



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

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

(11)



2-0002641

(51) **C12Q 1/68**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00124

(22) 16/03/2015

(67) 1-2015-00865

(45) 25/06/2021 399

(43) 27/07/2015 328A

(73) HỌC VIỆN QUÂN Y (VN)

Số 160 Phùng Hưng, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thái Sơn (VN); Đinh Thị Thu Hằng (VN); Nguyễn Văn An (VN).

(54) KIT PCR ĐA MỖI ĐỂ CHẨN ĐOÁN ĐỒNG THỜI VI KHUẨN THAN BACILLUS ANTHRACIS VÀ DỊCH HẠCH YERSINIA PESTIS VÀ PLASMIT TÁI TỔ HỢP DÙNG LÀM ĐỐI CHỨNG NỘI KIỂM TRONG KIT NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến kit PCR đa mẫu để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia pestis*, trong đó kit này bao gồm sáu cặp mẫu dùng để khuếch đại đồng thời bảy sản phẩm gồm ba gen đích là *vrrA*, *pagA* và *capA* của vi khuẩn than *Bacillus anthracis*, ba gen đích *ypj2088*, *pla* và *cafI* của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* và một gen đích *lef* của plasmid đối chứng nội kiểm. Kit theo giải pháp hữu ích giúp chẩn đoán nhanh, đồng thời vi khuẩn than và dịch hạch. Ngoài ra giải pháp hữu ích còn đề xuất đối chứng nội kiểm plasmid tái tổ hợp để làm đối chứng nội kiểm cho kit theo giải pháp hữu ích để xác minh kết quả của kit PCR đa mẫu, tránh được hiện tượng âm tính giả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến kit PCR đa môi chứa đối chứng nội kiểm (internal control - IC) plasmid tái tổ hợp dùng để xác định đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis*. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến plasmid tái tổ hợp dùng làm đối chứng nội kiểm trong kit PCR đa môi để xác minh kết quả của kit PCR đa môi theo giải pháp hữu ích.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trên thế giới, đã có một số kit PCR dùng để chẩn đoán vi khuẩn than *Bacillus anthracis* cũng như vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* như kit *Bacillus anthracis* PCR Detection Kit của hãng Takara Bio inc., LightMix Kit của hãng Roche (realtime PCR), PathAlert™ Detection Kit (Invitrogen). Các kit này chỉ phát hiện một loại plasmid độc lực trên mỗi vi khuẩn than cũng như vi khuẩn dịch hạch (thường là gen *pagA*, *pla*) nên không phát hiện được các trường hợp vi khuẩn than hay dịch hạch thiếu một trong các plasmid độc lực trên. Mặt khác, các kit thương mại thường đòi hỏi các trang thiết bị chuyên dụng, đồng bộ và đắt tiền.

Đối với vi khuẩn than trong tự nhiên, để chẩn đoán chính xác những chủng có độc lực, ngoài gen đặc trưng trên nhiễm sắc thể, cần phải chỉ ra được sự có mặt đầy đủ của hai plasmid độc lực là pXO1 và pXO2. Trong thực tế có những chủng vi khuẩn than *Bacillus anthracis* bị thiếu một trong hai plasmid trên nên khả năng gây bệnh thay đổi. Tương tự với vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*, hai plasmid liên quan đến tính độc là pPCP1 và pMT1 với các gen đặc trưng tương ứng. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, các plasmid này không bền, có thể bị mất đi trong tự nhiên hoặc trong quá trình nuôi cấy (Batra S. A. et al., 2013, A sensitive & specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei* & *Brucella* species, Indian Journal of Medical Research, Vol. 138, p. 111-116; Tomaso H. et al., 2003, Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes, FEMS Immunology and Medical Microbiology, Vol. 38, No. 2, p. 117-126). Do đó, các kit như giới thiệu ở

trên không đánh giá được đầy đủ tình trạng độc lực của vi khuẩn than và dịch hạch, và phải phụ thuộc vào thiết bị chuyên dụng đắt tiền, nhưng vẫn có thể bỏ sót chẩn đoán nếu chủng vi khuẩn thiếu plasmid chứa gen đích của bộ kit.

