



Original Article

Simultaneous Quantification of Mitochondrial DNA Copy Number and Large-Scale Deletion Using Real-Time PCR Method

Nguyen Thi Tu Linh, Pham Thi Bich, Trinh Hong Thai*

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

Received 28th May 2024

Revised 26th April 2025; Accepted 05th May 2025

Abstract: Alterations in mitochondrial DNA (mtDNA) copy number and the level of large-scale deletions have been shown to affect the function of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) and are associated with carcinogenesis when they exceed a critical threshold. Most studies quantify either mtDNA copy number alteration or large-scale deletions individually, without assessing both parameters simultaneously. In this study, we aim to develop a real-time PCR-based method capable of simultaneously quantifying mtDNA copy number and the extent of large-scale deletions. The detection limit was established at as low as 20 copies per reaction, with high repeatability. Standard curves demonstrated high linearity ($R^2 > 0.993$) and amplification efficiency ($> 93.08\%$). Application of the method to 20 tissue and blood samples from patients with benign breast tumors revealed that mtDNA copy number was generally higher in tissue samples compared to blood. Conversely, the level of large-scale deletions was significantly lower in tissue than in blood samples ($p < 0.05$). These findings suggest the successful development of a quantitative method based on real-time PCR with high sensitivity and accuracy, which enables the simultaneous quantification of mtDNA copy number and large-scale deletions, providing a valuable tool for mitochondrial gene analysis in biomedical research.

Keywords: Large-scale deletion, Mitochondrial DNA, mtDNA copy number, Real-time PCR.

* Corresponding author.

E-mail address: thaith@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5717>

Xác định đồng thời số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng phương pháp real-time PCR

Nguyễn Thị Tú Linh, Phạm Thị Bích, Trịnh Hồng Thái*

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

Nhận ngày 28 tháng 5 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 26 tháng 4 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 5 năm 2025

Tóm tắt: Biến đổi số bản sao và mất đoạn lớn của ADN ty thể đã được chứng minh có ảnh hưởng đến chức năng của phức hệ phosphoryl hóa oxi hóa (OXPHOS) và liên quan đến quá trình phát sinh ung thư khi vượt quá một ngưỡng nhất định. Hầu hết các nghiên cứu đều định lượng riêng lẻ sự thay đổi số bản sao hoặc mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể mà chưa định lượng đồng thời cả hai sự biến đổi này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp định lượng đồng thời số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng real-time PCR. Giới hạn phát hiện của phương pháp được xác định là từ 20 bản sao trong một phản ứng và có độ lặp lại cao. Các đường chuẩn được xây dựng có hệ số R^2 ($> 0,993$) và hiệu suất khuếch đại ($> 93,08\%$) cao. Áp dụng phân tích thử nghiệm trên 20 mẫu mô và máu của các bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính cho thấy số bản sao ADN ty thể trong mẫu mô có xu hướng cao hơn so với trong máu của cùng bệnh nhân, tuy nhiên mức độ mất đoạn lớn ở mẫu mô lại thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với mẫu máu ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ chúng tôi đã xây dựng thành công phương pháp định lượng bằng real-time PCR có độ nhạy và độ chính xác cao, có thể áp dụng được trong định lượng đồng thời số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể, cung cấp một công cụ có giá trị để phân tích gen ty thể trong nghiên cứu y sinh.

Từ khóa: ADN ty thể, Mất đoạn lớn, Số bản sao, Real-time PCR.

1. Mở đầu

Biến đổi của các gen mã hóa bởi ty thể từ lâu đã được cho là có liên quan với quá trình tạo u bởi vì các tế bào ung thư cần sử dụng nhiều năng lượng để sinh trưởng và tăng sinh dưới các điều kiện hạn chế [1]. Cho đến nay, ảnh hưởng của các đột biến ADN ty thể đến chức năng của con đường phosphoryl hóa oxi hóa (OXPHOS), quá trình phát sinh ung thư và tiến triển thành ác tính đã được chứng minh có liên quan đến một số thay đổi trong ADN ty thể mà trước tiên là thay đổi số bản sao ADN ty thể, sau đó là giảm biểu hiện của các gen ty thể

hoặc biến đổi hoạt tính các enzyme của ty thể [2, 3].

Gần đây, nhiều bằng chứng cho thấy có sự tích lũy bất thường về số bản sao ADN ty thể trong các loại ung thư. Khi so sánh với mô không ung thư, tăng số bản sao ADN ty thể đã được báo cáo trong ung thư buồng trứng [4], ung thư tuyến tiền liệt [5], ung thư đại trực tràng [6],... Trong khi đó, giảm số bản sao ADN ty thể đã được tìm thấy trong ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư phổi không tế bào nhỏ và một số dạng ung thư khác [7-9]. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể là do sự thiếu hụt của OXPHOS ức chế biểu hiện/chức năng của p53, từ đó làm tăng các đột biến của ADN ty thể hoặc giảm số bản sao ADN ty thể. Các biến đổi này tác động ngược lại gây rối loạn chức năng của OXPHOS từ đó làm cho tỉ lệ mắc ung thư cao hơn [10].

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: thaith@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5717>

Bên cạnh sự thay đổi số bản sao của ADN ty thể, giảm biểu hiện của các gen ty thể hoặc biến đổi hoạt tính enzyme của ty thể có thể liên quan đến các mất đoạn lớn của ADN ty thể. Hệ gen ty thể được đặc trưng bởi một số ít các trình tự lặp và hầu hết các mất đoạn lớn của ADN ty thể đều nằm giữa hai trình tự lặp trực tiếp [11]. Vùng mất đoạn chính của ADN ty thể nằm từ gen *CYTB* đến *COI* và có kích thước khoảng từ 1,3 đến 8 kb. Ngược lại, vùng ngược chiều kim đồng hồ từ vị trí 547 thuộc D-loop đến vị trí 5443 của gen *ND2* có ít trình tự lặp hơn và do đó ít bị mất hơn [12]. Đột biến này tạo ra phân tử ADN ty thể nhỏ hơn bình thường và vẫn có thể sao chép được nên có thể được tích lũy theo thời gian ở các mô sau nguyên phân với tỉ lệ khác nhau [13]. Các mất đoạn này thường ở dạng dị tế bào chất và mức độ mất đoạn được cho là khoảng 60% mới ảnh hưởng đến chức năng của chuỗi hô hấp ty thể [14]. So với các đột biến điểm, mất đoạn lớn của ADN ty thể xảy ra ít thường xuyên hơn nhưng lại đóng vai trò quan trọng hơn trong các bệnh liên quan đến ty thể và ung thư.

