



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0030041

(51)⁷ C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2016-03471

(22) 13/02/2015

(86) PCT/US2015/015939 13/02/2015

(87) WO 2015/126766 A1 27/08/2015

(30) 61/940,942 18/02/2014 US; 62/043,060 28/08/2014 US; 62/103,524 14/01/2015 US

(45) 25/11/2021 404

(43) 26/12/2016 345A

(73) ILLUMINA, INC. (US)

5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 (US)

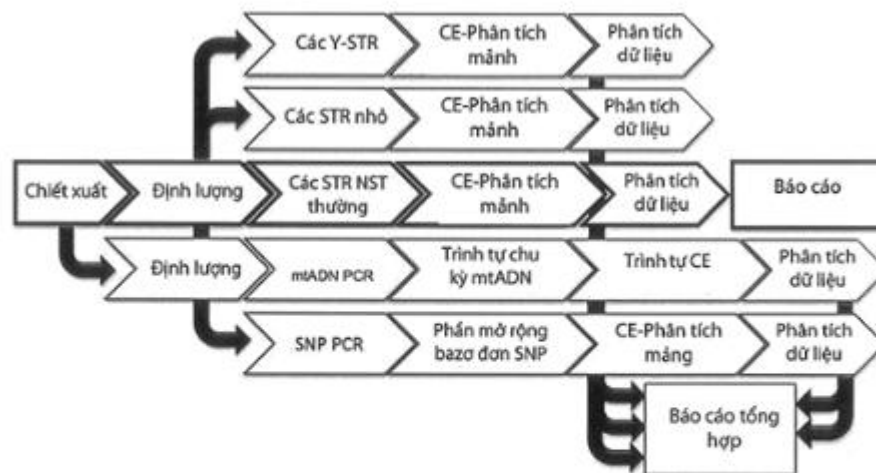
(72) STEPHENS, Kathryn, M. (US); HOLT, Cydne (US); DAVIS, Carey (US); JAGER, Anne (US); WALICHIEWICZ, Paulina (US); HAN, Yonmee (US); SILVA, David (US); SHEN, Min-ji, Richard (US); AMINI, Sasan (US); STEEMERS, Frank (US).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

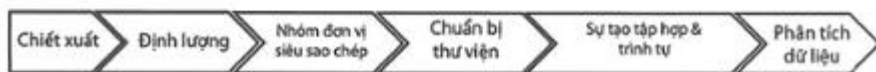
(54) CHẾ PHẨM ĐOẠN MÔI DỪNG CHO HỒ SƠ ADN

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp cấu tạo hồ sơ ADN bao gồm: tạo ra mẫu axit nucleic, khuếch đại mẫu axit nucleic bằng các đoạn môi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích bao gồm SNP và ít nhất một trình tự đích bao gồm trình tự lặp lại, và xác định các kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một trình tự lặp lại trong các sản phẩm khuếch đại, do đó cấu thành hồ sơ ADN của mẫu axit nucleic. Sáng chế còn đề xuất các đoạn môi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích ngắn và ít nhất một trình tự đích dài trong mẫu axit nucleic, trong đó khuếch đại mẫu axit nucleic sử dụng các đoạn môi trong phản ứng đơn dẫn đến sản phẩm khuếch đại ngắn và sản phẩm khuếch đại dài, trong đó mỗi trong số các đoạn môi bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể.

A



B



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và chế phẩm dùng cho hồ sơ ADN. Sáng chế còn đề xuất phương pháp khuếch đại trình tự đích của các cỡ biến dị trong phản ứng đơn, sau đó là trình tự tiếp theo của thư viện.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo lịch sử, việc sử dụng tập hợp con của các chất chỉ thị của bộ di truyền ở người đã được dùng để xác định nhận dạng cá nhân, hoặc dấu vân tay ADN hoặc hồ sơ. Các chất chỉ thị này bao gồm các đặc điểm hoặc vị trí của các trình tự lặp lại nối tiếp ngắn (STRs) và các trình tự lặp lại nối tiếp trung gian (ITRs) mà kết hợp hữu ích trong việc xác định một cá nhân so với cá nhân khác về mức độ di truyền học. Phân tích chất chỉ thị này đã trở thành tiêu chuẩn hóa trong việc phân tích ADN được tìm thấy tại hiện trường vụ án. Ví dụ, ở Mỹ số trình tự lặp lại này đã được kết hợp để tạo thành Hệ thống chỉ số kết hợp ADN (CODIS-Combined DNA Index System), mà dùng làm tiêu chuẩn phòng thí nghiệm cho hồ sơ ADN trong hình sự. Các nước tương tự khác đã chấp nhận hệ thống tiêu chuẩn dùng cho hồ sơ ADN. Các hệ thống này cũng được dùng để xác định huyết thống và các quan hệ huyết thống. Tuy nhiên, các hệ thống dòng đều dựa trên việc tách cỡ của các địa điểm lặp lại này trên hệ thống điện di và do đó được giới hạn đối với số địa điểm mà có thể được phân biệt trong hệ thống này. Ví dụ, một số hệ thống thương mại dòng dùng cho hồ sơ ADN để biệt hóa nhằm mục đích pháp y chỉ 16 chất chỉ thị do các giới hạn của phương pháp phát hiện điện di.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hệ thống và phương pháp mà không giới hạn nội dung và mang lại các đoạn thông tin di truyền khác nhau của cá thể để cùng tạo ra hồ sơ ADN toàn diện, hoàn thiện hơn của cá thể đó. Sáng chế còn đề xuất phương pháp và chế phẩm mà cho phép hồ sơ này của cá thể, do đó nâng cao các lĩnh vực của bộ gen cá nhân và pháp y.

Hiện nay, hồ sơ ADN sử dụng các chất chỉ thị sinh học được chọn để xác định tính đồng nhất của mẫu ADN. Ví dụ, phân tích thông thường nhất để xác định hồ sơ ADN là để xác định hồ sơ cho số trình tự lặp ngắn (STRs - short đoạn lặp nối tiếp) được tìm thấy trong bộ gen của sinh vật. Các phân tích bao gồm sự khuếch đại định ra các trình tự STR mà có thể dài đến 400bp mà có thể được biệt hóa bằng kích thước trên gel điện di hoặc bằng cách sử dụng các điện di mao quản (CE-capillary electrophoresis). Các điện di được sử dụng để phát hiện sự thay đổi kích thước do sự khác biệt về số các STR lặp lại ở vị trí đã cho và do đó chiều dài của các đơn vị siêu sao chép PCR, mà cho hệ thống CE nằm trong khoảng từ 50 đến 500bp. Để giúp khắc phục các giới hạn của các phương pháp luận biệt hóa kích thước (ví dụ, STRs của kích thước đơn vị siêu sao chép trùng không thể được biệt hóa), phương pháp hiện nay của hồ sơ ADN sử dụng các bộ khác nhau của mỗi được đánh dấu sao cho các đơn vị siêu sao chép mà trùng về kích thước có thể được đánh dấu bằng các thuốc nhuộm huỳnh quang khác nhau mà trên đó, về sự kích thích, phổ phát xạ khác nhau do đó cho phép các đơn vị siêu sao chép trùng lặp được phân biệt bằng cách sử dụng sự khác nhau về sự kích thích thuốc nhuộm và phổ phát xạ. Sử dụng việc đánh dấu được biệt hóa, các phương pháp hiện nay cho phép việc ghép 24 vị trí STR khác nhau sử dụng thuốc nhuộm có thể phát hiện khác nhau trong một lần chạy hồ sơ ADN.

Có nhiều giới hạn đối với các phương pháp luận hồ sơ ADN hiện nay. Như nêu trên, các hệ thống biệt hóa kích thước giới hạn số vị trí mà có thể được xác định riêng ở thời gian đã cho. Giới hạn khác của các phương pháp được xác định dùng cho hồ sơ ADN là ADN mà thường được phân tích bị phân hủy và vùng kích thước của một số đánh dấu không chứa ADN bị phân hủy, ví dụ các đơn vị siêu sao chép có thể lớn hơn kích thước của các mảnh ADN bị phân hủy. Với ADN bị phân hủy, các đơn vị siêu sao chép là 400bp được coi là rất dài và có thể dẫn đến mất sự khuếch đại của các vị trí dài hơn này. Khi các phân tích ADN khuếch đại các mẫu ADN bị phân hủy để nhận ra hồ sơ STR của chúng, ví dụ mẫu được tìm thấy ở hiện trường vụ án, chúng thường không thể phát hiện ra tất cả các vị trí dẫn đến hồ sơ từng phần mà có thể tạo sự trùng khớp người bị tình nghi trong hiện trường vụ án thành mẫu tội phạm khó hoặc không thể làm được. Khi mặc định đối với các mẫu này, người phân tích

ADN có một số lựa chọn và nếu mẫu bất kỳ còn sót lại, các xét nghiệm bổ sung cần phải được thực hiện để nhận ra các chất chỉ thị khác mà có thể đưa ra thông tin đối với sự tương đồng của cá thể, như phân tích dạng đa hình của nucleotit đơn (SNPs), STRs nhỏ, hoặc phân tích ADN ty thể (mtDNA - mitochondrial DNA). Tuy nhiên, mẫu quý phải được sử dụng trên mỗi xét nghiệm không chắc chắn thành công trong việc nhận dạng cá thể cuối cùng. Fig. 1A chứng minh các con đường tiềm năng khác nhau để nhận dạng ADN, tất cả các con đường này đều là quy trình làm việc phân biệt và yêu cầu các phân ước của các mẫu quý. Khi một hoặc nhiều quy trình làm việc đơn cần phải kết hợp và được lặp lại nhiều lần một cách tiềm năng sau đó việc xử lý kết quả không còn là đơn giản hoặc việc sử dụng hiệu quả mẫu quý.

Các phương án được mô tả theo sáng chế đề xuất các phương pháp, chế phẩm và hệ thống để xác định hồ sơ ADN của cá thể hoặc sinh vật bằng trình tự gen thế hệ mới (NGS - next generation sequencing) do đó đề xuất giải pháp đối với các vấn đề và giới hạn của phương pháp luận hiện nay cho hồ sơ ADN. Fig. 1B thể hiện quy trình làm việc ví dụ của các phương pháp được bộc lộ trong một phương án. Đề cập ở đây là các phương pháp và chế phẩm để kết hợp vô số các chất chỉ thị thích hợp trong pháp y thành một xét nghiệm bao gồm, nhưng không bị giới hạn đối với, các đoạn lặp lại nối tiếp (STRs), các đoạn lặp trung bình (ITRs), dạng đa hình của nucleotit đơn thông tin nhận dạng (iSNPs - identity informative single nucleotide polymorphisms) và dạng đa hình của nucleotit đơn thông tin nguồn gốc (aSNPs - ancestry informative single nucleotide polymorphisms) và dạng đa hình của nucleotit đơn thông tin kiểu hình (pSNPs - kiểu hình informative single nucleotide polymorphisms).

Sáng chế còn đề xuất các xét nghiệm mà khắc phục các giới hạn của phương pháp luận hiện nay cho hồ sơ ADN. Các phương án sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm dùng cho sự khuếch đại đa môi, sự chuẩn bị thư viện và trình tự kết hợp với STRs, ITRs, iSNPs, aSNPs, và pSNPs từ mẫu axit nucleic trong phản ứng đa môi đơn. Các phương pháp sáng chế phân tích các chất chỉ thị trong một xét nghiệm thực nghiệm có xử lý mẫu rất nhỏ, sử dụng lượng nhỏ mẫu ADN bao gồm ADN bị phân hủy. Một số phương án sáng chế được đề xuất có thể được dùng cho

ngân hàng dữ liệu hồ sơ ADN và/hoặc các hồ sơ ADN mà có thể được sử dụng trong vụ án hình sự. Một số phương án sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm PCR được phát triển đến độ nhạy đủ để phát hiện lượng dưới mức nanogram của ADN. Hơn nữa, các thông số thiết kế mỗi không theo quy ước cho phép PCR đa môi cao để nhận dạng STRs, ITRs và SNPs trong một phản ứng đa môi. Theo vụ án hình sự, các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế kết hợp các yếu tố nhận dạng phân tử duy nhất (UMIs - unique molecule identifiers) mà trợ giúp trong việc loại bỏ, ví dụ, PCR và các lỗi trình tự, vạch giả và tương tự từ các kết quả giải trình tự. *See Kivioja và cộng sự, Nat. Meth. 9, 72–74 (2012)*. Đồng thời, các kết quả từ các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây phù hợp đối với các cơ sở dữ liệu có sẵn.

Do đó, sáng chế đề cập đến các phương pháp cấu tạo hồ sơ ADN bao gồm: tạo ra mẫu axit nucleic, khuếch đại mẫu axit nucleic bằng các đoạn môi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích bao gồm dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP - single nucleotide polymorphism) và ít nhất một trình tự đích bao gồm đoạn lặp lại nối tiếp trong phản ứng đa môi để tạo ra các sản phẩm khuếch đại, và xác định các kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một đoạn lặp lại nối tiếp trong các sản phẩm khuếch đại, do đó cấu thành hồ sơ ADN của mẫu axit nucleic.

Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp bao gồm sự tạo ra thư viện axit nucleic từ các sản phẩm khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp bao gồm sự xác định các trình tự của thư viện axit nucleic. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic lấy từ người. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic lấy từ mẫu môi trường, thực vật, động vật không phải người, vi khuẩn, cổ khuẩn, nấm, hoặc virus. Theo một số phương án sáng chế, hồ sơ ADN được sử dụng cho một hoặc nhiều phép chẩn đoán bệnh hoặc tiên lượng, nhận dạng chỉ điểm sinh học ung thư, nhận dạng bất thường trong di truyền hoặc phân tích tính đa dạng trong di truyền. Theo một số phương án sáng chế, hồ sơ ADN được sử dụng cho một hoặc nhiều ngân hàng dữ liệu, pháp y, vụ án hình sự, huyết thống hoặc sự nhận dạng cá nhân. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất một SNP chỉ nguồn gốc hoặc đặc điểm kiểu hình (kiểu hình) của nguồn mẫu axit nucleic. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn môi có nhiệt độ nóng chảy thấp và/hoặc

có chiều dài ít nhất là 24 nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt nóng chảy thấp hơn 60°C. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có chiều dài ít nhất là 24nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có chiều dài nằm trong khoảng từ 24nucleotit đến 38nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi bao gồm trình tự nucleotit polyme đồng nhất. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR - polymerase chain reaction). Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic được khuếch đại trong bộ đệm khuếch đại có nồng độ muối mà tăng lên so với nồng độ muối của bộ đệm khuếch đại được sử dụng kết hợp với đoạn mỗi được thiết kế thông thường. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl, LiCl, NaCl, hoặc kết hợp các muối. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nằm trong khoảng từ 100nM đến 200nM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nhỏ hơn 150mM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại là 145nM. Theo một số phương án sáng chế, SNP là SNP tổ tiên, SNP kiểu hình, SNP tương đồng, hoặc kết hợp các SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 30 SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 50 SNP. Theo một số phương án sáng chế, đoạn lặp lại nối tiếp là các đoạn lặp ngắn (STR), các đoạn lặp trung bình (ITR), hoặc biến dị của các đoạn lặp lại. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 24 trình tự lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 60 trình tự lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic bao gồm từ 100pg đến 100 ng ADN. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic bao gồm từ 10pg đến 100pg ADN. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic bao gồm từ 5pg đến 10pg ADN. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic bao gồm ADN bộ gen. Theo một số phương án sáng chế, ADN bộ gen lấy từ mẫu trong pháp y. Theo một số phương án sáng chế, ADN bộ gen bao gồm ADN bị phân hủy Theo một số phương án sáng chế, ít nhất 50% kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một đoạn lặp lại nối

tiếp được xác định. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất 80% kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một đoạn lặp lại nối tiếp được xác định. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất 90% kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một đoạn lặp lại nối tiếp được xác định. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất 95% kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một đoạn lặp lại nối tiếp được xác định. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thể bao gồm thể mỗi, thể bắt giữ, thể giải trình tự, thể nhận diện phân tử đơn nhất, hoặc sự kết hợp của các thể. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thể bao gồm thể mỗi. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thể bao gồm thể nhận diện phân tử đơn nhất.

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất các phương pháp cấu tạo thư viện axit nucleic bao gồm: tạo ra mẫu axit nucleic, và khuếch đại mẫu axit nucleic bằng các đoạn mỗi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích bao gồm dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) và ít nhất một trình tự đích bao gồm trình tự lặp lại nối tiếp trong phản ứng đa mỗi để tạo ra các sản phẩm khuếch đại.

Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic không bị phân mảnh trước khi khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, các trình tự đích không được làm giàu trước khi khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất một SNP chỉ nguồn gốc hoặc đặc điểm kiểu hình (kiểu hình) của nguồn mẫu axit nucleic. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thể bao gồm thể mỗi, thể bắt giữ, thể giải trình tự, hoặc thể nhận diện phân tử đơn nhất, hoặc sự kết hợp của các thể. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp bao gồm sự khuếch đại các sản phẩm khuếch đại có các đoạn mỗi thứ hai. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi thứ hai bao gồm phần tương ứng với thể mỗi của các đoạn mỗi và một hoặc nhiều trình tự thể. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thể của các thể mỗi thứ hai bao gồm thể bắt giữ, hoặc thể giải trình tự, hoặc kết hợp các thể. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp bao gồm việc bổ sung protein bám vào các sợi đơn (SSB - single stranded-binding

protein) vào các sản phẩm khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic và/hoặc các sản phẩm khuếch đại được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic và/hoặc các sản phẩm khuếch đại được khuếch đại trong bộ đệm khuếch đại có nồng độ muối mà tăng lên so với nồng độ muối của bộ đệm khuếch đại được sử dụng kết hợp với đoạn môi được thiết kế thông thường. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl, LiCl, NaCl, hoặc kết hợp các muối. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nằm trong khoảng từ 100nM đến 200nM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nhỏ hơn 150mM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại là 145nM.

