

ỨNG DỤNG PCR KỸ THUẬT SỐ VI GIỌT TRONG ĐỊNH LƯỢNG TUYỆT ĐỐI NỒNG ĐỘ ARN

Nguyễn Linh Toàn^{1,2}, Bùi Khắc Cường^{1,2*}

Tóm tắt

Mục tiêu: PCR kỹ thuật số vi giọt (Droplet Digital PCR - ddPCR) là phương pháp PCR sử dụng hệ thống vi giọt, cho phép đo lường hàng nghìn sự kiện khuếch đại độc lập trong một phản ứng đơn lẻ. Kỹ thuật ddPCR cho phép sử dụng lượng mẫu và thuốc thử thấp hơn, đồng thời giảm chi phí tổng thể so với các phương pháp khác trong khi vẫn duy trì độ nhạy và độ chính xác cao. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu tiến hành theo phương pháp thực nghiệm, sử dụng ddPCR để định lượng RNA trong mẫu nghiên cứu. Quá trình định lượng trên hệ thống PCR kỹ thuật số vi giọt gồm các bước: Tạo vi giọt, khuếch đại, đọc vi giọt và phân tích dữ liệu để tính toán nồng độ RNA. **Kết quả:** Nồng độ RNA trong các mẫu không pha loãng, pha loãng với hệ số 10 và 100 lần lượt là 380 bản sao/ μ L; 40,7 bản sao/ μ L và 3,4 bản sao/ μ L. Biểu đồ phân bố tín hiệu cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cường độ tín hiệu giữa hai quần thể vi giọt có và không có sản phẩm khuếch đại. Dữ liệu cho thấy mối tương quan tuyến tính thuận rất chặt chẽ giữa lượng RNA với hệ số pha loãng. **Kết luận:** PCR kỹ thuật số vi giọt là kỹ thuật có độ nhạy cao trong định lượng tuyệt đối nồng độ RNA.

Từ khóa: PCR kỹ thuật số vi giọt; ddPCR; Định lượng.

APPLICATION OF DROPLET DIGITAL PCR FOR RNA ABSOLUTE QUANTIFICATION

Abstract

Objectives: Droplet Digital PCR (ddPCR) is a PCR method using a microdroplet system that allows the measurement of thousands of independent amplification events in a single reaction. The ddPCR technique requires lower sample and reagent volumes,

¹Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y

²Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

* Tác giả liên hệ: Bùi Khắc Cường (buikhaccuong@gmail.com)

Ngày nhận bài: 24/4/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 02/6/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i5.358>

and reduces overall costs compared to other methods while maintaining high sensitivity and accuracy. **Methods:** The study was conducted by the experimental method, using ddPCR to quantify the number of RNA copies in research samples. The quantification process on the ddPCR system includes microdroplet generation, amplification, microdroplet reading and data analysis to calculate RNA concentration. **Results:** RNA concentration in undiluted, diluted samples by a factor of 10 and 100 were 380 copies/ μ L, 40.7 copies/ μ L and 3.4 copies/ μ L, respectively. The signal distribution histogram showed a significant difference in signal intensity between the two populations of microdroplets with and without amplification products. The data showed a very tight positive linear correlation between RNA concentration and the dilution factors. **Conclusion:** ddPCR is a highly sensitive technique for RNA absolute quantification.

Keywords: Droplet Digital PCR; ddPCR; Quantification.

