

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN *JAK2* V617F PHỤC VỤ VIỆC DỰ ĐOÁN NGUY CƠ MẮC BỆNH ĐA HỒNG CẦU VÀ MỘT SỐ CĂN BỆNH TĂNG SINH TỦY ÁC TÍNH KHÁC

Nguyễn Thy Ngọc¹, Bùi Bích Hậu¹, Phạm Hoàng Nam¹, Trần Tuấn Anh¹, Đỗ Thị Trang², Nguyễn Thị Xuân^{2,✉}

¹Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: xuannt@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.11.2020

Ngày nhận đăng: 05.7.2021

TÓM TẮT

Đa hồng cầu, tăng tiểu cầu tiên phát và xơ tủy cấp là những căn bệnh thuộc nhóm bệnh ung thư máu tăng sinh tủy ác tính không xảy ra hiện tượng trao đổi đoạn nhiễm sắc thể Philadelphia. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra đột biến V617F thuộc gen *JAK2* chịu trách nhiệm cho phần lớn số ca mắc phải các căn bệnh trên, do đó việc xác định chính xác kiểu gen của đột biến trên có ý nghĩa rất quan trọng trong việc sàng lọc và chẩn đoán sớm những căn bệnh này. Một số công trình trên thế giới đã đưa ra những phương pháp khác nhau để xác định kiểu gen của *JAK2* V617F. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá các phương pháp PCR-ARMS, PCR-RFLP, giải trình tự Sanger nhằm tìm ra phương pháp nhanh chóng, chính xác, rẻ tiền để xác định kiểu gen *JAK2* V617F và dự đoán *in-silico* ảnh hưởng của đột biến này lên cấu trúc và chức năng của protein Janus kinase 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai phương pháp giải trình tự Sanger và PCR-RFLP có độ chính xác tương đương và tốt hơn so với PCR-ARMS. Phương pháp PCR-RFLP cũng có thời gian và chi phí trên một mẫu tương đối tốt so với các phương pháp còn lại. Các phân tích *in silico* cũng cho thấy *JAK2* V617F có tác động lớn đến hoạt tính của protein mã hóa tương ứng. Kết quả của nghiên cứu này là dữ liệu tiền đề quan trọng phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm sàng lọc, dự đoán bệnh tăng sinh tủy ác tính và các căn bệnh khác có liên quan ở người Việt.

Từ khóa: PCR-ARMS, PCR-RFLP, giải trình tự, đa hồng cầu, *JAK2* V617F, tăng sinh tủy ác tính

MỞ ĐẦU

Nhóm bệnh tăng sinh tủy ác tính (Myeloproliferative neoplasms - MPNs) là một dạng ung thư máu gây ra bởi sự biến đổi bất thường của các tế bào gốc tủy xương sinh máu, gây ra sự tăng sinh đột biến các tế bào máu như bạch cầu, hồng cầu và tiểu cầu (Wadleigh *et al.*, 2010). Theo ước tính của tổ chức LLS (Leukemia & Lymphoma Society), chỉ tính riêng tại Hoa Kỳ, số người mắc phải một trong các căn bệnh tăng sinh tủy ác tính là gần 300.000 bệnh nhân, với gần 20.000 ca mắc mới

mỗi năm (Shallis *et al.*, 2020). Ở Việt Nam cho đến nay vẫn chưa có con số thống kê về số lượng người mắc nhóm bệnh này trong cộng đồng.

Bệnh đa hồng cầu là một trong các bệnh tăng sinh tủy ác tính, gây ra do các tế bào tủy xương sinh ra quá nhiều tế bào hồng cầu, vượt quá 16,5 g/dL ở nam giới và 16,0 g/dL ở nữ giới (Horvitz, 2017). Lượng tế bào hồng cầu cao bất thường dẫn đến giảm tốc độ lưu thông trong mạch máu, tăng nguy cơ đông máu. Do vậy người bệnh thường có các triệu chứng như đa

đỏ hoặc tái xanh, dễ xuất huyết trong, lá lách sưng to, mệt mỏi khó thở, tăng nguy cơ bị đột quỵ, nhồi máu cơ tim. Bệnh nhân đa hồng cầu dễ dẫn đến các bệnh biến chứng như xơ hóa tủy xương và bệnh bạch cầu cấp (Saini *et al.*, 2010). Thời gian sống sót trung bình của người mắc bệnh đa hồng cầu là 13,5 năm, với hệ số nguy cơ là 1,8 (Tefferi *et al.*, 2014).