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất thư viện axit nucleic bao gồm các phân tử axit nucleic, trong đó các phân tử axit nucleic bao gồm ít nhất một trình tự lặp lại nối tiếp được chặn bởi cặp thứ nhất của trình tự thê và ít nhất một trình tự dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) được chặn bởi cặp thứ hai của trình tự thê. Các phương án sáng chế còn đề xuất thư viện axit nucleic được cấu thành sử dụng các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây. Theo một số phương án sáng chế, ít nhất một SNP chỉ nguồn gốc hoặc đặc điểm kiểu hình của nguồn của các phân tử axit nucleic.

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất các đoạn môi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích ngắn và ít nhất một trình tự đích dài trong mẫu axit nucleic, trong đó khuếch đại mẫu axit nucleic sử dụng các đoạn môi trong phản ứng đa môi đơn dẫn đến ít nhất một sản phẩm khuếch đại ngắn và ít nhất một sản phẩm khuếch đại dài, trong đó mỗi trong số các đoạn môi bao gồm một hoặc nhiều trình tự thê.

Theo một số phương án sáng chế, trình tự đích ngắn bao gồm dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) và trình tự đích dài bao gồm đoạn lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, một hoặc nhiều trình tự thê bao gồm thê môi, thê bắt giữ, thê giải trình tự, thê nhận diện phân tử đơn nhất, hoặc sự kết hợp của các thê. Theo một

số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt độ nóng chảy thấp và/hoặc có chiều dài ít nhất là 24 nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn 60°C. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có chiều dài ít nhất là 24nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có chiều dài nằm trong khoảng từ 24nucleotit đến 38nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi bao gồm trình tự nucleotit polyme đồng nhất. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR - polymerase chain reaction). Theo một số phương án sáng chế, SNP là SNP tổ tiên, SNP kiểu hình, SNP tương đồng, hoặc kết hợp các SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 30 SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 50 SNP. Theo một số phương án sáng chế, đoạn lặp lại nối tiếp là các đoạn lặp ngắn (STR), các đoạn lặp trung bình (ITR), hoặc biến dị của các đoạn lặp lại. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 24 trình tự lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn mỗi lai đặc hiệu với ít nhất 60 trình tự lặp lại nối tiếp.

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất bộ kit bao gồm ít nhất một phương tiện chứa, trong đó ít nhất một phương tiện chứa bao gồm các đoạn mỗi được nêu ở đây.

Theo một số phương án sáng chế, bộ kit bao gồm thuốc thử dùng cho phản ứng khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, thuốc thử là bộ đệm khuếch đại dùng cho phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại bao gồm nồng độ muối mà tăng lên so với nồng độ muối của bộ đệm khuếch đại được sử dụng kết hợp với đoạn mỗi được thiết kế thông thường. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl, LiCl, NaCl, hoặc kết hợp các muối. Theo một số phương án sáng chế, muối bao gồm KCl. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nằm trong khoảng từ 100nM đến 200nM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại nhỏ hơn

150mM. Theo một số phương án sáng chế, nồng độ KCl trong bộ đệm khuếch đại là 145mM.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A và Fig. 1B thể hiện sự khác biệt theo A) quy trình làm việc hiện nay của hồ sơ ADN so với B) quy trình làm việc của một phương án ví dụ theo mô tả của sáng chế.

Fig. 2 thể hiện một phương án ví dụ của phương pháp tạo ra thư viện hữu ích dùng cho hồ sơ ADN.

Fig.3 thể hiện một phương án ví dụ khác của phương pháp tạo ra thư viện hữu ích dùng cho hồ sơ ADN.

Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C và Fig. 4D là đồ thị minh họa các kết quả điện di đồ mà khi các cặp môi được thiết kế bằng các phương pháp truyền thống và quy trình và giới hạn thiết kế môi PCR được thiết lập sau đây như thế nào có thể tạo ra sự khuếch đại không đặc hiệu của các phân đích bộ gen và giảm phát hiện các đơn vị siêu sao chép mong muốn khi kết hợp bằng các đoạn môi được thiết kế bằng các phương pháp theo sáng chế sau đây; A) 10 cặp môi được thiết kế bằng phương pháp theo sáng chế hướng vào vị trí SNP, B) và D) 10 môi kết hợp với cặp môi bổ sung được thiết kế bằng các phương pháp truyền thống chứng tỏ rằng cặp môi bổ sung can thiệp vào 10 cặp môi trong quá trình khuếch đại, và C) 10 cặp môi kết hợp với cặp môi bổ sung, trong đó cặp môi bổ sung cũng được thiết kế bằng phương pháp theo sáng chế sau đây dẫn đến sự khuếch đại thành công của tất cả SNPs đích. Trục X là kích cỡ của các mảnh thư viện (bp) và trục Y là các đơn vị huỳnh quang của (FU) của các pic được khuếch đại của các mảnh khuếch đại.

Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 5C, Fig. 5D và Fig. 5E là các biểu đồ cột thể hiện các kết quả ví dụ đối với thử nghiệm quy trình làm việc được minh họa trên Fig. 2, mà được sử dụng để nhận dạng nhóm STRs 56 và hỗn hợp SNPs thông tin tương đồng 75 (iSNPs), SNPs thông tin nguồn gốc (aSNPs) và SNPs thông tin kiểu hình (pSNPs) theo sự khuếch đại đa môi và phản ứng giải trình tự từ mẫu. Báo cáo các kết quả

được lặp lại chứng tỏ rằng sự khuếch đại và trình tự thành công của vị trí STR từ nhóm; A) biểu đồ cột chứng tỏ rằng sự cân bằng nội vị trí cho 25 STRs dị hợp tử của nhóm, B) biểu đồ cột chứng tỏ rằng vạch giả thấp dùng cho đa số vị trí STR 56, C) biểu đồ cột chứng tỏ rằng độ bao phủ trình tự cho vị trí STR, D) biểu đồ cột chứng tỏ rằng độ bao phủ trình tự cho SNPs, và E) biểu đồ cột chứng tỏ rằng cân bằng đối với các SNP dị hợp tử 22 từ nhóm. Thanh lỗi dưới chỉ trị số tối thiểu, thanh lỗi trên chỉ trị số tối đa, cột dưới báo bách phân 25 và cột trên báo bách phân 75 có nghĩa là phần giao giữa cột dưới và cột trên.

Fig. 6 thể hiện chuỗi biểu đồ dạng cột thể hiện các sơ đồ vị trí STR ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 5. Các sơ đồ thể hiện số lần đếm alen khác nhau của STRs trong nhóm của Fig. 5.

Fig. 7A, Fig. 7B, Fig. 7C, Fig. 7D và Fig. 7E là các biểu đồ cột thể hiện các kết quả ví dụ đối với thử nghiệm quy trình làm việc được minh họa trên Fig.3, mà được sử dụng để nhận dạng nhóm STRs 26 và hỗn hợp iSNPs 94, aSNPs và pSNPs trong sự khuếch tán đa môi và phản ứng giải trình tự từ mẫu. Báo cáo các kết quả được lặp lại chứng tỏ rằng sự khuếch đại và trình tự thành công của STRs từ tám; A) biểu đồ cột chứng tỏ rằng sự cân bằng nội cho STRs dị hợp tử 21 của tám, B) biểu đồ cột chứng tỏ rằng vạch giả thấp dùng cho vị trí STR 26 (39 trong 47 alen của vị trí 26 thể hiện không vạch giả), C) biểu đồ cột chứng tỏ rằng độ bao phủ trình tự cho vị trí STR (đọc các số được chuẩn hóa sử dụng UMIs), D) biểu đồ cột chứng tỏ rằng độ bao phủ trình tự cho SNPs và E) biểu đồ cột chứng tỏ rằng cân bằng đối với các SNP dị hợp tử 21 từ tám. Thanh lỗi dưới chỉ trị số tối thiểu, thanh lỗi trên chỉ trị số tối đa, cột dưới báo bách phân 25 và cột trên báo bách phân 75 có nghĩa là phần giao giữa cột dưới và cột trên.

Fig. 8 thể hiện chuỗi biểu đồ dạng cột thể hiện các sơ đồ vị trí STR ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 7. Các sơ đồ thể hiện số lần đếm alen khác nhau của STRs trong nhóm của Fig. 7.

Fig. 9 thể hiện biểu đồ dạng cột của các mẫu được phân tích mà không có UMIs, và có UMIs. Nhóm bên trái cho mỗi bộ biểu diễn các mẫu được phân tích mà

không có UMIs và nhóm bên phải cho mỗi bộ biểu diễn các mẫu được phân tích mà có UMIs. Trục X chỉ số lặp lại của STR và trục Y chỉ số đếm của từng alen. Các dòng báo lỗi nằm trong các cột tách lỗi trình tự (phần cột trên) từ trình tự đúng (phần cột dưới) nằm trong trình tự STR.

Fig. 10A và Fig. 10B thể hiện các kết quả ví dụ từ thử nghiệm mà tỷ lệ ADN của nữ: nam là 90:10. A) tập hợp con các kết quả số lần đếm vị trí STR đối với vị trí STR khi sử dụng phương pháp hồ sơ ADN điện di mao quản hiện nay, và B) các kết quả số lần đếm vị trí STR riêng đối với từng vị trí STR khi sử dụng các phương pháp theo sáng chế. Cả phương pháp CE và phương pháp theo sáng chế đã phát hiện mức nhiễm bản ADN ở nam thấp.

Fig. 11 thể hiện biểu đồ dạng cột mà thể hiện vị trí STR đặc hiệu với nhiễm sắc thể Y được phát hiện trong thử nghiệm của Fig. 9, còn chứng tỏ rằng sáng chế có thể phát hiện ADN ở nam nhiễm bản và vị trí STR đặc hiệu từ ADN ở nam mà trong đó hai thử nghiệm cần phải thực hiện với các phương pháp luận CE hiện nay để thực hiện như vậy.

Fig. 12 là bảng mà thể hiện các kết quả giải trình tự mức cao theo ví dụ từ thử nghiệm sử dụng 12 cá thể mẫu và cá thể tham chiếu, chứng tỏ bao gồm các số lần đếm STR và SNP giữa hai sao chép.

Fig. 13 là bảng mà thể hiện các thống kê quần thể theo ví dụ từ thử nghiệm thể hiện trên Fig. 12.

Fig. 14 là bảng thể hiện các dự đoán kiểu hình theo ví dụ dựa trên kiểu gen pSNPs từ thử nghiệm thể hiện trên Fig. 12.

Fig. 15 là biểu đồ thể hiện sự sắp xếp nguồn gốc theo ví dụ dựa trên kiểu gen aSNPs từ thử nghiệm thể hiện trên Fig. 12.

Fig. 16A, Fig. 16B, Fig. 16C, Fig. 16D và Fig. 16E là biểu đồ dạng cột thể hiện các sơ đồ vị trí STR theo ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 17A và Fig. 17B là biểu đồ dạng cột thể hiện các sơ đồ SNP theo ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 18A và Fig. 18B thể hiện biểu đồ cột thể hiện sự cân bằng nội của vị trí STR và SNP theo ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 19A và Fig. 19B là biểu đồ thể hiện các phân tích vạch giả của vị trí STR theo ví dụ từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 20 là bảng thể hiện các dị hợp tử cùng kích thước ở vị trí STR từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 21 là sơ đồ khối mà thể hiện sơ đồ di truyền theo ví dụ dựa trên các biến dị với STR D8S1179 từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 22 là sơ đồ khối mà thể hiện sơ đồ di truyền theo ví dụ dựa trên các biến dị với STR D13S317 từ thử nghiệm của Fig. 12.

Fig. 23 là bảng mà thể hiện các kết quả kiểu gen theo ví dụ sử dụng ADN bị phân hủy.

Fig. 24A và Fig. 24B thể hiện các kết quả kiểu gen STR theo ví dụ và sự cân bằng trong ở các đầu vào ADN khác nhau.

Fig. 25A và Fig. 25B thể hiện các kết quả kiểu gen SNP theo ví dụ và sự cân bằng trong ở các đầu vào ADN khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Tất cả các patent, các đơn sáng chế, các đơn sáng chế được công bố và các công bố đơn khác được đề cập ở đây được kết hợp bằng cách viện dẫn đến các tài liệu viện dẫn và toàn bộ sáng chế. Nếu thuật ngữ hoặc cụm từ được sử dụng ở đây theo cách đó là trái hoặc không phù hợp với định nghĩa được thiết lập trước trong các patent, đơn sáng chế, đơn sáng chế được công bố và các công bố đơn khác mà được

kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn, việc sử dụng ở đây chiếm ưu thế so với định nghĩa đó là được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Như được sử dụng ở đây, các mạo từ số ít "a", "an", và "the" bao gồm các viện dẫn trừ khi được chỉ ra khác, rõ ràng hoặc theo ngữ cảnh. Ví dụ, "a" dime bao gồm một hoặc nhiều dime, trừ khi được chỉ ra khác, rõ ràng hoặc theo ngữ cảnh.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hồ sơ ADN", "dấu vân tay ADN", và "hồ sơ gen" được sử dụng có thể hoán đổi nhau được gọi là các biến dị alen trong bộ vị trí đa hình, như đoạn lặp lại nối tiếp, dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP), v.v... Hồ sơ ADN hữu ích trong pháp y để nhận dạng cá thể dựa trên mẫu axit nucleic. Hồ sơ ADN như được sử dụng ở đây còn có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác, như chẩn đoán và tiên lượng các bệnh bao gồm ung thư, nhận dạng chỉ điểm sinh học ung thư, phân tích sự di truyền, phân tích tính đa dạng trong di truyền, nhận dạng bất thường trong di truyền, ngân hàng dữ liệu, pháp y, vụ án hình sự, huyết thống, sự nhận dạng cá nhân, v.v...

Thuật ngữ "polynucleotit", "oligonucleotit", "axit nucleic" và "phân tử axit nucleic" được sử dụng có thể hoán đổi nhau được gọi là dạng polyme hóa của nucleotit có chiều dài bất kỳ, và có thể bao gồm ribonucleotit, deoxyribonucleotit, dạng tương tự, hoặc các hỗn hợp tương tự. Thuật ngữ này chỉ đề cập đến cấu trúc sơ cấp của phân tử. Do đó, thuật ngữ bao gồm axit deoxyribonucleic sợi ba, đôi và đơn ("ADN"), cũng như axit ribonucleic sợi ba, đôi và đơn ("ARN").

Như được sử dụng ở đây, "sự tương đồng trình tự" hoặc "sự tương đồng" hoặc "tính đồng nhất" theo ngữ cảnh của hai trình tự nucleotit bao gồm tham chiếu đến gốc của hai trình tự mà giống nhau khi mà được sắp xếp thẳng hàng tương ứng tối đa ở cửa sổ so sánh cụ thể. Phần trình tự nucleotit trong cửa sổ so sánh có thể bao gồm các phần thêm đoạn hoặc đứt đoạn (ví dụ, các khe hở) so với trình tự tham chiếu để sắp xếp thẳng hàng tối ưu của hai trình tự. Tỷ lệ phần trăm được tính bằng cách xác định số vị trí mà ở gốc bazơ của axit nucleic tương đồng xảy ra ở cả hai trình tự để tạo ra số vị trí bất cặp, mà chia số vị trí bất cặp với tổng số vị trí trong ô so sánh và nhân kết quả với 100 để tạo ra tỷ lệ phần trăm của sự tương đồng về trình tự.

Như được sử dụng ở đây, "về cơ bản là sự bổ sung hoặc về cơ bản là sự bắt cặp" có nghĩa là hai trình tự axit nucleic có ít nhất 90% về tính tương đồng trình tự. Tốt hơn là, trình tự axit nucleic có ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% về tính tương đồng trình tự. Ngoài ra, "về cơ bản là sự bổ sung hoặc về cơ bản là sự bắt cặp" có nghĩa là hai trình tự axit nucleic có thể lai dưới (các) điều kiện chính xác cao.

Được hiểu rằng các khía cạnh và phương án theo sáng chế được mô tả ở đây bao gồm "bao gồm" và/hoặc "bao gồm chủ yếu" các khía cạnh và phương án.

Mặt khác, hiệu quả và dấu hiệu kỹ thuật theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ các đặc điểm kỹ thuật sau đây kết hợp với các hình vẽ đi kèm.

Các phương pháp cấu thành hồ sơ ADN.

Phương pháp luận được lập để xác định hồ sơ ADN được giới hạn bằng số phương pháp. Ví dụ, các phương pháp hiện nay phát hiện sự thay đổi kích cỡ của vị trí khuếch đại mà phân biệt do thay đổi chiều dài của trình tự lặp lại nối tiếp được tìm thấy trong mẫu ADN. Để nhận các khuếch đại STR để nhìn thấy, các khuếch đại phải được thiết kế để cách các kích cỡ đơn vị siêu sao chếp khác nhau nằm trong các giới hạn kích cỡ riêng của hệ thống điện di, mà đối với CE nằm trong khoảng từ 50 đến 500bp. Như vậy, chỉ số trình tự lặp lại được giới hạn có thể được nhìn thấy trong một xét nghiệm. Ví dụ, bộ kit khuếch đại PCR GLOBALFILER (APPLIED BIOSYSTEMS) được cho là có thể biệt hóa vị trí STR 24 bằng cách sử dụng 6 thuốc nhuộm khác nhau. Hơn nữa, các phương pháp này có vấn đề khi mẫu ADN bị phân hủy thường với các mẫu ADN từ hiện trường vụ án, sao cho các sản phẩm khuếch đại lâu hơn không thể dẫn đến hồ sơ ADN không đầy đủ. Các phương pháp hiện nay cũng thường không đủ nhạy để phát hiện lượng nhỏ ADN nhiễm bẩn vì vậy mẫu được trộn có thể không được phát hiện và không được báo cáo, mà có thể có tính quyết định đối với các vụ án hình sự. Như vậy, các phương pháp hiện nay có thể dẫn đến các kết quả không đầy đủ mà dẫn đến các kết quả không xác định, mà có thể làm bất lợi cho hồ sơ ADN.