ĐẶT VẤN ĐỀ

PCR kỹ thuật số vi giọt (Droplet Digital PCR - ddPCR) là phương pháp PCR sử dụng hệ thống vi giọt nhũ tương dầu nước. Các vi giọt được tạo thành trong nhũ tương dầu-nước để tạo các vách ngăn phân tách các phân tử DNA mẫu. Các vi giọt có chức năng giống như các ống nghiệm hoặc giếng riêng lẻ của một đĩa phản ứng PCR [1]. Trong PCR truyền thống, một mẫu duy nhất chỉ cung cấp một phép đo duy nhất nhưng trong PCR kỹ thuật số vi giọt, một mẫu được phân chia thành 20.000 vi giọt có kích thước nanolit. Sự phân chia này cho phép đo lường hàng nghìn sự kiện khuếch đại độc lập trong một phản ứng đơn lẻ. Sau khi

khuếch đại, các vi giọt được phân tích để xác định tỷ lệ vi giọt dương tính trong mẫu ban đầu. Những dữ liệu này sau đó được phân tích bằng thống kê Poisson để xác định nồng độ mẫu DNA/RNA mục tiêu trong mẫu ban đầu [1]. Kỹ thuật ddPCR cho phép sử dụng lượng mẫu và thuốc thử thấp hơn, đồng thời giảm chi phí tổng thể so với các phương pháp khác trong khi vẫn duy trì độ nhạy và độ chính xác cao [2, 3]. Kỹ thuật ddPCR có khả năng định lượng số lượng tuyệt đối các bản sao DNA/RNA mục tiêu trên mỗi mẫu đầu vào mà không cần sử dụng các đường cong tiêu chuẩn, làm cho kỹ thuật này trở nên lý tưởng để định lượng DNA/RNA mục tiêu, phân tích tải

lượng virus và định lượng vi khuẩn [4, 5]. Hiện tại, kỹ thuật này chưa được triển khai phổ biến ở nước ta. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm: *Đánh giá khả năng định lượng số lượng bản sao RNA của kỹ thuật ddPCR.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng định lượng là mẫu RNA được tổng hợp *in vitro* với trình tự như sau: CCGACGACGACUACUAGCGUGC CUUUGUAAGCACAAGCUGAUGA GUACGAACUUAUGUACUCAUUC GUUUCGGAAGAGACAGGUACGU UAAUAGUAAUAGCGUACUUCU UUUUCUUGCUUUCGUGGUAUUC UUGCUAGUUACACUAGCCAUCU UUACUGCGCUUCGAUUGUGUGC GUACUGCUGCAAUAUUGUUAAC GUGAGUCUUGUAAAACCUUCUU UUUACGUUUACUCUCGUGUUA AAAUCUGAAUUCUUCUAGAGUU CCUGAUCUUCUGGUCU.

2. Phương pháp nghiên cứu

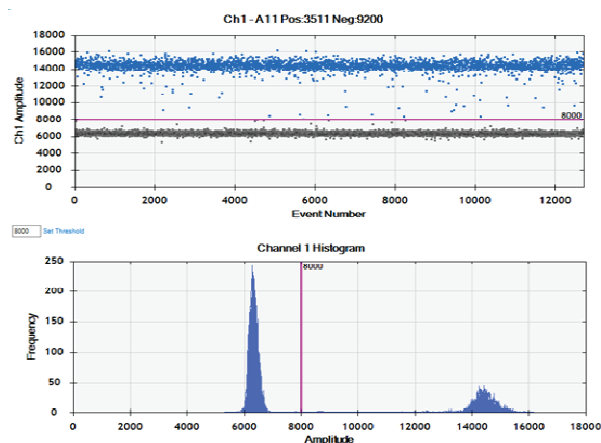
* *Phương pháp nghiên cứu:* Mẫu RNA được sử dụng để tổng hợp cDNA sử dụng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermal Fisher). Sau khi tổng hợp cDNA, mẫu cDNA được

pha loãng với hệ số 10 và 100 để tạo ra các dung dịch cDNA có độ pha loãng khác nhau và được sử dụng để định lượng trên hệ thống ddPCR. Quá trình định lượng trên hệ thống PCR kỹ thuật số vi giọt của Bio-Rad gồm các bước: Tạo vi giọt, khuếch đại, đọc vi giọt và phân tích dữ liệu để tính toán nồng độ của RNA trong mẫu nghiên cứu. Quá trình khuếch đại mẫu và phát hiện sản phẩm khuếch đại sử dụng các cặp mồi và probe đặc hiệu. Mẫu sau khi khuếch đại được phân tích trên hệ thống đọc vi giọt QX200 (BioRad). Nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y.