Trong những năm gần đây, có nhiều phương pháp đã được sử dụng để xác định số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể như PCR, long-range PCR, PCR bán định lượng, Southern blotting... tuy nhiên không phải phương pháp nào cũng có độ nhạy cao, đặc hiệu và có thể lặp lại được [15, 16]. Ngược lại, phương pháp real-time PCR được cho là thích hợp cho việc xác định số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể do có độ nhạy và độ chính xác cao, có thể xác định được từ một lượng nhỏ khuôn ADN, không tốn thời gian và nhân lực,... Tuy nhiên, trong phần lớn các nghiên cứu, phương pháp real-time PCR được phát triển để định lượng riêng lẻ sự thay đổi số bản sao hoặc mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể dựa trên sự có mặt của một gen nằm trong vùng ít xảy ra mất đoạn với một gen nằm trong vùng hay xảy ra mất đoạn và so sánh với số bản sao của một gen giữ nhà trong nhân mà chưa có phương pháp nào có thể định lượng được đồng thời cả hai sự biến đổi này của ADN ty thể [17 18].

Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp xác định đồng thời số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng phương pháp real-time PCR sử dụng SYBR Green làm chất phát huỳnh quang, sau đó tiến hành ứng dụng xác định các biến đổi này trên các mẫu mô và máu của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu bao gồm mẫu máu của người bình thường do Khoa Sàng lọc máu, Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương cung cấp, dùng để xây dựng các plasmid chuẩn và đánh giá phương pháp. Các mẫu mô và mẫu máu của 20 bệnh nhân được chẩn đoán mắc u tuyến vú lành tính do Khoa Giải phẫu bệnh - Tế bào, Bệnh viện K cung cấp được sử dụng để đánh giá phương pháp. Mẫu máu được đựng trong ống đựng máu chuyên dụng có chất chống đông và được bảo quản trong tủ lạnh -20 °C cho đến khi sử dụng. Các mẫu mô đựng trong ống eppendorf được vận chuyển trong Nitơ lỏng và bảo quản trong tủ lạnh sâu -80 °C cho đến khi thực hiện nghiên cứu tiếp theo.

Bệnh nhân tham gia lấy mẫu đã được biết về mục đích nghiên cứu và đồng ý chấp thuận cho mẫu. Nghiên cứu được thực hiện đúng theo các quy định hiện hành về đạo đức trong nghiên cứu y học trong việc thu thập các mẫu máu và mô của bệnh nhân và đã được Hội đồng Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua và phê duyệt (2422/QĐ-KHCN).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết từ mẫu mô và mẫu máu sử dụng QIAamp DNA Mini Kit và QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ ADN tổng số được xác định bằng máy quang phổ NanoDrop 2000c (Thermoscientific, Mỹ).

2.2.2. Tạo plasmid tái tổ hợp

Để định lượng số bản sao và mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng phương pháp real-time PCR, đoạn ADN của gen *HBB* (hemoglobin subunit beta - nằm trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 11) được chọn đại diện cho ADN nhân. Gen *ND1* nằm trong vùng ít xảy ra mất đoạn và gen *ND4* nằm trong vùng hay xảy ra mất đoạn được chọn đại diện cho ADN ty thể [19]. Các cặp mồi đặc hiệu cho gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được thiết kế bằng chương trình Primer-BLAST dựa vào trình tự chuẩn của ADN ty thể (mã số

NC_012920.1) và gen *HBB* (mã số NG_000007.3) trên NCBI (Bảng 1).

Thành phần PCR bao gồm: 6,25 µl Maxima Hot Start PCR Mastermix (2X); 0,25 µl mồi xuôi (0,2 µM); 0,25 µl mồi ngược (0,2 µM); khuôn ADN (2 ng/µl) và H₂O cho tổng thể tích 12,5 µl. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và chạy trên máy GenAmp® PCR System 9700 với chu trình nhiệt như sau: 95 °C: 4 phút, 35 chu kỳ (95 °C: 30 giây; 54 °C: 30 giây; 72 °C:30 giây); 72 °C: 5 phút, sau đó giữ ở 4 °C.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gene đích	Tên mồi	Kích thước sản phẩm PCR (vị trí)	Trình tự mồi xuôi (5' – 3')	Trình tự mồi ngược (5' – 3')	Mục đích
<i>HBB</i>	HBB-1	272 bp (70535 - 70806)	gtcagaagcaaatgtaagcaaga	gaaaatagaccaataggcagagaga	Tách dòng tạo plasmid tái tổ hợp
<i>ND1</i>	ND1-1	293 bp (3741 - 4033)	cctagccatcattctactatcaaca	ggaagattgtagtggtaggggt	
<i>ND4</i>	ND4-1	547 bp (10565 - 11111)	cctagaaggaataatactatcgctgt	atatgattagtctgtggctgtga	
<i>HBB</i>	HBB-2	104 bp (70615 - 70718)	ggagaagtctgccgttactg	ccttaaacctgtcttgaacct	Real-time PCR
<i>ND1</i>	ND1-2	115 bp (3775 - 3889)	agtggctccttaacctctc	ggttggtctctgctagtgtg	
<i>ND4</i>	ND4-2	128 bp (10903 - 11030)	cctatttagctgttcccaa	gtgatagtgttctactggataagt	

Các sản phẩm PCR sau khi đã kiểm tra bằng điện di trên gel agarose được tạo đầu bằng và gắn trực tiếp vào vector nhân dòng pJET1.2/blunt Cloning Vector và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5α. Các bước của phản ứng tạo đầu bằng, nối và biến nạp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Fermentas). Plasmid tái tổ hợp mang đoạn ADN của gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được tách chiết và tinh sạch bằng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Đức), sau đó được giải trình tự và so sánh với trình tự tham chiếu của ADN ty thể (NC_012920.1) và gen *HBB* (NG_000007.3) đã được công bố trên NCBI. Nồng độ plasmid được định lượng bằng cách đo mật độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm (A260) trên máy NanoDrop 2000c.