Ngoài ra, các phần đích hiện nay không bao gồm thông tin về nguồn gốc của mẫu, các đặc điểm kiểu hình như có thể có màu mắt và thông tin mẫu cá thể khác. Một số phương pháp luận giải trình tự đã được thực nghiệm bao gồm cả sự phát hiện STR và SNP. Ví dụ, đã có nỗ lực tạo ra thư viện sau đó làm giàu tùy ý đối với các STRs và SNPs, tuy nhiên không phải tất cả các STR được thực hiện hoàn toàn bằng các phương pháp tạo ra thư viện mà thường bao gồm việc cắt mẫu mà có thể phá hủy trình tự đích. Hơn nữa, các phương pháp thiết kế mồi và các quy trình được thiết lập có thể tạo ra các bộ mồi để khuếch đại các trình tự dài (ví dụ, các STR) hoặc các trình tự ngắn (ví dụ, các SNP), nhưng sự kết hợp của các hai trong một phản ứng chưa đạt được yêu cầu.

Sáng chế mô tả các giải pháp đối với các vấn đề và giới hạn của hệ thống hồ sơ ADN hiện nay. Các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây sau đó là sự kết hợp của các STR và SNP vào một xét nghiệm sử dụng PCR để khuếch đại các đích và tạo ra thư viện cho trình tự. Trong khi phát triển các xét nghiệm sáng chế, bất ngờ phát hiện ra rằng, ví dụ, khi dùng thiết kế mồi khác thường và không theo quy ước, cả STR và SNP có thể được khuếch đại trong một phản ứng mà cho phép trình tự của tất cả vị trí đích được xác định. Ngạc nhiên là, khi thiết kế các đoạn mồi khuếch đại sử dụng các thông số trái với học thuyết hiện nay quanh thiết kế mồi, các đoạn mồi được tạo ra mà cho phép các vùng STR dài hơn được khuếch đại và các vùng SNP ngắn được khuếch đại theo ít hoặc nhiều cách cân bằng do đó cho phép cả STR và SNP được khuếch đại đa mồi với nhau.

Các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây để xác định hồ sơ ADN của sinh vật có thể được sử dụng bất cứ khi nào bộ kích cỡ đơn vị siêu sao chép khác nhau mong muốn từ một phản ứng khuếch đại bên ngoài hồ sơ ADN. Ví dụ, nếu các phần đích đang đề cập đối với PCR bao gồm cả vùng gen lớn và vùng SNP ngắn mà có thể dẫn đến các khuếch đại mà lần lượt thay đổi kích cỡ từ một trăm đến một nghìn cặp gốc so với các đơn vị siêu sao chép nhỏ hơn 100 cặp gốc, sau đó các phương pháp và các chế phẩm được nêu ở đây có thể cho phép việc khuếch đại đồng thời thành công của gen và các đích SNP mà không thể thực hiện các phương pháp được nêu. Hơn nữa, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có thể áp dụng

đối với sinh vật, ví dụ người, bộ linh trưởng không phải là người, các động vật, thực vật, virus, vi khuẩn, nấm và tương tự. Vì vậy, các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế không chỉ hữu ích đối với hồ sơ ADN (ví dụ, pháp y, huyết thống, sự nhận dạng cá thể, v.v...) và người như bộ gen đích, mà còn có thể được sử dụng đối với các đích khác như ung thư và các chất chỉ thị bệnh, chất chỉ thị dị thường bộ gen và/hoặc khi bộ gen đích không phải là gốc ở người.

Do đó, các phương án được nêu ở đây đề xuất phương pháp cấu tạo hồ sơ ADN bao gồm: tạo ra mẫu axit nucleic, khuếch đại mẫu axit nucleic bằng các đoạn mồi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích bao gồm dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) và ít nhất một trình tự đích bao gồm đoạn lặp lại nối tiếp, và xác định các kiểu gen của ít nhất một SNP và ít nhất một trình tự lặp lại trong các sản phẩm khuếch đại, do đó cấu thành hồ sơ ADN của mẫu axit nucleic.

Được đánh giá bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đó là các kỹ thuật phù hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong việc xác định các kiểu gen của các trình tự đích bao gồm, nhưng không bị giới hạn đối với, lai gốc sắp xếp, trình tự, hoặc tương tự. Do đó, theo một số phương án sáng chế, các phương pháp được nêu ở đây có thể bao gồm việc tạo ra thư viện axit nucleic, như thư viện trình tự, từ các sản phẩm khuếch đại, và xác định các trình tự của thư viện axit nucleic.

Theo một số phương án sáng chế, sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm dùng cho hồ sơ ADN mà bao gồm việc nhận dạng đồng thời các STR và iSNP, ví dụ để sử dụng trong quần thể hoặc ngân hàng dữ liệu cá nhân. Theo các ngân hàng dữ liệu này, dữ liệu cá nhân không cần thiết phải là các cá thể thường biết đến. Tuy nhiên, nếu thông tin bổ sung là mong muốn sau đó các đích thông tin bổ sung có thể được bổ sung cho sự nhận dạng đồng thời. Các đoạn lặp lại ngắn được biết đến tốt trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm các trình tự di hoặc tri nucleotit lặp lại. Các đoạn lặp trung bình điển hình được coi là các trình tự lặp lại nằm trong khoảng từ 4 đến 7 trình tự nucleotit. Các SNP được dùng ở đây có thể là dạng bất kỳ mà có thể đưa các trực quan vào các đặc tính vật lý của người. Các SNP được minh họa bằng ví dụ ở

đây là các SNP mà tạo ra các thông tin cho nguồn gốc hoặc các tính trạng di truyền (aSNP) và các SNP mà tạo ra các thông tin cho các đặc điểm kiểu hình (các SNP thông tin kiểu hình). Theo phương pháp được mô tả ở đây, xét nghiệm hồ sơ ADN có thể bao gồm số SNP bất kỳ kết hợp với xác định vị trí STR và ITR.

Ví dụ, sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm bổ sung mà, bao gồm cùng với các STR và iSNP, các đích bổ sung. Nếu nhiều thông tin về các thể được mong muốn, ví dụ khi mẫu theo các thể chưa biết hoặc nhóm cá thể khi có thể theo trường hợp đối với vụ án hình sự, các chất chỉ thị thông tin khác có thể được bổ sung vào STR và các iSNP, như các SNP liên quan đến nguồn gốc (các aSNP) và SNP liên quan đến các biến dị kiểu hình (SNP thông tin kiểu hình). Thông tin bổ sung có thể sau đó được sử dụng để hỗ trợ các điều tra viên, ví dụ bằng cách cung cấp trực quan vào tính trạng di truyền của các thể chưa biết, màu mắt, màu tóc, và tương tự. Vì vậy, ngoài tất cả thông tin được kết hợp có thể tạo ra hồ sơ ADN hoàn thiện hơn của các thể mà trước đó không biết đến sử dụng các phương pháp hiện tại của hồ sơ ADN.

Các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây được thiết kế để đủ độ nhạy phát hiện lượng phân tử axit nucleic dưới nanogram. Hơn nữa, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có thể hữu ích để khuếch đại mẫu axit nucleic mà có các phân tử axit nucleic chất lượng thấp, như bộ gen ADN bị phân hủy và/hoặc phân mảnh từ mẫu của pháp y. Mẫu axit nucleic có thể là mẫu được làm sạch hoặc ADN thô chứa dịch thủy phân, ví dụ được lấy từ que quét lấy mẫu bên trong má, giấy, vải hoặc các đối tượng khác mà có thể thấm được với nước bọt, máu hoặc các dịch thể khác. Vì vậy, theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng nhỏ, hoặc phần mảnh ADN, như ADN bộ gen. Ví dụ, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà là, khoảng, hoặc nhỏ hơn, 1 pg, 2 pg, 3 pg, 4 pg, 5 pg, 6 pg, 7 pg, 8 pg, 9 pg, 10 pg, 11 pg, 12 pg, 13 pg, 14 pg, 15 pg, 16 pg, 17 pg, 18 pg, 19 pg, 20 pg, 30 pg, 40 pg, 50 pg, 60 pg, 70 pg, 80 pg, 90 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, hoặc khoảng được xác định bằng hai trong số các trị số bất kỳ này, ví dụ, từ 10 pg đến 100 pg, 10 pg đến 1 ng, 100 pg đến 1 ng, 1 ng đến 10 ng, 10 ng đến 100 ng, v.v... Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng

axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà nằm trong khoảng từ 100pg đến 1ng. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà lớn hơn 62,5pg. Theo một số phương án sáng chế, các bước phân mảnh bổ sung, như sự tiêu hóa dịch đồng nhất vô bào hoặc endonucleaza, không bao gồm trong các cách tiến hành phân mảnh.

Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có khả năng xác định thành công các kiểu gen hoặc một hoặc nhiều trình tự đích, ví dụ, các SNP, STR, v.v..., ngay cả với lượng dưới nanogram của và/hoặc mẫu axit nucleic bị phân hủy. Ví dụ, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có khả năng xác định thành công kiểu gen mà, khoảng, hoặc lớn hơn, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ trong số các trị số trên, của các trình tự đích. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có khả năng xác định thành công kiểu gen là hơn 50%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc nhiều trình tự đích. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có khả năng đạt cân bằng nội là khoảng hơn 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ trong số các trị số trên, của các trình tự đích.

Đối với điều tra pháp y, các đoạn mồi có thể kết hợp các yếu tố nhận dạng phân tử duy nhất (UMIs) mà trợ giúp trong việc loại bỏ, ví dụ, PCR và các lỗi trình tự, vạch giả và tương tự từ các kết quả giải trình tự. *See Kivioja và cộng sự, Nat.* Như được bàn luận chi tiết hơn trong phần bất kỳ của bản mô tả này, bao gồm cả UMI trong các đoạn mồi cũng cho phép việc nhận dạng các biến dị ở vị trí đoạn lặp lại nối tiếp, nâng cao hơn nữa tính hữu ích của các phương pháp và chế phẩm hiện tại dùng cho hồ sơ ADN và mục đích khác như phân tích di truyền.

Do đó, theo một số phương án sáng chế, các kiểu gen của trình tự lặp lại nối tiếp được nêu ở đây có thể bao gồm các biến dị trình tự ở vị trí đoạn lặp lại nối tiếp. Do đó, đồng hợp tử đối với đoạn lặp lại nối tiếp (ví dụ, 13, 13 cho D9S1122) sử dụng phương pháp truyền thống có thể được nhận dạng bằng dị hợp tử cùng kích thước

dựa trên các biến dị trình tự trong đoạn lặp lại nối tiếp. Như được đánh giá bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, có tính đến các biến dị trình tự bên trong sẽ nâng lên đáng kể tính hữu ích của các phương pháp được nêu ở đây, ví dụ, cho các phân tích di truyền.

Các phương pháp cấu tạo thư viện axit nucleic

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất các phương pháp cấu tạo thư viện axit nucleic bao gồm: tạo ra mẫu axit nucleic, và khuếch đại mẫu axit nucleic bằng các đoạn mồi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích bao gồm dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) và ít nhất một trình tự đích bao gồm trình tự lặp lại nối tiếp.

Các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây được thiết kế để đủ độ nhạy phát hiện lượng phân tử axit nucleic dưới nanogram. Hơn nữa, các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây có thể hữu ích để khuếch đại mẫu axit nucleic mà bao gồm phân tử axit nucleic chất lượng thấp, như bộ gen ADN bị phân hủy và/hoặc phân mảnh từ mẫu của pháp y. Mẫu axit nucleic có thể hoặc là mẫu được làm sạch hoặc là ADN thô chứa dịch thủy phân, ví dụ được lấy từ que quẹt lấy mẫu bên trong má, giấy, vải hoặc các đối tượng khác mà có thể thấm được với nước bọt, máu hoặc các dịch thể khác. Vì vậy, theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng nhỏ phần mảnh ADN, như ADN bộ gen. Ví dụ, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà là, khoảng, hoặc nhỏ hơn, 1 pg, 2 pg, 3 pg, 4 pg, 5 pg, 6 pg, 7 pg, 8 pg, 9 pg, 10 pg, 11 pg, 12 pg, 13 pg, 14 pg, 15 pg, 16 pg, 17 pg, 18 pg, 19 pg, 20 pg, 30 pg, 40 pg, 50 pg, 60 pg, 70 pg, 80 pg, 90 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, hoặc khoảng được xác định bằng hai trong số các trị số bất kỳ này, ví dụ, từ 10 pg đến 100 pg, 10 pg đến 1 ng, 100 pg đến 1 ng, 1 ng đến 10 ng, 10 ng đến 100 ng, v.v... Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà nằm trong khoảng từ 100pg đến 1ng. Theo một số phương án sáng chế, mẫu axit nucleic có thể bao gồm lượng axit nucleic (ví dụ, ADN bộ gen) mà lớn hơn 62,5pg. Theo một số phương án sáng chế, không bao gồm

các bước phân mảnh bổ sung, như sự tiêu hóa dịch đồng nhất vô bào hoặc endonucleaza.

Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp được nêu ở đây bao gồm sự khuếch đại và tạo ra thư viện trong dự đoán trình tự song song xuôi dòng. Xét nghiệm có thể bao gồm hai mastermixe PCR (phương pháp pha sẵn dung dịch PCR mà không có ADN), hai polymeraza chịu nhiệt, hai hỗn hợp môi và bộ phối hợp thu viện. Theo một số phương án sáng chế, mẫu ADN có thể được khuếch đại số chu kỳ bằng cách sử dụng bộ môi khuếch đại thứ nhất mà bao gồm các vùng đích đặc hiệu và các vùng thể không có đích đặc hiệu và mastermix PCR. Vùng thể có thể là trình tự bất kỳ, như vùng thể phổ biến, vùng thể bắt giữ, vùng thể khuếch đại, vùng thể trình tự, vùng thể UMI, và tương tự. Ví dụ, vùng thể có thể là nhiệt độ dùng cho các đoạn môi khuếch đại được dùng trong vòng thứ hai hoặc sau đó của việc khuếch đại, ví dụ dùng cho việc tạo thư viện. Theo một số phương án sáng chế, các phương pháp bao gồm việc bổ sung protein bám vào các sợi đơn (SSB) vào các sản phẩm khuếch đại thứ nhất. Phân ước của mẫu được khuếch đại thứ nhất có thể bị loại bỏ và được khuếch đại lần thứ hai sử dụng bộ môi khuếch đại thứ hai mà đặc hiệu đối với vùng thể, ví dụ, vùng thể phổ biến hoặc vùng thể khuếch đại, của các đoạn môi khuếch đại thứ nhất mà có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể bổ sung, như các thể trình tự đặc hiệu dùng cho một hoặc nhiều quy trình làm việc trình tự xuôi dòng, và các thể trình tự hoặc mastermix PCR thứ hai. Vì vậy, thư viện mẫu ADN gốc sẵn cho trình tự.

Phương pháp thay thế có thể bao gồm việc khuếch đại thứ nhất được thực hiện theo thể tích nhỏ (ví dụ, 15ul) và thay vì chuyển phân ước đến vị trí mới cho vòng khuếch đại thứ hai, các thuốc thử bổ sung để thực hiện vòng khuếch đại thứ hai có thể được bổ sung vào ống.

Thu viện được tạo ra một lần, nó có thể được làm sạch và được định lượng. Theo một số ví dụ, việc làm sạch có thể được thực hiện bằng cách xử lý mẫu qua nền như AMPURE XP Beads (Beckman Coulter) mà dùng để làm sạch các mảnh ADN khỏi các thành phần phản ứng. Phương pháp khác có thể là sự tích hợp của nửa việc

làm sạch như nửa hapten, vào bộ mỗi khuếch đại thứ hai. Ví dụ, nếu biotin được tích hợp vào các đoạn mỗi của một bộ mỗi khuếch đại thứ hai sau đó các mảnh thu viện có thể được giữ sử dụng gốc streptavidin trên hạt, ví dụ. Bằng cách sử dụng phương pháp bắt, các thư viện cũng có thể được chuẩn hóa và được định lượng sử dụng Chuẩn hóa cơ sở hạt (Bead Based Normalization - BBN). Tuy nhiên, các thư viện có thể được làm sạch và được định lượng, hoặc được tích huyết và được định lượng nếu các phản ứng cộng được thực hiện, mà không sử dụng BBN. Ví dụ, các thư viện cũng có thể được định lượng bằng các phương pháp điện di gel, BioAnalyzer, qPCR, các phương pháp phổ quang kế, bộ kit định lượng (ví dụ, PicoGreen, ví dụ). và các phương pháp tương tự được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Tiếp theo việc định lượng, sau đó thư viện có thể được giải trình tự bằng các trình tự song song.

Theo một số phương án sáng chế, bộ mỗi khuếch đại thứ nhất được sử dụng để khuếch đại ADN đích được tạo ra theo nồng độ giới hạn mà khi phân ước của phản ứng khuếch đại thứ nhất được bổ sung vào ống mới và thuốc thử từ phản ứng khuếch đại thứ hai được bổ sung mà đó là lượng tối thiểu để không thể phát hiện ra kết quả khuếch đại luân chuyển từ bộ mỗi khuếch đại thứ nhất và bước loại bỏ giữa phản ứng khuếch đại thứ nhất và phản ứng khuếch đại thứ hai không được yêu cầu. Theo một số ví dụ, nồng độ mỗi khuếch đại dùng cho PCR thứ nhất là, khoảng, hoặc nhỏ hơn, 0,5nM, 0,6nM, 0,7nM, 0,8nM, 0,9nM, 1,0nM, 1,5nM, 2,0nM, 3,0nM, 4,0nM, 5,0nM, 6,0nM, 7,0nM, 8,0nM, 9,0nm 10,0nM, 11,0nM 12,0nM, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, ví dụ, 0,5 nM đến 1,0 nM, 1,0 nM đến 12 nM, 0,8 nM to 1,5 nM, v.v... Theo một số phương án sáng chế, nồng độ mỗi khuếch đại dùng cho PCR thứ nhất nằm trong khoảng từ 0,9 nM đến 10 nM.

