



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001894

(51)⁷ **C12Q 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00254

(22) 25.08.2015

(45) 25.12.2018 369

(43) 27.03.2017 348

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN - ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**
334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Phan Tuấn Nghĩa (VN), Nguyễn Văn Minh (VN), Phùng Bảo Khánh (VN), Vũ Thị Thu (VN), Trịnh Hồng Thái (VN)

(54) **QUY TRÌNH TẠO MẪU CHUẨN ĐỂ PHÁT HIỆN CÁC ĐỘT BIẾN ĐIỂM Ở
BỆNH NHÂN NGHI MẮC BỆNH TY THỂ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo mẫu chuẩn để phát hiện các đột biến điểm ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể, trong đó quy trình tạo ra các đột biến điểm A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176G và G11778A nhân tạo bằng cách dựa trên các đoạn môi đặc hiệu để nhân lên các trình tự chứa các đột biến điểm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử ứng dụng trong y học, cụ thể là đề cập đến quy trình tạo các đột biến điểm nhân tạo trên gen ty thể và các plasmit mang đột biến được tạo ra từ quy trình này. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến việc sử dụng các plasmit mang đột biến trong quy trình xác định đột biến gen ty thể bằng phương pháp RFLP-PCR như là mẫu chuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã biết kit Fusion Site-Directed Mutagenesis của hãng ThermoFisher dùng để tạo các đột biến định hướng như đột biến thay thế nucleotit, mất nucleotit, thêm nucleotit, tuy nhiên đối với mỗi quy trình cần phải thiết kế riêng từng loại môi đặc trưng cho từng đột biến. Các môi được thiết kế sao cho sản phẩm PCR đóng vòng một cách dễ dàng trong phản ứng đóng vòng vector.

Trên thế giới, PCR-RFLP là một trong các kỹ thuật phổ biến được sử dụng trong việc nghiên cứu đột biến gen ty thể (Martin-Kleiner I, et al., Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) associated with mitochondrial DNA point mutation G11778A in two Croatian families. Coll Antropol. 2006 Mar;30(1):171-174.). Năm 2014, việc sàng lọc và nghiên cứu các đột biến gen ty thể này sử dụng phương pháp PCR-RFLP trên bệnh nhi Việt Nam đã được thực hiện bởi Trương Thị Huệ và cộng sự (Truong, H.T., et al., Screening of common point-mutations and discovery of new T14727C change in mitochondrial genome of Vietnamese encephalomyopathy patients. Mitochondrial DNA. 10.3109/19401736.2014.900665: p. 1-8). Tuy nhiên nhóm tác giả chưa có đối chứng dương đi kèm để so sánh và kết luận kết quả. Hơn nữa, do đặc điểm di truyền của bệnh ty thể cùng với việc thiếu đối chứng dương mà các kết luận chẩn đoán về di truyền đột biến gen ty thể thường bị hạn chế. Để giúp các nhà khoa học cũng như bác sĩ có thể tin tưởng

và khẳng định chắc chắn hơn kết quả xét nghiệm thì trong các kết quả nghiên cứu và xét nghiệm sinh học phân tử thì đối chứng dương là một yếu tố không thể tách rời.

Trên thế giới, chưa có một nghiên cứu nào về tạo đối chứng dương cho các đột biến điểm (như A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C, G11778A). Nghiên cứu tạo ra và sử dụng các đột biến này làm đối chứng dương hỗ trợ trong chẩn đoán đột biến gen ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể bằng phương pháp PCR-RFLP. Việc tạo thành công đột biến điểm nhân tạo trong phòng thí nghiệm giúp chúng ta có thể chủ động về nguồn mẫu chuẩn (vector, plasmit mang các đột biến), trong nghiên cứu, xét nghiệm cũng như hỗ trợ chẩn đoán và điều trị bệnh.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục các hạn chế trong kỹ thuật PCR-RFLP trong nghiên cứu về đột biến điểm trên gen ty thể trước đây (Truong, H.T., et al., Screening of common point-mutations and discovery of new T14727C change in mitochondrial genome of Vietnamese encephalomyopathy patients. Mitochondrial DNA. 10.3109/19401736.2014.900665: p. 1-8). Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tạo đột biến điểm A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C, G11778A làm mẫu chuẩn hay còn gọi là đối chứng dương trong xét nghiệm PCR-RFLP và các vector mang các đột biến này.

Quy trình tạo mẫu chuẩn để phát hiện đột biến điểm ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể bao gồm các bước:

(a) tạo vector mang vùng gen bình thường chứa đột biến điểm bằng cách chiết ADN tổng số của người và nhân các đoạn gen ty thể chứa các vị trí 3251, 3271, 3291, 3460, 8993G, 9176 và 11778 bằng phản ứng PCR, sau khi cắt bằng enzym ADN đầu bằng, gắn vào vector nhân dòng jJET1.2, sau đó biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α và chọn lọc trong môi trường LB đặc chứa 50 μ g/ml ampicillin ở 37°C, sau đó chiết tách để thu plasmit tái tổ hợp;

b) tạo đoạn mồi mang đột biến điểm bằng các đoạn mồi chứa đột biến T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G hoặc G11778A và được gắn gốc phosphat vào đầu 5' như sau:

Tên đột biến	Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn
A3251G	MAG51M1	5'Phos-CCC GGT <u>G</u> AT CGC ATA AAA CT -3'	55,3°C
	MAG51M2	5'Phos-CTC TGC CAT CTT AAC AAA CCC T -3'	55,0°C
T3271C	MTC71M1	5'Phos-TAA AAC <u>C</u> TT AGA GTC AGA GGT TC-3'	51,7°C
	MTC71M2	5'Phos-AGT TTT ATG CGA TTA CCG GG -3'	52,8°C
T3291C	MTC91M1	5'Phos-TTG GAT <u>C</u> CC TCT TCT TAA CA -3'	50,5°C
	MTC91M2	5'Phos-CCT CTG ACT GTA AAG TTT TAA GT -3'	50,4°C
G3460A	LHGA34M1	5'Phos-CCC TTC GCT GAC <u>A</u> CC ATA AA -3'	55,0°C
	LHGA34M2	5'Phos-TTG TAG TAG CCC GTA GGG G -3'	55,8°C
T8993G/C	LTC89M1	5'Phos-GCC TAA CCG CTA ACA TTA CTG CAG GC-3'	61,7°C
	LTG89M2	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CG GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C
	LTC89M3	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CG GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C
T9176C	LTC91M1	5'Phos-TCA CAC TTC <u>C</u> AG TAA GCC TCT A -3'	55,0°C
	LTC91M2	5'Phos-AAA CGT AGG CTT GGA TTA AGG C -3'	55,4°C
G11778A	LHGAM1	5'Phos-CTC ACA GTC <u>A</u> CA TCA TAA TCC T -3'	51,9°C
	LHGAM2	5'Phos-TGC GTT CGT AGT TTG AGT TT -3'	52,4°C

