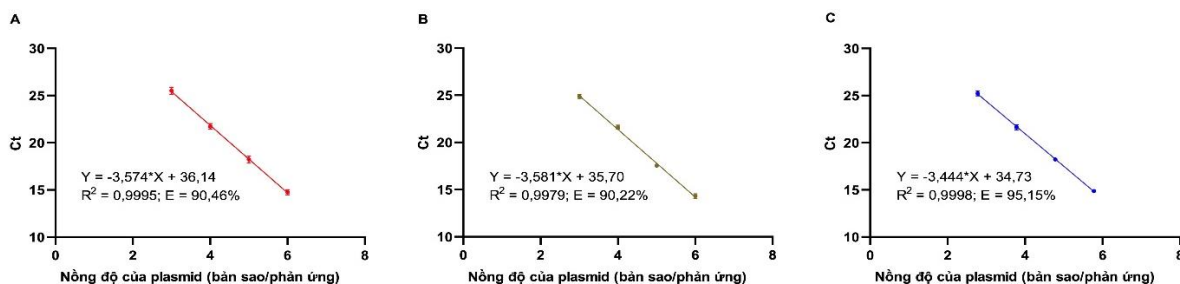
Tính đặc hiệu của các mồi chỉ khuếch đại ADN sau xử lý bisulfite mà không khuếch đại ADN chưa xử lý được chứng minh khi ADN trước và sau xử lý được làm khuôn trong phản ứng PCR. Mỗi cặp mồi được thực hiện với 3 mẫu ADN tổng số khác nhau. Kết quả Hình 2 cho thấy cả hai cặp mồi đều khuếch đại sản phẩm đích đặc hiệu với khuôn plasmid tái tổ hợp và

cho kết quả âm tính với khuôn là ADN trước xử lí. Như vậy, kết quả PCR đã xác nhận rằng hai cặp mồi P1 và P2 được thiết kế dành riêng

cho trình tự *AluY* bị methyl hóa đã trải qua xử lí bisulfite.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra tính đặc hiệu của hai cặp mồi P1 và P2 sử dụng 0,5 ng ADN chưa xử lí bisulfite. Mỗi cặp mồi được thực hiện với 3 mẫu ADN tổng số chưa xử lí (M1-M3). Mẫu (-): đối chứng âm không có ADN khuôn, mẫu (+): đối chứng dương sử dụng plasmid tái tổ hợp mang đoạn chèn *Alu* bị methyl hoá. M: thang chuẩn 50 bp (Thermo Scientific).



Hình 3. Phân tích hiệu suất khuếch đại (E) và hệ số tuyến tính (R^2) của phản ứng qPCR. Dải nồng độ plasmid pAlu-Me được khuếch đại với cặp mồi P1 (A) và cặp mồi P2 (B). Dải nồng độ plasmid Ref-LINE được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu cho *LINE-1* sau xử lí (C). Đường chuẩn được xây dựng dựa trên các giá trị Ct, sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính đơn giản. Mỗi điểm của đường chuẩn được lặp lại ít nhất 3 lần và độ lệch chuẩn được biểu thị bằng các thanh sai số.

3.2. Hiệu suất khuếch đại và hệ số tuyến tính của phản ứng qPCR

Để xác định hiệu suất khuếch đại của 2 cặp mồi P1 và P2, plasmid pAlu-Me được pha loãng bậc 10 để làm khuôn cho phản ứng qPCR. Kết quả biểu diễn trên Hình 3 cho thấy giá trị Ct tương ứng với dải nồng độ plasmid pAlu-Me với 2 cặp mồi đều đạt hiệu suất khuếch đại >90% và hệ số tuyến tính $R^2 > 0,99$. Hiệu suất khuếch đại (E) và hệ số tuyến tính (R^2) của đường chuẩn sử

