

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT HẤP PHỤ MIỄN DỊCH VI HẠT ĐÁNH DẤU HUỖNH QUANG TRONG ĐỊNH TÝP HLA

Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Đỗ Khắc Đại¹

Hoàng Trung Kiên¹, Nguyễn Đặng Dũng¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật định tít kháng nguyên bạch cầu người (HLA) mới dựa trên nguyên lý kỹ thuật hấp phụ miễn dịch vi hạt đánh dấu huỳnh quang (FCMIA). **Đối tượng và phương pháp:** Sử dụng bộ kit định tít HLA-SSO dựa trên nguyên lý FCMIA để định tít mẫu thử DNA đã được định tít bằng phương pháp PCR-SSP, so sánh kết quả định tít HLA và phân tích ưu, nhược điểm của từng kỹ thuật. **Kết quả:** Bộ kit định tít PCR-SSO cho kết quả định tít chính xác, có thể định tít được nhiều mẫu trong thời gian ngắn. **Kết luận:** Công nghệ FCMIA có một số ưu điểm trong định tít HLA như độ chính xác, thời gian tiến hành ngắn, chi phí chỉ tương đương các kỹ thuật khác.

* Từ khoá: Định tít HLA; Kỹ thuật hấp phụ miễn dịch vi hạt đánh dấu huỳnh quang.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng nguyên bạch cầu người (human leukocyte antigen - HLA) được mã hóa bởi một hệ thống gen nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 6, bao gồm 3 locus chính là A, B (HLA lớp I) và DR (HLA lớp II). HLA tham gia vào quá trình nhận diện kháng nguyên, dẫn đến hình thành đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chống lại kháng nguyên lạ ở cơ thể người. Chính vì vậy, HLA đặc biệt quan trọng trong phản ứng thải ghép [1]. Để giảm thiểu phản ứng thải ghép cần lựa chọn người cho có HLA phù hợp với người nhận tạng. Năm 1992, Học viện Quân y đã thực hiện thành công kỹ thuật định tít HLA bằng phương pháp huyết thanh học. Năm 2011, cũng tại Học viện Quân y, Bộ môn Miễn dịch tiếp tục thành công trong định tít HLA bằng kỹ

thuật sinh học phân tử (PCR-SSP) [3]. Từ đó cho đến nay, định tít HLA được chỉ định cho hầu hết các ca ghép thận, ghép tim được thực hiện tại Học viện Quân y. Góp phần không nhỏ trong chống thải ghép, giúp tăng chất lượng sống cho bệnh nhân ghép. Kỹ thuật PCR-SSP có nhiều ưu điểm so với phương pháp huyết thanh học nhưng vẫn còn tồn tại hạn chế, đó là chưa thể thực hiện việc định tít nhanh cùng một lúc nhiều mẫu xét nghiệm do đa số các thao tác thực hiện chưa được tự động hóa, kết quả định tít vẫn phụ thuộc vào nhận định chủ quan của người đọc dựa trên kết quả điện di. Yêu cầu định tít nhanh và chính xác cùng một lúc nhiều mẫu xét nghiệm xảy ra khi có rất nhiều người nhận tạng mong muốn kiểm tra sự phù hợp với tạng hiến từ người cho chết não.

¹Bộ môn Miễn dịch, Học viện Quân y

Người phản hồi: Nguyễn Ngọc Tuấn (nguyenngoctuanmd@gmail.com)

Ngày nhận bài: 06/5/2020

Ngày bài báo được đăng: 22/6/2020

Trong thời gian gần đây, các xét nghiệm sử dụng đầu dò oligonucleotid đang được ứng dụng rộng rãi trên thế giới. Kỹ thuật PCR-SSO dựa trên nguyên lý này đã và đang được áp dụng trong định týp HLA ở nhiều nước với nhiều ưu điểm về độ chính xác cũng như độ phân giải [4], ngoài ra có thể định týp nhiều mẫu xét nghiệm trong một thời gian ngắn. Chính vì vậy, chúng tôi nghiên cứu đề tài này nhằm: *Phát triển và ứng dụng một kỹ thuật mới trong định týp HLA (kỹ thuật PCR-SSO dựa trên công nghệ hạt từ của Luminex) [1], qua đó đáp ứng yêu cầu thực tiễn đặt ra.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu:*

05 mẫu thử DNA được tách từ máu toàn phần có nồng độ từ 40 - 200 ng/μl,

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Nguyên lý định týp HLA dựa trên kỹ thuật FCMIA:*

độ tinh sạch từ 1,8 - 2,2 (tỷ lệ OD 260/280), đã biết trước kết quả định týp dựa trên kỹ thuật PCR-SSP.