Hơn 90% trường hợp bệnh nhân đa hồng cầu có liên quan đến đột biến V617F trên gen *JAK2* gây ra bởi đa hình gen rs77375493 (Jones *et al.*, 2013). *JAK2* mã hóa cho thụ thể tín hiệu janus kinase 2 trên màng tế bào, đóng vai trò quan trọng trong một số con đường truyền tín hiệu cytokine *JAK/STATs*, *MAPK* và *PI3K/AKT* liên quan đến quá trình kiểm soát miễn dịch, sự phát triển của tế bào và quá trình chết theo chương trình (apoptosis) (Dell'Albani *et al.*, 1998; Krasilnikov *et al.*, 2003). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh 3 phương pháp là: phương pháp khuếch đại đa hình chiều dài cắt giới hạn (PCR-RFLP), phương pháp khuếch đại allele đặc trưng (ARMS-PCR) và phương pháp giải trình tự Sanger để xác định kiểu gen của đa hình *JAK2* V617F các bệnh nhân mắc bệnh đa hồng cầu, tăng tiểu cầu và xơ hóa tủy xương. Bên cạnh đó chúng tôi cũng tiến hành một số phân tích *in silico* để dự đoán ảnh hưởng của đột biến này lên cấu trúc và chức năng của protein tương ứng. Nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm điều tra về tỷ lệ các bệnh nhân tăng sinh tủy ác tính do liên quan đến đột biến *JAK2* V617F và các đột biến có liên quan.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu nghiên cứu được thu thập từ các bệnh nhân mắc bệnh tăng sinh tủy ác tính và các tình nguyện viên tại bệnh viện Học viện Quân Y 103 bao gồm 4 nhóm: nhóm bệnh đa hồng cầu, nhóm bệnh tăng tiểu cầu tiền phát, nhóm bệnh xơ tủy cấp và nhóm đối chứng khỏe mạnh, chưa có tiền sử bệnh tật hoặc sử dụng các chất kích thích gây nghiện. Các bệnh nhân và tình nguyện viên tham gia đều đồng ý cung cấp mẫu máu và

thông tin cho đề tài này. Nghiên cứu đã được chấp thuận và cho phép tiến hành bởi Hội đồng đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh của Viện Nghiên cứu Hệ gen theo Chứng nhận số 4-2021/NCHG-HĐĐĐ.

Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA từ máu tổng số

DNA genome được chiết tách từ máu tổng số của bệnh nhân mắc bệnh tăng sinh tủy ác tính và nhóm khỏe mạnh đối chứng bằng kit Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Promega, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất. Sản phẩm sau đó được kiểm tra nồng độ DNA và độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và đo OD trên máy Nanodrop.

Kỹ thuật phân tích kiểu gen PCR-RFLP

Phản ứng khuếch đại đoạn DNA chứa đa hình *JAK2* V617F bao gồm 2 U Taq DNA polymerase (Thermo), Taq enzyme buffer 1X, dNTP 2 mM mỗi loại, nồng độ mỗi mỗi loại 0,4 μ M, 20 ng DNA khuôn và nước cất được bổ sung đến thể tích 30 μ L. Trình tự cặp mồi sử dụng được liệt kê trong Bảng 1. PCR bắt đầu với giai đoạn biến tính 95°C trong 5 phút, 40 chu kỳ lặp lại bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 57°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 40 giây, bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút và giữ ở 10°C. Sản phẩm PCR được cắt giới hạn với 1 U *Bsa*XI ở 37°C trong 10 phút và điện di kiểm tra kích thước các băng sản phẩm trên gel agarose 2,5%.

Kỹ thuật phân tích kiểu gen ARMS-PCR

ARMS-PCR phân tích đột biến *JAK2* V617F sử dụng 2 cặp mồi cùng lúc được mô tả bởi A.V. Jones và cộng sự (Bảng 1) (Jones *et al.*, 2005). Phản ứng có thành phần gồm 2 U Taq DNA polymerase (Thermo), Taq enzyme buffer 1X, dNTP 2 mM, 20 ng ADN khuôn, nồng độ cặp mồi ngoài và mồi trong lần lượt là 1 μ M và 0,5 μ M, nước cất bổ sung đến 30 μ L. PCR sử dụng các nhiệt độ gắn mồi khác nhau: từ 56°C đến 64°C trong 30 giây. Sản phẩm của ARMS-PCR được điện di kiểm tra kích thước trên gel agarose 3%.