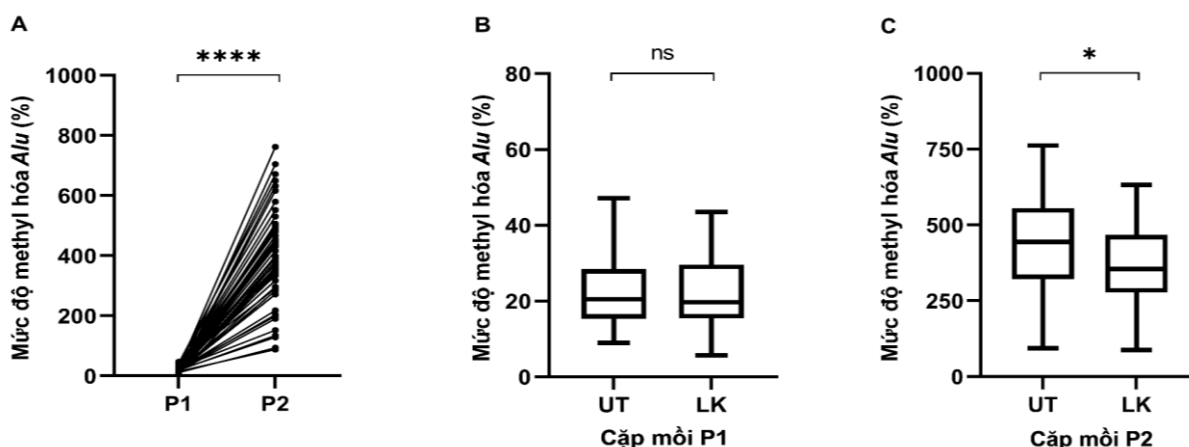
dụng plasmid pRef-LINE-1 tương tự như đã công bố [14]. Các thông số E và R^2 của các đường chuẩn này phù hợp với công thức Pfaffl để tính tỷ lệ methyl hóa *Alu* [13].

3.3. Phân tích mức độ methyl hóa *Alu* trong mẫu mô ung thư vú và mẫu mô liền kề

Thay đổi mức độ methyl hóa *Alu* ở vùng giàu CpG ở vùng 5' được phân tích cho 25 cặp mẫu mô tươi ung thư vú, mỗi cặp gồm mẫu khối u

(UT) và mẫu liền kề (LK). Tỷ lệ methyl hóa *Alu* ở tất cả các mẫu vú cao hơn rõ ràng khi sử dụng cặp môi P2 so với cặp môi P1 với $p < 0,0001$ (Hình 4A). Trong khi cặp môi P1 chưa cho phép xác định sự thay đổi mức độ methyl hóa *Alu* có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm mẫu vú (với $p = 0,2996$, Hình 4B) thì cặp môi P2 cho kết quả tỷ lệ methyl hóa *Alu* cao hơn đáng kể ở mẫu ung

thư so với mẫu liền kề ($p = 0,0210$, Hình 4C). Xu hướng methyl hóa *Alu* tương tự cũng từng được ghi nhận ở nghiên cứu trước đây về khối u cơ xương [4]. Tuy nhiên, số lượng mẫu phân tích còn ít (25 cặp mẫu) là một yếu tố tác động đến số liệu thống kê. Tăng số mẫu phân tích với cặp môi P2 là công việc cần làm tiếp theo.



Hình 4. Methyl hóa vùng 5' của *Alu* ở mẫu ung thư vú. Tỷ lệ methyl hóa *Alu* ở tất cả các mẫu vú khi sử dụng cặp môi P2 cao hơn rõ ràng so với khi sử dụng cặp môi P1 (A). Methyl hóa *Alu* ở mẫu ung thư (UT) so với mẫu liền kề (LK) không thay đổi khi sử dụng cặp môi P1 (B) nhưng sai khác có ý nghĩa thống kê khi sử dụng cặp môi P2 (C). Kiểm định Wilcoxon matched-pairs signed rank test được sử dụng để so sánh sự khác biệt của 2 nhóm mẫu không tuân theo phân phối chuẩn (A, B) và ngược lại, sử dụng kiểm định Paired t test khi các nhóm mẫu đều tuân theo phân phối chuẩn (C), (*) $p < 0,05$, (****) $p < 0,0001$, ns - không có ý nghĩa thống kê.