và

c) tạo các vector mang đột biến điểm bằng cách PCR với sản phẩm plasmit tái tổ hợp thu được ở mục a) và các đoạn mồi mang đột biến điểm ở mục b), sau đó, sản phẩm được khép vòng bằng T4 ligaza, tiếp đó, plasmit này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α và chọn lọc trên môi trường LB đặc chứa 50μg/ml penicillin, sau đó thu được vector chứa đột biến điểm nhân tạo A3251G, T3271C, T3291C, A3251G, G3460A,

T8993G/C, T9176G và G11778A để làm mẫu chuẩn dùng để phát hiện đột biến điểm ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể.

Theo một phương án, trong đó quy trình theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước tạo chủng giống *E.coli* DH5 α chứa vector đột biến điểm nhân tạo A3251G, T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G và G11778A.

Giải pháp hữu ích cũng mô tả quy trình chẩn đoán các đột biến gen ty thể bằng phương pháp PCR-RFLP bao gồm các bước:

(a) Nhân gen (PCR) các mẫu bệnh phẩm và các đối chứng âm, đối chứng dương tương ứng với vùng gen mang đột biến;

(b) Cắt enzym giới hạn và phân biệt các phân đoạn được tạo ra (RFLP) có cải tiến, sử dụng đệm FastDigest làm giảm thời gian phản ứng xuống còn dưới 15 phút;

(c) Điện di kiểm tra kết quả cắt enzym giới hạn trên gel acrylamit 12% hoặc gel agarosa 2%; và

(d) Đọc kết quả điện di.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản các plasmid chứa các đoạn chèn không mang đột biến với các cặp mồi tạo đột biến điểm A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A có kích thước khoảng 3 kb.

Hình 2 là ảnh điện di plasmid mang các đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A có kích thước khoảng 3 kb.

Hình 3 là một phần kết quả giải trình tự các đoạn gen mang và không mang đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A có kích thước khoảng 3 kb.

Hình 4 là hình ảnh kết quả PCR nhân bản các đoạn mang đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A có kích thước khoảng 3 kb của đối chứng và các mẫu bệnh phẩm.

Hình 5 là kết quả điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn của đối chứng và các mẫu bệnh phẩm nghi mang các đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích:

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tạo các đột biến điểm A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A bao gồm các bước:

(a) tạo các vector mang vùng gen bình thường chứa các vị trí mang đột biến nêu trên:

- Chuẩn bị ADN tổng số: ADN tổng số của người bình thường được tách theo kit của Qiagen.

- Nhân bản đoạn gen ty thể chứa vị trí đột biến bằng kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp polymeraza): Các đoạn gen ty thể chứa các vị trí 3251, 3271, 3291, 3460, 8993G, 9176 hoặc 11778 được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

- Nhân dòng trực tiếp các đoạn gen trên lần lượt vào vector pJET1.2: sau khi đã kiểm tra trên gel agarosa 2%, các sản phẩm PCR của các đoạn gen ty thể chứa các vị trí 3251, 3271, 3291, 3460, 8993G, 9176 hoặc 11778 được gắn trực tiếp vào vector nhân dòng pJET1.2 theo kit của Thermiscentifics. Do đây là vector nhân dòng đầu bằng, khả năng gắn thêm một gốc adenosine monophosphate (A) ở đầu 3' của sản phẩm PCR nhờ hoạt tính transferaza đầu chuỗi không phụ thuộc vào trình tự ADN khuôn của Taq ADN polymeraza, nên cần phải có phản ứng loại bỏ nucleotit A ở cuối chuỗi ADN ở phản ứng PCR. Nhờ đó, sản phẩm của phản ứng PCR có thể được gắn chính xác vào vector nhân dòng.

Phản ứng tạo đầu bằng được thực hiện trong 5 phút ở nhiệt độ 70°C sau đó mẫu được ủ trên nước đá lạnh. Thành phần phản ứng (với tổng thể tích của phản ứng là 18 µl) bao gồm 10 µl đệm phản ứng 2X, 1 µl sản phẩm PCR, 17 µl nước tinh sạch khử ion và 1 µl enzyme ADN đầu bằng. Sau phản ứng tạo đầu bằng, phản ứng gắn được tiến hành bằng

việc cho thêm vào hỗn hợp sản phẩm tạo đầu bằng 1 μl pJET1.2/blunting Cloning vector (50 ng/ μl) và 1 μl enzym T4 ADN ligaza ủ ở nhiệt độ 22°C trong 5 phút. Sau đó, sản phẩm của phản ứng sẽ được bảo quản ở -20°C hoặc sử dụng để biến nạp vào *E. coli* DH5 α .

Để biến nạp plasmit vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α , tế bào khả biến (đã được xử lý trong điều kiện lạnh, có ion Ca^{2+} , bảo quản ở -80°C) được lấy ra và rã đông trên nước đá từ 10-20 phút. Sau đó, 10 μl hỗn hợp phản ứng gán ở trên được bổ sung vào dung dịch tế bào, trộn nhẹ và để trên nước đá 20 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào. Sau đó, hỗn hợp được sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây và được làm lạnh ngay trên nước đá trong 2 phút. Hỗn hợp biến nạp này tiếp tục được bổ sung thêm 300-500 μl môi trường LB lỏng và mẫu được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở 37°C trong 10 phút. Tiếp đến, mẫu được nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 50 phút nhằm phục hồi các tế bào sau khi bị sốc nhiệt. Hỗn hợp biến nạp (khoảng từ 50-100 μl) tiếp tục được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin và được nuôi trong tủ ấm 37°C cho đến khi quan sát thấy sự hình thành các khuẩn lạc rõ rệt (sau 8- 20 giờ nuôi cấy).

Các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α tạo thành được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp. Khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp sẽ được chọn lọc và nuôi trong môi trường LB lỏng để chuẩn bị cho bước tách plasmit.