* *Vật liệu nghiên cứu:*

- Các hoá chất và sinh phẩm xét nghiệm (hãng LIFECODES, Mỹ) bao gồm: Master Mix; Probe Mix; Taq Polymerase; nước cất: Nuclease-free, khử ion; phức hợp chất huỳnh quang PE gắn streptavidin; dung dịch pha loãng PE.

- Phần mềm MATCH IT! DNA sử dụng phân tích HLA.

- Hệ thống Luminex 200 và phần mềm điều khiển đi kèm (hãng Luminex, Mỹ).

- Các vật liệu và thiết bị labô khác như máy PCR, tủ thao tác PCR, máy ủ nhiệt, máy vortex, máy spin, pipet và đầu týp các loại, giấy bạc, ống PCR, phiến Costar (Costar No.6509) đều đạt tiêu chuẩn quốc tế.



Hình 1: Nguyên lý định týp HLA dựa trên kỹ thuật FCMIA.

Định týp HLA dựa trên kỹ thuật FCMIA [1] bao gồm các công đoạn nhân gen và xác định các gen đặc hiệu. Khác với kỹ thuật PCR-SSP, kỹ thuật định týp HLA bằng FCMIA sử dụng các cặp mồi đã được Biotin hóa. Các sản phẩm PCR sau khi được nhân lên đều được gắn Biotin. Các đoạn DNA này sẽ được lai với các hạt từ huỳnh quang (có các mã màu khác nhau, được gắn với các probe hay còn gọi là đầu dò cho các gen đặc hiệu).

Sản phẩm sau khi lai được gắn nhãn SA-PE (streptavidin - phycoerythrin) thông qua tương tác streptavidin - biotin. Khi đưa vào máy phân tích, phức hợp DNA - hạt từ dưới tác động của tia laser bước sóng tử ngoại sẽ phát ra ánh sáng huỳnh quang. Mật độ huỳnh quang do PE phát ra dưới tác động của laser xanh chứng tỏ sự có mặt của các sản phẩm DNA khuếch đại. Song song với đó, mật độ huỳnh quang phát ra từ các hạt từ dưới tác động của laser đỏ cho phép nhận biết những hạt từ này là hạt từ nào, tương ứng với đầu dò cho những gen đặc hiệu nào. Gen đặc hiệu được xác định khi có sự xuất hiện đồng thời của 2 loại tín hiệu [4].

* Quy trình xét nghiệm:

- Bước 1: Chuẩn bị các thành phần cần thiết cho khuếch đại DNA:

Thành phần	Thể tích cho vào mỗi ống PCR
Master Mix	6 μ l
DNA	5 μ l (dung dịch chuẩn độ có nồng độ 15 ng/ μ l)
Taq Polymerase	0,2 μ l
Nước cất	20 μ l

- Bước 2: Chạy chu trình nhân gen:

Bước	Thời gian và nhiệt độ	Số chu kỳ
1	95°C trong 3 phút	1
2	95°C trong 15 giây	12
	60°C trong 30 giây	
	72°C trong 30 giây	
3	95°C trong 10 giây	28
	63°C trong 30 giây	
	72°C trong 30 giây	
4	72°C trong 2 phút	1
5	4°C ~ ∞	1

- Bước 3: Đợi phản ứng PCR còn 10 phút, lấy dung dịch hạt từ ra ủ ấm ở 60°C, vortex 20 giây, spin 5 giây.

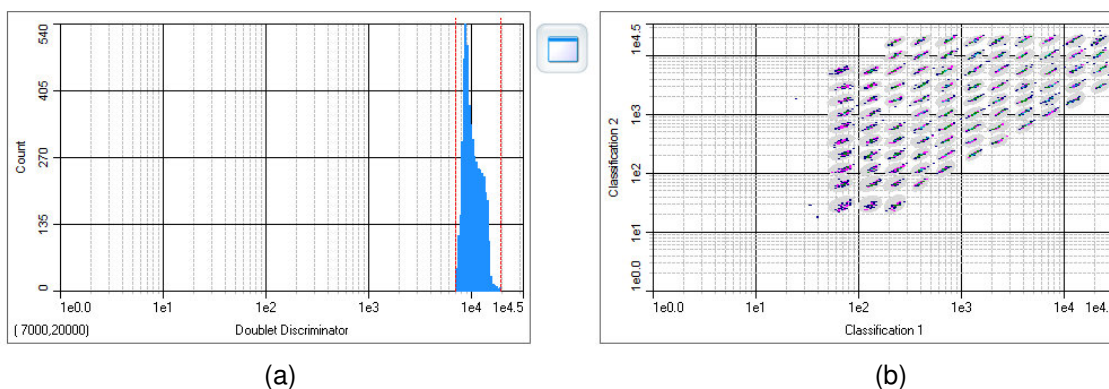
- Bước 4: Trộn 15 μ l dung dịch hạt từ + 5 μ l sản phẩm PCR của từng locus ở bước trên, sử dụng phiến Costar 96 giếng. Che phủ giếng bằng miếng dán. Đặt phiến Costar vào máy PCR sau đó chạy chương trình lai như sau:

Bước	Thời gian và nhiệt độ
1	97°C trong 2 phút
2	47°C trong 10 phút
3	56°C trong 8 phút
4	56°C ~ ∞

- Bước 5: Chuẩn bị dung dịch PE. Mỗi giếng gồm 170 μ l dung dịch pha loãng và 0,85 μ l PE. Kết thúc quá trình gắn (nhiệt độ đang được giữ ở 56°C), mở nắp máy PCR, để nguyên phiên trên máy. Gỡ bỏ miếng dán và cho vào mỗi giếng 170,85 μ l dung dịch PE.

- Bước 6: Lấy phiên ra đặt lên khay kim loại. Cho khay kim loại vào máy Luminex để phân tích kết quả.

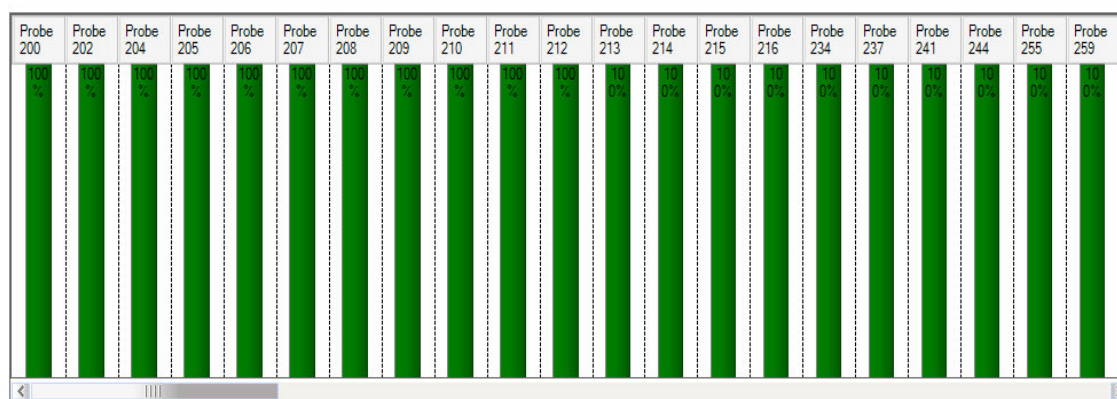
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN



Biểu đồ 1: Số lượng và sự phân bố các hạt từ huỳnh quang.

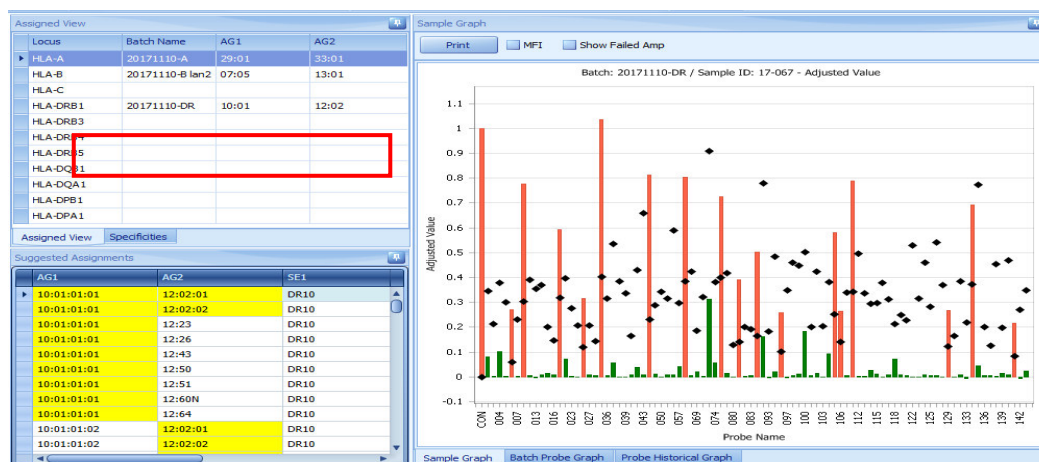
Biểu đồ 1a là số lượng các hạt từ được sử dụng để phân tích dữ liệu. Với mỗi loại hạt từ, số lượng tối thiểu là 40 hạt. Tín hiệu trên mỗi hạt sẽ được sử dụng để tính giá trị mật độ huỳnh quang trung bình (medium fluorescence intensity - MFI).

Biểu đồ 1b là phân bố của 100 loại hạt từ huỳnh quang được sử dụng. Có thể thấy các hạt từ phân bố đều, không bị phân tán.



Biểu đồ 2: Tỷ lệ các đầu dò được sử dụng để phân tích.