Do đó, để đáp ứng yêu cầu về an ninh, quốc phòng và khắc phục được tình trạng trên, cần có kit PCR tối ưu dùng để chẩn đoán nhanh, đồng thời hai tác nhân vi khuẩn than và dịch hạch.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến kit PCR đa môi để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia pestis*, và plasmid tái tổ hợp để làm đối chứng nội kiểm trong kit theo giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến kit PCR đa môi để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn *Bacillus anthracis* và vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia pestis*, trong đó kit này bao gồm:

a) các cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 3 và SEQ ID No. 4; SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6; SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 9 và SEQ ID No. 10; SEQ ID No. 11 và SEQ ID No. 12 để khuếch đại tương ứng các gen đích *vrroA*, *pagA* và *capA* của vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và các gen đích *ypa2088*, *pla* và *cafI* của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*;

b) thành phần để thực hiện phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzyme Taq ADN polymeraza và $MgCl_2$; và

c) plasmid tái tổ hợp chứa gen *lef* có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đối chứng nội kiểm với sản phẩm khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến plasmid tái tổ hợp chứa gen *lef* có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đối chứng nội kiểm với sản phẩm khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là ảnh điện di trên thạch agarosa 1,5% của sản phẩm PCR đa môi. Trong đó S1 là mẫu bệnh phẩm dương tính với vi khuẩn dịch hạch có độc lực; S2 là mẫu bệnh phẩm dương tính với vi khuẩn than có độc lực; S3 là mẫu bệnh phẩm dương tính đồng thời với cả vi khuẩn than và dịch hạch; S4 là mẫu bệnh phẩm âm tính; S5 là mẫu bệnh phẩm dương tính với vi khuẩn than không độc; ĐC(+) và ĐC(-) là đối chứng dương và đối chứng âm; M là thang chuẩn 100 bp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp.

Gen *vrpA* là gen đặc trưng trên nhiễm sắc thể mã hóa cho protein VrpA, thường được sử dụng trong chẩn đoán *Bacillus anthracis*. Gen này có chiều dài 444 cặp bazơ (base pair-bp) và có số truy cập trên ngân hàng gen là CP001215.

Gen *papA* là gen trên plasmit độc lực pXO1 đặc trưng cho *Bacillus anthracis* có độc lực, mã hóa cho kháng nguyên bảo vệ PA (protective antigen). Gen này có chiều dài 2295 bp và có số truy cập trên ngân hàng gen là CP007665.

Gen *capA* là gen trên plasmit độc lực pXO2 đặc trưng cho *Bacillus anthracis* có độc lực, mã hóa cho protein capA tham gia vào quá trình tạo vỏ. Gen này có chiều dài 1236 bp và có số truy cập trên ngân hàng gen là CP007664.

Gen *ypj2088* là gen đặc trưng trên nhiễm sắc thể mã hóa cho protein của enzym methyltransferaza đặc trưng cho vi khuẩn than *Yersinia pestis*. Gen này có chiều dài 645 bp và có số truy cập trên ngân hàng gen là CP002956.

Gen *pla* là gen nằm trên plasmit pPCP1, quyết định tính độc của *Yersinia pestis* bằng con đường lây truyền qua da do mã hóa cho protein plasminogen, có từ 150 đến 200 bản sao trong hệ gen của *Yersinia pestis*. Gen này có chiều dài 939 bp và có số truy cập trên ngân hàng gen là AL109969.

Gen *cafI* là gen trên plasmit pMT1, mã hóa kháng nguyên vỏ F1 (fraction 1) có tác dụng giúp cho *Yersinia pestis* không bị hấp thụ bởi đại thực bào. Gen này có chiều dài 513 bp và có số truy cập trên ngân hàng gen là AL117211.

Giải pháp hữu ích đề xuất kit PCR đa môi để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*, trong đó kit này bao gồm:

a) các cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 3 và SEQ ID No. 4; SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6; SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 9 và SEQ ID No. 10; SEQ ID No. 11 và SEQ ID No. 12 để khuếch đại tương ứng các gen đích *vrnA*, *pagA* và *capA* của vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và các gen đích *ypo2088*, *pla* và *cafI* của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*;

b) thành phần để thực hiện phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzym Taq ADN polymeraza và MgCl₂; và

c) plasmit tái tổ hợp chứa gen *lef* có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đối chứng nội kiểm với sản phẩm khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13.