- Tinh sạch và giải trình tự: các plasmit từ tế bào mang vector tái tổ hợp thu được ở bước trên được tinh sạch để gửi đi xác định trình tự nhằm khẳng định trình tự vùng nhân lên là chính xác, làm cơ sở cho việc thiết kế mồi tạo đột biến.

(b) thiết các cặp mồi phosphoryl hóa ở đầu 5' (bảng 1):

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi tạo đột biến được thiết kế

Tên đột biến	Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gán
A3251G	MAG51M1	5'Phos-CCC GGT <u>G</u> AT CGC ATA AAA CT -3'	55,3°C

	MAG51M2	5'Phos-CTC TGC CAT CTT AAC AAA CCC T -3'	55,0°C
T3271C	MTC71M1	5'Phos-TAA AAC <u>C</u> TT AGA GTC AGA GGT TC-3'	51,7°C
	MTC71M2	5'Phos-AGT TTT ATG CGA TTA CCG GG -3'	52,8°C
T3291C	MTC91M1	5'Phos-TTG GAT <u>C</u> CC TCT TCT TAA CA -3'	50,5°C
	MTC91M2	5'Phos-CCT CTG ACT GTA AAG TTT TAA GT -3'	50,4°C
G3460A	LHGA34M1	5'Phos-CCC TTC GCT GAC <u>A</u> CC ATA AA -3'	55,0°C
	LHGA34M2	5'Phos-TTG TAG TAG CCC GTA GGG G -3'	55,8°C
T8993G/C	LTC89M1	5'Phos-GCC TAA CCG CTA ACA TTA CTG CAG GC-3'	61,7°C
	LTG89M2	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CC GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C
	LTC89M3	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CC GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C
T9176C	LTC91M1	5'Phos-TCA CAC TTC <u>C</u> AG TAA GCC TCT A -3'	55,0°C
	LTC91M2	5'Phos-AAA CGT AGG CTT GGA TTA AGG C -3'	55,4°C
G11778A	LHGAM1	5'Phos-CTC ACA GTC <u>A</u> CA TCA TAA TCC T -3'	51,9°C
	LHGAM2	5'Phos-TGC GTT CGT AGT TTG AGT TT -3'	52,4°C

- cặp môi được thiết kế dựa vào trình tự chuẩn trên ngân hàng gen đã được công bố (Anderson S., et al., Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981. 290: 457-465) và các đột biến mong muốn như tại vị trí 3251 A được thay bằng G, 3271 T được thay bằng C, 3291 T được thay bằng C, 3460 G được thay bằng A, 8993 T được thay bằng C, 9176 T được thay bằng C, 11778 G được thay bằng A.

- Các môi phải được gắn thêm gốc phosphat ở đầu 5' đây là việc mà cần thiết cho bước khử phosphat trước khi đóng vòng (ligation).

- Để tăng hiệu suất cắt của enzym, chất lượng của các môi cần đạt độ sạch cao, tránh tạp nhiễm.

- Nhiệt độ gắn mỗi được tính dựa và trang web: www.thermoscientific.com/tmc nhằm xác định nhiệt độ chính xác phù hợp với hệ enzym của hãng. Để tăng tính đặc hiệu đối với enzym Phusion Hot Start II DNA Polymerase của mỗi thì nhiệt độ gắn mỗi thường cao hơn nhiệt độ tính toán là 3°C.

- Trên vector 2 mỗi được thiết kế nối tiếp nhau và một trong hai mỗi mang nucleotit đột biến tại vị trí đột biến.

(c) tạo các vector mang các đột biến điểm nói trên:

- Tiến hành PCR sử dụng khuôn ADN là sản phẩm plasmit ở mục (a) với cặp mỗi được thiết kế ở mục (b) theo kit Phusion Site-Directed Mutagenesis.

- Thành phần mỗi phản ứng PCR nhân bản các plasmit được tạo ra ở mục (a) bao gồm: 10 µl đệm Phusion HF 5X; 0,5 µl Phusion Hot Start ADN polymeraza (2U/µl); 1 µl dNTPs 10 mM; 2,5 µl mỗi xuôi 10 pmol; 2,5 µl mỗi ngược 10 pmol; bổ sung ddH₂O để thể tích mỗi phản ứng đạt 48 µl. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều, sau đó ống mẫu này được bổ sung thêm 2 µl ADN plasmit làm khuôn (20pg). Chương trình chạy cho phản ứng PCR gồm 25 chu kỳ, với chế độ nhiệt cho mỗi chu kỳ là 98°C trong thời gian 10 giây để biến tính ADN, 55-60°C trong thời gian 30 giây để gắn mỗi và 72°C trong thời gian 2 phút để kéo dài chuỗi.

- Đoạn sản phẩm PCR được nhân lên theo bước trên tiếp tục được đóng vòng bằng T4 ADN ligaza. Cụ thể, 20 ng sản phẩm PCR được thêm vào 2 µl 5X đệm ligation nhanh, dẫn thêm nước khử ion đến thể tích đạt 9,5 µl rồi trộn đều hỗn hợp. Sau đó, 0,5 µl enzym T4 ADN ligaza được bổ sung. Hỗn hợp được trộn mạnh, ly tâm nhanh và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Như vậy, hỗn hợp sản phẩm ở bước này sẽ được sử dụng để biến nạp trực tiếp hoặc được bảo quản ở -20°C (lưu ý không được bất hoạt enzym bằng nhiệt).

- Các bước tiến hành để biến nạp plasmit vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α tương tự như đã nêu ở mục a). Tế bào khả biến (bảo quản ở -80°C) được lấy ra và rã đông trên nước đá từ 10 đến 20 phút. Sau đó, 10 µl hỗn hợp phản ứng gắn ở trên được bổ sung vào dung dịch tế bào, trộn nhẹ và ủ trên nước đá 20 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào.

Sau đó, hỗn hợp được sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây và được làm lạnh ngay trên nước đá trong 2 phút. Hỗn hợp biến nạp này được bổ sung thêm 300-500 µl môi trường LB lỏng và mẫu được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở 37°C trong 10 phút; tiếp đến nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C trong 50 phút để phục hồi các tế bào sau khi bị sốc nhiệt. 50-100 µl hỗn hợp biến nạp tiếp tục được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có 50 µg/ml ampicillin và được nuôi trong tủ ấm 37°C cho đến khi quan sát thấy sự hình thành các khuẩn lạc rõ rệt (sau 8- 20 giờ nuôi cấy).