2.2.3. Xây dựng đường chuẩn định lượng số bản sao và mức độ mất đoạn lớn

Để xây dựng đường chuẩn, số bản sao ADN plasmid ban đầu được tính toán dựa trên kích thước, trọng lượng phân tử và nồng độ của ADN plasmid theo công thức sau [20]:

$$\text{Số bản sao ADN plasmid} = \frac{C \times 6,02 \times 10^{23}}{L \times 660 \times 10^9}$$

Trong đó: C là nồng độ plasmid (ng/µl). L là kích thước plasmid cộng đoạn chèn (bp).

Dung dịch ADN plasmid chứa các đoạn ADN của gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được pha loãng với hệ số 10 (từ 10⁹ đến 10¹ bản sao/µl) để xây dựng đường chuẩn và xác định giới hạn phát hiện của phản ứng cho phương pháp định

lượng real-time PCR. Thí nghiệm được lặp lại trong 3 ngày, mỗi ngày 3 lần, mỗi lần 3 phản ứng. Hiệu suất khuếch đại của phản ứng real-time PCR được xác định dựa vào đường chuẩn theo công thức: $Hiệu\ suất\ phản\ ứng\ (\%) = (10^{1/a} - 1) \times 100$. Trong đó: a là hệ số góc của đường chuẩn định lượng [21].

2.2.4. Phân tích đường cong nóng chảy

Phân tích đường cong nóng chảy sau các chu kỳ của phản ứng real-time PCR bằng cách biến tính sản phẩm PCR ở các điểm nhiệt khác nhau, nâng lên dần từ 55 °C đến 95 °C theo từng 0,5 °C/lần để xác định được nhiệt độ nóng chảy T_m . Bên cạnh đó, sản phẩm sau khi chạy real-time PCR được điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra độ đặc hiệu của sản phẩm.

2.2.5. Xác định số bản sao và mức độ mất đoạn của ADN ty thể

Số bản sao và mức độ mất đoạn của ADN ty thể được xác định bằng phương pháp real-time PCR sử dụng SYBR Green làm chất phát huỳnh quang. Thành phần phản ứng gồm: 5 μ l qPCR BIO SyGreen Mix Lo-ROX (Bioline, Meridian Bioscience); 1 μ l mỗi xuôi (0,04 μ M); 1 μ l mỗi ngược (0,04 μ M); 15 ng ADN tổng số và H₂O trong tổng thể tích 10 μ l phản ứng. Trình tự các cặp mồi dùng cho phản ứng real-time PCR được trình bày trong Bảng 1. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và chạy trên máy MyGo Pro Real-time PCR (IT-IS Life Science Ltd) với chu trình: hoạt hóa enzyme ở 95 °C trong 120 giây, 40 chu kỳ gồm biến tính ADN ở 95 °C trong 10 giây; gắn mồi và kéo dài chuỗi ở 60 °C trong 30 giây. Cường độ tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận trong 1 giây sau khi kết thúc một chu kỳ và được phân tích bởi phần mềm của máy MyGo Pro Real-time PCR.

Dựa trên các giá trị C_t của mẫu nghiên cứu, số bản sao tương đối của ADN ty thể được tính toán dựa trên công thức $2^{\Delta C_t}$, trong đó $\Delta C_t = C_t_{HBB} - C_t_{ND1}$ [22].

Mức độ mất đoạn (%) của ADN ty thể được tính toán sử dụng công thức $(1 - R_{ND4/ND1}) \times 100$. Trong đó, $R_{ND4/ND1}$ là tỉ số bản sao của gen $ND4$ và $ND1$, được xác định bằng $2^{\Delta C_t}$ và $\Delta C_t = C_t_{ND1} - C_t_{ND4}$ [23].

2.2.6. Các phần mềm tin sinh học và phân tích thống kê

Các mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR được thiết kế bằng chương trình Primer-BLAST (NCBI). Trình tự các gen ty thể được so sánh, phân tích với trình tự tham chiếu của ADN ty thể công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng các phần mềm tin sinh học chuyên dụng như BioEdit v7.0, BLAST và ClustalX. Sử dụng phần mềm GraphPad Prism 8.4.2 để phân tích số liệu thu được theo các kiểm định thống kê thường dùng. So sánh thống kê bằng kiểm định T Wilcoxon đối với các biến định lượng theo cặp không tuân theo phân phối chuẩn.

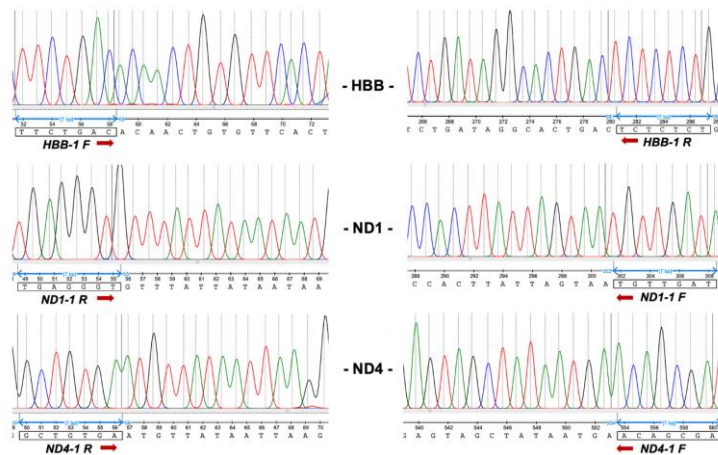
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo các plasmid mang đoạn gen *HBB*, *ND1* và *ND4* làm mẫu chuẩn

Các plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được giải trình tự nucleotide và so sánh với trình tự tham chiếu của ADN ty thể và trình tự của gen *HBB* trên NCBI. Kết quả phân tích trình tự ADN cho thấy đã thành công trong nhân dòng, giải trình tự và xác định được chính xác đoạn ADN của gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được chèn vào các plasmid thu được (Hình 1).