Các cặp môi dùng để khuếch đại các gen đích *vrnA*, *pagA*, *capA*, *ypo2088*, *pla* và *cafI*, được thiết kế dựa trên trình tự của các gen đích này đã được công bố trên ngân hàng gen với các mã số tương ứng là *vrnA* GeneID: CP001215, *pagA* GeneID: CP007665, *capA* GeneID: CP007664, *ypo2088* GeneID: CP002956, *pla* GeneID: AL109969 và *cafI* GeneID: AL117211.

Phương pháp thiết kế cặp môi là đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực này, và có thể tìm thấy trong nhiều tài liệu (Untergrasser A. et al, 2012, Primer3 - new capabilities and interfaces, Nucleic Acids Research, Vol. 40, No. 15, e115; Koressaar T. et al, 2007, Enhancements and modifications of primer design program Primer3, Bioinformatics, Vol. 23, No. 10, p. 1289-1291). Theo giải pháp hữu ích, các tác giả đã lựa chọn những vùng có độ bảo thủ cao nhất trong sáu gen nêu trên để thiết kế môi. Vấn đề mấu chốt ở đây là thiết kế sáu cặp môi phù hợp cho phản ứng PCR đa môi phát hiện đồng thời vi khuẩn than và dịch hạch có độc lực trong tự nhiên. Sáu cặp môi này phải không được bắt cặp chéo lẫn nhau cũng như đảm bảo không cạnh tranh, ức chế lẫn nhau. Các tác giả đã thiết kế các cặp môi đều có chiều dài 20 bp và tỷ lệ phần trăm của nucleotit G và C khá tương đồng với nhau để đảm bảo nhiệt độ bắt cặp của các cặp môi này với gen đích cũng tương đương nhau, nhằm khuếch đại

cùng lúc nhiều gen đích trong cùng một điều kiện về nhiệt độ và các thành phần của phản ứng PCR đa môi.

Theo đó, các tác giả đã thiết kế được cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 222 bp của gen đích *vrpA*, cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 3 và SEQ ID No. 4 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 751 bp của gen đích *pagA* và cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 610 bp của gen đích *capA*, cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 8 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 103 bp của gen đích *ypo2088*, cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 9 và SEQ ID No. 10 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 438 bp của gen đích *pla* và cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 11 và SEQ ID No. 12 để khuếch đại đoạn ADN có chiều dài 271 bp của gen đích *cafI*. Kích thước của các đoạn gen đích được nhân bởi các cặp mồi nêu trên đủ để có thể phân biệt rõ ràng trên bản điện di thạch agarosa.

Gen đích	Trình tự mồi	Số trình tự
<i>vrpA</i> của vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	CTGTAAGCCC TGTCGTCGAA	SEQ ID No.1
	CCTCGCGCAC TTCTTTTTCT	SEQ ID No.2
<i>pagA</i> của vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	AAATGGAGCA CGGCTTCTGA	SEQ ID No.3
	AGCCTGTATC CACCCTCACT	SEQ ID No.4
<i>capA</i> của vi khuẩn <i>B. anthracis</i>	TGACGATGAC GATGGTTGGT	SEQ ID No.5
	GCTTCCTGTC TAGGACTCGG	SEQ ID No.6
<i>ypo2088</i> của vi khuẩn <i>Y. pestis</i>	GGATGAGATA ACGCGGGTGT	SEQ ID No.7
	AGAGAATCGT GATGCCGTCC	SEQ ID No.8
<i>pla</i> của vi khuẩn <i>Y. pestis</i>	CGGGATGCTG AGTGGAAGT	SEQ ID No.9
	ATTACCCGCA CTCCTTTCGG	SEQ ID No.10
<i>cafI</i> của vi khuẩn <i>Y. pestis</i>	CGCTTACTCT TGGCGGCTAT	SEQ ID No.11
	GCTGCAAGTT TACCGCCTTT	SEQ ID No.12

Cặp mồi dùng để khuếch đại đối chứng nội kiểm cũng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6, chỉ khác ở sản phẩm khuếch đại gen. Đối chứng nội kiểm là plasmit tái tổ hợp được thiết kế chứa gen *lef* với hai đầu gắn đoạn ADN nhận biết có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 thông qua quá trình tách dòng. Trình tự của gen *lef* đã được công bố trên ngân hàng gen với mã số là GeneID:

CP006743, đây là gen có nguồn gốc từ vi khuẩn than. Plasmid tái tổ hợp được sử dụng làm đối chứng nội kiểm được khuếch đại bởi cặp mồi mồi trên khuếch đại cho sản phẩm ADN với kích thước 1000 bp có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13 (phân biệt rõ ràng với kích thước của sáu gen đích chẩn đoán như trên khi điện di thạch agarosa). Chính nhờ chiến lược thiết kế này đã cho phép đối chứng nội kiểm sử dụng chung cặp mồi khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 mà không phải thiết kế bổ sung cặp mồi riêng của đối chứng nội kiểm. Đây là ưu điểm nổi bật của đối chứng nội kiểm theo kit của giải pháp hữu ích.

Việc sử dụng đối chứng nội kiểm (được bổ sung với lượng tối thiểu vừa đủ trong giai đoạn tách chiết ADN) của kit PCR đa mồi theo giải pháp hữu ích giúp kiểm soát được chất lượng của quá trình chẩn đoán và xác định được kết quả chẩn đoán là âm tính thật hay âm tính giả. Cụ thể, nếu các hóa chất và thao tác kỹ thuật của người thực hiện trong quá trình tách chiết ADN và PCR đảm bảo thì kết quả PCR luôn dương tính với đối chứng nội kiểm. Trong trường hợp kết quả PCR đối với đối chứng nội kiểm là âm tính, thì hóa chất hỏng hay quá trình thực hiện đã có sai sót, và kết quả chẩn đoán khi đó không có giá trị, quá trình chẩn đoán cần phải được thực hiện lại. Đồng thời, việc sử dụng đối chứng nội kiểm trong giai đoạn tách chiết ADN của kit theo giải pháp hữu ích ưu điểm hơn so với việc chỉ bổ sung vào giai đoạn sau (giai đoạn chạy PCR) như hầu hết các kit trên thị trường (chỉ kiểm soát được giai đoạn chạy PCR). Bởi chỉ khi đối chứng nội kiểm được sử dụng trong giai đoạn đầu tiên trong quy trình tách chiết ADN mới có thể kiểm soát được toàn bộ quá trình chẩn đoán.

Các hoá chất dùng cho phản ứng PCR gồm có dung dịch đệm PCR, các dNTP, enzym Taq ADN polymeraza, $MgCl_2$. Đây là các hoá chất thông dụng của phản ứng PCR, và là kiến thức thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, việc kết hợp sáu cặp mồi để khuếch đại đồng thời ba gen đích của vi khuẩn than, ba gen đích của vi khuẩn dịch hạch và một gen đích của đối chứng nội kiểm trong một ống nghiệm cho kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu 100% (kết quả kiểm định trên bộ mẫu chuẩn của Viện Kiểm định vacxin và sinh phẩm Y tế, Bộ Y tế) là ưu điểm đặc biệt của kit theo giải pháp hữu ích. Ngoài ra, việc thực hiện các phản ứng khuếch đại chỉ trong một ống nghiệm làm giảm giá thành xét nghiệm, rút ngắn thời gian trả lời kết quả. Để có được kit PCR đa mồi với đối chứng nội kiểm theo giải pháp hữu ích này, các tác giả tối ưu hóa phản ứng PCR đa mồi cho cả các gen đích này. Các

tác giả đã lần lượt thử các thành phần trong phản ứng PCR đa môi với các nồng độ khác nhau bao gồm dung dịch đệm PCR, nồng độ $MgCl_2$, nồng độ môi và nồng độ ADN khuôn. Đối với chu trình nhiệt cũng lần lượt thử với các nồng độ biến tính, gắn môi, kéo dài các chuỗi khác nhau dựa trên đặc điểm, thành phần môi, kích thước đoạn gen đích cần khuếch đại và dựa vào chu trình chuẩn của phản ứng PCR. Sau mỗi lần thực hiện phản ứng với mỗi nồng độ, thành phần tham gia phản ứng và với mỗi chu trình nhiệt khác nhau, kết quả sản phẩm PCR được lựa chọn là những băng đậm nét nhất, đặc hiệu đúng kích thước mong muốn và không có sản phẩm phụ. Các thông số về nồng độ của các thành phần tham gia phản ứng sẽ được lựa chọn cho các lần tiến hành phản ứng tiếp theo tương ứng với băng sản phẩm PCR rõ nét và đặc hiệu. Cụ thể, các thành phần tốt nhất để thực hiện phản ứng PCR đa môi cho cả sáu gen đích *vrnA*, *pagA*, *capA*, *ypo2088*, *pla*, *cafI* và đối chứng nội kiểm được các tác giả đề xuất trong Bảng 1 dưới đây sau quá trình nghiên cứu với trên 1000 phản ứng thử nghiệm.