* *Xử lý số liệu:* Số liệu được phân tích và xử lý trên phần mềm QuantaSoft và GraphPad Prism 8.0. Số lượng bản sao trong phương pháp ddPCR được tính toán theo thuật toán phân phối Poisson dựa trên dữ liệu thu được từ tín hiệu của các vi giọt.

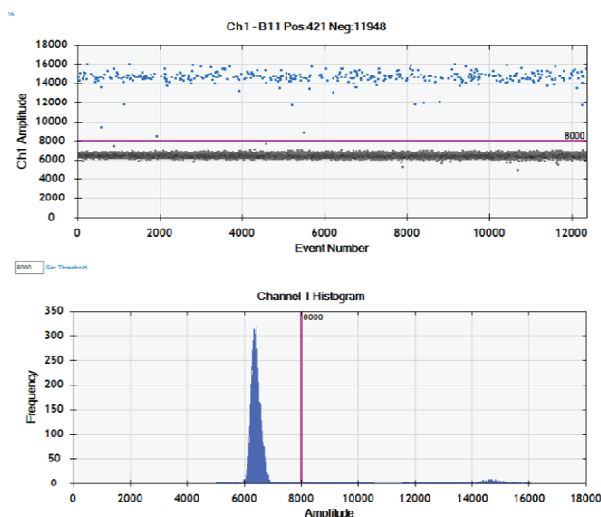
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Các mẫu thử được định lượng thông qua các bước tạo vi giọt, khuếch đại, đọc vi giọt và phân tích dữ liệu để tính toán nồng độ của RNA trong mẫu nghiên cứu.



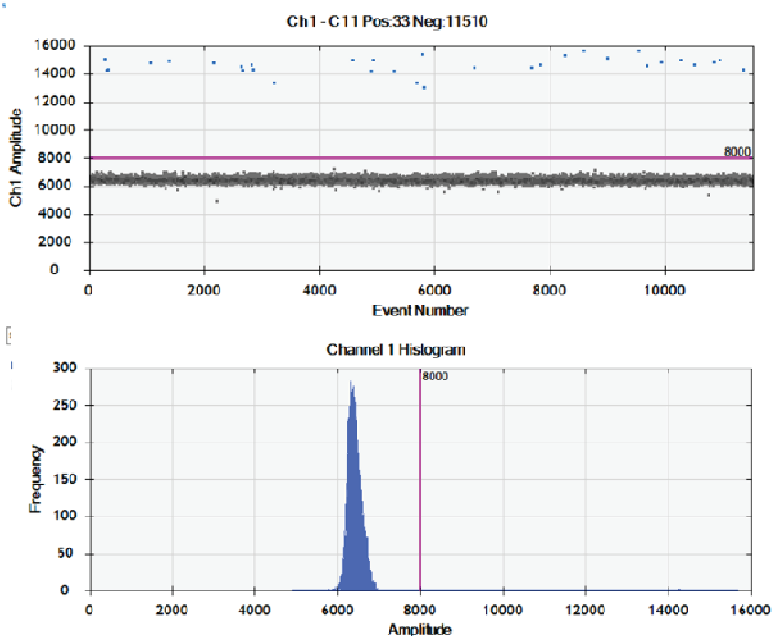
Hình 1. Kết quả phân tích mẫu RNA không pha loãng trên hệ thống ddPCR.

Kết quả định lượng mẫu RNA không pha loãng trên hệ thống ddPCR cho số lượng 380 bản sao/ μL . Biểu đồ phân bố tín hiệu cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cường độ tín hiệu giữa hai quần thể vi giọt có sản phẩm khuếch đại và không có sản phẩm khuếch đại. Trong đó, tín hiệu huỳnh quang của các giọt có sản phẩm khuếch đại dao động xung quanh 15.000 đơn vị, trong khi tín hiệu của các giọt không có sản phẩm khuếch đại chỉ dao động xung quanh 6.000 đơn vị. Đặc biệt, hai quần thể giọt này có sự phân tách rõ ràng trên biểu đồ (Hình 1).