Các plasmid chứa gen *HBB*, *ND1* và *ND4* được đo nồng độ trên máy quang phổ và được xác định tương ứng bằng 6,6 ng/ μ l, 6,7 ng/ μ l và 7,3 ng/ μ l. Số bản sao ADN plasmid được tính toán dựa trên kích thước của plasmid sau khi gắn gen *HBB*, *ND1* và *ND4* (tương ứng là 3246 bp, 3267 bp và 3521 bp) với giả định rằng 660 g/mol cho mỗi bp của ADN. Kết quả thu được dung dịch plasmid đã gắn đoạn gen *HBB*, *ND1* và *ND4* có nồng độ tương ứng là $1,86 \times 10^9$ bản sao/ μ l, $1,87 \times 10^9$ bản sao/ μ l và $1,89 \times 10^9$ bản sao/ μ l.

Như vậy, kết quả phân tích đã cho thấy các plasmid đủ điều kiện để sử dụng làm mẫu chuẩn xây dựng đường chuẩn định lượng số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể.



Hình 1. Kết quả giải trình tự các plasmid mang đoạn chèn của gen *HBB*, *ND1* và *ND4*. Vòng đóng khung chỉ vị trí bắt cặp của các mồi vào trình tự gen đích.

3.2. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao và mức độ mất đoạn của ADN ty thể

ADN plasmid được pha loãng với hệ số 10 (từ 10^9 đến 10^1 bản sao/ μ l) để xây dựng đường chuẩn bằng real-time PCR. Kết quả cho thấy nồng độ ADN plasmid thấp nhất cho tín hiệu dương tính là $\sim 2 \times 10^1$ bản sao/ μ l (giá trị Ct > 25). Điều này chứng tỏ giới hạn phát hiện của phương pháp là khoảng 20 bản sao trong một

phản ứng. Tuy nhiên, với các nồng độ quá cao (2×10^9) hoặc quá thấp (2×10^1) thì giá trị Ct thu được nằm ngoài khoảng tuyến tính, do đó giới hạn định lượng của phương pháp được xác định là từ 10^8 đến 10^2 bản sao/ μ l. Bên cạnh đó, phương pháp có độ lặp lại cao với hệ số biến thiên (CV) từ 0,89 đến 2,95 đối với gen *HBB*, từ 0,21 đến 0,94 đối với gen *ND1* và từ 0,003 đến 0,86 đối với gen *ND4* (Bảng 2).

Bảng 2. Độ nhạy và độ biến thiên kết quả định lượng plasmid chuẩn bằng real-time PCR

Nồng độ plasmid (số bản sao/ μ l)	<i>HBB</i>			<i>ND1</i>			<i>ND4</i>		
	TB (Ct)	SD	CV (%)	TB (Ct)	SD	CV (%)	TB (Ct)	SD	CV (%)
2×10^8	7,63	0,14	1,84	4,92	0,04	0,77	9,12	0,02	0,23
2×10^7	10,17	0,28	2,74	8,38	0,03	0,33	12,01	0,34	2,80
2×10^6	12,66	0,14	1,10	12,11	0,04	0,33	15,39	0,07	0,43
2×10^5	17,59	0,16	0,89	15,55	0,07	0,44	19,17	0,09	0,46
2×10^4	21,23	0,35	1,66	18,98	0,05	0,24	22,77	0,12	0,52
2×10^3	24,50	0,72	2,95	22,21	0,05	0,21	26,53	0,00	0,00
2×10^2	27,88	0,40	1,42	25,19	0,24	0,94	29,01	0,25	0,86

Ghi chú: TB: giá trị trung bình. SD: độ lệch chuẩn. CV: hệ số biến thiên.

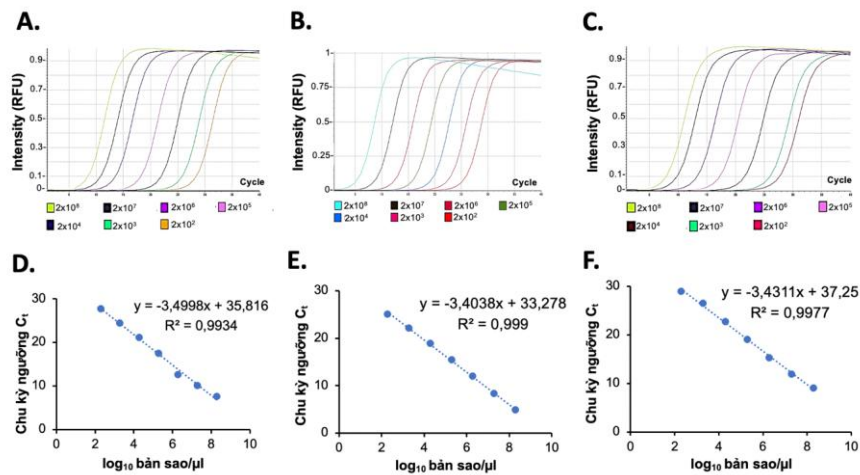
Độ nhạy và kết quả định lượng chính xác còn được khẳng định thông qua đường chuẩn - đường thẳng tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng Ct với lượng bản sao đích ban đầu trong từng nồng độ plasmid pha

loãng. Theo Hình 2, đường chuẩn định lượng của gen *HBB* thu được có hệ số $R^2 = 0,9934$ và hệ số góc của đường chuẩn là 3,4998, do đó có hiệu suất khuếch đại tính toán được là 96,69%. Tương tự, đường chuẩn định lượng của gen