Kit PCR đa môi theo giải pháp hữu ích được sử dụng để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* bằng cách bổ sung ADN của mẫu cần chẩn đoán (mẫu ADN này được chuẩn bị bằng kit tách chiết ADN tổng số thương mại bất kỳ) vào ống eppendorf đã chứa sẵn các thành phần của kit PCR đa môi với nồng độ và thể tích như được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Thành phần của phản ứng PCR đa môi

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μ l)
1	Môi có trình tự SEQ ID No. 1	0,6 μ M	0,75
2	Môi có trình tự SEQ ID No. 2	0,6 μ M	0,75
3	Môi có trình tự SEQ ID No. 3	0,6 μ M	0,75
4	Môi có trình tự SEQ ID No. 4	0,6 μ M	0,75
5	Môi có trình tự SEQ ID No. 5	0,64 μ M	0,8
6	Môi có trình tự SEQ ID No. 6	0,64 μ M	0,8
1	Môi có trình tự SEQ ID No. 7	0,1 μ M	0,25
2	Môi có trình tự SEQ ID No. 8	0,1 μ M	0,25
3	Môi có trình tự SEQ ID No. 9	0,1 μ M	0,25
4	Môi có trình tự SEQ ID No. 10	0,1 μ M	0,25
5	Môi có trình tự SEQ ID No. 11	0,1 μ M	0,25
6	Môi có trình tự SEQ ID No. 12	0,1 μ M	0,25

10	Dung dịch đệm	1,2 X	3
11	Các dNTP	0,25 mM	2,5
12	Enzym Taq ADN polymeraza	2,5 U	0,5
13	MgCl ₂	0,6 mM	0,6
14	ADN khuôn	10 ng/μl	5
Tổng thể tích		25μl	

Sau đó trộn nhẹ nhàng, đậy kín nắp ống eppendorf rồi tiến hành chạy PCR với chu trình nhiệt như được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR đa môi

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kì
1	Biến tính	94	5 phút	1
2	Biến tính	94	1 phút	32
3	Gắn mồi	56	45 giây	
4	Kéo dài chuỗi	72	50 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	1
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	

Các lưu ý khi tiến hành:

- Khu vực xử lý mẫu và trộn các thành phần để thực hiện phản ứng PCR phải được bố trí biệt lập và khử trùng bề mặt bằng dung dịch natri hypoclorua 0,5%, chiếu tia tử ngoại trước và sau các thao tác để tránh lây nhiễm chéo.

- Quá trình trộn các thành phần phải được thực hiện trên đá hoặc khay giữ lạnh, tiến hành phản ứng PCR ngay sau khi trộn.

Sản phẩm PCR thu được được điện di trên thạch agarosa 1,5%, nhuộm bằng EtBr 0,5μg/ml trong thời gian từ 15 đến 20 phút và chụp ảnh bằng ánh sáng tử ngoại.

Toàn bộ quá trình thực hiện chẩn đoán được thực hiện khoảng từ 4 đến 5 giờ.

Cách đọc kết quả điện di như sau:

Trường hợp 1: có 1 băng điện di kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp) và xuất hiện đồng thời cả 3 băng điện di có kích thước tương ứng với các

gen đích *vrnA* (222 bp), *pagA* (751 bp) và *capA* (610 bp). Mẫu này được xác định là dương tính với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* có độc lực.

Trường hợp 2: có 1 băng điện di kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp) và xuất hiện 1 hoặc 2 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *vrnA* (222 bp), *pagA* (751 bp) và *capA* (610 bp). Mẫu này được xác định là âm tính với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* có độc lực, hay đó là những mẫu dương tính với vi khuẩn than không đầy đủ độc lực.