Fig. 2 thể hiện quy trình làm việc ví dụ của các phương pháp được bộc lộ ngay trong một phương án. Trình tự ADN bộ gen đích được khuếch đại sử dụng bộ mỗi thứ nhất bao gồm vùng mà chặn trình tự đích và các vùng thể khuếch đại (mà có thể giống hoặc khác nhau) dẫn đến các đơn vị siêu sao chép bao gồm trình tự thể và các thể trên cả hai đầu. Phân ước của các đơn vị siêu sao chép từ PCR thứ nhất còn được khuếch đại sử dụng bộ mỗi thứ hai đặc hiệu đến các trình tự thể thứ nhất còn bao gồm các trình tự mỗi giải trình tự (các trình tự làm thích ứng i5 và i7), do đó tạo thư

viện bao gồm trình tự ADN đích được chặn bằng các trình tự được sử dụng theo sự sắp xếp trình tự song song, trong trường hợp các trình tự i5 và i7 được dùng theo sự sắp xếp trình tự bằng các phương pháp tổng hợp được tạo bởi Illumina, Inc.

Ví dụ về quy trình làm việc khác để xác định hồ sơ ADN từ mẫu được mô tả trên Fig. 3. Theo ví dụ này, phần đích ADN được khuếch đại bằng cặp môi thứ nhất mà bao gồm các trình tự mà chặn trình tự đích, các trình tự thể không có đích (giống hoặc khác nhau), và còn chặn các trình tự nhận dạng phân tử đơn nhất hoặc các UMI, mà bao gồm các gốc ngẫu nhiên. Các UMI có thể được sử dụng, ví dụ, để làm giảm tin sinh học hoặc các lỗi được loại bỏ mà xảy ra trong quá trình xử lý tạo thư viện (ví dụ, thành phần lạ PCR hoặc các kết hợp sai, v.v...). Việc sử dụng các UMI có thể quan trọng đối với hồ sơ ADN, nhưng đặc biệt quan trọng là sử dụng trong việc giúp loại bỏ các lỗi khi mẫu được giải trình tự trong vụ án hình sự. Trong ví dụ này, vòng khuếch đại thứ nhất được thực hiện cho 2 chu kỳ, mà tiếp theo bổ sung protein bám vào các sợi đơn (SSB) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 15 phút tiếp theo là khử hoạt tính ở nhiệt độ 95°C/5 phút mà còn tiêu diệt hữu hiệu sự khuếch đại bộ môi khuếch đại thứ nhất trong vòng khuếch đại thứ hai. Mặc dù cơ cấu không được biết, dự định rằng việc bổ sung SSB liên kết nghịch đảo bằng các đoạn môi khuếch đại thứ nhất mạch đơn và ngăn chúng khỏi tham gia vào các phản ứng khuếch đại sau đó. Sau khi ủ SSB, bộ môi thứ hai bao gồm các thể trình tự và dẫn đến bổ sung PCR mix thứ hai vào thư viện trình tự.

Thư viện axit nucleic

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất các thư viện axit nucleic, mà có thể được sử dụng cho trình tự. Theo một số phương án sáng chế, thư viện axit nucleic được nêu ở đây có thể bao gồm các phân tử axit nucleic, trong đó các phân tử axit nucleic bao gồm ít nhất một trình tự lặp lại nối tiếp được chặn bởi cặp thứ nhất của trình tự thể và ít nhất một trình tự dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP) được chặn bởi cặp thứ hai của trình tự thể.

Như đã nêu trong bản mô tả này, kích cỡ của các phân tử axit nucleic có thể thay đổi đáng kể sử dụng các phương pháp và chế phẩm được nêu ở đây. Đánh giá

bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đó là các phân tử axit nucleic được khuếch đại từ trình tự đích bao gồm đoạn lặp lại nối tiếp (ví dụ, STR) có thể có kích cỡ lớn, trong đó các phân tử axit nucleic được khuếch đại từ trình tự đích bao gồm SNP có thể có kích cỡ nhỏ. Ví dụ, các phân tử axit nucleic có thể bao gồm ít nhất từ một trăm phân tử nucleotit đến hàng trăm hoặc hàng nghìn phân tử nucleotit. Do đó, kích cỡ các phân tử axit nucleic có thể có khoảng trị số nằm trong khoảng bất kỳ giữa hai trị số là 50bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 kb, hoặc lớn hơn. Theo một số phương án sáng chế, kích cỡ tối thiểu của các phân tử axit nucleic có thể có chiều dài là, khoảng, hoặc nhỏ hơn, 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, hoặc 100 bp. Theo một số phương án sáng chế, kích cỡ tối đa của các phân tử axit nucleic có thể có chiều dài là, khoảng, hoặc nhỏ hơn, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp, hoặc 1kb.

Với việc tạo tập hợp, các mảnh thư viện được cố định trên nền, ví dụ việc biểu diễn, mà bao gồm các trình tự oligonucleotit đồng nhất để giữ và cố định các mảnh thư viện ADN. Các mảnh thư viện ADN cố định được khuếch đại sử dụng các phương pháp khuếch đại theo tập hợp như được minh họa bằng ví dụ trong Patent của Mỹ số 7,985,565 và 7,115,400, nội dung của mỗi patent được kết hợp có viện dẫn đến tài liệu này. Các vật liệu được kết hợp của Patent Mỹ số 7,985,565 và 7,115,400 đề xuất các phương pháp khuếch đại axit nucleic pha rắn mà cho phép các sản phẩm khuếch đại được cố định trên chất mang rắn để tạo các mảng bao gồm các nhóm hoặc "cụm" phân tử axit nucleic cố định. Mỗi tập hợp hoặc cụm trên mảng này được tạo từ các sợi polynucleotit cố định đồng nhất và các sợi polynucleotit bổ sung cố định đồng nhất. Các mảng mà được tạo ra thường được gọi là "các mảng nhóm" Các sản phẩm của phản ứng khuếch đại pha rắn như được mô tả trong Patent của Mỹ số 7,985,565 và 7,115,400 được gọi là các cấu trúc "cầu" được tạo ra bằng cách ủ cặp sợi polynucleotit cố định và sợi bổ sung cố định, cả hai sợi được cố định trên chất mang rắn ở đầu 5', tốt hơn là qua việc gắn kèm không phân cực. Các phương pháp khuếch đại tập hợp là các ví dụ của phương pháp mà trong đó khung axit nucleic cố định được sử dụng để tạo ra các đơn vị siêu sao chép cố định. Các phương pháp thích hợp

khác cũng có thể được sử dụng để tạo ra các đơn vị siêu sao chép cố định từ các mảng ADN cố định được tạo ra theo các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả sáng chế Ví dụ một hoặc nhiều nhóm hoặc cụm có thể được tạo ra qua PCR pha rắn mà hoặc là một hoặc là cả hai mỗi tổng mỗi cặp mỗi khuếch đại được cố định. Tuy nhiên, các phương pháp được mô tả ở đây không bị giới hạn đối với phương pháp tạo trình tự hoặc nền trình tự bất kỳ và có thể theo phương pháp tạo nền trình tự song song khác và kết hợp các nền trình tự.

Các đoạn môi

Các phương án sáng chế ở đây đề xuất các đoạn môi mà lai đặc hiệu với ít nhất một trình tự đích ngắn và ít nhất một trình tự đích dài trong mẫu axit nucleic, trong đó khuếch đại mẫu axit nucleic sử dụng các đoạn môi trong phản ứng đa môi đơn dẫn đến ít nhất một sản phẩm khuếch đại ngắn và ít nhất một sản phẩm khuếch đại dài, trong đó mỗi trong số các đoạn môi bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể. Hơn nữa còn đề xuất các đoạn môi mà có các trình tự được thiết lập trước trên Bảng 1-2.

Đối với việc khuếch đại đa môi của trình tự đích lớn (ví dụ, các STR, ITR) và trình tự đích nhỏ (ví dụ, các SNP), các đoạn môi được thiết kế để cho phép việc khuếch đại cân bằng trên tất cả các kiểu đích. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để khuếch đại nhiều trình tự đích lặp lại nối tiếp trong phản ứng đa môi đơn. Ví dụ, các đoạn môi có thể lai đặc hiệu với số trình tự lặp lại nối tiếp là, khoảng, hoặc lớn hơn 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, như từ 4 đến 12, 10 đến 24, 30 đến 100, v.v... Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 24 trình tự lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 60 trình tự lặp lại nối tiếp. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để khuếch đại nhiều trình tự đích SNP trong phản ứng đơn. Ví dụ, các đoạn môi có thể lai đặc hiệu với số trình tự SNP là, khoảng, hoặc lớn hơn 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, như từ 4 đến 12, 10 đến 24, 30 đến 100, v.v... Theo một số phương án sáng

chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 30 trình tự SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 50 trình tự SNP.

Phát hiện trong quá trình thí nghiệm đó là các trình tự đích SNP ngắn được khuếch đại ưu tiên trên các trình tự đích STR dài hơn khi sử dụng môi mà cho phép thiết kế theo tiêu chuẩn được thiết lập sau và sự hiểu biết về thiết kế môi thành công. Hơn nữa, ít nhất theo trình tự do tổng hợp quy trình làm việc mà các nhóm được tạo ra và các nhóm được tự giải trình tự (ví dụ, khi trình tự sau do tổng hợp (SBS, được bộc lộ trong bản mô tả này ở nơi khác) được kết hợp với các trình tự của Illumina, Inc.) quá trình khuếch đại tập hợp ưu tiên của các mảnh SNP thư viện ngắn hơn cũng xảy ra. Để khắc phục hai khuynh hướng này, phương pháp mới cần để thiết kế môi đó là cho phép quá trình khuếch đại cân bằng giữa các trình tự đích SNP ngắn và các trình tự đích STR dài.

Một trong số phương pháp này bao gồm việc thiết kế các đoạn môi dùng cho quá trình khuếch đại STR. Đối với các STR, các trình tự lặp lại thường được gắn vào vùng lặp lại lớn hơn; do đó việc thiết kế các đoạn môi đặc hiệu cho quá trình khuếch đại STR có thể khó giải quyết. Hơn nữa các STR và vùng chặn của chúng thường giàu AT. Trong một trường hợp, các đoạn môi được thiết kế để các vùng khó giải quyết sử dụng phương pháp thiết kế trái với thông thường và tiêu chuẩn thiết kế PCR được thiết lập tốt. Tiêu chuẩn được thiết lập để thiết kế môi PCR đó là, trong số tiêu chuẩn khác, 1) chiều dài tối ưu cho các đoạn môi là nằm trong khoảng từ 18 đến 22 nucleotit, 2) Tm nên nằm trong khoảng từ 55 đến 58°C, 3) hàm lượng GC nên nằm trong khoảng từ 40 đến 60 %, 4) và vùng dinucleotit AT lặp lại được tránh, tối đa <4 đoạn lặp lại AT dinucleotit. Các đoạn môi được thiết kế đó là dài hơn các đoạn môi PCR điển hình, ví dụ nằm trong khoảng từ 23 đến 35 nucleotit theo chiều dài thay vì nằm trong khoảng từ 18 đến 22 nucleotit, chúng có nhiệt độ nóng chảy thấp (Tm), ví dụ khoảng 54°C thay vì 58°C, và các đoạn môi giàu AT, ba thông số mà nội dung tiêu chuẩn PCR được thiết lập thông thường sẽ tránh được thiết kế môi tối ưu. Hiệu quả là, các đoạn môi không tối ưu được thiết kế. Ngạc nhiên là, được bộc lộ rằng các đoạn môi dài, giàu AT, Tm thấp được đa môi thực sự với các STR tốt hơn các đoạn môi ngắn, chứa AT thấp, Tm cao. Không bị phụ thuộc vào lý thuyết bất kỳ, dự tính

rằng các đoạn mồi ngắn hơn được thiết kế theo tiêu chuẩn thiết kế PCR được thiết lập có thể tạo ra các dimer mà có nhiệt độ nóng chảy cao và do đó tạo các dimer hữu hiệu dưới các điều kiện PCR thông thường, trong khi các đoạn mồi dài hơn, T_m thấp có thể tạo các dimer dưới T_m thấp thật sự và do đó không thể tạo dimer, do đó cho phép tăng sự tham gia của các đoạn mồi T_m thấp, dài hơn dưới các điều kiện khuếch đại thông thường so bằng các đoạn mồi T_m cao, ngắn (ví dụ, nằm trong khoảng từ 18 đến 22 nucleotit, T_m là 60°C , hàm lượng 50% GC).

Các đoạn mồi giàu AT, T_m thấp, dài hơn dùng cho quá trình khuếch đại STR sau đó được đa mồi bằng các đoạn mồi ngắn hơn T_m cao, được thiết kế thông thường mà được tạo đích SNP. Tuy nhiên, các phản ứng khuếch đại đa mồi một lần nữa không thành công trong việc tạo quá trình khuếch đại cân bằng của cả STR và SNP trong một phản ứng đa mồi. Dự tính là việc áp dụng thiết kế mồi không thông thường thực sự để khuếch đại các đoạn mồi không khó giải quyết, ví dụ khuếch đại các đích SNP, có thể mang lại quá trình khuếch đại mồi thành công. Vì vậy, cùng tiêu chuẩn sử dụng để thiết kế các đoạn mồi không tối ưu dùng cho STR được áp dụng vào thiết kế mồi cho SNP (dài, T_m thấp, giàu AT). Ngạc nhiên là, các đoạn mồi được thiết kế mới dẫn đến cân bằng tốt hơn giữa quá trình khuếch đại của STR và SNP trong phản ứng đa mồi.

Fig.4 thể hiện các ví dụ về sự tác động giữa các đoạn mồi được thiết kế thông thường và không thông thường trong phản ứng đa mồi. Trên Fig. 4A phản ứng đa mồi của 10 đích SNP thể hiện quá trình khuếch đại được kỳ vọng trong khoảng mong muốn là từ 200 đến 350 bp đối với thư viện. Các đoạn mồi được sử dụng để khuếch đại 10 SNP theo đa mồi được thiết kế thành mồi dài hơn, có T_m thấp hơn và giàu AT hơn mà được báo bởi tiêu chuẩn thiết kế mồi PCR được thiết lập. Khi cặp mồi thứ 11 được thiết kế sử dụng tiêu chuẩn thiết kế PCR được thiết lập, mà là các đoạn mồi ngắn, có T_m cao và không giàu AT, và được bổ sung vào 10 cặp dẫn đến sự đa mồi thể hiện quá trình khuếch đại không đặc hiệu của ADN đích. Như đã thấy trên Fig. 4B và 4D, việc thêm cặp mồi được thiết kế thông thường thứ 11 can thiệp 10 plex cặp mồi không thông thường và dẫn đến quá trình khuếch đại đa mồi không thành công của các SNP tạo đích. Tuy nhiên, việc thêm cặp mồi thứ 11 mà cũng được thiết

kế không thông thường theo cùng tiêu chuẩn như 10 plex cặp mỗi dẫn đến quá trình khuếch đại thành công của các đích SNP (Fig. 4C).

Do đó, theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi có nhiệt độ nóng chảy thấp, ví dụ, thấp hơn 60°C hoặc nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C, và/hoặc có chiều dài ít nhất là 24 nucleotit, ví dụ, nằm trong khoảng từ 24 đến 38 nucleotit. Theo một số phương án sáng chế, mỗi trong số các đoạn mỗi bao gồm trình tự nucleotit polyme đồng nhất.

Theo một số ví dụ, các đoạn mỗi được thiết kế không thông thường bao gồm các trình tự mà chặn các STR và SNP hướng đích và thêm các trình tự không có khung. Các trình tự thêm có thể là, ví dụ các trình tự thẻ mà thỏa mãn mục đích trong quá trình tạo thư viện hoặc phương pháp luận về trình tự. Ví dụ, trình tự thẻ có thể là trình tự bắt như gốc hapten hơn là có thể được bắt giữ bởi gốc nhánh được cố định để làm sạch mảnh thư viện. Ví dụ về gốc hapten là biotin mà có thể được bắt giữa bởi streptavidin cho các mảnh thư viện được cách từ các thành phần phản ứng và tương tự. Trình tự thẻ cũng có thể là trình tự khuếch đại, ví dụ đó là việc thêm vào mỗi khuếch đại và được sử dụng trong một hoặc nhiều phản ứng khuếch đại. Fig. 2 và 3 thể hiện các ví dụ về các trình tự thẻ mà được sử dụng trong vòng khuếch đại thứ hai theo vòng khuếch đại thứ nhất. Trình tự thẻ cũng có thể là thẻ trình tự. Fig. 2 và 3 cũng thể hiện các ví dụ về các thẻ trình tự, trình tự thích ứng i5 và i7 được sử dụng trong trình tự như quá trình lai, sự tạo tập hợp và các đoạn mỗi trình tự trong quá trình theo trình tự do các phản ứng tổng hợp như được mô tả ở đây. Ví dụ khác của trình tự thẻ là việc nhận dạng phân tử đơn nhất, hoặc UMI, như được thể hiện trên Fig. 3.

UMI bao gồm sự giãn ngẫu nhiên của các nucleotit mà có thể được sử dụng trong trình tự để điều chỉnh cho PCR và các lỗi trình tự, do đó thêm lớp bổ sung của việc điều chỉnh lỗi và các kết quả trình tự. UMI có thể có chiều dài, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3 đến 10 nucleotit, tuy nhiên số này phụ thuộc vào ADN đưa vào. Ví dụ, nếu 1ng ADN được sử dụng vào các vị trí 250 vòng đích, sau đó được tiên liệu rằng cần khoảng 350 đơn vị sao chép x 250 đích, vì vậy khoảng 90000 UMI khác nhau.