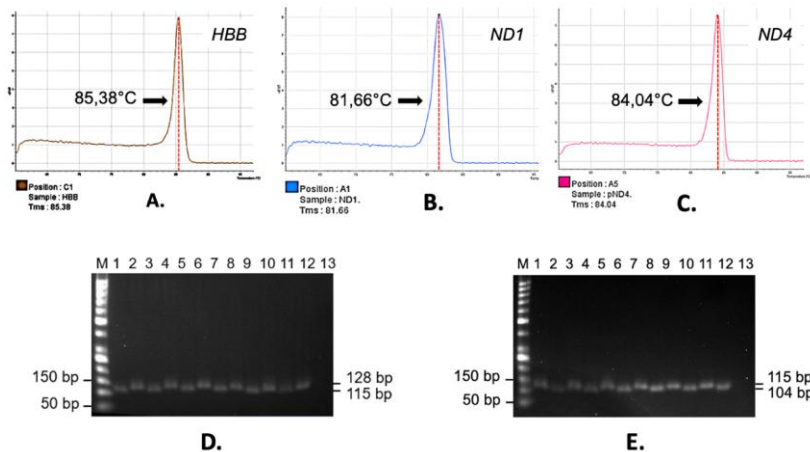
ND1 thu được có các giá trị tương ứng là 0,999; 3,4038 và 93,08%. Đường chuẩn định lượng của gen *ND4* thu được có các giá trị tương ứng là 0,9977; 3,4311 và 95,64%. Điều này chứng tỏ phản ứng có hiệu suất khuếch đại tốt và ổn định.

Bên cạnh đó, phân tích đường cong đỉnh chảy cho thấy nhiệt độ nóng chảy của đoạn gen *HBB*, *ND1* và *ND4* tương ứng là 85,38 °C;

81,66 °C và 84,04 °C (Hình 3A, B, C). Kết quả điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 2% cũng cho thấy các băng thu được sáng rõ nét, đặc hiệu, không có sản phẩm phụ. Điều này chứng tỏ các cặp mồi đã nhân bản đặc hiệu các đoạn gen quan tâm và có thể sử dụng được trong PCR định lượng với SYBR Green (Hình 3D, E).



Hình 2. Biểu đồ khuếch đại real-time PCR sử dụng SYBR Green của các plasmid mang đoạn gen *HBB* (A), *ND1* (B), *ND4* (C) ở các nồng độ từ 10⁸ – 10² bản sao/μl và các đường chuẩn định lượng tương ứng của gen *HBB* (D), *ND1* (E) và *ND4* (F).

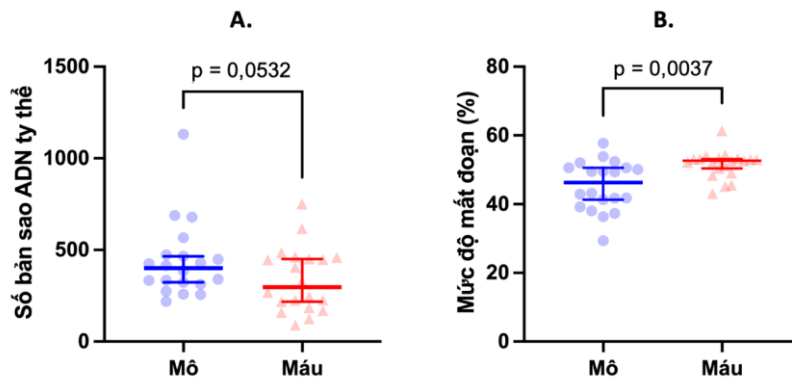


Hình 3. Đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại bằng real-time PCR và kết quả điện di sản phẩm real-time PCR trên gel agarose 2%. (A) Đường cong đỉnh chảy của đoạn gen *HBB*. (B) Đường cong đỉnh chảy của đoạn gen *ND1*. (C) Đường cong đỉnh chảy của đoạn gen *ND4*. (D) Ảnh điện di sản phẩm real-time PCR nhân bản gen *ND1* (băng kích thước 115 bp) và gen *ND4* (băng kích thước 128 bp). (E) Ảnh điện di sản phẩm real-time PCR nhân bản gen *ND1* (băng kích thước 115 bp) và gen *HBB* (băng kích thước 104 bp). Trong đó, M: thang chuẩn ADN 50 bp. Giếng 1-12: các mẫu phân tích. Giếng 13: Đối chứng âm (H₂O).

3.3. Ứng dụng định lượng số bản sao và mức độ mất đoạn của ADN ty thể trên các mẫu bệnh phẩm

Áp dụng phương pháp real-time PCR đã định lượng được số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể trên các mẫu mô và máu của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính. Để xác định vùng tuyến tính và giới hạn phát hiện của mẫu, các mẫu ADN tổng số được chạy thử nghiệm với các nồng độ giảm dần từ 50 đến 0,5 ng/ μ l. Kết quả cho thấy nồng độ ADN tổng số tối ưu cho phản ứng real-time PCR là từ 1 - 1,5 ng/ μ l. Kết quả này cũng phù hợp với phương pháp định lượng số bản sao ADN ty thể được áp dụng trong các nghiên cứu trước đây [24, 25].

Kết quả phân tích cho thấy số bản sao ADN ty thể trong mô của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính (trung vị = 400,5; khoảng tin cậy 95%: 315,7 - 471,3) có xu hướng cao hơn so với số bản sao trong máu của cùng bệnh nhân (trung vị = 297,0; khoảng tin cậy 95%: 192,6 - 456,8) ($p = 0,0532$). Đối với mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể, so sánh giữa mẫu mô và mẫu máu của cùng bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính thấy mức độ mất đoạn lớn ở mẫu mô (trung vị = 46,3; khoảng tin cậy 95%: 39,7 - 50,6) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với mẫu máu (trung vị = 52,6, khoảng tin cậy 95%: 49,4 - 53,2) với $p = 0,0037$ (Hình 4).



Hình 4. Biểu đồ biểu diễn kết quả định lượng số bản sao (A) và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể (B) trên mẫu mô và mẫu máu của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính. Hình tròn và tam giác biểu diễn cho các giá trị thu được của từng mẫu nghiên cứu. p nhận được từ kiểm định T Wilcoxon.