Kỹ thuật giải trình tự Sanger

Phản ứng PCR nhân gen được tiến hành giống phương pháp PCR-RFLP đã nêu trên. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit MEGAquick-spin™ Plus Purification Kit (iNtRON, Hàn Quốc) và giải trình tự theo

phương pháp đọc Sanger trên kit Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) bởi máy đọc sequence model ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer sử dụng môi đọc theo chiều ngược. Trình tự sản phẩm thu được được phân tích bằng phần mềm Chromas.

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

| Phản ứng | Tên môi | Trình tự môi (5' – 3') |
|----------|----------------|-------------------------------|
| PCR-RFLP | RFLP-FP | TCCTCAGAACGTTGATGGCAG |
| | RFLP-RP | ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT |
| ARMS-PCR | ARMS-FP-outer | TCCTCAGAACGTTGATGGCAG |
| | ARMS-RP-outer | ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT |
| | ARMS-Wt-inner | GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG |
| | ARMS-Mut-inner | GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA |

Dự đoán in silico

Trình tự và vị trí đột biến tại điểm V617F thuộc gen *JAK2* được nhập vào các phần mềm phân tích ảnh hưởng của đột biến gen lên cấu trúc và chức năng protein bao gồm Predict SNP, PhD-SNP, Polyphen-2, SIFT, và SNAP. Độ bảo thủ của trình tự axit amin giữa các loài được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu của UCSC, hệ gen người bản GRCh38/hg38.

KẾT QUẢ

Kết quả giải trình tự Sanger

Đột biến *JAK2* p.V617F xảy ra do đột biến sai nghĩa tại vị trí nucleotide số 1849 trên trình tự cDNA biến đổi guanine thành thymine. Kết quả giải trình tự Sanger từ sản phẩm PCR tinh sạch chứa điểm đột biến cho thấy tín hiệu giải trình tự rõ ràng, sắc nét, không có tín hiệu nhiễu hay ngoại lai. Do môi được sử dụng để giải trình tự là môi ngược, kiểu gen GG tại vị trí đa hình *JAK2* V617F sẽ có một đỉnh tín hiệu C, kiểu gen TT sẽ có một đỉnh tín hiệu A và kiểu gen dị hợp tử GT sẽ có 2 đỉnh tín hiệu của C và A. Kết quả có thể sử dụng để phân biệt dễ dàng các kiểu gen đồng hợp GG, dị hợp GT hay đồng hợp GT mà không gây ra nhầm lẫn (Hình 1).

Kết quả phân tích PCR-RFLP

Đoạn DNA chứa đột biến *JAK2* V617F

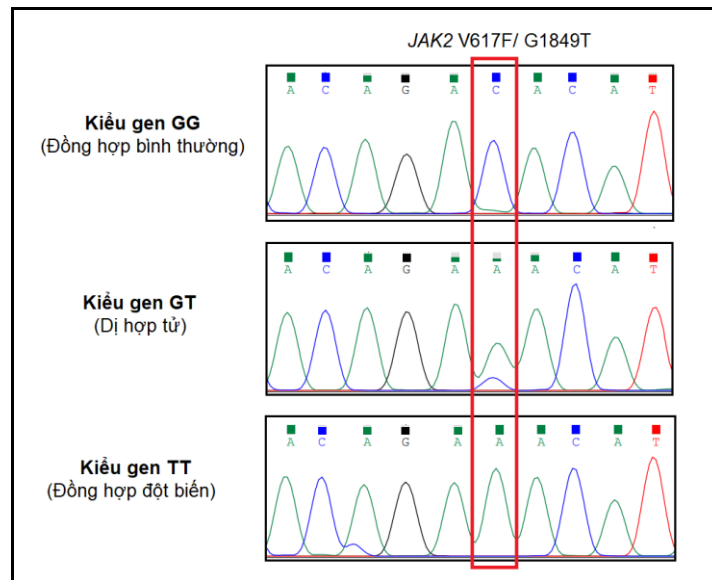
được khuếch đại bằng PCR có kích thước 453 bp. Sản phẩm PCR sẽ được ủ với enzyme giới hạn cắt *Bsa*XI để phản ứng cắt xảy ra hoàn toàn. Enzyme sẽ cắt ở allele G (allele hoang dại) tạo thành các sản phẩm cắt có kích thước lần lượt là 201 bp và 252 bp. Do vậy ở các mẫu có kiểu gen đồng hợp tử GG, sản phẩm PCR-RFLP sẽ cho ra hai băng với kích thước 201 và 252 bp. Ở các mẫu có kiểu gen đồng hợp tử TT, do enzyme *Bsa* XI không cắt ở allele T (allele đột biến), sẽ cho ra 1 băng duy nhất với kích thước bằng kích thước sản phẩm PCR là 453 bp. Ở các mẫu có kiểu gen dị hợp tử GT sẽ quan sát thấy cả 3 băng có kích thước lần lượt là 201 bp, 252 bp và 453 bp. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy các băng ADN phân tách rõ ràng, phù hợp để nhận biết kiểu gen *JAK2* V617F ở từng cá thể (Hình 2).