Nếu nhiều ADN được dùng hơn, ví dụ 10ng, sau đó có thể cần khoảng 1 triệu UMI khác nhau. Tất cả bản sao PCR từ phản ứng PCR giống nhau sẽ có trình tự UMI giống nhau, như các bản sao này có thể được so sánh và các lỗi bất kỳ trong trình tự như việc thay gốc đơn, xóa, thêm (ví dụ vạch giả trên PCR) có thể loại trừ khỏi các kết quả trình tự tin sinh học. Các phát hiện phân tử đơn nhất cũng có thể được sử dụng trong phân tích mẫu được trộn. Các mẫu được trộn, ví dụ mẫu ADN ở nữ mà bị nhiễm bản ADN ở nam, có thể được mở xoắn để báo cả việc góp ADN ở nam và nữ sử dụng các trình tự UMI. Ví dụ, có thể là tổng bốn lượng lặp lại khác nhau đối với hai ADN được trộn; tuy nhiên có thể ít hơn bốn nếu hỗn hợp hai mẫu alen chia ở vị trí cụ thể. Các alen chia này có thể được phân biệt và khoảng phần trăm được xác định sử dụng UMI để xác định lượng alen khác nhau trong quần thể phân tử ADN ban đầu. Ví dụ, các phân tử ban đầu có thể đếm được và nếu sự đóng góp phụ có mặt ở, ví dụ 5%, sau đó 5% UMI được nhận dạng một kiểu gen và 95% nhận dạng kiểu gen thứ hai. Sau khi PCR, nếu một alen (hoặc có thể hơn) có khuynh hướng khuếch đại sau đó là không thể nhận tỷ lệ 5:95. Tuy nhiên, nhờ sử dụng các UMI tỷ lệ sai lệch có thể được hiệu chỉnh sau khi PCR hai lần được ngưng tụ sử dụng sự phát hiện và hiệu chỉnh. Quan trọng là khi thử để biệt hóa từ thành phần lạ vạch giả từ PCR và sự đóng góp phụ chuẩn.

Mỗi theo các phương pháp sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự thể. Trình tự thể có thể là một hoặc nhiều trình tự mỗi mà không đồng nhất đối với trình tự đích, nhưng ví dụ có thể được sử dụng làm khung cho một hoặc nhiều phản ứng khuếch đại. Trình tự thể có thể là trình tự bất, ví dụ trình tự hapten như biotin mà có thể được sử dụng để làm sạch các đơn vị siêu sao chép khỏi các thành phần phản ứng. Các trình tự thể có thể là các trình tự như trình tự nối mạch đôi mà thuận lợi để giữ các đơn vị siêu sao chép thư viện trên nền ví dụ đối với khuếch đại cầu trong dự đoán trình tự bằng kỹ thuật tổng hợp như được mô tả ở đây. Hơn nữa, trình tự thể có thể là thể nhận diện phân tử đơn nhất điển hình, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3 đến 10 nucleotit bao gồm sự giãn ngẫu nhiên của các nucleotit mà có thể được sử dụng để hiệu chỉnh lỗi trong quá trình tạo thư viện và/hoặc các phương pháp trình tự.

Ngoài ra, thuận lợi đối với phản ứng PCR đa môi để chứa các đoạn môi oligonucleotit về cơ bản đối với tất cả đích được tích huyết thành một hỗn hợp. Tuy nhiên, như được nêu ở đây, các oligonucleotit dài hơn các đoạn môi một cách không điển hình mà được thiết kế sử dụng các thông số truyền thống. Hơn nữa việc thêm các trình tự thè vào các đoạn môi, như thêm UMI mà được gắn vào trình tự đặc hiệu đích gen vẫn tạo các trình tự môi dài hơn. Theo một số phương án sáng chế, glyxin betain (khoảng 1,5M) có thể được thêm vào các đoạn môi. Ví dụ, theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại có môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ betain là, khoảng, hoặc lớn 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1 M, 1,2 M, 1,3 M, 1,4 M, 1,5 M, 1,6 M, 1,7 M, 1,8 M, 1,9 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, 8 M, 9 M, 10 M, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ này, ví dụ, từ 500 mM đến 2 M, từ 1 M đến 1,5 M, v.v... Vì vậy, hỗn hợp môi như được mô tả ở đây được bổ sung bằng betain, ví dụ ở khoảng 1,5M, sẽ thuận lợi khi hoạt động các phương pháp theo sáng chế. Theo một số phương án sáng chế, glyxerol có thể được thêm vào các đoạn môi. Ví dụ, theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại bằng các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ glyxerol là, khoảng, hoặc lớn 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1 M, 1,2 M, 1,3 M, 1,4 M, 1,5 M, 1,6 M, 1,7 M, 1,8 M, 1,9 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, 8 M, 9 M, 10 M, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ này, ví dụ, từ 500 mM đến 2 M, từ 1 M đến 1,5 M, v.v... Vì vậy, hỗn hợp môi như được mô tả ở đây được bổ sung bằng glyxerol, ví dụ ở khoảng 1,5M, sẽ thuận lợi khi hoạt động các phương pháp theo sáng chế.

Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm kết hợp với thiết kế môi không thông thường sử dụng các phương pháp khuếch đại theo sáng chế có thể còn được cải biến. Ví dụ, theo một số phương án sáng chế nồng độ muối, như KCl, LiCl, NaCl, hoặc sự kết hợp của chúng, của bộ đệm khuếch đại tăng lên so với nồng độ muối của bộ đệm khuếch đại được sử dụng kết hợp với đoạn môi được thiết kế thông thường. Theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng

khuếch đại bằng các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ KCl là, khoảng, hoặc lớn 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 250mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, ví dụ, từ 60 mM đến 200 mM, từ 100 mM đến 250 mM, v.v... Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại được sử dụng trong phản ứng khuếch đại có các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ KCl mà là khoảng 145mM. Theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại bằng các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ LiCl là, khoảng, hoặc lớn 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 250mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, ví dụ, từ 60 mM đến 200 mM, từ 100 mM đến 250 mM, v.v... Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại được sử dụng trong phản ứng khuếch đại có các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ LiCl mà là khoảng 145mM. Theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại bằng các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ NaCl là, khoảng, hoặc lớn 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 250mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, ví dụ, từ 60 mM đến 200 mM, từ 100 mM đến 250 mM, v.v... Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại được sử dụng trong phản ứng khuếch đại có các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ NaCl mà là khoảng 145mM.

Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại có các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây có thể bao gồm MgSO_4 , MgCl_2 , hoặc sự kết hợp của chúng.

Bộ kit

Các phương án sáng chế được nêu ở đây đề xuất bộ kit bao gồm ít nhất một phương tiện chứa, trong đó ít nhất một phương tiện chứa bao gồm các đoạn môi được nêu ở đây. Theo một số phương án sáng chế, phương tiện chứa có thể là ống, giếng, tấm vi chuẩn, v.v... Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi có thể lai đặc hiệu với số trình tự lặp lại nối tiếp là, khoảng, hoặc lớn hơn 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, như từ 4 đến 12, 10 đến 24, 30 đến 100, v.v... Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 24 trình tự lặp lại nối tiếp. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 60 trình tự lặp lại nối tiếp. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để khuếch đại nhiều trình tự đích SNP trong phản ứng đơn. Ví dụ, các đoạn môi có thể lai đặc hiệu với số trình tự SNP là, khoảng, hoặc lớn hơn 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, như từ 4 đến 12, 10 đến 24, 30 đến 100, v.v... Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 30 trình tự SNP. Theo một số phương án sáng chế, các đoạn môi lai đặc hiệu với ít nhất 50 trình tự SNP.

Theo một số phương án sáng chế, ít nhất một phương tiện chứa bao gồm bộ đệm khuếch đại. Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm kết hợp với thiết kế môi không thông thường sử dụng các phương pháp khuếch đại theo sáng chế có thể còn được cải biến. Ví dụ, theo một số phương án sáng chế nồng độ muối, như KCl, LiCl, NaCl, hoặc sự kết hợp của chúng, của bộ đệm khuếch đại tăng lên so với nồng độ muối của bộ đệm khuếch đại được sử dụng kết hợp với đoạn môi được thiết kế thông thường. Theo một số phương án sáng chế các bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại bằng các đoạn môi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ KCl, NaCl hoặc LiCl là, khoảng, hoặc lớn 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, hoặc khoảng giữa hai trị số bất kỳ, ví dụ, từ 60 mM đến 200 mM, từ 100 mM đến 250 mM, v.v... Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại được sử dụng trong phản ứng khuếch đại có

các đoạn mồi không thông thường như được nêu ở đây bao gồm nồng độ KCl, NaCl hoặc LiCl mà là khoảng 145mM.

Theo một số phương án sáng chế, bộ đệm khuếch đại sử dụng trong phản ứng khuếch đại có các đoạn mồi không thông thường như được nêu ở đây có thể bao gồm MgSO_4 , MgCl_2 , hoặc sự kết hợp của chúng.

Các phương pháp trình tự

Các phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn đối với nền trình tự cụ thể bất kỳ, tuy nhiên được minh họa bằng ví dụ ở đây liên quan đến SBS, hoặc trình tự do tổng hợp, kiểu trình tự song song. Kỹ thuật ứng dụng cụ thể ở chỗ các axit nucleic được gắn ở các vị trí cố định trong mảng sao cho các vị trí liên quan của chúng không bị thay đổi và mảng được vẽ lặp đi lặp lại. Các ví dụ mà trong đó hình ảnh thu được theo sự thay đổi màu, ví dụ trùng với các đánh dấu khác nhau sử dụng để phân biệt một kiểu gốc nucleotit so với các gốc khác có thể áp dụng cụ thể.

Kỹ thuật SBS thường bao gồm độ giãn enzym của sợi axit nucleotit mới nhờ việc thêm lặp đi lặp lại các nucleotit chống lại sợi mẫu. Trong các phương pháp truyền thống SBS, monome nucleotit đơn có thể được cung cấp cho nucleotit đích trong sự có mặt của polymeraza trong mỗi lần sinh ra. Tuy nhiên, theo các phương pháp được mô tả ở đây, nhiều hơn một kiểu monome nucleotit có thể được cung cấp cho axit nucleic đích trong sự có mặt của polymeraza trong lần sinh ra.

Kỹ thuật SBS có thể dùng các monome nucleotit mà có gốc đánh dấu hoặc các monome không có gốc đánh dấu. Do đó, các giai đoạn tích hợp có thể bị phát hiện dựa vào các đặc điểm đánh dấu, như huỳnh quang đánh dấu; đặc điểm của monome nucleotit như trọng lượng phân tử hoặc sự nạp điện; sản phẩm phụ của sự tích hợp nucleotit, như sự thoát ra pyrophosphat; hoặc tương tự. Trong một số ví dụ mà hai hoặc nhiều nucleotit khác nhau có mặt trong thuốc thử trình tự, nucleotit khác nhau có thể phân biệt nhau, hoặc thay thế, hai hoặc nhiều đánh dấu khác nhau có thể không phân biệt được dưới kỹ thuật phát hiện được sử dụng. Ví dụ, các nucleotit khác nhau có mặt trong thuốc thử trình tự có thể có đánh dấu khác nhau và chúng có

thể phân biệt được sử dụng quang hợp thích hợp được minh họa bằng ví dụ bằng các phương pháp trình tự được phát triển bởi Solexa (Illumina, Inc. hiện nay).

Một số ví dụ bao gồm kỹ thuật giải trình tự gen (pyrosequencing). Kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện ra sự thoát ra của pyrophosphat vô cơ (inorganic pyrophosphate - PPi) như các nucleotit cụ thể được kết hợp thành sợi mới (Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. và Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. và Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science* 281(5375), 363; Tài liệu patent của Mỹ No. 6,210,891; Tài liệu patent của Mỹ No. 6,258,568 và Tài liệu patent của Mỹ No. 6,274,320, các bộ lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến tài liệu này). Trong kỹ thuật giải trình tự gen, PPi thoát ra có thể được phát hiện bằng cách chuyển ngay thành adenosin triphosphat (adenosine triphosphate - ATP) bằng ATP sulfurylaza, và mức ATP được tạo ra được phát hiện qua photon tạo luxiferaza. Các axit nucleic được giải trình tự có thể được gắn vào các dấu hiệu trong mảng và mảng có thể được tạo ảnh để giữ các tín hiệu phát quang bằng phản ứng hóa học mà được tạo ra do sự kết hợp của nucleotit ở các dấu hiệu của mảng. Ảnh có thể thu được sau khi mảng được xử lý với kiểu nucleotit cụ thể (ví dụ A, T, C hoặc G). Các ảnh thu được sau khi thêm mỗi kiểu nucleotit sẽ khác nhau về hình ảnh mà các dấu hiệu trong mảng được phát hiện. Sự khác biệt này trong hình ảnh phản ánh hàm lượng trình tự khác nhau của các dấu hiệu trên mảng. Tuy nhiên, các vị trí liên quan của mỗi dấu hiệu sẽ không thay đổi trong các hình ảnh. Các hình ảnh có thể được lưu trữ, xử lý và phân tích sử dụng các phương pháp được thiết lập ở đây. Ví dụ, các hình ảnh thu được sau khi xử lý mảng đối với mỗi loại nucleotit khác nhau có thể được xử lý theo cùng một cách như được minh họa bằng ví dụ ở đây cho các hình ảnh thu được từ các kênh phát hiện khác nhau đối với các phương pháp giải trình tự cơ sở đầu cuối đảo ngược.

Theo các ví dụ khác về SBS, trình tự theo chu kỳ thu được bằng việc bổ sung từng bước các nucleotit đầu cuối đảo ngược chứa, ví dụ, thuốc đánh dấu có thể phân

cất hoặc có thể phục hồi phát quang như được mô tả, ví dụ, trong WO 04/018497 và Tài liệu patent của Mỹ số 7,057,026, các bậc lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Phương pháp này được thương mại hóa bởi Solexa (now Illumina Inc.), và cũng được mô tả trong WO 91/06678 và WO 07/123,744, mỗi phương pháp được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Tính có sẵn của các đầu cuối được đánh dấu bằng huỳnh quang trong đó các hai đầu cuối có thể được đảo ngược và đánh dấu huỳnh quang được phân cắt thúc đẩy trình tự đầu cuối đảo ngược theo chu kỳ (CRT-cyclic reversible termination) có hiệu quả. Các polymeraza cũng có thể được đồng thiết kế để kết hợp hiệu quả và kéo dài từ các nucleotit được cải biến này. Hệ thống SBS làm ví dụ bổ sung và các phương pháp mà có thể được dùng với các phương pháp và hệ thống được mô tả ở đây được mô tả trong Công bố đơn Patent của Mỹ số 2007/0166705, Công bố đơn Patent của Mỹ số 2006/0188901, Patent của Mỹ số 7,057,026, Công bố đơn Patent của Mỹ số 2006/0240439, Công bố đơn Patent của Mỹ số 2006/0281109, Công bố PCT số WO 05/065814, Công bố đơn Patent của Mỹ số 2005/0100900, Công bố PCT số WO 06/064199, Công bố PCT số WO 07/010,251, Công bố đơn Patent của Mỹ số 2012/0270305 và Công bố đơn Patent của Mỹ số 2013/0260372, các bậc lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn theo toàn bộ tài liệu.

Một số ví dụ có thể dùng để phát hiện bốn nucleotit khác nhau sử dụng ít hơn bốn đánh dấu khác nhau. Ví dụ, SBS có thể được thực hiện dùng các phương pháp và hệ thống được mô tả trong các nội dung được kết hợp của Tài liệu công bố đơn Patent của Mỹ số 2013/0079232. Như ví dụ thứ nhất, cặp loại nucleotit có thể được phát hiện ở cùng một bước sóng, nhưng được phân biệt dựa trên sự khác biệt về mật độ quang đối với một thành phần của cặp so với thành phần còn lại, hoặc dựa trên sự thay đổi đối với một thành phần của cặp (ví dụ, qua biến đổi hóa học, biến đổi quang hóa hoặc biến đổi vật lý) mà làm cho tín hiệu rõ ràng để biến mất hoặc không biến mất so với tín hiệu được phát hiện đối với thành phần còn lại của cặp. Như ví dụ thứ hai, bao hoặc bố loại nucleotit khác nhau có thể được phát hiện dưới các điều kiện cụ thể trong khi loại nucleotit thứ tư không có đánh dấu mà có thể phát hiện dưới các điều kiện này, hoặc được phát hiện dưới các điều kiện này một cách tối thiểu (ví dụ,

phát hiện tối thiểu nhờ huỳnh quang cơ bản, v.v...). Sự kết hợp của ba loại nucleotit thứ nhất thành axit nucleic có thể được xác định dựa trên sự có mặt của các tín hiệu tương ứng của chúng và sự kết hợp của loại nucleotit thứ tư thành axit nucleic có thể được xác định dựa trên sự không có mặt hoặc sự phát hiện tối thiểu của tín hiệu bất kỳ. Như ví dụ thứ ba, một loại nucleotit có thể bao gồm (các) đánh dấu mà được phát hiện trong hai kênh khác nhau, trong khi các loại nucleotit khác được phát hiện trong không nhiều hơn một kênh. Ba kết cấu làm ví dụ đã nói trên không được coi là loại trừ lẫn nhau và có thể được sử dụng theo sự kết hợp khác nhau. Phương án làm ví dụ mà kết hợp với cả ba ví dụ, là phương pháp SBS cơ sở huỳnh quang mà sử dụng loại nucleotit thứ nhất mà được phát hiện trong kênh thứ nhất (ví dụ, dATP có đánh dấu mà được phát hiện trong kênh thứ nhất khi được kích thích bằng chiều dài bước sóng kích thích thứ nhất), loại nucleotit thứ hai mà được phát hiện trong kênh thứ hai (ví dụ, dCTP có đánh dấu mà được phát hiện trong kênh thứ hai khi được kích thích bằng chiều dài bước sóng thứ hai), loại nucleotit thứ ba mà được phát hiện trong cả kênh thứ nhất và kênh thứ hai (ví dụ, dTTP có ít nhất một đánh dấu mà được phát hiện trong cả hai kênh khi được kích thích bởi chiều dài bước sóng kích thích thứ nhất và/hoặc thứ hai) và loại nucleotit thứ tư mà không có đánh dấu mà không, hoặc tối thiểu hóa, được phát hiện trong kênh (ví dụ dATP không có đánh dấu).