3.4. Thảo luận

ADN ty thể có từ hàng trăm đến hàng ngàn bản sao trong một tế bào và các bản sao ADN ty thể có biến đổi có thể cùng tồn tại với các bản sao không bị biến đổi (hiện tượng dị tế bào chất) và chỉ ảnh hưởng đến chức năng của OXPHOS khi tỉ lệ phân tử bị biến đổi vượt qua một ngưỡng nhất định, đặc hiệu cho loại mô và loại đột biến. Ví dụ, đối với đột biến mất đoạn lớn của ADN ty thể, ngưỡng ảnh hưởng được xác định là từ khoảng 50 - 60%, trong khi đó đối với các đột biến điểm của gen tRNA có ngưỡng ảnh hưởng là trên 90% [15]. Do đó, việc định lượng được số bản sao của ADN ty

thể, đặc biệt là số bản sao ADN bị biến đổi, có vai trò quan trọng và tiềm năng được sử dụng như một chỉ thị sinh học đặc hiệu trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh.

Có nhiều phương pháp được sử dụng để phát hiện và định lượng mức độ dị tế bào chất của ADN ty thể. Trước đây, phương pháp lai Southern blot được sử dụng như một phương pháp tiêu chuẩn trong đánh giá mức độ biến đổi số bản sao của ADN ty thể trong các mẫu nghiên cứu. Mặc dù có độ tin cậy cao nhưng kỹ thuật này có nhược điểm là mất nhiều thời gian, chỉ bán định lượng và cần lượng ADN ban đầu tương đối lớn [15]. Đây được cho là nhược

điểm lớn trong nghiên cứu trên các mẫu ở người. Tương tự, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao biến tính DHPLC cũng có thể phân tách được các dạng biến đổi ADN ty thể với độ tin cậy cao. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là cần các đoạn khuếch đại lớn kết hợp với sử dụng các enzyme giới hạn hoặc phân tích DHPLC các sản phẩm PCR đơn lẻ với độ phân giải không xác định, không phù hợp để định lượng mức độ dị tế bào chất của ADN ty thể [26, 27]. Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ cũng được sử dụng để phân tích số bản sao ADN ty thể trong một tế bào nhưng cũng có nhược điểm là tốn nhiều công sức, chỉ cung cấp được một phần thông tin do chỉ ước tính được tỉ lệ thay đổi của ADN ty thể [15]. Gần đây, phương pháp giải trình tự Sanger và giải trình tự thế hệ mới (NGS) cũng được sử dụng trong xác định mức độ dị tế bào chất của ADN ty thể, bao gồm phương pháp giải trình tự toàn bộ exome (WES) và giải trình tự toàn bộ genome (WGS). Các phương pháp này có độ chính xác cao, tuy nhiên giá thành đắt, do đó hạn chế trong phân tích thường quy và áp dụng rộng rãi trong lâm sàng. Bên cạnh đó, tỉ lệ biến đổi thấp của ADN ty thể cũng gây khó khăn trong việc phát hiện các biến đổi do chưa đạt được độ bao phủ cần thiết để loại bỏ các sai sót của giải trình tự và giá thành xét nghiệm cao [15, 16].

Khắc phục nhược điểm của các phương pháp trên, phương pháp real-time PCR được coi là chuẩn vàng trong xác định số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể do có độ nhạy và độ chính xác cao, có thể xác định được từ một lượng nhỏ khuôn ADN, không tốn thời gian và nhân lực,... Tuy nhiên, trong phần lớn các nghiên cứu, phương pháp real-time PCR được phát triển để định lượng riêng lẻ sự thay đổi số bản sao hoặc mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể mà chưa có phương pháp nào có thể định lượng được đồng thời cả hai sự biến đổi này [17, 18]. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi xây dựng phương pháp xác định đồng thời số bản sao tương đối và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng real-time PCR, từ đó có thể mở rộng tiềm năng sử dụng các chỉ thị

này trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh được nhanh chóng và thuận tiện hơn.

Trong nghiên cứu này, số bản sao của ADN ty thể được xác định dựa trên tỷ số giữa số bản sao của gen *ND1* ty thể trên số bản sao của gen *HBB*. Gen *HBB* (hemoglobin subunit beta) nằm trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 11 được lựa chọn đại diện cho sự có mặt của hệ gen nhân do luôn được biểu hiện ổn định và tính đa hình thấp. Đối với ty thể, gen *ND1* nằm trong vùng hiếm khi xảy ra mất đoạn của ADN ty thể (có trong hệ gen của 94% trường hợp có các mất đoạn đơn và 100% trường hợp có nhiều mất đoạn của ADN ty thể) được lựa chọn đại diện cho số bản sao của ADN ty thể trong một tế bào [19, 23].

Để xác định mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể, tỷ số giữa số bản sao của gen *ND4* và *ND1* ty thể đã được sử dụng. Gen *ND1* thuộc vùng ADN ty thể hiếm khi bị mất ở người (vùng ít xảy ra mất đoạn) được lựa chọn đại diện cho số bản sao của ADN ty thể trong một tế bào. Gen *ND4* thuộc vùng thường bị mất ở đa số các bệnh nhân có các đột biến mất đoạn lớn (vùng mất đoạn chính) (chiếm 82% trường hợp có mất đoạn lớn và 96% trường hợp có nhiều mất đoạn của ADN ty thể) và được lựa chọn để đại diện cho sự có mặt của bản sao ADN ty thể không chứa mất đoạn [19, 23]. Như vậy, số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể sẽ được xác định đồng thời nhờ sự có mặt của 3 gen này.

Kết quả cho thấy phương pháp này có độ chính xác và độ nhạy cao, có thể phát hiện được tối thiểu 2×10^1 bản sao trong một phản ứng với hệ số khuếch đại > 93,08%. Phạm vi phát hiện rộng, có thể xác định được từ 10^2 đến 10^8 bản sao/ μ l. Hệ số biến thiên giữa các lần chạy thấp, dao động từ 0,003% đến 2,95% đối với các gen đích khác nhau. Bên cạnh đó, phân tích đường cong nóng chảy cũng giúp đánh giá tính đặc hiệu sản phẩm (không có sản phẩm phụ) khi dựa vào đỉnh của đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy với các giá trị T_m đều > 81,66 °C. Điều này cho thấy các thông số của đường chuẩn đều có độ tin cậy và quy trình định lượng

đạt hiệu quả cao, có thể áp dụng được trong phân tích số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể với ưu điểm nhanh, chính xác và không cần các bước phân tích sau khi PCR.