Có 100 đầu dò tương ứng 100 loại hạt từ được sử dụng. Kết quả phân tích cho thấy, 100% các đầu dò đều được hệ thống phân tích để đưa ra kết quả. Việc một đầu dò không đạt tỷ lệ 100% có thể do lượng hạt từ sử dụng khi lại không đầy đủ, tín hiệu khi đó sẽ có độ chính xác không cao.



Hình 2: Kết quả phân tích HLA-DRB1 trên phần mềm Match IT! DNA.

Theo kết quả phân tích dựa trên tín hiệu MFI từ các đầu dò (cụ thể là locus A), cột màu đỏ tương ứng giá trị dương tính, cột màu xanh tương ứng giá trị âm tính. Kết quả định typ được tô màu vàng là những kết quả được hệ thống phân tích đưa ra, có độ phù hợp cao nhất (HLA-DRB1*10:01:01:01 và HLA-DRB1*12:02:01:01). Tương tự, hệ thống cho kết quả định typ HLA-A và HLA-B trùng với kết quả đã được thực hiện theo phương pháp PCR-SSP nhưng độ phân giải cao hơn.

Bảng 1: So sánh 2 kỹ thuật PCR-SSP và PCR-SSO.

Nội dung \ Kỹ thuật	PCR-SSP	PCR-SSO
Tiêu chuẩn mẫu DNA	Nồng độ và độ tinh sạch DNA tương đương nhau	
Thời gian định typ: (sau khi đã tách DNA) - 1 mẫu - ≥ 2 mẫu	90 - 120 phút Thêm 90 phút/mẫu	90 - 100 phút Thêm 3 phút/mẫu
Phân tích kết quả	Dựa vào kết quả điện di	Dựa vào tín hiệu huỳnh quang đo được
Chi phí xét nghiệm	Chi phí tương đương	

Với tiêu chuẩn DNA đầu vào như nhau, rõ ràng kỹ thuật PCR-SSO dựa trên công nghệ hạt từ của Luminex có nhiều ưu điểm hơn, đó là thời gian định typ, độ chính xác dựa trên tín hiệu huỳnh quang đo được và độ phân giải tốt hơn.

Với yêu cầu định typ cùng một lúc cho nhiều mẫu xét nghiệm, với khả năng tự

động hóa đến 90%, kỹ thuật PCR-SSO có thể đáp ứng tốt yêu cầu này. Việc định typ thêm 10 mẫu cũng chỉ mất thêm 30 phút, trong khi để thực hiện điều này với kỹ thuật PCR-SSP là không thể (mất tối thiểu thêm 15 tiếng làm liên tục). Kỹ thuật PCR-SSP mất nhiều thời gian do quá trình nhân gen và điện di được thực hiện

trên cả plate 96 giếng, trong khi đó kỹ thuật PCR-SSO chỉ là 3 giếng. Có nghĩa là, cùng thời gian nhân gen, kỹ thuật PCR-SSP chỉ nhân được cho 1 mẫu xét nghiệm nhưng ở kỹ thuật PCR-SSO là 24 mẫu. Quá trình điện di của PCR-SSP cũng tương tự, kỹ thuật viên phải chuyển sản phẩm nhân gen của 1 mẫu xét nghiệm từ plate 96 giếng sang 96 giếng điện di tương ứng, trong khi đó PCR-SSO chỉ cần đưa cả plate vào hệ thống phân tích cho tối đa 24 mẫu xét nghiệm/lần đọc.

Chi phí cho một xét nghiệm định týp HLA bằng PCR-SSO cũng chỉ tương đương kỹ thuật PCR-SSP.

KẾT LUẬN

Ứng dụng thành công kỹ thuật FCMIA trong định týp HLA với độ chính xác và độ phân giải cao. Kỹ thuật có nhiều ưu điểm, trong đó quan trọng nhất là khả năng tự

động hóa lên đến 90% và có thể định týp nhanh được nhiều mẫu xét nghiệm trong một thời gian ngắn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Văn Mạnh và CS. Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng và một số chỉ số miễn dịch ở bệnh nhân sau ghép thận. Luận án Tiến sĩ Y học. Học viện Quân y 2009.
2. Đỗ Khắc Đại và CS. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật hấp phụ miễn dịch vi hạt đánh dấu huỳnh quang trong phát hiện đồng thời nhiều cytokine. Tạp chí Y - Dược học Quân sự 2017; 3:17-23.
3. Nguyễn Đặng Dũng, Nguyễn Ngọc Tuấn. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong xác định HLA. Tạp chí Y - Dược học Quân sự 2011; 6:45-52.
4. Trajanoski D, Fidler SJ. HLA typing using bead-based methods. In Immunogenetics, Humana Press, Totowa, NJ 2012:47-65.