Hơn nữa, như được mô tả trong chất được kết hợp của Công bố đơn Patent của Mỹ số 2013/0079232, dữ liệu trình tự có thể thu được nhờ sử dụng kênh đơn. Trong các phương pháp giải trình tự được gọi là thuốc nhuộm, loại nucleotit thứ nhất được đánh dấu nhưng đánh dấu bị loại bỏ chỉ sau khi ảnh thứ nhất tạo ra. Loại nucleotit thứ ba giữa đánh dấu của nó trong cả hình ảnh thứ nhất và thứ hai, và loại nucleotit thứ tư không còn được đánh dấu trên cả hai hình ảnh.

Một số ví dụ có thể dùng trình tự do kỹ thuật nối. Các kỹ thuật này dùng ADN ligaza để kết hợp các oligonucleotit và nhận dạng sự kết hợp các oligonucleotit này. Các oligonucleotit thường có các nguyên tử đánh dấu khác nhau mà được có liên quan với sự nhận dạng nucleotit cụ thể trong trình tự mà để oligonucleotit lai vào đó. Đối với các phương pháp SBS khác, các hình ảnh có thể thu được sau đây bằng cách xử lý mảng các dấu hiệu axit nucleic có các thuốc thử giải trình tự được đánh dấu.

Mỗi hình ảnh sẽ thể hiện dấu hiệu axit nucleic mà được kết hợp các nguyên tử đánh dấu của loại cụ thể. Các dấu hiệu khác nhau sẽ có mặt hoặc không có mặt trong các hình ảnh khác nhau do hàm lượng trình tự khác nhau của mỗi dấu hiệu, nhưng vị trí liên quan của các dấu hiệu sẽ được không thay đổi trong các hình ảnh. Các hình ảnh thu được từ các phương pháp giải trình tự cơ sở nổi có thể được lưu trữ, được xử lý và phân tích được đặt ra ở đây. Các hệ thống và phương pháp SBS làm ví dụ mà có thể được giữ bằng các phương pháp và hệ thống được mô tả ở đây được mô tả trong Tài liệu Patent của Mỹ số 6,210,891; Tài liệu patent của Mỹ số 6,172,218, và Tài liệu patent của Mỹ số 6,274,320, các bộc lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến tài liệu này.

Một số ví dụ có thể dùng trình tự lỗ cỡ nano (Deamer, D. W. & Akeson, M. "Nanopores và nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing." Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer, D. và D. Branton, "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis". Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002); Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, và J. A. Golovchenko, "DNA molecules và configurations in a solid-state nanopore microscope" Nat. Mater. 2:611-615 (2003), các bộc lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến tài liệu này). Theo các phương án này, axit nucleic đi qua lỗ cỡ nano. Lỗ cỡ nano có thể là lỗ tổng hợp hoặc protein màng sinh học, như α -hemolysin. Khi axit nucleic đi qua lỗ cỡ nano, mỗi cặp cơ sở có thể được nhận dạng bằng cách đo sự biến thiên sự dẫn điện của lỗ. (Tài liệu patent của Mỹ số 7,001,792; Soni, G. V. & Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores." Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis." Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft, S. L., Chu, J., Amorin, M. & Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution." J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 (2008), các bộc lộ của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến tài liệu này). Dữ liệu thu được từ các phương pháp giải trình tự có thể được lưu trữ, được xử lý và phân tích được đặt ra ở đây. Cụ thể là, dữ liệu có thể được xử lý làm hình ảnh theo việc xử lý làm ví dụ của các hình ảnh quang học và hình ảnh khác mà được đề cập ở đây.

Một số ví dụ có thể dùng các phương pháp bao gồm việc điều chỉnh thời gian thực của hoạt hóa ADN polymeraza. Sự kết hợp nucleotit có thể được phát hiện nhờ các sự tương tác truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET - fluorescence resonance energy transfer) giữa polymeraza mang huỳnh quang và các nucleotit được đánh dấu γ -phosphat như được mô tả, ví dụ, trong Tài liệu patent của Mỹ số 7,329,492 và Tài liệu patent của Mỹ số 7,211,414 (mỗi tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn) hoặc sự kết hợp nucleotit có thể được phát hiện bằng các đường dẫn sóng độ) như được mô tả, ví dụ, trong Tài liệu patent của Mỹ số 7,315,019 (mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn) và sử dụng các chất tương tự nucleotit huỳnh quang và các polymeraza được tạo ra bằng kỹ thuật như được mô tả, ví dụ, trong Tài liệu patent của Mỹ số 7,405,281 và công bố đơn Patent của Mỹ số 2008/0108082 (mỗi tài liệu mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn). Sự phát sáng có thể được giới hạn đến thể tích chia theo đơn vị zeptolit quanh polymeraza theo phạm vi bề mặt mà sự kết hợp các nucleotit được đánh dấu huỳnh quang có thể được quan sát được với nền thấp (Levene, M.J. và cộng sự "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations." *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist, P. M. et al. "Parallel confocal detection of single molecules in real time." *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach, J. et al. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008), các bộ lọc của tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến tài liệu này). Các hình ảnh thu được từ các phương pháp này có thể được lưu trữ, được xử lý và phân tích được đặt ra ở đây.

Một số phương án SBS bao gồm việc phát hiện proton thoát ra khi kết hợp nucleotit thành sản phẩm mở rộng. Ví dụ, trình tự dựa trên sự phát hiện của các proton thoát ra có thể sử dụng bộ phát hiện điện và các kỹ thuật kết hợp mà có mặt thương mại từ Ion Torrent (Guilford, CT, a Life Technologies subsidiary) hoặc các phương pháp và hệ thống giải trình tự được mô tả trong US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; hoặc US 2010/0282617 A1, mỗi tài liệu mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp được đề cập ở đây để

khuếch đại các axit nucleic đích sử dụng sự loại trừ động học có thể dễ dàng áp dụng cho các cơ chất sử dụng để phát hiện các proton. Cụ thể hơn là, các phương pháp được đề cập ở đây có thể được sử dụng để tạo các quần thể đơn vị siêu sao chép vô tính mà được sử dụng để phát hiện các proton.

Các phương pháp SBS nêu trên có thể được thực hiện hiệu quả trong các dạng đa môi để các axit nucleic đích khác nhau được thao tác đồng thời. Theo các phương án cụ thể, các axit nucleic đích khác nhau có thể được xử lý trong bình phản ứng thông thường hoặc bề mặt của nền cụ thể. Điều này cho phép vận chuyển thuận lợi các chất trình tự, loại bỏ các chất chưa phản ứng và phát hiện các dòng kết hợp theo cách đa dạng. Theo các phương án sử dụng các axit nucleic đích liên kết bề mặt, các axit nucleic đích có thể theo định dạng mảng. Trong định dạng mảng, các axit nucleic đích có thể là liên kết điển hình với bề mặt theo cách có thể phân biệt theo không gian. Các axit nucleic đích có thể được liên kết bằng cách phát hiện sự gắn kết cộng hóa trị, gắn vào hạt hoặc hạt khác hoặc liên kết polymeraza hoặc phân tử khác mà được gắn vào bề mặt. Mảng có thể bao gồm việc sao chép một lần của axit nucleic đích ở mỗi vị trí (cũng được gọi là dấu hiệu) hoặc sao chép nhiều lần có cùng trình tự có thể có mặt ở mỗi vị trí hoặc dấu hiệu. Sao chép nhiều lần có thể được tạo ra bằng các phương pháp khuếch đại như khuếch đại kiểu cầu hoặc PCR nhũ tương như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Các phương pháp theo sáng chế dùng kỹ thuật Illumina, Inc. để giải trình tự các thư viện hồ sơ ADN được tạo ra bằng cách thực hiện các phương pháp đề cập trong bản mô tả. Dụng cụ giải trình tự MiSeq được sử dụng để tập hợp và giải trình tự cho các ví dụ được mô tả ở đây. Tuy nhiên, như được đề cập trước đó và được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn bởi kiểu sử dụng nền trình tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây bộc lộ các phương pháp và chất dùng cho hồ sơ ADN. Các phương pháp và chất này có thể được sửa đổi trong khi duy trì nội dung và phạm vi của sáng chế. Các sửa đổi này sẽ trở nên rõ ràng đối với những người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật trên cơ sở xem xét của bản mô tả này và thực hiện các phương pháp được đề cập ở đây. Do đó, không có mục đích là các phương pháp hoặc vật liệu này bị giới hạn đối với các ví dụ cụ thể được đề cập ở đây, nhưng bao gồm tất cả các sửa đổi và thay thế mà nằm trong phạm vi và tinh thần của sáng chế.

Ví dụ 1 - Thiết kế môi không thông thường

Máy tính thiết kế chương trình DesignStudio từ Illumina, Inc. (San Diego, CA) được sửa đổi và sử dụng cho thiết kế môi. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của nguồn được hiểu là các chương trình thiết kế môi thay thế như Primer3 cũng có thể được sử dụng và thiết lập các thông số mặc định tương tự với các thông số được sửa đổi đối với thiết kế môi. Các thiết lập thường được thiết lập theo tệp tin config.xml mà đi kèm với phần mềm, tuy nhiên việc này có thể khác khi sử dụng phần mềm khác nhau và tra cứu các chất cụ thể để truy cập các thông số mặc định đối với mỗi phần mềm thường thực hiện. Các thông số sau đây có thể được thiết lập lại trong phần mềm thiết kế môi:

- 1) Đơn vị siêu sao chép có chiều dài tối thiểu mong muốn được thiết lập đến >60<
- 2) Đơn vị siêu sao chép có chiều dài tối đa mong muốn được thiết lập đến >120<
- 3) Khoảng cách cạnh tranh chập chệch được thiết lập đến >3< (mặc định là 30bp)
- 4) Mẫu dò Max %GC được thiết lập đến >60< cho phép tăng số đoạn kéo giãn lặp lại giàu.
- 5) Tm trung bình được thiết lập đến >57< (mặc định là 59°C) đến Tm trung bình thấp hơn.
- 6) Tm tối đa được thiết lập đến >60< (mặc định là 71)
- 7) Tm tối thiểu được thiết lập đến >51< (mặc định là 55)
- 8) Chiều dài mẫu dò trung bình được thiết lập đến >28< (mặc định là 27)
- 9) Chiều dài mẫu dò tối đa được thiết lập đến >38< (mặc định là 30)
- 10) Chiều dài mẫu dò tối thiểu được thiết lập đến >25< (mặc định là 22)

Đối với thiết kế các đoạn môi SNP, khoảng đi đến đầu 3' của môi được thiết lập đến "nhỏ" để giữ các đoạn môi quanh khoảng 1bp ra khỏi SNP hướng đích. Ngay

sau khi tất cả các thông số được thiết lập, chương trình thiết kế môi có thể được chạy trên trình tự để xác định các ứng viên cặp môi mà nằm dưới các thông số mới. Ví dụ, người dùng phần mềm có thể tạo ra danh sách đích mà chỉ ra rằng phần mềm nhìn vào đâu ở bộ gen để thiết kế các đoạn môi. Theo ví dụ, các vùng đích được sao chép và được dán vào ứng dụng giao diện đồ họa mà phần mềm DesignStudio được sử dụng để định hướng và tạo ra thiết kế môi. Ngay khi các vùng đích được nhập vào chương trình, chương trình hướng đến Tạo ra tệp tin thiết kế để khởi động công cụ và tạo ra các thiết kế môi. Theo ví dụ, đầu ra chính là tệp tin dạng .txt mà bao gồm các trình tự môi và/hoặc một trong các vùng chứa các lỗi và "không thể thiết kế", mà chỉ ra các trình tự đích cần được xác định lại và chạy lại ở đó. Phần mềm được sử dụng trong thử nghiệm này đã tạo ra các đoạn môi thiết kế mà được ánh xạ trên trình tự mà đặc hiệu là vùng đích. Sau các thông số thiết lập, các đoạn môi được thiết kế không tuân theo các điều kiện thông thường đối với thiết kế môi để khuếch đại; tuy nhiên nó cho phép sự khuếch đại đa môi của các STR dài và SNP ngắn.

Các ví dụ về các đoạn môi đích STR được thiết kế thuận lợi trong phương pháp được đề cập ở đây bao gồm các trình tự được liệt kê trên Bảng 1. Các ví dụ về các đoạn môi đích SNP thuận lợi trong phương pháp được đề cập ở đây bao gồm các trình tự được liệt kê trên Bảng 2.

Bảng 1 - Môi đích STR không có thể và kích cỡ đơn vị siêu sao chép.

SEQ ID NO	Môi vị trí STR	Các ví dụ về các đoạn môi STR không có thể	Kích cỡ đơn vị siêu sao chép
1	AmelPP_F_T	CCCTGGGCTCTGTAAAGAA	106, 112
2	AmelPP_R_Sm	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	
3	CSF1PO_F1_T	ACAGTAACTGCCCTTCATAGATAG	117
4	CSF1PO_R1_Sm	GTGTCAGACCCCTGTTCTAAGTA	
5	D5S818_F2_T	TGATTTTCCTCTTTGGTATCCTTATGTAAT	112
6	D5S818_R2_Sm	ACAACATTTGTATCTTTATCTGTATCCT	
7	D8S1179_F1_T	TTTGATTTTCATGTGTACATTCGTATC	110
8	D8S1179_R1_Sm	ACCTATCCTGTAGATTATTTTCACTGTG	
9	D18S51_F1_T	CTCTGAGTGACAAATTGAGACCTT	184
10	D18S51_R1_T	TTAACTTCTCTGGTGTGGAGATG	
11	D19S433_F1_T	TTTGGTGCACCCATTACCCG	188
12	D19S433_R1_Sm	AGGAGGTTGAGGCTGCAAAA	

13	D7S820_F2_T	CACCAAATATTGGTAATTAAATGTTTACTATAGAC	167
14	D7S820_R2_Sm	TAAAGGGTATGATAGAACACTTGTC	
15	D16S539_F2_T	CAAAGCAGATCCCAAGCTCT	160
16	D16S539_R2_Sm	TGTGTGTGCATCTGTAGCAT	
17	D3S1358_F2_T	TGGTGTGTATTCCCCTGTGCC	170
18	D3S1358_R2_Sm	GCAGTCCAATCTGGGTGACA	
19	D10S1248_F1_T	CCAATCTGGTCACAAACATAATTAATGAA	148
20	D10S1248_R1_Sm	TTTCCCCTTGTCTTGTATTAAAGGAAC	
21	TH01_F1_T	TTCCCATTGGCCTGTTCCTC	112
22	TH01_R1_Sm	CTGTACACAGGGCTTCCGAG	
23	FGA_F2_T	GCTGAGTGATTGTCTGTAAATG	188
24	FGA_R2_Sm	GAACTCACAGATTAAACTGTAAACCAAAATAAAATTAG	
25	D61043_F1_T	CAATAGTGTGCAAGGATGGGTG	175
26	D61043_R1_Sm	TCTGTGGTTCTCCAGCTTAC	
27	TPOX_F1_T	CTTAGGGAACCCCTCACTGAATG	77

28	TPOX_R1_Sm	GTCCTTGTCAGCGTTTATTGCG	
29	D13S317_F2_T	TTGGGTTGAGCCATAGGCAG	162
30	D13S317_R2_Sm	GCATCCGTGACTCTCTGGAC	
31	D21S11_F1_T	GTTATGGGACTTTTCTCAGTCTCCAT	226
32	D21S11_R3_Sm	GAGACTAATAGGAGGTAGATAGACTGG	
33	D12S391_F1_T	GAGACTGTATTAGTAAGGCTTCTC	253
34	D12S391_R2_Sm	CCTGGACTGAGCCATGCTCC	
35	D1S1656_F2_T	CAGTCCTGTGTAGTCAGGATTC	173
36	D1S1656_R1_Sm	TCAAGGGTCAACTGTGTGATGT	
37	D9S1122_F3_T	CTTCTGAAAGCTTCTAGTTTACCT	120
38	D9S1122_R2_Sm	TTGCTTATTGTGGGGGTATTCA	
39	PentaE_F1_T	AAGAATTCTCTTATTGTGGTTATTAATTG	362
40	PentaE_R1_Sm	AAATTGTGGACAGGTGCGGT	
41	D17S1301_F2_T	CCATGTAAAAATACATGCATGTGTTTATTATAC	142
42	D17S1301_R2_Sm	TGATTAAAAAAGAAATGAAGGTAAAAATGTGTATAAC	

43	D2S441_F2_T	CCAAATGTTTATGATTAACTCTTTTAAATTGGAGC	160
44	D2S441_R3_Sm	GTAAACAAGGGCTACAGGAATCATGAG	
45	D4S2408_F3_T	TCATCCACTGAAATGACTGAAAAATAG	102
46	D4S2408_R9_Sm	AGGTACATAACAGTTCAATAGAAAG	
47	D2S1338_F2_T	GAGTTATTCAGTAAGTTAAAGGATTGCAG	162
48	D2S1338_R2_Sm	GGAGCCAGTGGATTGTGAAACAG	
49	PentaD_F3_T	GCATGGTGAGGGCTGAAGTAG	268
50	PentaD_R1_Sm	CTAACCTATGGTCATAACGATTTT	
51	vWA_F3_T	GATGATAAGAAATAATCAGTATGTGACTTGG	160
52	vWA_R3_Sm	ATAGGTTAGATAGAGATAGGACAGATGATA	
53	SE33_F1_T	CCCTACCGCTATAGTAACTTGC	380
54	SE33_R2_Sm	CACGTCGTGTAATTCCAGCTCCTA	
55	D20S482_F3_T	GGAAGCGTGTACTAGAGTTCTTCAG	145
56	D20S482_R2_Sm	GGACAGCCTCCATATCCACATG	
57	DXS10074_F1_T	TTCTACTGCCCCACCTTTATTG	212