Áp dụng thử nghiệm trên các mẫu của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính, phản ứng real-time PCR xác định số bản sao và mức độ mất đoạn lớn ADN ty thể đều cho kết quả thành công 100%. Phân tích dữ liệu thu được cho thấy số bản sao ADN ty thể trong mẫu mô của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính có xu hướng cao hơn so với số bản sao trong mẫu máu của cùng bệnh nhân. Ngược lại, mức độ mất đoạn lớn ở mẫu mô (46,3%) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với mẫu máu (52,6%) ($p < 0,05$).

Cũng trên đối tượng bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính, sử dụng phương pháp real-time PCR định lượng tuyệt đối dựa vào đường chuẩn, Ye và cộng sự xác định được phần trăm đột biến mất đoạn 4977 bp là từ 0,000149% đến 7% trong tất cả các mẫu nghiên cứu [28]. Các tác giả cho rằng tỉ lệ phát hiện đột biến mất đoạn lớn cao trong nghiên cứu này là kết quả của phương pháp định lượng có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với các phương pháp được dùng trước đây như long-PCR hay PCR bán định lượng. Nghiên cứu của Nie và cộng sự xác định thấy cả số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể trong mẫu mô đều cao hơn so với trong mẫu máu của cùng bệnh nhân Trung Quốc bị u tuyến vú lành tính [18]. Bên cạnh đó, nhóm tác giả cũng không tìm thấy có mối liên quan giữa tăng số bản sao của ADN ty thể ở các mẫu mô và mẫu máu có mức độ mất đoạn tăng. Lý giải cho điều này, có giả thuyết cho rằng thay đổi số bản sao của ADN ty thể trong quá trình phát sinh ung thư có thể được điều hòa theo một cách thức đặc hiệu mô, tức là khác nhau ở các loại mô khác nhau [29]. Đối với biến đổi của số bản sao ADN ty thể, số bản sao ADN ty thể cao trong mô hoặc máu của bệnh nhân so với đối chứng được cho là làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú [17].

Theo hiểu biết của chúng tôi, cho đến nay mới có một số ít nghiên cứu sử dụng phương pháp real-time PCR để xác định đồng thời sự

thay đổi số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể, đặc biệt trên các mẫu mô và máu của bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nếu kết hợp với dữ liệu phân tích trên đối tượng bệnh nhân mắc ung thư vú và nhóm đối chứng khỏe mạnh có thể có giá trị trong việc đánh giá nguy cơ cũng như tiên lượng của ung thư vú.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công phương pháp định lượng số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể bằng real-time PCR có độ nhạy và độ chính xác cao, có thể áp dụng được trong định lượng đồng thời số bản sao và mức độ mất đoạn lớn của ADN ty thể trong các mẫu mô và mẫu máu. Kết quả phân tích ban đầu trên 20 bệnh nhân mắc u tuyến vú lành tính cho thấy số bản sao ADN ty thể trong mẫu mô có xu hướng cao hơn so với số bản sao trong máu của cùng bệnh nhân. Ngược lại, mức độ mất đoạn lớn ở mẫu mô lại thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với mẫu máu của cùng nhóm bệnh nhân này.

Tài liệu tham khảo

- [1] O. Warburg, F. Wind, A. Negelein, The Metabolism of Tumors in the Body, *J. Gen Physiol*, Vol. 8, No. 6, 1927, pp. 519-530.
- [2] A. Kapoor, V. G. Vogel, Prognostic Factors for Breast Cancer and Their Use in the Clinical Setting, *Expert Rev Anticancer Ther*, Vol. 5, No. 2, 2005, pp. 269-281.
- [3] A. Isidoro, M. Martínez, P. L. Fernández, A. D. Ortega, G. Santamaría, M. Chamorro, J. C. Reed, J. M. Cuezva, Alteration of the Bioenergetic Phenotype of Mitochondria is a Hallmark of Breast, Gastric, Lung and Oesophageal Cancer, *Biochem J*, Vol. 378, No. Pt 1, 2004, pp. 17-20.
- [4] Y. Wang, V. W. Liu, W. C. Xue, A. N. Cheung, H. Y. Ngan, Association of Decreased Mitochondrial DNA Content with Ovarian Cancer Progression, *Br J Cancer*, Vol. 95, No. 8, 2006, pp. 1087-1091.
- [5] T. Mizumachi, L. Muskhelishvili, A. Naito, J. Furusawa, C. Y. Fan, E. R. Siegel, F. F. Kadlubar, U. Kumar, M. Higuchi, Increased