Kết quả phân tích PCR-ARMS

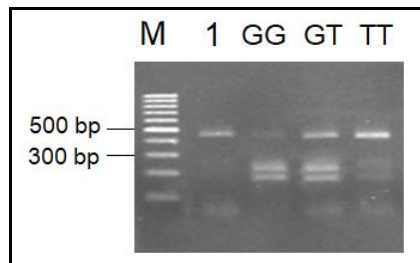
PCR nhân đoạn gen chứa *JAK2* V617F sử dụng đồng thời 2 cặp môi và được tiến hành thử nghiệm với các nhiệt độ bắt môi khác nhau từ 56°C đến 64°C. Về lý thuyết, ở tất cả các mẫu nghiên cứu sẽ xuất hiện băng ADN kích thước 453 bp là sản phẩm khuếch đại của cặp môi ngoài (outer). Ở mẫu có allele G sẽ xuất hiện thêm băng DNA có kích thước 229 bp là sản phẩm của cặp môi ARMS-Wt-inner và ARMS-RP-outer. Ở allele T sẽ xuất hiện

băng với kích thước 279 bp là sản phẩm của cặp mồi ARMS-FP-outer và ARMS-Mut-inner. Bệnh nhân mang kiểu gen dị hợp tử sẽ có cả 3 băng DNA trên. Tuy nhiên thực tế khi kiểm tra bằng điện di cho thấy các băng cho

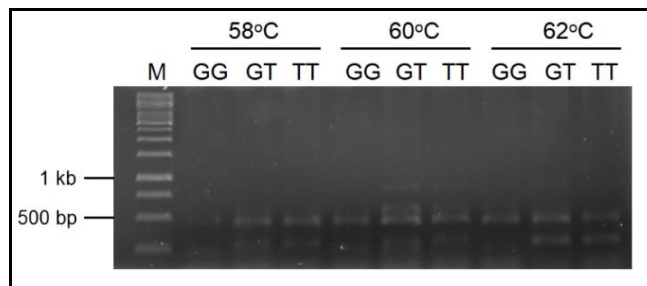
kết quả không rõ ràng, dẫn đến có thể xảy ra sai sót trong quá trình xác định kiểu gen theo phương pháp này (Hình 3). Giá thành, thời gian thực hiện và độ tin cậy của từng phương pháp được thể hiện trong Bảng 2.



Hình 1. Kết quả giải trình tự Sanger vị trí JAK2 p.V617F c.G1849T ở các kiểu gen khác nhau với mỗi được sử dụng để giải trình tự là mỗi ngược.



Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR-RFLP trên gel agarose 2,5%. (M: Thang DNA 100 bp; 1: sản phẩm PCR trước RFLP; GG, GT và TT: sản phẩm RFLP ở các kiểu gen tương ứng).



Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR-ARMS trên gel agarose 3% ở các kiểu gen tương ứng tại các nhiệt độ bắt mồi khác nhau (M: Thang 1 kb).