- Các khuẩn lạc *E.coli* DH5α tạo thành được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp. Khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp sẽ được chọn lọc và nuôi trong môi trường LB lỏng, chuẩn bị cho bước tách plasmid.

- Tinh sạch plasmid từ tế bào mang vector tái tổ hợp thu được ở bước trên để gửi đi xác định trình tự, khẳng định trình tự vùng nhân lên là chính xác.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp đề xuất các plasmid thu được từ quy trình nêu trên. Plasmid là plasmid tách dòng và mang các vị trí đột biến tương ứng trên hệ gen ty thể.

Giải pháp mô tả việc cải tiến quy trình chẩn đoán bệnh nhân mang đột biến gene ty thể bằng phương pháp PCR-RFLP sử dụng các plasmid mang các đột biến tương ứng làm đối chứng dương. Quy trình này bao gồm các bước:

(a) Nhân gen (PCR) các mẫu bệnh phẩm, đối chứng âm và đối chứng dương tương ứng với vùng gen mang đột biến.

- Thành phần mỗi phản ứng PCR nhân bản đoạn gene mang các đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A bao gồm: 2,5 µl đệm Taq ADN polymeraza 10X; 0,5 µl Taq ADN polymeraza; 2,5 µl dNTPs 2 mM; 1 µl mỗi xuôi (tương ứng từng đột biến) 10 pmol; 1 µl mỗi ngược (tương ứng từng đột biến) 10 pmol; bổ sung ddH₂O để thể tích mỗi phản ứng đạt 23 µl. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều, sau đó ống nghiệm chạy PCR này được bổ sung thêm 2 µl ADN bệnh nhân, hoặc plasmid không đột biến, hoặc plasmid mang đột biến hoặc nước khử ion. Chương trình chạy cho phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ, với chế độ nhiệt cho mỗi chu kỳ là 95°C trong thời gian 10 giây để

biến tính ADN, 55°C-60°C (tùy theo cặp môi từng đột biến) trong thời gian 20 giây để gắn môi và 72°C trong thời gian 30 giây để kéo dài chuỗi.

- Điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1,5% để kiểm tra kết quả. Nếu sản phẩm PCR lên đều, sáng rõ nét và không lên với ống bổ sung nước khử ion thì tiến hành sang bước tiếp theo. Nếu có vấn đề như băng lên không đều, đôi chứng âm lên thì phải tiến hành PCR lại.

(b) Cắt enzyme giới hạn và phân biệt các phân đoạn được tạo ra (RFLP) có cải tiến, sử dụng đệm FastDigest làm giảm thời gian phản ứng xuống còn dưới 15 phút.

- Phản ứng cắt được thực hiện với các thành phần (tổng thể tích là 10 µl) như sau: 1 µl đệm enzyme giới hạn FastDigest 10X; 0,5 µl enzyme giới hạn (10 đơn vị/µl) tương ứng cho từng đột biến; 6 µl sản phẩm PCR và 2,5 µl dd H₂O. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong khoảng thời gian từ 5-15 phút.

(c) Điện di kiểm tra kết quả cắt enzyme giới hạn trên gel acrylamide 12% hoặc gel agarosa 2%.

- Tra các mẫu với thể tích tối đa không quá 10 µl vào bản gel theo thứ tự thang chuẩn, đôi chứng âm, đôi chứng dương và các mẫu bệnh phẩm. Sau khi tiến hành chạy điện di ở điện thế 120 volt trong khoảng 45 phút, bản gel được nhuộm với ethidium bromide 50 µg/µl trong 5 phút và soi trên máy đọc geldoc của BioRad

(d) Đọc kết quả điện di các đột biến A3251G, T3271C, T3291C, G3460A, T8993G/C, T9176C và G11778A (hình 5).

- Với đột biến A3251G, mẫu đột biến sẽ có hai băng 118 bp và 80 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng đồng nhất, hoặc ba băng 118 bp, 80 bp và 198 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng không đồng nhất, mẫu không đột biến chỉ một băng 198 bp.

- Với đột biến T3271C, mẫu đột biến sẽ có ba băng 79 bp, 24 bp và 45 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng đồng nhất, hoặc bốn băng 79 bp, 24 bp, 45 bp và 148

bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng không đồng nhất, còn mẫu không đột biến có 2 băng là 103 bp và 45 bp.

- Với đột biến T3291C, mẫu đột biến sẽ có hai băng 282 bp và 27 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng đồng nhất, hoặc ba băng 282 bp, 27 bp và 309 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng không đồng nhất, mẫu không đột biến chỉ một băng là 309 bp.

- Với đột biến G3460A, mẫu đột biến sẽ chỉ có một băng 306 bp, hoặc có ba băng 306 bp, 184 bp, 122 bp trong trường hợp mẫu mang đột biến ở dạng không đồng nhất, còn mẫu không mang đột biến có 2 băng là 184 bp và 122 bp.

- Với đột biến T8993G/C, mẫu đột biến sẽ có hai băng 224 bp và 178 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng đồng nhất, hoặc 3 băng 402 bp, 224 bp và 178 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng không đồng nhất, mẫu không đột biến chỉ có một băng 402 bp.

- Với đột biến T9176C, mẫu đột biến sẽ chỉ có một băng 163 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng đồng nhất, hoặc có 3 băng 163 bp, 117 bp và 46 bp với trường hợp bệnh nhân mang đột biến ở dạng không đồng nhất, còn mẫu không mang đột biến chỉ có 2 băng là 117 bp và 46 bp.

- Với đột biến G11778A, mẫu đột biến sẽ chỉ có một băng 318 bp, hoặc có ba băng 318 bp, 213 bp, 105 bp trong trường hợp mẫu mang đột biến ở dạng không đồng nhất, còn mẫu không mang đột biến có 2 băng là 213 bp và 105 bp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ: Sản xuất plasmit mang đột biến

Bước thứ nhất là tạo vector tái tổ hợp mang các vùng gen bình thường của đoạn cần tạo đột biến A3251G:

Nguyên liệu và các hóa chất sử dụng: kit tách chiết ADN từ máu được mua ví dụ từ hãng Qiagen (1 phản ứng); các thành phần của phản ứng PCR gồm oligonucleotit (1µl mỗi loại) được đặt mua ví dụ từ hãng IDT; Taq ADN polymeraza (1µl) của Enzymomics;

dNTPs (5 μ l), vector pJET1.2 (1 μ l), của hãng Thermoscientifics và 01 phản ứng tách plasmid được mua ví dụ từ hãng Qiagen; tế bào khả biến DH5 α (200 μ l) được mua ví dụ từ hãng Invitrogen. Các hóa chất khác đều đạt độ tinh khiết dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử. Cặp mồi MAG Fw, MAG Rv có trình tự sau:

MAG Fw: 5' CAAGAGAAATAAGGCTTACTTC 3'

MAG Rv: 5' GGA GTA GGA GGT TAG CCA TGG G 3'

pJET1.2 Fw: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

pJET1.2 Rv: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

- Tách ADN từ máu theo hướng dẫn của kit.
- Nhân bản đoạn gen mang vị trí 3251 sử dụng cặp mồi MAG Fw, MAG Rv
- Thành phần mỗi phản ứng PCR nhân bản đoạn gen mang vị trí 3251 bao gồm: 2,5 μ l đệm Taq ADN polymeraza 10X; 0,5 μ l Taq ADN polymeraza; 2,5 μ l dNTPs 2 mM; 1 μ l MAG Fw 10 pmol; 1 μ l MAG Rv 10 pmol; bổ sung ddH₂O để thể tích mỗi phản ứng đạt 23 μ l. Trộn đều các thành phần, sau đó bổ sung thêm 2 μ l ADN được tách từ máu làm khuôn. Chương trình chạy PCR gồm 35 chu kỳ với chế độ nhiệt cho mỗi chu kỳ là 95°C trong thời gian 10 giây để biến tính ADN, 56°C trong thời gian 15 giây để gắn mồi và 72°C trong thời gian 30 giây để kéo dài chuỗi.

- Kiểm tra kết bằng cách điện di sản phẩm phản ứng PCR trên gel agarosa 2%, sử dụng thang chuẩn ADN 25 bp. Phản ứng cho kết quả dương tính khi lên một băng ADN duy nhất kích thước 198 bp của đoạn gen. Sản phẩm phản ứng này sẽ được sử dụng cho các bước nhân dòng tiếp theo.

- Gắn đoạn gen mang vị trí 3251 vào vector pJET1.2 như sau: tạo hỗn hợp gồm vector pJET1.2 (từ 10 ng đến 100 ng), gen mang vị trí 3251 (từ 30 ng đến 300 ng), đệm T4 ADN ligaza 10X (2 μ l); T4 ADN ligaza (1 μ l); bổ sung thêm dung dịch H₂O để thể tích cuối cùng của phản ứng là 20 μ l; ủ hỗn hợp sản phẩm gắn ở 4°C qua đêm hoặc 22°C trong 3 giờ.

- Biến nạp sản phẩm gắn vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α như sau: lấy 100 μ l tế bào khả biến *E. coli* DH5 α (bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C) ra rã đông trên nước đá trong thời gian 15 phút; bổ sung 10 μ l hỗn hợp phản ứng gắn ở trên vào, trộn nhẹ và để trên nước

đá trong thời gian 10 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào; sốc nhiệt hỗn hợp ở 42°C trong thời gian 45 giây chuyển mẫu ngay lên nước đá ủ 2 phút; bổ sung 500 µl môi trường LB (Luria Bertani) lỏng vào hỗn hợp biến nạp, mẫu sau đó được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ ở 37°C trong thời gian 20 phút và tiếp đến nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 60 phút. Sau đó, 50 µl hỗn hợp biến nạp được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có 50 µg/ml ampicillin và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Kết quả biến nạp xuất hiện một vài khuẩn lạc trắng. Tiến hành sàng lọc vi khuẩn mang vector pJET1.2 tái tổ hợp có đoạn chèn là đoạn gen mang vị trí 3251 bằng PCR với khuôn chính là các khuẩn lạc trắng, sử dụng cặp mồi pJET1.2 Fw và pJET1.2 Rv cùng các thành phần phản ứng và chu trình nhiệt tương tự như phản ứng PCR nêu trong bước thứ nhất. Sản phẩm PCR cho băng ADN kích thước khoảng 318 bp chính là các khuẩn lạc mang vector pJET1.2 tái tổ hợp có đoạn chèn là gen mã hóa cotB tương ứng gọi tắt là pJET1.2 3251.

- Tinh sạch plasmid từ tế bào mang vector tái tổ hợp thu được ở bước trên để gửi đi giải trình tự, kết quả phù hợp với trình tự chuẩn trên ngân hàng gen và sử dụng cho bước tiếp theo.

Bước thứ hai tạo thiết kế cặp mồi tạo đột biến A3251G bao gồm các công đoạn sau:

Nguyên liệu và hóa chất: trình tự được giải ở trên; phần mềm Primer 5, Primer Blast của NCBI.

- Xác định mồi thứ nhất mang một vị trí sai khác chính là nucleotit đột biến.
- Mồi thứ 2 được bắt đầu từ trước vị trí 5' của mồi thứ nhất nhưng ở mạch đối diện.
- Xác định chiều dài 2 mồi sao cho nhiệt độ gắn mồi tương đương nhau.
- Nucleotit gạch chân là nucleotit đột biến, các mồi đều được gắn phosphat ở đầu 5'.

Tên đột biến	Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn
A3251G	MAG51M1	5'Phos-CCC GGT <u>GAT</u> CGC ATA AAA CT -3'	55,3°C
	MAG51M2	5'Phos-CTC TGC CAT CTT AAC AAA CCC T -3'	55,0°C

Bước thứ ba là tạo plasmid đột biến A3251G bao gồm các công đoạn sau:

- Nhân PCR plasmit pJET1.2 3251 ở bước một với cặp mồi được thiết kế ở bước hai. Thành phần mỗi phản ứng PCR nhân bản các plasmit được tạo ra ở mục (a) bao gồm: 10 µl đệm Phusion HF 5X; 0,5 µl Phusion Hot Start ADN polymeraza (2U/µl); 1 µl dNTPs 10 mM; 2,5 µl mồi xuôi 10 pmol; 2,5 µl mồi ngược 10 pmol; bổ sung H₂O để thể tích mỗi phản ứng đạt 48 µl. Trộn đều các thành phần sau đó bổ sung thêm 2 µl ADN được plasmit làm khuôn (20 pg) và chạy PCR gồm 35 chu kỳ với chế độ nhiệt cho mỗi chu kỳ là 98°C trong thời gian 10 giây để biến tính ADN, 55-60°C trong thời gian 30 giây để gắn mồi và 72°C trong thời gian 2 phút để kéo dài chuỗi.