- Distributional Variance of Mitochondrial DNA Content Associated with Prostate Cancer Cells as Compared with Normal Prostate Cells, *Prostate*, Vol. 68, No. 4, 2008, pp. 408-417.
- [6] T. Chen, J. He, L. Shen, H. Fang, H. Nie, T. Jin, X. Wei, Y. Xin, Y. Jiang, H. Li, G. Chen, J. Lu, Y. Bai, The Mitochondrial DNA 4,977-bp Deletion and its Implication in Copy Number Alteration in Colorectal Cancer, *BMC Med Genet*, Vol. 12, No. 8, 2011.
- [7] D. Meierhofer, J. A. Mayr, U. Foetschl, A. Berger, K. Fink, N. Schmeller, G. W. Hacker, C. Hauser-Kronberger, B. Kofler, W. Sperl, Decrease of Mitochondrial DNA Content and Energy Metabolism in Renal Cell Carcinoma, *Carcinogenesis*, Vol. 25, No. 6, 2004, pp. 1005-1010.
- [8] H. C. Lee, S. H. Li, J. C. Lin, C. C. Wu, D. C. Yeh, Y. H. Wei, Somatic Mutations in the D-loop and Decrease in the Copy Number of Mitochondrial DNA in Human Hepatocellular Carcinoma, *Mutat Res*, Vol. 547, No. 1-2, 2004, pp. 71-78.
- [9] C. S. Lin, L. S. Wang, C. M. Tsai, Y. H. Wei, Low Copy Number and Low Oxidative Damage of Mitochondrial DNA are Associated with Tumor Progression in Lung Cancer Tissues after Neoadjuvant Chemotherapy, *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, Vol. 7, No. 6, 2008, pp. 954-958.
- [10] S. Compton, C. Kim, N. B. Griner, P. Potluri, I. E. Scheffler, S. Sen, D. J. Jerry, S. Schneider, N. Yadava, Mitochondrial Dysfunction Impairs Tumor Suppressor p53 Expression/Function, *J. Biol Chem*, Vol. 286, No. 23, 2011, pp. 20297-20312.
- [11] D. C. Samuels, E. A. Schon, P. F. Chinnery, Two Direct Repeats Cause most Human MtDNA Deletions, *Trends Genet*, Vol. 20, No. 9, 2004, pp. 393-398.
- [12] G. D. Dakubo, *Mitochondrial Genetics and Cancer*, Springer Heidelberg Dordrecht London Publishers, New York, 2010.
- [13] G. A. Cortopassi, D. Shibata, N. W. Soong, N. Arnheim, A Pattern of Accumulation of a Somatic Deletion of Mitochondrial DNA in Aging Human Tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, No. 16, 1992, pp. 7370-7374.
- [14] R. Rossignol, B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J. P. Mazat, T. Letellier, Mitochondrial Threshold Effects, *Biochem J*, Vol. 370, No. Pt 3, 2003, pp. 751-762.
- [15] R. Filograna, M. Mennuni, D. Alsina, N. G. Larsson, Mitochondrial DNA Copy Number in Human Disease: the More the Better?, *FEBS Lett*, Vol. 595, No. 8, 2021, pp. 976-1002.
- [16] C. A. Castellani, R. J. Longchamps, J. Sun, E. Guallar, D. E. Arking, Thinking Outside the Nucleus: Mitochondrial DNA Copy Number in Health and Disease, *Mitochondrion*, Vol. 53, 2020, pp. 214 -223.
- [17] N. Chen, S. Wen, X. Sun, Q. Fang, L. Huang, S. Liu, W. Li, M. Qiu, Elevated Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Tissue Predict the Opposite Outcome of Cancer: A Meta-Analysis, *Sci Rep*, Vol. 6, No. 37404, 2016.
- [18] H. Nie, G. Chen, J. He, F. Zhang, M. Li, Q. Wang, H. Zhou, J. Lyu, Y. Bai, Mitochondrial Common Deletion is Elevated in Blood of Breast Cancer Patients Mediated by Oxidative Stress, *Mitochondrion*, Vol. 26, 2016, pp. 104-112.
- [19] L. He, P. F. Chinnery, S. E. Durham, E. L. Blakely, T. M. Wardell, G. M. Borthwick, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletions in Individual Cells by Real-Time PCR, *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, No. 14, 2002, pp. e68.
- [20] A. Lemnrau, M. N. Brook, O. Fletcher, P. Coulson, K. Tomczyk, M. Jones, A. Ashworth, A. Swerdlow, N. Orr, M. Garcia-Closas, Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood Cells and Risk of Developing Breast Cancer, *Cancer Res*, Vol. 75, No. 14, 2015, pp. 2844-2850.
- [21] K. A. Rygiel, J. P. Grady, R. W. Taylor, H. A. Tuppen, D. M. Turnbull, Triplex Real-Time PCR--an Improved Method to Detect a Wide Spectrum of Mitochondrial DNA Deletions in Single Cells, *Sci Rep*, Vol. 5, No. 9906, 2015.
- [22] P. Xia, H. J. Wang, T. T. Geng, X. J. Xun, W. J. Zhou, T. B. Jin, C. Chen, Mitochondrial DNA Levels in Blood and Tissue Samples from Breast Cancer Patients of Different Stages, *Asian Pac J Cancer Prev*, Vol. 15, No. 3, 2014, pp. 1339-1344.
- [23] R. K. Bai, L. J. Wong, Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease, *J Mol Diagn*, Vol. 7, No. 5, 2005, pp. 613-622.
- [24] C. S. Liu, C. S. Tsai, C. L. Kuo, H. W. Chen, C. K. Lii, Y. S. Ma, Y. H. Wei, Oxidative Stress-Related Alteration of the Copy Number of Mitochondrial DNA in Human Leukocytes, *Free Radic Res*, Vol. 37, No. 12, 2003, pp. 1307-1317.
- [25] A. Wong, G. Cortopassi, Reproducible Quantitative PCR of Mitochondrial and Nuclear

- DNA Copy Number using the LightCycler, *Methods Mol Biol*, Vol. 197, 2002, pp. 129-138.
- [26] D. Meierhofer, J. A. Mayr, S. Ebner, W. Sperl, B. Kofler, Rapid Screening of the Entire Mitochondrial DNA for Low-Level Heteroplasmic Mutations, *Mitochondrion*, Vol. 5, No. 4, 2005, pp. 282-296.
- [27] I. A. Sobenin, K. Y. Mitrofanov, A. V. Zhelankin, M. A. Sazonova, A. Y. Postnov, V. V. Revin, Y. V. Bobryshev, A. N. Orekhov, Quantitative Assessment of Heteroplasmy of Mitochondrial Genome: Perspectives in Diagnostics and Methodological Pitfalls, *Biomed Res Int*, Vol. 2014, No. 292017, 2014.
- [28] C. Ye, X. O. Shu, W. Wen, L. Pierce, R. Courtney, Y. T. Gao, W. Zheng, Q. Cai, Quantitative Analysis of Mitochondrial DNA 4977 bp Deletion in Sporadic Breast Cancer and Benign Breast Diseases, *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 108, No. 3, 2008, pp. 427-434.
- [29] E. Mambo, A. Chatterjee, M. Xing, G. Tallini, B. R. Haugen, S. C. Yeung, S. Sukumar, D. Sidransky, Tumor-Specific Changes in MtDNA Content in Human Cancer, *Int J Cancer*, Vol. 116, No. 6, 2005, pp. 920-924.