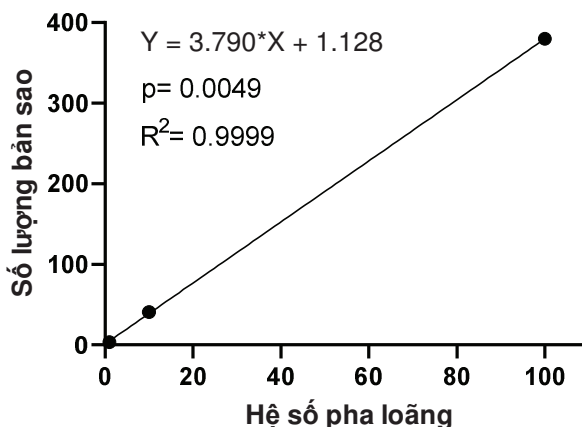
Hình 2. Kết quả phân tích mẫu RNA pha loãng 10 lần trên hệ thống ddPCR.

Kết quả định lượng mẫu RNA không pha loãng 10 lần trên hệ thống ddPCR cho số lượng 40,7 bản sao/ μL . Biểu đồ phân bố tín hiệu cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cường độ tín hiệu giữa hai quần thể vi giọt có sản phẩm khuếch đại và không có sản phẩm khuếch đại (Hình 2).



Hình 3. Kết quả phân tích mẫu RNA pha loãng 100 lần trên hệ thống ddPCR.

Kết quả định lượng mẫu RNA pha loãng 100 lần trên hệ thống ddPCR cho số lượng 3,4 bản sao/ μ L. Biểu đồ phân bố tín hiệu cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cường độ tín hiệu giữa hai quần thể vi giọt có sản phẩm khuếch đại và không có sản phẩm khuếch đại. Như vậy, trên cả ba biểu đồ phân bố của ba nồng độ pha loãng khác nhau, cường độ tín hiệu của các vi giọt có và không có khuếch đại có độ ổn định, nhất quán và phân tách rõ về tín hiệu huỳnh quang (Hình 3).



Hình 4. Phương trình đường chuẩn xây dựng dựa trên hệ số pha loãng và số lượng bản sao định lượng trên hệ thống ddPCR (theo các kết quả cung cấp ở hình 1 - 3).

Dữ liệu cho thấy mối tương quan tuyến tính thuận rất chặt chẽ giữa kết quả định lượng RNA trên hệ thống ddPCR và các hệ số pha loãng với phương trình tuyến tính $Y = 3,790 * X + 1,128$, hệ số $R^2 = 0,9999$ và $p = 0,0049$. Kết quả này phản ánh độ chính xác và độ nhạy cao của phương pháp định lượng bằng kỹ thuật ddPCR. Trong thí nghiệm này, số bản sao thấp nhất được phát hiện là 3,4 bản sao/ μ L (Hình 4).

BÀN LUẬN

Về mặt lý thuyết, kỹ thuật ddPCR có thể phát hiện được số lượng bản sao thấp. Giới hạn phát hiện của kỹ thuật này là 0,25 bản sao/ μ L. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, ddPCR có độ nhạy cao hơn ngưỡng phát hiện là 0,066 bản sao/ μ L, cao hơn 180 lần so với kỹ thuật RT-qPCR truyền thống [6]. ddPCR cũng có thể phát hiện mẫu có số lượng bản sao thấp, ngay cả ở nồng độ pha loãng gấp nhiều lần. ddPCR cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với RT-qPCR để chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm như COVID-19 với tải lượng virus thấp [4]. Các thử nghiệm dựa trên ddPCR cũng cho phép phát hiện các đột biến liên quan đến các gen IDH1, IDH2, H3-3A, BRAF, PRKCA và TERT trong bệnh u thần kinh đệm. Ngoài ra, các xét nghiệm dựa trên ddPCR cũng đánh giá được sự thay đổi số lượng bản