Trường hợp 3: có 1 băng điện di kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp) và xuất hiện đồng thời cả 3 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *ypn2088* (103 bp), *pla* (483 bp) và *cafI* (271 bp). Mẫu này được xác định là dương tính với vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực.

Trường hợp 4: có 1 băng điện di kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp) và xuất hiện 1 hoặc 2 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *ypn2088* (103 bp), *pla* (483 bp) và *cafI* (271 bp). Mẫu này được xác định là âm tính với vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực hay đó là những mẫu dương tính với vi khuẩn dịch hạch không đầy đủ độc lực.

Trường hợp 5: có 1 băng điện di kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp) và xuất hiện đồng thời cả 6 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *vrnA* (222 bp), *pagA* (751 bp), *capA* (610 bp), *ypn2088* (103 bp), *pla* (483 bp) và *cafI* (271 bp). Mẫu này được xác định là dương tính đồng thời với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và *Yersinia pestis* có độc lực.

Trường hợp 6: có 1 băng điện di có kích thước tương ứng đối chứng nội kiểm (1000 bp) và không hoặc chỉ xuất hiện 1 băng có kích thước tương ứng với gen đích *vrnA* (222 bp). Mẫu này được xác định là âm tính với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực.

Trường hợp 7: không xuất hiện băng điện di có kích thước tương ứng với đối chứng nội kiểm (1000 bp). Kết quả này cho thấy hóa chất bị hỏng hoặc quá trình thao tác có sai sót và quá trình chẩn đoán cần phải được thực hiện lại.

Kit PCR đa môi theo giải pháp hữu ích được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Kit theo giải pháp hữu ích chứa sáu cặp mồi dùng để khuếch đại đồng thời ba gen đích *vrpA*, *pagA*, *capA* của vi khuẩn than; ba gen đích *ypa2088*, *pla* và *cafI* của vi khuẩn dịch hạch, do đó khắc phục được hiện tượng dương tính giả đối với trường hợp chủng vi khuẩn than *Bacillus anthracis* hay dịch hạch *Yersinia pestis* bị mất một trong các gen trên, làm giảm giá thành chẩn đoán bệnh so với việc phải thực hiện ba phản ứng riêng rẽ (trong chẩn đoán đơn lẻ từng tác nhân) hay việc phải thực hiện sáu phản ứng riêng rẽ (trong chẩn đoán đồng thời hai tác nhân) và rút ngắn thời gian chẩn đoán.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất plasmit tái tổ hợp chứa gen *lef* có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại sản phẩm khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13. Plasmit tái tổ hợp này được dùng làm đối chứng nội kiểm trong kit PCR đa mồi theo giải pháp hữu ích nêu trên.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Chẩn đoán vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis*

- ADN của 5 mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm vi khuẩn than và dịch hạch (mẫu bệnh phẩm số 1, 2, 3, 4 và mẫu bệnh phẩm số 5) được tách chiết theo quy trình của nhà sản xuất (ADN genome QIAGEN Minikit) sau khi bổ sung 5µl plasmit đối chứng nội kiểm (nồng độ 10^2 plasmit/µl) cùng mẫu bệnh phẩm. Sau đó các mẫu ADN này cùng ADN của vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* (đối chứng dương) và ADN của vi khuẩn than *Bacillus cereus* và *E. coli* (đối chứng âm) được bổ sung vào các ống eppendorf chứa hỗn hợp phản ứng PCR đa mồi với thể tích và nồng độ được nêu trong Bảng 1 nêu trên.

- Trộn nhẹ nhàng, đậy kín nắp ống eppendorf rồi chuyển ngay các ống này vào máy PCR và bắt đầu chương trình chạy với chu trình nhiệt như được nêu trong Bảng 2.

Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarosa 1,5%. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR đa mồi được thể hiện trên Hình 1.

- Ở đường chạy S1 của mẫu bệnh phẩm số 1, có 1 băng điện di có kích thước tương ứng của đối chứng nội kiểm và 3 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *ypa2088*, *pla* và *cafI*, giống như 3 băng điện di tương ứng trên đường chạy

của đối chứng dương (+). Mẫu này được kết luận là dương tính với vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực.