Bảng 2. Bảng so sánh giá thành, thời gian thực hiện và độ tin cậy của các phương pháp phân tích kiểu gen được thực hiện trong nghiên cứu.

| | Phương pháp xác định kiểu gen <i>JAK2 V617F</i> | | |
|---------------------------|---|-----------|---------------|
| | Giải trình tự Sanger | PCR-RFLP | PCR-ARMS |
| Giá thành/mẫu (USD) | 8,5 | 3,5 | 2,5 |
| Thời gian tiến hành (giờ) | 11 | 2,5 | 1,5 |
| Độ tin cậy | Chính xác | Chính xác | Không rõ ràng |

Phân bố kiểu gen ở quần thể nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiếp tục sử dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định được kiểu gen của đột biến *JAK2 V617F* ở 54 bệnh nhân tăng sinh tủy ác tính bao gồm 44 bệnh nhân tăng tiểu cầu tiền phát, 8 bệnh nhân đa hồng cầu, 2 bệnh nhân xơ tủy cấp và 15 tình nguyện viên thuộc nhóm đối chứng khỏe mạnh.

Kết quả tần số kiểu gen của đột biến *JAK2 V617F* cho thấy tần số xuất hiện ít nhất một allele đột biến ở nhóm bệnh nhân mắc bệnh tăng tiểu cầu tiền phát, đa hồng cầu và xơ tủy cấp lần lượt là 61,4%, 75% và 50%, không phát hiện thấy allele này ở nhóm đối chứng (Bảng 3). Mọi tương quan giữa kiểu gen đa hình *JAK2 V617F* và tính trạng bệnh tăng sinh tủy ác tính được kiểm tra bằng kiểm định Fisher exact.

Bảng 3. Kết quả phân tích tần số kiểu gen và xác định mối tương quan của đa hình *JAK2 V617F* ở nhóm bệnh Tăng tiểu cầu tiền phát (TTCTP), Đa hồng cầu (ĐHC), Xơ tủy cấp (XTC) và nhóm đối chứng khỏe mạnh.

| Kiểu gen <i>JAK2 V617F</i> | Nhóm bệnh Tăng sinh tủy ác tính | | | Nhóm đối chứng khỏe mạnh | [95%CI] p-value |
|----------------------------|---------------------------------|-----|-----|--------------------------|------------------------------|
| | TTCTP | ĐHC | XTC | | |
| GG | 17 | 2 | 1 | 15 | [2,888 – 900,612] p < 0,0001 |
| GT | 16 | 2 | 1 | 0 | |
| TT | 11 | 4 | 0 | 0 | |
| Tổng cộng | 44 | 8 | 2 | 15 | |

Kết quả dự đoán *in silico*

Kết quả phân tích bằng các phần mềm như PredictSNP, PhD-SNP, Polyphen-2, SIFT, SNAP đều dự đoán rằng đột biến *JAK2 V617F* có khả năng cao làm thay đổi cấu trúc 3D của protein, qua đó làm suy giảm hoạt tính của

enzyme tương ứng (deleterious). Ngoài ra, vị trí axit amin số 617 (Valine) ở gen *JAK2* cũng cho thấy sự bảo thủ lớn giữa các loài động vật khác nhau, cho thấy vùng trình tự axit amin này đóng một vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng của Janus kinase 2.

| Loài | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | D |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Người | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | D |
| Khỉ núi | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Chuột | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Mèo | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Chó | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Voi | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Gà | V | L | N | Y | G | V | C | V | C | E |
| Ếch xanh | I | L | N | Y | G | V | C | V | C | D |
| Cá ngựa vằn | V | L | T | Y | G | I | C | V | C | D |

Hình 4. So sánh trình tự amino acid tại vị trí *JAK2 V617* giữa các loài khác nhau.

THẢO LUẬN

Bệnh tăng sinh tủy ác tính được chia thành hai phân nhóm chính là nhóm Philadelphia dương và Philadelphia âm, với dấu hiệu đặc trưng là sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể (NST) giữa NST số 22 và NST số 9, tạo thành tổ hợp gen *BCR-ABL* trên NST số 22 (còn gọi là NST Philadelphia) (Harrison *et al.*, 2017). Các nhóm bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu này bao gồm: nhóm bệnh đa hồng cầu, nhóm bệnh tăng tiểu cầu tiền phát và nhóm bệnh xơ tủy cấp thuộc phân nhóm tăng sinh tủy ác tính philadelphia âm, nghĩa là không có sự chuyển đoạn giữa 2 NST số 22 và 9. Nguyên nhân gây ra các căn bệnh trên thường tập trung vào các đột biến trên gen *JAK2* mà chủ yếu là đột biến tại vị trí V617F thuộc gen này (Tefferi *et al.*, 2008). Đột biến này chịu trách nhiệm cho 90% số ca bệnh đa hồng cầu và khoảng 50%-60% số ca bệnh tăng tiểu cầu tiền phát và bệnh xơ tủy cấp trên toàn thế giới (Vainchenker *et al.*, 2017). Đột biến này cũng đã được chứng minh rằng có liên quan đến tình trạng tăng huyết khối, qua đó dẫn đến rối loạn chức năng tim mạch ở các nghiên cứu *in vitro* trên mô hình tế bào nội mô cũng như trên mô hình chuột (Edelmann *et al.*, 2018; Sano *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, các mô hình dự đoán *in silico* cũng đã dự đoán đột biến V617F có tiềm năng gây ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và chức năng của enzyme tương ứng, từ đó có khả năng làm thay đổi mạng lưới phân tử tín hiệu bên trong tế bào gốc tủy xương sinh máu. Do đó, việc xây dựng được một phương pháp có thể xác định kiểu gen của *JAK2* V617F một cách chính xác, nhanh chóng, thuận tiện với chi phí hợp lý là vô cùng cần thiết để nghiên cứu những căn bệnh trên.