58	DXS10074_R1_sm	TTTATGGTCTCAGTGCCCCCTCAGA	
59	DXS10103_F1_sm	TCATAATCACATATACATGAGC	177
60	DXS10103_R1_T	AAACAGAACCAAGGGAATGAA	
61	DXS10135_F1_T	TGAAACTAAAGTCAAAATGGGGCTAC	268
62	DXS10135_R1_sm	TAAGGGGTGACACCTCTCTGGATA	
63	DXS8377_F2_sm	CCCAGCCTACATCTACCACTTCATG	276
64	DXS8377_R2_T	CTAATGTTCGTATGGACCTTTGGAAAGC	
65	DXS7423_F1_sm	GTCTCCAGTACCCAGCTAGCTTAG	191
66	DXS7423_R1_T	TCTCCCAACCTGCCCTTATCA	
67	DXS8378_F1_sm	TTTGGGCTGACACAGTGGCT	442
68	DXS8378_R1_T	TTGATCAACACAGGAGGTTTGACC	
69	HPRTB_F1_sm	TATACCACTTTGATGTTGACACTAGTTTAC	213
70	HPRTB_R1_T	CCTGTCTATGGTCTCGATTCAAT	
71	DXS10148_F3_sm	TGCATGACAGAGGGAGATTCT	256
72	DXS10148_R3_T	AGAGGGGAAATAGTAGAATGAGGATG	

73	DXS7132_F3_sm	GCCAAACTCTATTAGTCAACGTTTC	204
74	DXS7132_R4_T	CTGGTTCTCTAGCTCACATACAGT	
75	DYF387S1ab_F2_T	TTTACCCCTAACAAAGAAAAAAGAGAA	227,231
76	DYF387S1ab_R2_Sm	CAGTGTGAGAAAGTGTGAGAAAGTGC	
77	DYS385a_b_F1_T	GACACCATGCCAAACAACAAC	260,248
78	DYS385a_b_R1_Sm	ATCTATCTATTCCAATTACATAGTCC	
79	DYS389I_II_F3_T	TCATTATACCTACTTCTGTATCCAACTCTC	183,303
80	DYS389I_II_R3_Sm	GGAACACAATTATCCCTGAGTAGCAG	
81	DYS390_F2_T	GGTAGCATAATAGAAATTTTATGAGTGGG	318
82	DYS390_R2_Sm	GAAGACAGACTTCAATATCACAGAACATCG	
83	DYS391_F1_T	GTGTATCTATTCAATTCATACACACC	143
84	DYS391_R1_Sm	CTCCCTGGTTGCAAGCAATTGCC	
85	DYS438_F1_T	CCAAAAATTAGTGGGGAATAGTTGAAC	149
86	DYS438_R2_Sm	GTCGAGATCACACCATTTGCATTC	
87	DYS439_F1_T	GCCTGGCTTGGAATTCTTTTACCC	195

88	DYS439_R1_Sm	TTTAAGTCTTTAATCTATCTTGAATTAATAGATTTC	
89	DYS481_F1_T	CTTTAAGAGGAGTCTGCTAAAAGGAATG	144
90	DYS481_R3_Sm	TCACCAGAAAGGTTGCAAGAC	
91	DYS505_F1_T	TCTGGCGAAGTAACCCAAAC	174
92	DYS505_R1_Sm	TCGAGTCAGTTCACCAGAAGG	
93	DYS522_F2_T	GGAAACCAGTGAGAGCCG	306
94	DYS522_R2_Sm	CTCAGAGTGCTGAACCCAG	
95	DYS533_F2_T	GTATTATTCATGATCAGTCTTAACTCAACC	206
96	DYS533_R2_Sm	CTACCTAAATATTTATCTATATCATCTCTAATTATGTCTCTTC	
97	DYS549_F1_T	CTCTAAAGGTTTTTTTTTGGTGGCATAAG	222
98	DYS549_R1_Sm	GATTAATACAAACAAAAATTTGGTAATCTGAAA	
99	DYS570_F1_T	CAACCTAAGCTGAAATGCAGATATTC	170
100	DYS570_R1_Sm	GTTATGAAACGTAAAATGAATGATGACTAG	
101	DYS576_F2_T	GCAGTCTCATTTCCCTGGAGATGAAGG	191
102	DYS576_R1_Sm	CTTGGGCTGAGGAGTTCAATC	

103	DYS612_F2_T	GCCAGTAAGAAATAAAATTACAGCATGAAG	287
104	DYS612_R2_Sm	GAATAATCTACCAGCAACAATGGCT	
105	DYS635_F4_T	TGCCCCAATGGAATGCTCTCT	274
106	DYS635_R2_Sm	GCTCCATCTCAAAACAACAAAAACACAAAAAATG	
107	DYS643_F2_T	GGGTCATTGAACCTCATGCTCTG	170
108	DYS643_R1_Sm	CCCCCAGAAATTCTACTGAAGTAA	
109	Y_GATAH4_F2_T	TAACAGGATAAATCACCTATCTATGTAT	175
110	Y_GATAH4_R2_Sm	GCTGAGGAGAAATTTCCAAATTTA	

Bảng các đoạn mỗi đích 2-SNP

SE Q ID NO	Mỗi SNP	Các ví dụ về mỗi SNP không có thể
111	rs10092491_iSNP1_T_F2	CCCGCAAACCTAACTAGGATAAATCTCTA
112	rs1015250_iSNP1_T_F	CGACATGGGAAATGTCAGATCATAAGAC
113	rs1024116_iSNP1_T_F2	CCAGGGAGTGAAAAATCCTTTTATCATC
114	rs1028528_iSNP1_T_F2	GAGGATGAAGGTTAGAGCCAGACCT
115	rs1029047_iSNP1_T_F2	TGTGGAATAAACTGAAGGCTAAAGAAAA
116	rs1031825_iSNP1_T_F2	CAAGCCCTATGCCAAGGATATAACAATG
117	rs10488710_iSNP1_T_F	GAGGTTTTACTGTATTAGGAGTTCCAC
118	rs10495407_iSNP1_T_F	CAGATGTGAGATGATAATTTTCGTTCTCC
119	rs1058083_iSNP1_T_F	TTGTTCTTCTCCATCCCATTTCACCC
120	rs10773760_iSNP1_T_F	CTTGATACATTCCCTTATCTGCTATGTGG
121	rs1294331_iSNP1_T_F2	CTCTCTTTGGAGTTTTATGTGTTGCTAC
122	rs12997453_iSNP1_T_F	CTCTGATGATGTGCAAGAAAGGTAGGTA
123	rs13182883_iSNP1_T_F	TCAGACTATGTTTTAAGGAGACTATGAGG
124	rs13218440_iSNP1_T_F	CTAAGTATCTACCAATGTGCTACGTACC
125	rs1335873_iSNP1_T_F	CACGTGGATGATATGGTTTCTCAAGG
126	rs1336071_iSNP1_T_F2	AGCACCTATATATTATACCTGAAAGCAT
127	rs1355366_iSNP1_T_F	CCCATGATTTTCTTGTGGTGAGAATTTC
128	rs1357617_iSNP1_T_F	CACCCTCTGTACTTTAATTTGACTTCCC
129	rs1382387_iSNP1_T_F	GTTTTTCTTCATTCCCATGTTGTGTAC

130	rs1413212_iSNP1_T_F	CACTCTTCTGAATCCTGGTCAACAAC
131	rs1454361_iSNP1_T_F	CAAGTTATATCATAGAGTCTACGACCCC
132	rs1463729_iSNP1_T_F	CTGCAACTATCAGTCTCTGCCCTTATTC
133	rs1493232_iSNP1_T_F	GATGTGTCTCAAACGTGTTTATTGTGAGG
134	rs1498553_iSNP1_T_F	GAACTCATTTATCCAGAGACCTGTTCTC
135	rs1523537_iSNP1_T_F	CATAATACAACCTGTCTTTGGAGTTACT
136	rs1528460_iSNP1_T_F	GTGACCAGTAGTTCTATGAGCAAGTATG
137	rs159606_iSNP1_T_F	CCACATTGTATGGTTTTTAGGCACCATG
138	rs1736442_iSNP1_T_F	CTAATAAGTGGGACAGTTAAGAGAAGGC
139	rs1821380_iSNP1_T_F	CAAGACAAGCGATTGAAAGAAGTGGAT
140	rs1886510_iSNP1_T_F	CCTTGTC AATCTTTCTACCAGAGGGTAA
141	rs1979255_iSNP1_T_F	GAATCATAGCTTGTGTTGGTCAGGG
142	rs2016276_iSNP1_T_F	GAATTACAAGTATTTGCATCCCAGCCT
143	rs2040411_iSNP1_T_F	GACCAACTTGGCTTTAACAGATGCAAAT
144	rs2046361_iSNP1_T_F2	TCCTTACCTTTAAGACTTTTCCTATTTG
145	rs2056277_iSNP1_T_F2	CATTATCTCGTCATACTTCCCTGTCTTG
146	rs2076848_iSNP1_T_F	GCATCAAATTCACCAGTGAAATTATTGA
147	rs2107612_iSNP1_T_F	ATGAGTACATTATTCAACTGTTTTGGAG
148	rs2111980_iSNP1_T_F	CAGCCATGTTGTAAACATTTTTACGGTC
149	rs214955_iSNP1_T_F	GCACATTCTAAGAACTGGTGATTCTATC
150	rs221956_iSNP1_T_F	GCTAGAAAAAGCTGAGATAGCTGTGAAG
151	rs2342747_iSNP1_T_F	CCTTGAAGCTCATTCTTTGTTGTCCC
152	rs2399332_iSNP1_T_F	CTGGACACCAGACCAAAAACAAATAACC
153	rs251934_iSNP1_T_F	GTAATTAGAGGGCAGTGAGGCTTTTAA

154	rs279844_iSNP1_T_F	CTCCAGAAGCTACTGGGATATTAATTAG
155	rs2830795_iSNP1_T_F	TGAGCCAAATCAGCAATATAATAGGACT
156	rs2831700_iSNP1_T_F	CCTAGAACCACAATTATCTGTCTTTGGC
157	rs2920816_iSNP1_T_F2	CCATTGATTCTCTACAGTTCTGCAGGTA
158	rs321198_iSNP1_T_F	CTCCACACTTTATACAGGTGAAATCTGA
159	rs338882_iSNP1_T_F	CATTTTCTCTCCTTCTGTCTCACCTTC
160	rs354439_iSNP1_T_F	GCTTCTCTTCCCTTATGTATCTCTCTC
161	rs3780962_iSNP1_T_F	GGCTTTTGAAGAAAAACACTAACCTGTC
162	rs430046_iSNP1_T_F	CACCTATGGGCTCTTCTTATTTCTCC
163	rs4364205_iSNP1_T_F	CATTTGATAGCCATTTGGGTTGTTTCCA
164	rs445251_iSNP1_T_F	CCATCACACTATCCTGACATGAACAAAT
165	rs4606077_iSNP1_T_F	GAAGATTTGCATCCCAGTGAAAGCAC
166	rs560681_iSNP1_T_F	GCACTTCATAAAGAATCAGTCAGGATGC
167	rs6444724_iSNP1_T_F	GGAGAATCAGGAAATAGTCACTTCCTAC
168	rs6811238_iSNP1_T_F	CATTTGACCTTCTAGCCAAATGAAGTAC
169	rs7041158_iSNP1_T_F	GGAATTTCTGAGAATAACATTGCCTCTC
170	rs717302_iSNP1_T_F	CATATGTTGGGGGAGCTAAACCTAATGA
171	rs719366_iSNP1_T_F	CACTGTGACCACAGCATCTTTTAACTC
172	rs722098_iSNP1_T_F2	GGGTAAAGAAATATTCAGCACATCCAAA
173	rs722290_iSNP1_T_F	GAGTATCCCTTATCTAAAATGCTGGTCC
174	rs727811_iSNP1_T_F	CTTTTCTCTTACCGGAACCTCAACGAC
175	rs729172_iSNP1_T_F	CCTCATTAATATGACCAAGGCTCCTCTG
176	rs733164_iSNP1_T_F	TGACTCTAATTGGGGATGTGGTAATTAG
177	rs735155_iSNP1_T_F	GACCTAACCTGGAGAAAACCGGAGA

178	rs740598_iSNP1_T_F	GTTTCTCTTCTCTGAACCTTTGTCTCAG
179	rs740910_iSNP1_T_F	GCAAACACACAAAGATAGGTTTCGAGTTT
180	rs763869_iSNP1_T_F	CATATCAAGTGCTTTCTGTTGACATTTG
181	rs8037429_iSNP1_T_F	CTGAAAAGTGCTACGTAAGAGGTCATTG
182	rs8078417_iSNP1_T_F	CATCTGAGTGTGAGAAGAGCCTCAA
183	rs826472_iSNP1_T_F2	CCCAGCAAAAACCTTCTTTTCTCCAGTAA
184	rs873196_iSNP1_T_F	GCTAGGAAAGTTTTCTCTCTGGTTCACA
185	rs876724_iSNP1_T_F	GAATATCTATGAGCAGGCAGTTAGCAG
186	rs891700_iSNP1_T_F2	CTAATCAGTGTCCTATGTGTGAGCTAT
187	rs901398_iSNP1_T_F	CATCATACAGACTCAAGGAGCTTAGCTG
188	rs907100_iSNP1_T_F	CTTCCAAGCCTTGGAACACAGAAAA
189	rs914165_iSNP1_T_F	GTACCTTATAAATCACGGAGTGCAGAC
190	rs917118_iSNP1_T_F	CAAGTGGTAAGAGATGACTGAGGTCAA
191	rs938283_iSNP1_T_F	CTTCTTCTCTTAGAAGGACACTGGTCAG
192	rs964681_iSNP1_T_F	GTTATGGAGGATTGGTAAGAACCAGAG
193	rs987640_iSNP1_T_F	GAGCTGTTTAAGGGTAAAGGGGTAGTTA
194	rs9905977_iSNP1_T_F	GCAGACAAAACCATGACAATGATCTTAG
195	rs993934_iSNP1_T_F	CCCATGATGAAACAGTTTGCCTAAATG
196	rs9951171_iSNP1_T_F	CTCAATTTTCTTGTCCCTGCTTTCATG
197	rs10092491_iSNP1_S_R2	TTAGAAATTCCAGATAGAGCTAAACTG
198	rs1015250_iSNP1_S_R	GTTAGGAAAAGAACCAGGTGTTTT
199	rs1024116_iSNP1_S_R2	GCAAAAAGTAAATACAAAGGCATACTTT
200	rs1028528_iSNP1_S_R2	CAATGCAAAAAGAAAGGTCCTTACTCGAC
201	rs1029047_iSNP1_S_R2	CATTTCTAAACTCTAAAACAAACATTTG

202	rs1031825_iSNP1_S_R2	GGTCCTTAACCTATTAAATTTTAATGAG
203	rs10488710_iSNP1_S_R	GACTTTCAATTTATGTCAGCATTTAAAA
204	rs10495407_iSNP1_S_R	CCTCTTGGTTGCATTGGATTCTCATTG
205	rs1058083_iSNP1_S_R	TCTCCATGAAACTTGGGTTAATTTTGC
206	rs10773760_iSNP1_S_R	TGTCTGGAAGTTCGTCAAATTGCAG
207	rs1294331_iSNP1_S_R2	GTAGCATAAAACATTCCAAAAATTCAAT
208	rs12997453_iSNP1_S_R	TGCTTTAAAGATACAGGTTATCTGTATTAC
209	rs13182883_iSNP1_S_R	CTCTCCGTTACTTTCTTCCTGCCTTT
210	rs13218440_iSNP1_S_R	GATCCTGAGATTCACCTCTAGTCCCT
211	rs1335873_iSNP1_S_R	CCGTACCAGGTACCTAGCTATGTACT
212	rs1336071_iSNP1_S_R2	CTTTCTGTTTTGTCCATCTGAAATTCT
213	rs1355366_iSNP1_S_R	CAAAGTTAAGTATCACCATCCAGCTGG
214	rs1357617_iSNP1_S_R	ATAGGGATAGCTGATAAGAAACATGACC
215	rs1382387_iSNP1_S_R	CTTAATAAGACGCTGCATCTGCCCA
216	rs1413212_iSNP1_S_R	TCCAGGAGACATTTGTTTCATATAAGTGA
217	rs1454361_iSNP1_S_R	AGACACTTTTCAGTATCCATTTAGAAAC
218	rs1463729_iSNP1_S_R	GTTTCACATGTGCATGCTTTTGGGT
219	rs1493232_iSNP1_S_R	CCAAAGCTATTCTCTCTTTTGGGTGC
220	rs1498553_iSNP1_S_R	GAAAGTTCACTTCAGATGTTCAAAGCC
221	rs1523537_iSNP1_S_R	GGGTTTCAGTCTGCAACAAGATCTTG
222	rs1528460_iSNP1_S_R	TGGAGATCAATATTTAGCCTTAACATAT
223	rs159606_iSNP1_S_R	GACTGTTTCTCATCCTGTTATTATTTGT
224	rs1736442_iSNP1_S_R	AACACACAGAAACATCAAGCTGAGC
225	rs1821380_iSNP1_S_R	TTCCTGACATTCTCCTTCTTCTATCTG