- Ở đường chạy S2 của mẫu bệnh phẩm số 2, có 1 băng điện di có kích thước tương ứng của đối chứng nội kiểm IC và 3 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *vrnA*, *pagA* và *capA*, giống như 3 băng điện di tương ứng trên đường chạy của đối chứng dương (+). Mẫu này được kết luận là dương tính với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* có độc lực.

- Ở đường chạy S3 của mẫu bệnh phẩm số 3, có 1 băng điện di có kích thước tương ứng của đối chứng nội kiểm IC và 6 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *ypa2088*, *pla*, *caf1*, *vrnA*, *pagA* và *capA* giống như đường chạy của đối chứng dương (+). Mẫu này được kết luận là dương tính đồng thời với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực.

- Ở đường chạy S4 của mẫu bệnh phẩm số 4, chỉ có 1 băng điện di có kích thước tương ứng của đối chứng nội kiểm IC giống băng điện di tương ứng trên đường chạy của đối chứng dương (-). Mẫu này được kết luận là âm tính đồng thời với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* có độc lực.

- Ở đường chạy S5 của mẫu bệnh phẩm số 5, có 1 băng điện di có kích thước tương ứng của đối chứng nội kiểm và trong các gen đích chỉ xuất hiện 2 băng điện di có kích thước tương ứng với các gen đích *vrnA* và *pagA* giống như 2 băng điện di tương ứng trên đường chạy của đối chứng dương (+). Mẫu S5 này không xuất hiện băng điện di có kích thước tương ứng với gen đích *capA* - như vậy có hiện tượng mất plasmid độc lực pXO2 - khiến chủng *Bacillus anthracis* này bị giảm độc lực. Mẫu này được kết luận là dương tính với vi khuẩn than *B. anthracis* không đầy đủ độc lực hay là âm tính với vi khuẩn than *Bacillus anthracis* có độc lực. Đây là ưu thế của kit PCR đa môi theo giải pháp hữu ích, có thể chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than và dịch hạch có độc lực, phân biệt với những chủng vi khuẩn than và dịch hạch không đầy đủ độc lực trong tự nhiên.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Kit theo giải pháp hữu ích chứa sáu cặp môi dùng để khuếch đại đồng thời ba gen đích *vrnA*, *pagA* và *capA* của vi khuẩn than *Bacillus anthracis*, ba gen đích *ypa2088*, *pla* và *caf1* của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis* và một gen đích đối chứng nội

kiểm, do đó khắc phục được hiện tượng dương tính giả đối với trường hợp chủng vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* không đầy đủ độc lực, làm giảm giá thành chẩn đoán bệnh so với việc phải thực hiện các phản ứng riêng rẽ và rút ngắn thời gian chẩn đoán bệnh. Giải pháp hữu ích còn cung cấp một plasmid đối chứng nội kiểm được khuếch đại đồng thời trong phản ứng PCR đa môi trên cho phép xác minh kết quả chẩn đoán.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit PCR đa mồi để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn gây bệnh than *Bacillus anthracis* và vi khuẩn gây bệnh dịch hạch *Yersinia pestis*, trong đó kit này bao gồm:

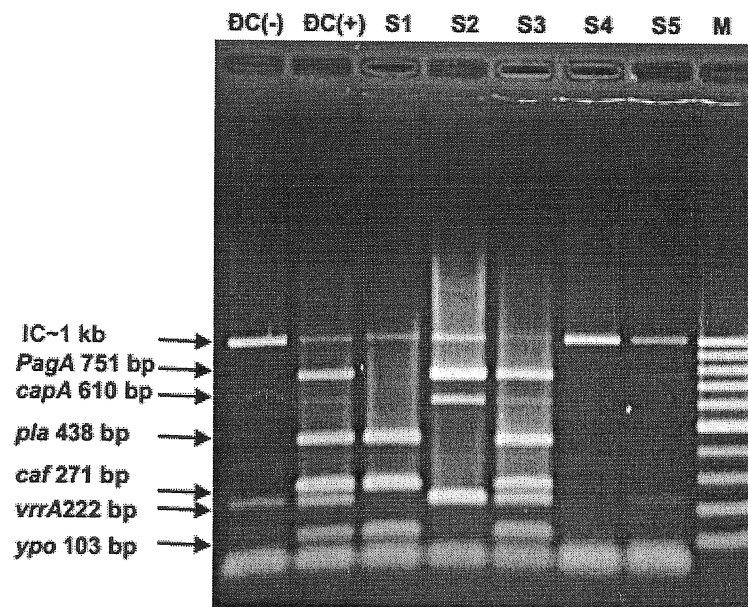
a) các cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 3 và SEQ ID No. 4; SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6; SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 9 và SEQ ID No. 10; SEQ ID No. 11 và SEQ ID No. 12 để khuếch đại tương ứng các gen đích *vrnA*, *pagA* và *capA* của vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và các gen đích *ypa2088*, *pla* và *cafI* của vi khuẩn dịch hạch *Yersinia pestis*;