Sự biến động trong mức độ methyl hóa *Alu* của cùng một mẫu ADN khi xác định bởi hai cặp môi có thể được giải thích bởi sự khác biệt trong thiết kế của hai môi xuôi Alu-Me-F1, Alu-Me-F2 chỉ khác nhau 5 nucleotide nằm phía đầu tận cùng 3' của môi có thêm CpG. Sự khác biệt này đã được chứng minh là có tác động quan trọng tới khả năng tương tác của môi với mạch khuôn [16]. Ngoài ra, thêm 1 vị trí CG ở đầu 3' của môi xuôi thứ 2 có thể giúp môi này có khả năng bám với mạch khuôn tốt hơn, bám với nhiều biến thể *Alu* hơn khi CG này bị methyl hoá, do đó xác định tình trạng methyl hóa *Alu* trong hệ gen ở mức tổng quát hơn [16]. Trong một tế bào, số bản sao của *LINE-1* nguyên vẹn có chứa vùng 5' có khoảng 5×10^3 , nhỏ hơn nhiều so với *Alu* ($\sim 1,2 \times 10^6$ bản sao) [2]. Do đó, theo công thức tính tương đối thu nhận được tỷ lệ methyl hoá

vượt quá 100% là điều hợp lý. Kết quả của chúng tôi cho thấy cặp môi P2 cho phép phát hiện sự biến đổi methyl hoá *Alu* giữa nhóm mẫu ung thư so với nhóm mẫu liền kề và tỷ lệ methyl hóa *Alu* cũng cao hơn so với khi sử dụng cặp môi P1 khoảng 16 lần. Điều này gợi ý rằng, cặp môi P2 có ưu thế nhất định cho phép xác định thay đổi tình trạng methyl *Alu* của tế bào từ giai đoạn sớm. Mặt khác, *Alu* là trình tự ADN lặp rất đa dạng, với nhiều dạng biến thể khác nhau và một trình tự *Alu* trong plasmid tái tổ hợp chưa thực sự hợp lý làm đại diện hoàn hảo cho các biến thể của *Alu* có trong bộ gen. Do đó sử dụng mẫu chuẩn ADN tổng số do các hãng thương mại cung cấp là hướng nghiên cứu tiếp để lựa chọn được cặp môi phân tích tỷ lệ methyl hoá *Alu* có giá trị thực tế hơn nữa.

4. Kết luận

Lựa chọn phương pháp định lượng đặc hiệu methyl (qMSP), chúng tôi đã lựa chọn được cặp mồi đặc hiệu cho phép xác định sự thay đổi mức methyl hóa của trình tự lặp *Alu*. Điều này cho phép mở rộng phân tích methyl hóa *Alu* ở cả vùng 3' của *Alu* khi vùng này có mức độ tương đồng 87% với vùng 5' nhằm thúc đẩy việc phát triển các dấu chuẩn sinh học dựa trên methyl hóa *Alu* cho ung thư có giá trị trong ứng dụng lâm sàng.

Lời cảm ơn

Các tác giả trân trọng cảm ơn Bệnh viện Quân y 175 và các bệnh nhân đã cung cấp mẫu sinh phẩm phục vụ cho nghiên cứu. Nghiên cứu này được tài trợ bởi dự án VINIF.2022.DA00036 từ Quỹ Đổi mới Sáng tạo VinGroup (VINIF).