- Đoạn sản phẩm PCR được nhân lên được đóng vòng bằng T4 ADN ligaza. Cụ thể, hỗn hợp chứa 20 ng sản phẩm PCR, 2 µl 5X đệm ligation nhanh, 9,5 µl nước khử ion được trộn đều và sau đó bổ sung 0,5 µl enzyme T4 ADN ligaza. Hỗn hợp tiếp tục được trộn mạnh, ly tâm nhanh và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sản phẩm sau cùng sẽ được sử dụng để biến nạp trực tiếp hoặc bảo quản ở -20°C (Lưu ý không được bất hoạt enzyme bằng nhiệt).

- Để biến nạp plasmit vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α, tế bào khả biến (bảo quản ở -80°C) được rã đông trên nước đá 10-20 phút. Sau đó, 10 µl hỗn hợp phản ứng gắn ở trên được bổ sung vào dung dịch tế bào, trộn nhẹ và ủ trên nước đá 20 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào, sản phẩm tiếp tục được sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây và được chuyển ngay lên nước đá ủ 2 phút. Bổ sung 500 µl môi trường LB (Luria Bertani) lỏng vào hỗn hợp biến nạp, mẫu sau đó được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút và tiếp đến nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 60 phút. Tiếp đó, 50-100 µl hỗn hợp biến nạp được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có 50 µg/ml ampicillin và nuôi trong tủ ấm 37°C cho đến khi quan sát thấy sự hình thành các khuẩn lạc rõ rệt (sau 8- 20 giờ nuôi cấy).

- Các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α tạo thành được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp. Khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp sẽ được chọn lọc và nuôi trong môi trường LB lỏng, chuẩn bị cho bước tách plasmid.

- Tinh sạch plasmid từ tế bào mang vector tái tổ hợp thu được ở bước trên để gửi đi xác định trình tự và khẳng định trình tự vùng nhân lên là chính xác.

Việc sản xuất các vector mang đột biến điểm T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G và G11778A được sản xuất tương tự như việc sản xuất vector mang đột biến điểm A3251G như trên, chỉ khác sử dụng các đoạn môi tương ứng.

Kết quả thực hiện được thể hiện trên các Hình 1-4, trong đó Hình 1 là ảnh điện di sản phẩm PCR nhân các plasmid chứa đoạn chèn không mang đột biến điểm. Hình 2 là ảnh điện di plasmid đột biến thu được bằng quy trình theo giải pháp. Hình 3 là kết quả giải trình tự các đoạn gen mang và không mang đột biến. Hình 4 là kết quả PCR các bản mang đột biến theo giải pháp và các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Theo quy trình thiết lập, các plasmid mang các đột biến T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176C, G11778A là một dạng tái tổ hợp mới, sau khi được tạo thành có thể được sản xuất bằng phương pháp lên men vi sinh đơn giản ở quy mô lên men công nghiệp, cho phép tạo thành sản phẩm với giá thành có tính cạnh tranh cao.

Các plasmid mang các đột biến T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176C, G11778A sau đó được sử dụng làm đối chứng dương hỗ trợ trong chẩn đoán đột biến gen ty thể ở người bằng phương pháp PCR-RFLP. Quá trình chẩn đoán được thực hiện rất đơn giản và không yêu cầu máy móc đắt tiền hay phức tạp kèm theo nên dễ dàng áp dụng quy trình ở bất kỳ bệnh viện hay cơ sở xét nghiệm y tế nào. Hơn nữa, giá thành của nguyên liệu thực hiện quy trình này cũng sẽ là một ưu thế so với các sản phẩm trên thị trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo mẫu chuẩn để phát hiện các đột biến điểm ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể bao gồm các bước:

(a) tạo vector mang vùng gen bình thường chứa đột biến điểm bằng cách chiết ADN tổng số của người và nhân các đoạn gen ty thể chứa các vị trí 3251, 3271, 3291, 3460, 8993G, 9176 và 11778 bằng phản ứng PCR, sau khi cắt bằng enzym ADN đầu bằng, gắn vào vector nhân dòng jJET1.2, sau đó biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5 α và chọn lọc trong môi trường LB đặc chứa 50 μ g/ml ampicillin ở 37°C, sau đó chiết tách để thu plasmit tái tổ hợp;

b) tạo đoạn mồi mang đột biến điểm bằng các đoạn mồi chứa các đột biến T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G hoặc G11778A và được gắn gốc phosphat vào đầu 5' như sau:

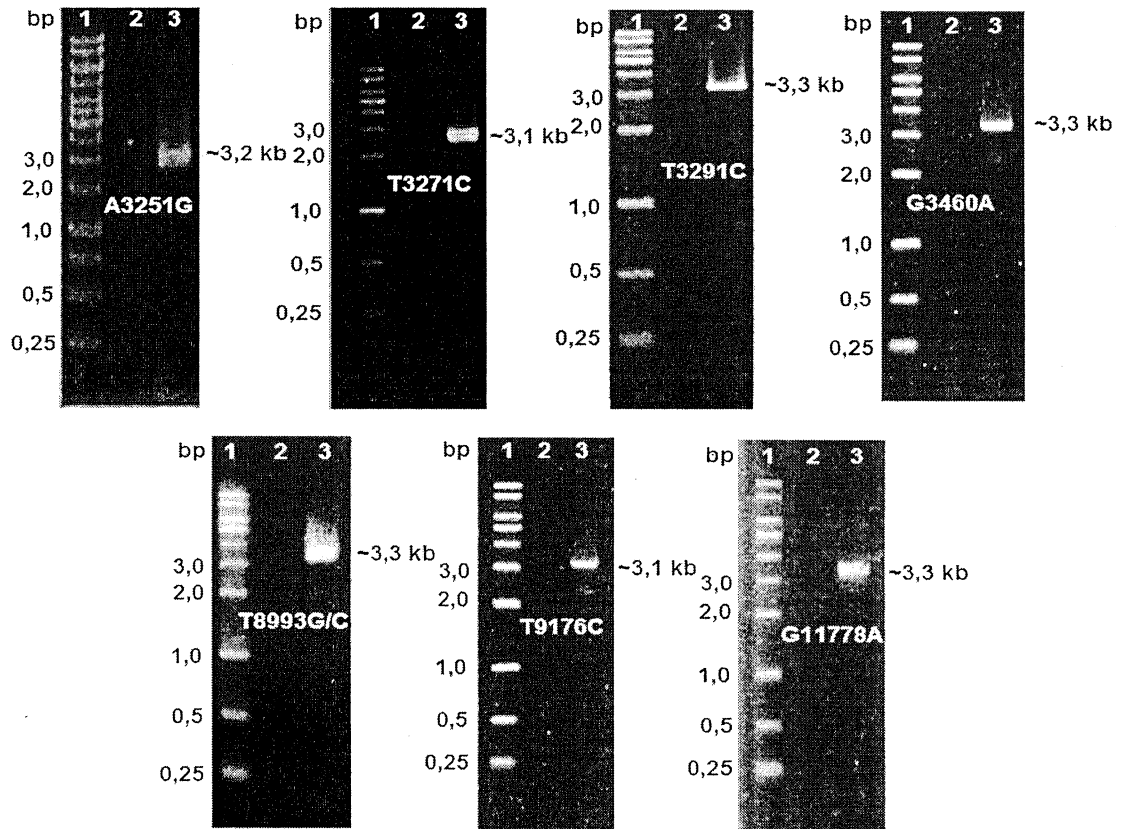
Tên đột biến	Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn
A3251G	MAG51M1	5'Phos-CCC GGT <u>G</u> AT CGC ATA AAA CT -3'	55,3°C
	MAG51M2	5'Phos-CTC TGC CAT CTT AAC AAA CCC T -3'	55,0°C
T3271C	MTC71M1	5'Phos-TAA AAC <u>C</u> TT AGA GTC AGA GGT TC-3'	51,7°C
	MTC71M2	5'Phos-AGT TTT ATG CGA TTA CCG GG -3'	52,8°C
T3291C	MTC91M1	5'Phos-TTG GAT <u>C</u> CC TCT TCT TAA CA -3'	50,5°C
	MTC91M2	5'Phos-CCT CTG ACT GTA AAG TTT TAA GT -3'	50,4°C
G3460A	LHGA34M1	5'Phos-CCC TTC GCT GAC <u>A</u> CC ATA AA -3'	55,0°C
	LHGA34M2	5'Phos-TTG TAG TAG CCC GTA GGG G -3'	55,8°C
T8993G/C	LTC89M1	5'Phos-GCC TAA CCG CTA ACA TTA CTG CAG GC-3'	61,7°C
	LTG89M2	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CC GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C
	LTC89M3	5'Phos-GTA CGG <u>C</u> CG GGG CTA TTG GT -3'	62,2°C

T9176C	LTC91M1	5'Phos-TCA CAC TTC <u>C</u> AG TAA GCC TCT A -3'	55,0°C
	LTC91M2	5'Phos-AAA CGT AGG CTT GGA TTA AGG C -3'	55,4°C
G11778A	LHGAM1	5'Phos-CTC ACA GTC <u>A</u> CA TCA TAA TCC T -3'	51,9°C
	LHGAM2	5'Phos-TGC GTT CGT AGT TTG AGT TT -3'	52,4°C

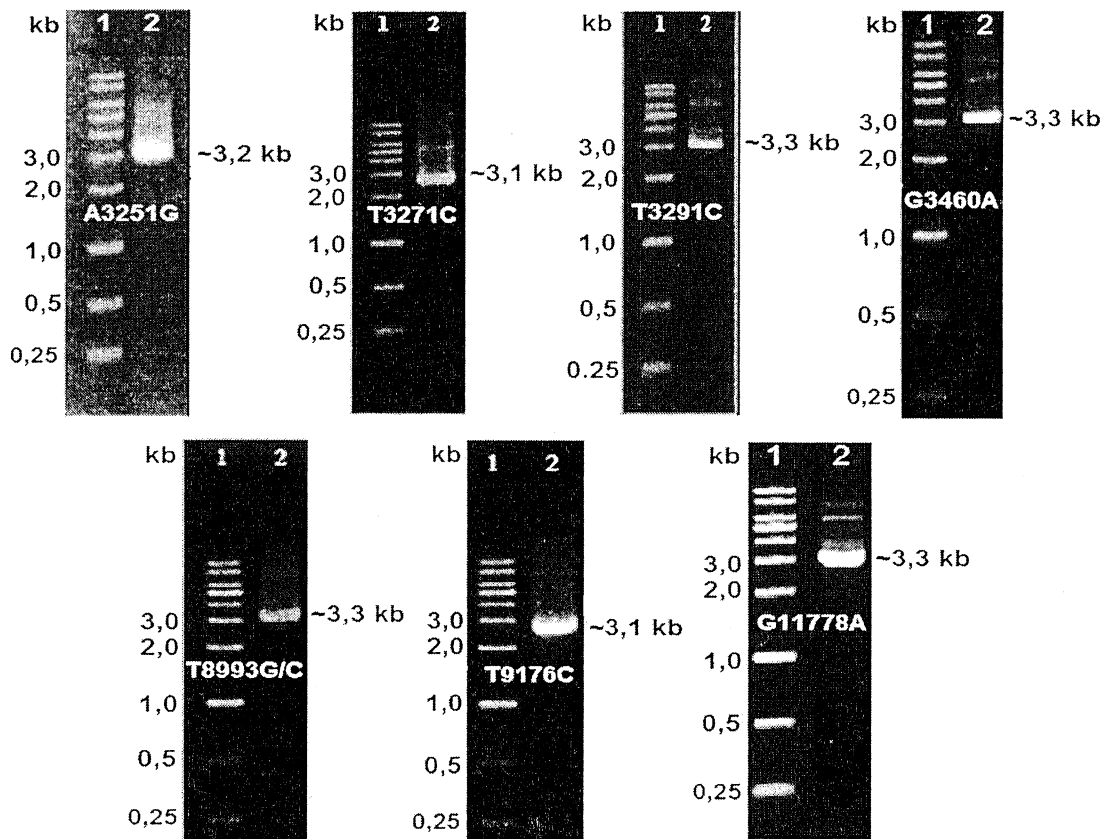
và

c) tạo các vectơ mang đột biến điểm bằng cách PCR với sản phẩm plasmid tái tổ hợp thu được ở mục a) và các đoạn mồi mang đột biến điểm ở mục b), sau đó, sản phẩm được khép vòng bằng T4 ligaza, tiếp đó, plasmid này được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α và chọn lọc trên môi trường LB đặc chứa 50 μ g/ml penicillin, sau đó thu vectơ chứa đột biến điểm nhân tạo A3251G, T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G và G11778A để làm mẫu chuẩn dùng để phát hiện đột biến điểm ở bệnh nhân nghi mắc bệnh ty thể.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước tạo chủng giống *E.coli* DH5 α chứa vectơ đột biến điểm nhân tạo A3251G, T3271C, T3291C, A3251G, G3460A, T8993G/C, T9176G và G11778A.