b) thành phần để thực hiện phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm, các dNTP, enzym Taq ADN polymeraza và $MgCl_2$; và

c) plasmit tái tổ hợp chứa gen *lef* có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại đối chứng nội kiểm với sản phẩm khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13.

2. Plasmit tái tổ hợp chứa gen *lef* để làm đối chứng nội kiểm trong kit PCR đa mồi theo điểm 1, trong đó plasmit tái tổ hợp này có hai đầu chứa trình tự nhận biết của cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 6 để khuếch đại sản phẩm có trình tự nêu trong SEQ ID No. 13.

HÌNH 1



Hình 1. S1-5: mẫu bệnh phẩm xét nghiệm

ĐC(+), ĐC(-): đối chứng dương và đối chứng âm

M: Maker 100 bp (Thermo Scientific)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Học viện Quân y

<120> Kit PCR đa mồi để chẩn đoán đồng thời vi khuẩn than *Bacillus anthracis* và dịch hạch *Yersinia pestis* và plasmit tái tổ hợp dùng làm đối chứng nội kiểm trong kit này

<130>

<160> 13

<170>

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 1

ctgtaagccc tgtcgctcgaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 2

cctcgcgcac ttctttttct

20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 3

aaatggagca cggtttctga

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 4

agcctgtatc caccctcact

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 5

tgacgatgac gatggttggt

20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 6

gcttcctgtc taggactcgg

20

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 7

ggatgagata acgcgggtgt

20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 8

agagaatcgt gatgccgtcc

20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 9

cgggatgctg agtggaaagt

20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 10

attaccgca ctcctttcgg

20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 11

cgcttactct tggcggctat

20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<221> CDS

<220>

<400> 12

gctgcaagtt taccgccttt

20

<210> 13

<211> 1000

<212> ADN

<213> *Bacillus anthracis*

<221> CDS

<220>

<400> 13

gcttcctgtc taggactcgg tttattatcg tattcttccc ccagtgcggt atttactacg	60
acaagatcag cattaccttt tttaggatcc tatcttgcca gcatccggtg atctttaagt	120
tcttccaagg atagatttat ttcttggtcg ttaaatttat ccatgtaatt aaaagcttcc	180
ggtgcataaa gctgtaaaac atcacgatgc tgtggctcga tataatatgc aaaagctttc	240
gcaaatactt cttgtacctc attgctattt tgttccaaga attctacaga aaagtctgtg	300
ggatgttcct taagctgatt agtaaataaa agatcttgct catctgaatc agatgcattt	360
ttaatggtat ttaatacatc taaaaatttc tgatatggtt gattaatttt acttaaaata	420
tcccttgata atatcttacc tatttcataa taaacgttca gtgccttttc agtattttct	480
acataatctt ccgaagattg gattacaagt acgggttcat atccttcttt tgcataatac	540
taatgttcat gtaataaagc atctttccca taaatgtctt ttattttttt cttatcttca	600
gataatgctt ctaaagatat atgttttgta atatcaccat ccacaatata tatctttcct	660
ccaattgctt tatacatctc taaaacatca gatggtactt tctcaagtag cttttctgct	720
gcctctttca tatggttatt cgccaaattt aatactgtaa atccggcttc ttttactgcc	780
ttaactgttt cttcttttgc acttaagtga atattcttat ctgctttttg ataattcttt	840
ttatcttcta acaaaacagg atgttcgaaa ttcccactta cgtaatctga gttttttaaa	900
tatggcgaaa catgacgaaa aacataatct gtaccgtaac gattaacaat ctcttttacg	960
tgacgtccca tcataatgtc accaaccatc gtcacgtca	1000