Tài liệu tham khảo

- [1] R. Lakshminarasimhan, G. Liang, The Role of DNA Methylation in Cancer, in: A. Jeltsch, R. Z. Jurkowska (Eds), DNA Methyltransferases - Role and Function, Springer, Cham, New York, 2016, pp. 151-172, https://doi.org/10.1007%2F978-3-319-43624-1_7.
- [2] D. J. Weisenberger, M. Campan, T. I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich, P. W. Laird, Analysis of Repetitive Element DNA Methylation by Methyl Light, *Nucleic Acids Res*, Vol. 33, 2005, pp. 6823-6836, <https://doi.org/10.1093/nar/gki987>.
- [3] Y. Luo, X. Lu, H. Xie, Dynamic *Alu* Methylation During Normal Development, Aging, and Tumorigenesis, *BioMed Res. Int*, 2014, pp. 784706, <https://doi.org/10.1155/2014/784706>.
- [4] T. Woraruthai, C. Charoenlap, C. Hongsaprabhas, A. Mutirangura, S. Honsawek, *Alu* Hypermethylation and High Oxidative Stress in Patients with Musculoskeletal Tumors, *Peer J*, Vol. 6, 2018, pp. e5492, <https://doi.org/10.7717/peerj.5492>.
- [5] S. Denariyakoon, C. Puttipanyalears, K. Chatamra, A. Mutirangura, Breast Cancer Sera Changes in *Alu* Element Methylation Predict Metastatic Disease Progression, *Cancer Diagn. Progn*, Vol. 2, 2022, pp. 731-738, <https://doi.org/10.21873/cdp.10168>.
- [6] E. Mettler, C. Fottner, N. Bakhshandeh, A. Trenkler, R. Kuchen, M. M. Weber, Quantitative Analysis of Plasma Cell-Free DNA and Its DNA Integrity and Hypomethylation Status as Biomarkers for Tumor Burden and Disease Progression in Patients with Metastatic Neuroendocrine Neoplasias, *Cancers*, Vol. 14, 2022, pp. 1025, <https://doi.org/10.3390%2Fcancers14041025>.
- [7] M. Jordà, A. D. Villanueva, I. Mallona, B. Martín, S. Lois, V. Barrera, M. Esteller, T. Vavouri, M. A. Peinado, the Epigenetic Landscape of *Alu* Repeats Delineates The Structural And Functional Genomic Architecture of Colon Cancer Cells, *Genome Res*, Vol. 27, 2017, pp. 118-132, <https://doi.org/10.1101/gr.207522.116>.
- [8] Y. Gao, A. Baccarelli, X. O. Shu, B.T. Ji, K. Yu, L. Tarantini, G. Yang, H. L. Li, L. Hou, N. Rothman, W. Zheng, Y. T. Gao, W. H. Chow, Blood Leukocyte *Alu* and LINE-1 Methylation and Gastric Cancer Risk in the Shanghai Women's Health Study, *Br. J. Cancer*, Vol. 106, 2012, pp. 585-591, <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.562>.
- [9] D. Tiwawech, R. Srisuttee, P. Rattanatyong, C. Puttipanyalears, N. Kitkumthorn, A. Mutirangura, *Alu* Methylation in Serum from Patients with Nasopharyngeal Carcinoma, *Asian Pac. J. Cancer Prev*, Vol. 15, 2014, pp. 9797-9800, <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.22.9797>.
- [10] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers In 185 Countries, *CA: Cancer J. Clin*, Vol. 71, 2021, pp. 209-249, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [11] S. M. Nguyen, Q. T. Nguyen, L. M. Nguyen, A. T. Pham, H. N. Luu, H. T. T. Tran, T. V. Tran, X. O. Shu, Delay in The Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in Vietnam, *Cancer Med*, Vol. 10, 2021, pp. 7683-7691, <https://doi.org/10.1002/cam4.4244>.
- [12] S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul, M. Frommer, High Sensitivity Mapping of Methylated Cytosines, *Nucleic Acids Res*, Vol. 22, 1994, pp. 2990-2997, <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F22.15.2990>.
- [13] M. W. Pfaffl, A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-time RT-PCR,

- Nucleic Acids Res, Vol. 29, 2001, pp. e45, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [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, 2022, pp. 65-73, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4314>.
- [15] P. Deininger, Alu Elements: Know the SINEs, *Genome Biol*, Vol. 12, 2011, pp. 236, <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>.
- [16] S. Kwok, D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, J. J. Sninsky, Effects of Primer-Template Mismatches on the Polymerase Chain Reaction: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Model Studies, *Nucleic Acids Res*, Vol. 18, 1990, pp. 999-1005, <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F18.4.999>.