Để có thể xác định kiểu gen (genotyping) của đa hình gen *JAK2* V617F, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng các phương pháp khác nhau như PCR-RFLP (Nikolova *et al.*, 2019), giải trình tự (Riedlinger *et al.*, 2019), PCR-ARMS (Jones *et al.*, 2005), Real-time PCR (Senamela *et al.*, 2018). Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Lê H.S và cộng sự cũng đã thử áp dụng phương pháp PCR-ARMS và phương

pháp xét nghiệm nhân gen phân biệt độ dài (PCR-ALDA) để xác định kiểu gen của *JAK2* V617F và các đa hình có liên quan đến bệnh tăng sinh tủy ác tính (Trung *et al.*, 2019). Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi so sánh ba phương pháp giải trình tự gen Sanger, PCR-RFLP và PCR-ARMS cho thấy phương pháp PCR-RFLP tỏ ra tối ưu nhất khi xét trên các phương diện độ chính xác, thời gian tiến hành, độ đơn giản và giá thành xét nghiệm trên từng mẫu. Do đó phương pháp này đã được ứng dụng để xác định kiểu gen của một quần thể bệnh chứng nhỏ bao gồm 54 bệnh nhân mắc bệnh tăng sinh tủy ác tính và 15 tình nguyện viên đối chứng khỏe mạnh. Với cỡ mẫu của quần thể nghiên cứu còn nhỏ, việc xác định tần số allele của đột biến *JAK2* V617F có thể chưa hoàn toàn chính xác. Do vậy, chúng tôi kiến nghị nên sử dụng phương pháp này cho các nghiên cứu tiếp theo về khảo sát tần số đa hình *JAK2* V617F trong nghiên cứu bệnh tăng sinh tủy ác tính ở người Việt.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này cho thấy việc xác định kiểu gen của đa hình *JAK2* V617F ở các bệnh nhân Tăng sủy ác tính bằng phương pháp PCR-RFLP tỏ ra tối ưu so với 2 phương pháp còn lại là PCR_ARMS và giải trình tự Sanger về độ chính xác, thời gian và giá thành. Chúng tôi cũng đã xác định kiểu gen của một số bệnh nhân mắc Tăng sinh tủy ác tính bằng phương pháp này. Tuy nhiên với cỡ mẫu của quần thể nghiên cứu còn nhỏ, việc xác định tần số alen của đột biến *JAK2* V617F có thể chưa hoàn toàn chính xác. Do vậy, chúng tôi kiến nghị nên sử dụng phương pháp này cho các nghiên cứu tiếp theo về khảo sát tần số đa hình *JAK2* V617F trong nghiên cứu bệnh tăng sinh tủy ác tính ở người Việt.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài Khoa học Công nghệ cấp cơ sở của Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội mã số USTH.BIO.01/20-22. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn các bệnh nhân và tình nguyện viên đã cung cấp mẫu cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Wadleigh M, Tefferi A (2010) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol* 91(2): 174-179.
- Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Podoltsev NA, Zeidan AM (2020) Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Rev* 42: 100706.
- Horvitz RA (2017) Diagnostic Criteria for Polycythemia Vera: Difference in Changes Between Males and Females. *Am J Clin Pathol* 147(4): 439-440.
- Saini KS, Patnaik MM, Tefferi A (2010) Polycythemia vera-associated pruritus and its management. *Eur J Clin Invest* 40(9): 828-834.
- Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, Gangat N, Fjerza R, Belachew AA, Lasho TL (2014) Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 124(16): 2507-2513.
- Jones AV, Cross NC (2013) Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther Adv Hematol* 4(4): 237-253.
- Krasilnikov M, Ivanov VN, Dong J, Ronai Z (2003) ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene* 22(26): 4092-4101.
- Dell'Albani P, Kahn MA, Cole R, Condorelli DF, Giuffrida-Stella AM, de Vellis J (1998) Oligodendroglial survival factors, PDGF-AA and CNTF, activate similar JAK/STAT signaling pathways. *J Neurosci Res* 54(2): 191-205.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH (2005) Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106(6): 2162-2168.
- Harrison CN, Koschmieder S, Foltz L, Guglielmelli P, Flindt T, Koehler M, Mathias J, Komatsu N, Boothroyd RN, Spierer A (2017) The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. *Ann Hematol* 96(10): 1653-1665.
- Tefferi A, Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22(1): 14-22.
- Vainchenker W, Kralovics R (2017) Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 129(6): 667-679.
- Sano S, Wang Y, Yura Y, Sano M, Oshima K, Yang Y, Katanasaka Y, Min KD, Matsuura S, Ravid K (2019) JAK2 (V617F) -Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Pathological Remodeling in Murine Heart Failure. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Sci* 4(6): 684-697.
- Edelmann B, Gupta N, Schnoeder TM, Oelschlegel AM, Shahzad K, Goldschmidt J, Philipsen L, Weinert S, Ghosh A, Saalfeld FC (2018) JAK2-V617F promotes venous thrombosis through beta1/beta2 integrin activation. *J Clin Invest*, 128(10): 4359-4371.
- Nikolova D, Yordanov A, Damyanova V, Radinov A, Toncheva D (2019) Janus Kinase V617F Mutation Detection in Patients with Myelofibrosis. *BJMG* 22(1): 57-60.
- Riedlinger G, Hadigol M, Khiabani H, Ganesan S (2019) Association of JAK2-V617F Mutations Detected by Solid Tumor Sequencing With Coexistent Myeloproliferative Neoplasms. *JAMA Oncol* 5(2): 265-267.
- Senamela T, Kock M, Becker P, Potgieter JJ (2018) Detection of the Janus kinase 2 V617F mutation using a locked nucleic-acid, real-time polymerase chain reaction assay. *Afr J Lab Med* 7(1): 1-4.
- Trung NT, Quyen DT, Hoan NX, Giang DP, Trang TTH, Velavan TP, Bang MH, Song LH (2019) Rapid, low cost and sensitive detection of Calreticulin mutations by a PCR based amplicon length differentiation assay for diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *BMC Med Genet* 20(1): 115.