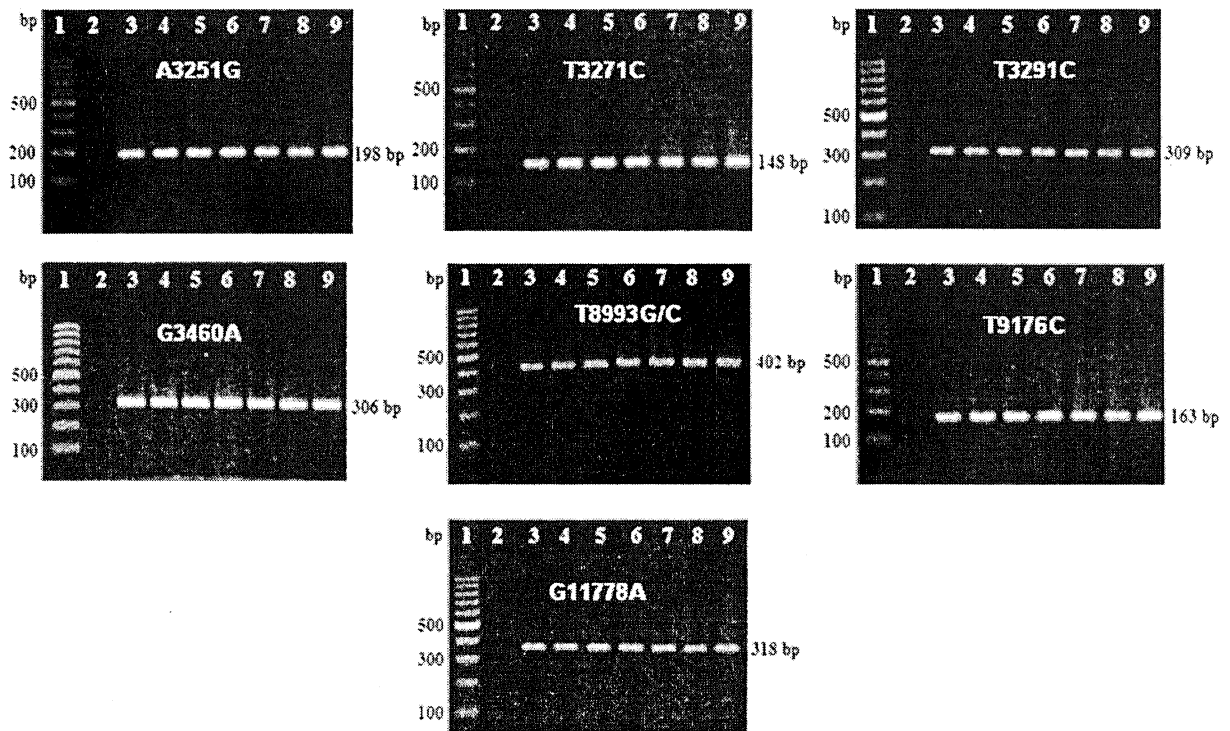
Hình 1



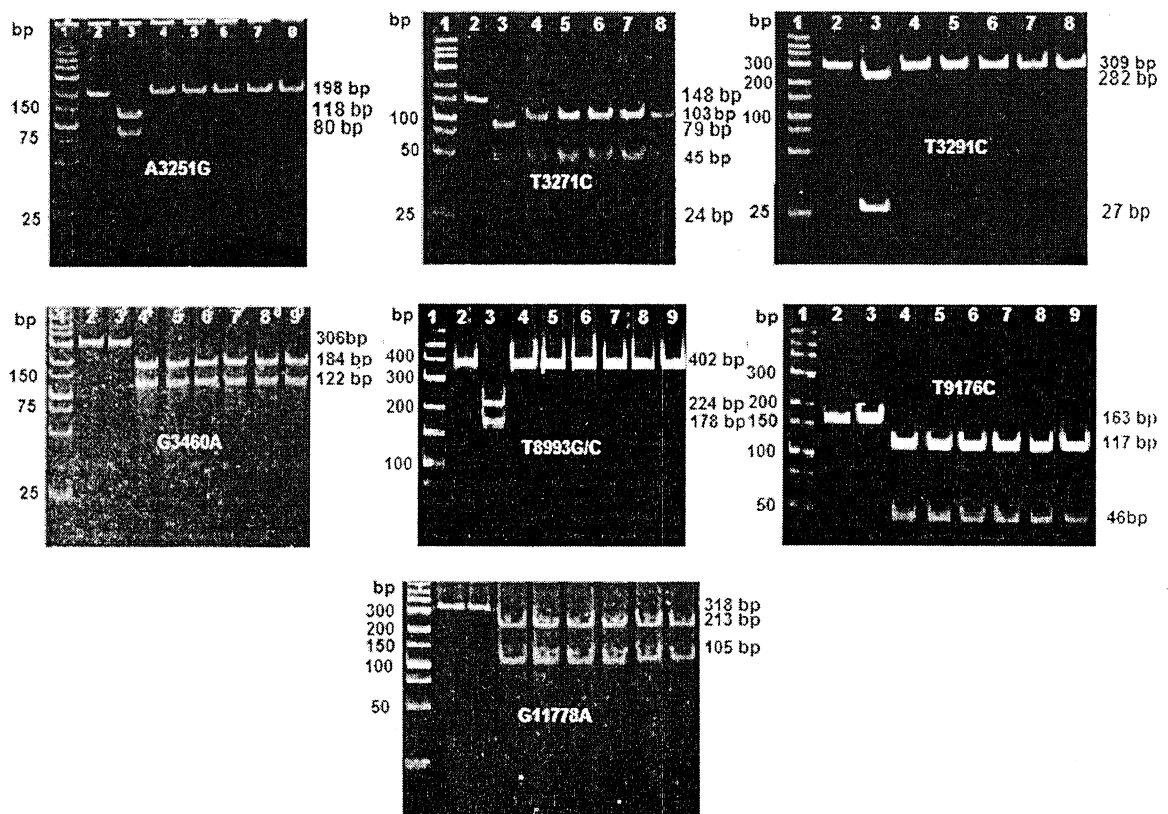
Hình 2



Hình 3.



Hình 4.



Hình 5.