sao của các gen có liên quan đến chẩn đoán bệnh [3]. ddPCR cho phép phát hiện đột biến trong các tế bào khối u không được chọn lọc, cho phép bỏ qua quy trình chọn lọc tế bào tốn thời gian và chi phí. Độ chính xác của ddPCR gần đây đã được chứng minh phù hợp để phát hiện đột biến trong các mẫu sinh thiết lỏng, có thể được sử dụng như một phương pháp thay thế không xâm lấn và thân thiện với bệnh nhân, đặc biệt trong quá trình theo dõi bệnh [2]. Các nghiên cứu cũng chứng minh ddPCR là phương pháp phát hiện đột biến có độ nhạy cao và chính xác. Ví dụ, sự hiện diện của đột biến T315I ở bệnh nhân lơ-xe-mi cấp dòng lympho [7]; các biến thể KRAS và GNAS liên quan đến quá trình bệnh sinh ung thư tuyến tụy [8]. PCR kỹ thuật số vi giọt là kỹ thuật có độ nhạy cao để phát hiện và theo dõi ctDNA. Với độ chính xác, độ nhạy cao, khả năng lặp lại và khả năng định lượng tuyệt đối cao, ddPCR ngày càng được sử dụng rộng rãi trong sinh thiết lỏng phục vụ theo dõi và quản lý bệnh nhân [5].

KẾT LUẬN

PCR kỹ thuật số vi giọt là kỹ thuật có độ nhạy cao trong định lượng tuyệt đối nồng độ RNA trong các mẫu nghiên cứu. Ứng dụng kỹ thuật này có tiềm năng mang lại nhiều lợi ích trong các nghiên cứu y sinh học và hoạt động thực hành lâm sàng.

* **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2019.324.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*. Jan 17 2012; 84(2):1003-11. doi:10.1021/ac202578x.
2. Drandi D, Ferrante M, Borriero M, Ferrero S. MYD88 L265P mutation detection by ddPCR: Recommendations for screening and minimal residual disease monitoring : ddPCR for highly sensitive detection of MYD88 L265P mutation. *Methods Mol Biol*. 2023; 2621:57-72. doi:10.1007/978-1-0716-2950-5_5.
3. Wolter M, Felsberg J, Malzkorn B, Kaulich K, Reifenberger G. Droplet digital PCR-based analyses for robust, rapid, and sensitive molecular diagnostics of gliomas. *Acta Neuropathol Commun*. Mar 31 2022; 10(1):42. doi:10.1186/s40478-022-01335-6.
4. Falzone L, Musso N, Gattuso G, et al. Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. *Int J Mol Med*. Sep 2020; 46(3):957-964. doi:10.3892/ijmm.2020.4673.
5. Gezer U, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. The Clinical Utility of Droplet Digital PCR for Profiling Circulating Tumor DNA in Breast Cancer Patients. *Diagnostics (Basel)*. Dec 5 2022;12(12)doi:10.3390/diagnostics12123042.
6. Dutton DG, Painter S. The battered woman syndrome: effects of severity and intermittency of abuse. *Am J Orthopsychiatry*. Oct 1993; 63(4):614-22. doi:10.1037/h0079474.
7. Wan L, Ma J, Gong X, et al. Droplet digital polymerase chain reaction improves the detection of BCR-ABL1 kinase domain mutation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. Mar 29 2023; doi:10.1111/ijlh.14069
8. Maeda C, Ono Y, Hayashi A, et al. Multiplex digital PCR assay to detect multiple KRAS and GNAS mutations associated with pancreatic carcinogenesis from minimal specimen amounts. *J Mol Diagn*. Mar 23 2023; doi:10.1016/j.jmoldx.2023.02.007.