EVALUATING SEVERAL METHODS OF *JAK2* V617F MUTATION-GENOTYPING TO PREDICT THE RISK OF GETTING POLYCYTHEMIA VERA AND OTHER MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM DISEASES

Nguyen Thy Ngoc¹, Bui Bich Hau¹, Pham Hoang Nam¹, Tran Tuan Anh¹, Do Thi Trang², Nguyen Thi Xuan²

¹*University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis are members of the Philadelphia negative chronic subgroup of Myeloproliferative neoplasm. Published studies showed that the mutation *JAK2* V617F is mostly responsible for the diseases; therefore, an accurate, low-cost and rapid molecular method to identify this mutation is important in screening and early diagnostic of these diseases. Different methods for genotyping of *JAK2* V617F have been proposed. In this study, we evaluated the quality and cost-effectiveness of three genotyping methods, i.e., PCR-ARMS, PCR-RFLP, Sanger sequencing, to determine the appropriate genotyping for *JAK2* V617F and predicted *in silico* the effect of this mutation on the structure and function of Janus kinase 2 protein. Results showed that the Sanger sequencing and PCR-RFLP genotyping methods were more accurate than PCR-ARMS. PCR-RFLP was also more rapid and economical than the other methods. *In silico* studies also demonstrated that the *JAK2* V617F mutation had a large effect on the activity of corresponding protein. These results provided the initial data for further studies on genetic screening and prediction of myeloproliferative neoplasm and other related diseases in the Vietnamese population.

Keywords: PCR-ARMS, PCR-RFLP, Sanger sequencing, polycythemia vera, *JAK2* V617F, myeloproliferative neoplasm