226	rs1886510_iSNP1_S_R	TATGACGCCTGGATTTTCACAACAAC
227	rs1979255_iSNP1_S_R	CAGAGACTATGGATGGTATTTAGGTCAA
228	rs2016276_iSNP1_S_R	ACTTTGTGTGGCTGAGAGAGAGAAA
229	rs2040411_iSNP1_S_R	TGAGTGTTCCTCTGTATTTTCTTACTCTAAG
230	rs2046361_iSNP1_S_R2	ATTTTTGGTCATTGTTGACACTTCACC
231	rs2056277_iSNP1_S_R2	GGTGTTAGGGAGACAGGCATGAATG
232	rs2076848_iSNP1_S_R	TGAAACTTTTCAACTCTCCTACCGCC
233	rs2107612_iSNP1_S_R	GTAAAATTGCCACTAATTATGTGTTTT
234	rs2111980_iSNP1_S_R	AACTGATCCTATGCAGCAAGATCTTTG
235	rs214955_iSNP1_S_R	GATGCTTGCAAACAAAGACTGAAAAGG
236	rs221956_iSNP1_S_R	GTCTGTGTGTCCTCTGAGATGATGAATG
237	rs2342747_iSNP1_S_R	GGGAGGAAGAAAACAGAGAGTCTTGA
238	rs2399332_iSNP1_S_R	AGTTTGTTGGCTTCTTTTGAGAAGTATC
239	rs251934_iSNP1_S_R	GGCAGATGAAGTAGTAGATATCTGGCTG
240	rs279844_iSNP1_S_R	G TTCAGTGTCAATTTTGACCAGATATT
241	rs2830795_iSNP1_S_R	AGACATAGGACACACCATTTTATTGTCT
242	rs2831700_iSNP1_S_R	TCAAAATATTTGGCTAAACTATTGCCGG
243	rs2920816_iSNP1_S_R2	CTGGAGTTATTAATAAATTGGATTATATAGC
244	rs321198_iSNP1_S_R	TTACCTGTTTTCTTTTTGTGATTCCAC
245	rs338882_iSNP1_S_R	ACCAAGTCAAGAGCTCTGAGAGACAT
246	rs354439_iSNP1_S_R	ACAGTGAATGATATTCAGAATATTGTGC
247	rs3780962_iSNP1_S_R	GAACAAGGTCAAGATATCAGCTTTCACC
248	rs430046_iSNP1_S_R	AGGTCATACAATGAATGGTGTGATGT
249	rs4364205_iSNP1_S_R	ATCCACCCATGAGAAATATATCCACAA

250	rs445251_iSNP1_S_R	ACAATTCAAATTAATGTAAAACTGCAAGTG
251	rs4606077_iSNP1_S_R	TAGTTCTAGTGTGGGATCTGACTCC
252	rs560681_iSNP1_S_R	GAACATCTGTTTCAGGTTTCTCTCCATC
253	rs6444724_iSNP1_S_R	GAAAGGACTAAATTGTTGAACACTGGT
254	rs6811238_iSNP1_S_R	TGTGTGTTTTAAAGCCAGGTTTGTT
255	rs7041158_iSNP1_S_R	GATGGACTGGAAGTGGAGGATTTTCA
256	rs717302_iSNP1_S_R	AGCTTTAGAAAGGCATATCGTATTAAGT
257	rs719366_iSNP1_S_R	TTATAGTGAGTAAAGGACAGGCCCC
258	rs722098_iSNP1_S_R2	ACACATCTGTTGACAGTAATGAAATATCC
259	rs722290_iSNP1_S_R	GTTTAAACTTGGATACCATCCCCAAGAC
260	rs727811_iSNP1_S_R	ATGAGATTGCTGGGAGATGCAGATG
261	rs729172_iSNP1_S_R	CACATTTCCCTCTTGCGGTTACATAC
262	rs733164_iSNP1_S_R	GACAAGCCTCGCTTGAGTTTTCTTT
263	rs735155_iSNP1_S_R	TGTGAGAGTGTACACGAATTCAACG
264	rs740598_iSNP1_S_R	AAATAGCAATGGCTCGTCTATGGTTAG
265	rs740910_iSNP1_S_R	TGCTAAGTAAGGTGAGTGGTATAATCA
266	rs763869_iSNP1_S_R	ATAAATATGATGTGGCTACTCCCTCAT
267	rs8037429_iSNP1_S_R	GCTACACCTCCATAGTAATAATGTAAGAG
268	rs8078417_iSNP1_S_R	TGAAGCAGCTAGAGAACTCTGTACGT
269	rs826472_iSNP1_S_R2	TTTTGTCTCTGTTATATTAGTCACCTATCTC
270	rs873196_iSNP1_S_R	ATAGCCCTGCATTCAAATCCCAAGTG
271	rs876724_iSNP1_S_R	TCCATTTTTATACCACTGCACTGAAG
272	rs891700_iSNP1_S_R2	GCAGTAAAACATTTTCATCAAATTTCCA
273	rs901398_iSNP1_S_R	TCTGGGTGCAAAGTCTGAATATCAG

274	rs907100_iSNP1_S_R	GAAAATCTGGAGGCAATTCATGATGCC
275	rs914165_iSNP1_S_R	ATACAATGATGATCACACGGGACCCT
276	rs917118_iSNP1_S_R	CCATGAAGATGGAGTCAACATTTTACA
277	rs938283_iSNP1_S_R	TCCTAACCCCTAGTACGTTAGATGTG
278	rs964681_iSNP1_S_R	GAGGTGATTTCTGTGAGGAACGTCG
279	rs987640_iSNP1_S_R	GTACATTCACTTAACAGGCTCTCTTTCC
280	rs9905977_iSNP1_S_R	AATTCATGAGCTGGTGTCCAAGGAG
281	rs993934_iSNP1_S_R	ATAACAGTCTCCAGAGTATATTAGCTTAG
282	rs9951171_iSNP1_S_R	GTTCTCTGGGATGCAACATGAGAG
283	rs10497191_aSNP1_T_F	GAAAGGATGAAGAGGGTGGATATTGGAG
284	rs1079597_aSNP1_T_F	CCAAACCTCATCATCTCTTACCTGGATT
285	rs11652805_aSNP1_T_F	GTCCAAAGTCAAGTGCAAGTATAGTTGG
286	rs1229984_aSNP1_T_F	ACAATCTTTTCTGAATCTGAACAGCTTC
287	rs12439433_aSNP1_T_F	CAAAGGAAGGCATTTCTTAATGATCTTC
288	rs12498138_aSNP1_T_F	CTTTGCTTTGCTTTTCTTCTTCAGGGAA
289	rs12913832_pSNP1_NU_T_F	CTGCTTCAAGTGTATATAAACTCACAGT
290	rs1426654_aSNP1_T_F	CCTAGGAAAGCAGTAACTAATTCAGGAG
291	rs1462906_aSNP1_T_F	GCAATTTGTTCACTTTTAGTTTCGTAGC
292	rs1572018_aSNP1_T_F	GGCCTAATATGCATGTGTTTCATGTCTCT
293	rs16891982_aSNP1_T_F	CAGAGTTTCTCATCTACGAAAGAGGAGT
294	rs174570_aSNP1_T_F	ATCCTAGACCTCCAGGTGGAATGATC
295	rs17642714_aSNP1_T_F	CTTGGCTGTCTCAATATTTTGGAGTAAG
296	rs1800414_aSNP1_T_F	GAGTAAATGAGCTGTGGTTTCTCTCTTA
297	rs1834619_aSNP1_T_F	CTTTCCATGTGGACCCTTTAACATTCAG

298	rs1876482_aSNP1_T_F	GCATAGTGAGCTGTTGATAGAGCTTTTG
299	rs1919550_aSNP1_T_F	CTAGAACAAAATCATTGGCTCTCCTAGT
300	rs192655_aSNP1_T_F	GTCTGGTGAGTACTGGCTGAATGTAAA
301	rs200354_aSNP1_T_F	CCAGAGGATGCTGCTAAACATTCTACAA
302	rs2024566_aSNP1_T_F	GCTCATGCCTGGAATTCACCTTTATTTT
303	rs2042762_aSNP1_T_F	CTAACTAGACATTTGGGCCACCTTACTT
304	rs2166624_aSNP1_T_F	GTCTATGGTGCCTATAGAATGTACAGGT
305	rs2196051_aSNP1_T_F	CCCTCTCAAGTTTGTGAGCAAATATCAC
306	rs2238151_aSNP1_T_F	CTCTATCTTGCTGCAATGGACTTTCC
307	rs260690_aSNP1_T_F	CCTAGAAACAGATTTTGAAGGGCTCTTG
308	rs2814778_aSNP1_T_F	AAATGAGGGGCATAGGGATAAGGGA
309	rs310644_aSNP1_T_F	CCTAGAAATCTGATACGTTATCCTATGA
310	rs3737576_aSNP1_T_F	AGGAGAGATATATTCAACATGAACCCAA
311	rs3811801_aSNP1_T_F	GAACATCTCTGACCAGAAATTTCCAGTA
312	rs3823159_aSNP1_T_F	GTGTAGTGAAATCCTTAGACTTAGGTAA
313	rs3916235_aSNP1_T_F	AATACATGAAAAAGTAATACATGGGGCA
314	rs4471745_aSNP1_T_F	ATTAAATGTTTACTTCTATCTACAAGGA
315	rs4833103_aSNP1_T_F	CATTTTGTGAAATGCAAAGGGCAAATCT
316	rs4891825_aSNP1_NU_T_F	GCTGAGAGGCTTAATTCCATCAAGATGA
317	rs4918664_aSNP1_NU_T_F	CCCATCCTAAACTTAGTTTTATGGGCAG
318	rs6754311_aSNP1_T_F	GTAACACATTCTCTTTGGGAAGCTAGC
319	rs6990312_aSNP1_NU_T_F	CTTAGCTTCAGTGAAAATGGTTCCTCTC
320	rs7226659_aSNP1_NU_T_F	CTTTCTTAGCTCCTCTCCATTTCTCTTC
321	rs7326934_aSNP1_NU_T_F	GTCTATGCAGTGCTTCACTGAGGATTAT

322	rs735480_aSNP1_NU_T_F	CTCTATCTGCTCAGAGCCTGCTTAAAAG
323	rs7554936_aSNP1_NU_T_F	GGAAAGGATACAGTGTTGAGCAAGATAG
324	rs7657799_aSNP1_NU_T_F	GCCAACTTGATTCTCTTTCAAATGCTTG
325	rs7722456_aSNP1_T_F	AGATGGGGTTTACCATGTTTCCCAG
326	rs798443_aSNP1_T_F	GTACAGTAGTTAGTTTCCAGACTGATGA
327	rs7997709_aSNP1_T_F	GTAAATATCTAACTGTGTTTCCCTCAGT
328	rs870347_aSNP1_T_F	GAACCAAAAGGAATTAAGAGACTAGGGG
329	rs917115_aSNP1_T_F	CTGCTTTTACGGCTTCTTCCTTTCTTC
330	rs10497191_aSNP1_S_R	CCCACATCCTTCCCATTATAGGCAA
331	rs1079597_aSNP1_S_R	TACATGATCCTAAGGGCAGCAGGAA
332	rs11652805_aSNP1_S_R	GTTTGGTGCATCCTCTTTCTCTCTC
333	rs1229984_aSNP1_S_R	GACTGTAGTCACCCCTTCTCCAACA
334	rs12439433_aSNP1_S_R	AGAGTGAAATACATAGAAAAGAACTTAAAG
335	rs12498138_aSNP1_S_R	ATTTGCGAGAAACAGATAAATATTGAAG
336	rs12913832_pSNP1_NU_S_R	ACAGGAACAAAGAATTTGTTCTTCATGG
337	rs1426654_aSNP1_S_R	CCTTGGATTGTCTCAGGATGTTGCA
338	rs1462906_aSNP1_S_R	CTGGGATGTTTGTGTTTGGCTTTGTG
339	rs1572018_aSNP1_S_R	ATTGGTAGTACACTAATGGATATATGTGAG
340	rs16891982_aSNP1_S_R	GAATAAAGTGAGGAAAACACGGAGTTG
341	rs174570_aSNP1_S_R	GAGAGAGGCAGAAAGGAGGGATGAA
342	rs17642714_aSNP1_S_R	TACTCTGTCTTCAGTAGCTGTTTCTTGG
343	rs1800414_aSNP1_S_R	TTAGACTCACCAAGATCAAGATGAATGC

344	rs1834619_aSNP1_S_R	ATCTCAATAAAGCTGTTCAAAACAGAAAG
345	rs1876482_aSNP1_S_R	TAAAGAAAATGCCATGGGCTGTACCC
346	rs1919550_aSNP1_S_R	ATTGTGCAGCAGAACAGAGTGTAGTG
347	rs192655_aSNP1_S_R	ATTCTTTGCATAGCTCACGAAATTTCCC
348	rs200354_aSNP1_S_R	AAAATGAGACCTCGTATCTTTGCAGC
349	rs2024566_aSNP1_S_R	AAATGCAGAACTGCCAAAAGAAACCC
350	rs2042762_aSNP1_S_R	GAGAATCTGTGAATGCCAGGGTCTG
351	rs2166624_aSNP1_S_R	ATGGATTTCATGTTTCAGACATCTAATT
352	rs2196051_aSNP1_S_R	ATCACTAGAAAAGAAAAGAGTTCCTATTC
353	rs2238151_aSNP1_S_R	GAAGTTTAAAAGAGTGGGAACATGGGG
354	rs260690_aSNP1_S_R	CTACGTAAGCAAAAATGATCACGCAC
355	rs2814778_aSNP1_S_R	AACCTGATGGCCCTCATTAGTCCTT
356	rs310644_aSNP1_S_R	CACCAGATTTCTAGGAATAGCATGTGAG
357	rs3737576_aSNP1_S_R	AAGAGCATAGTGAGGGGTTAGACCT
358	rs3811801_aSNP1_S_R	CTTTATATTTAGTGTAGAGATCAGTCTCC
359	rs3823159_aSNP1_S_R	TGAGTCCTTTACCTAATCTTGGTTGTC
360	rs3916235_aSNP1_S_R	AATCCAAAGCAACTCTCTTTTCACCAC
361	rs4471745_aSNP1_S_R	TTTACTGGAACCCTGATTTTGTGTTGA
362	rs4833103_aSNP1_S_R	TGCCACTGATATATCAGTACCTGAGT
363	rs4891825_aSNP1_NU_S_R	ACAATCTCAATCCCCCTTAATGTTTTTC
364	rs4918664_aSNP1_NU_S_R	GTGGGCAGAGAGAGTAAGAGAACCT
365	rs6754311_aSNP1_S_R	CAAACCAGATTCTGGCAGAATAGTTAGC
366	rs6990312_aSNP1_NU_S_R	CTTCTCTCCCATCCTCCTTCTCCAC
367	rs7226659_aSNP1_NU_S_R	AGATCAAGGGATCTGTGGGACAATAAC

368	rs7326934_aSNP1_NU_S_R	GGGGAGTGATTTCAAGCATCCTGATT
369	rs735480_aSNP1_NU_S_R	CATGAGTTTGAGGTAAGATGAAGGAGA
370	rs7554936_aSNP1_NU_S_R	TCTCTCTCATCCTAGTGAATGCCATC
371	rs7657799_aSNP1_NU_S_R	GGGTGATGATCTACCTTGCAGGTATA
372	rs7722456_aSNP1_S_R	CTCAAGGCCCTGGGTCTGAAATTAC
373	rs798443_aSNP1_S_R	ACATCTCCAGTTAATAATTTCCACTAAC
374	rs7997709_aSNP1_S_R	TGGATTGCTCAACAAATAGTGCTAAAA
375	rs870347_aSNP1_S_R	CATGCGACATCCAGGTAGCTAAAATAC
376	rs917115_aSNP1_S_R	ATGGATAAAAATGGAAGTTTCAAGAGAA
377	rs12203592_pSNP1_T_F	GTTTTATGTAAAGCTTCGTCATATGGCT
378	rs12821256_pSNP1_T_F	GTTCCAAGTTAGTCATAAAGTTCCTGG
379	rs12896399_pSNP1_T_F	GGGTCTTGATGTTGTATTGATGAGGAAG
380	rs1393350_pSNP1_T_F	CCTAACAGAAAGTCACTGTTTGTATCTG
381	rs1800407_pSNP1_T_F	TCACTCTGGCTTGTACTCTCTCTGTG
382	rs2378249_pSNP1_T_F	GGCTGGTTTCAGTCTGGAGACTTTATTT
383	rs2402130_pSNP1_T_F	CTTCACCTCGATGACGATGATGATGAT
384	rs4959270_pSNP1_T_F	GACAATAACAGCACAAAGGATGGAAAAG
385	rs1805009_pSNP1_T_F	GAACCAGACCACACAATATCACCAC
386	rs28777_pSNP1_T_F	TCTACCTCTTTGATGTCCCCTTCGATAG
387	rs16891982_pSNP1_T_F	CAGAGTTTCTCATCTACGAAAGAGGAGT
388	rs683_pSNP1_T_F	CCCAGCTTTGAAAAGTATGCCTAGAACT
389	rs12913832_pSNP1_T_F	CTGCTTCAAGTGTATATAAACTCACAGT
390	rs12203592_pSNP1_S_R	TTGTTTCATCCACTTTGGTGGGTAAAAG
391	rs12821256_pSNP1_S_R	TAATTAAGCTCTGTGTTTAGGGTTTTT

392	rs12896399_pSNPl_S_R	CAATTCTTTGTTCTTTAGGTCAGTATAT
393	rs1393350_pSNPl_S_R	TACTCTTCCTCAGTCCCTTCTCTGC
394	rs1800407_pSNPl_S_R	TGAGACAGAGCATGATGATCATGGC
395	rs2378249_pSNPl_S_R	GCACAAGTCTAGGAACTACTTTGCAC
396	rs2402130_pSNPl_S_R	GAAGTATTTGAACCATACGGAGCCC
397	rs4959270_pSNPl_S_R	TGAGGAACACATCCAAACTATGACAC
398	rs1805009_pSNPl_S_R	TTTCTCGCCCTCATCATCTGCAATG
399	rs28777_pSNPl_S_R	TCAGTTGATTTTCATGTGATCCTCACAG
400	rs16891982_pSNPl_S_R	GAATAAAGTGAGGAAAACACGGAGTTG
401	rs683_pSNPl_S_R	ATTACCTTCTTTCTAATACAAGCATATG
402	rs12913832_pSNPl_S_R	ACAGGAACAAAGAATTTGTTCTTCATGG

Các ví dụ về hồ sơ 2-ADN cho ngân hàng dữ liệu

Ví dụ này mô tả thử nghiệm theo quy trình làm việc trên Fig. 2. Ví dụ này không được dùng các UMI, như nó có thể được giả thiết rằng các mẫu thu được từ các cá thể mà sự nhận dạng của chúng được biết đến.

Theo thử nghiệm này, các STR được tạo đa môi với các iSNP được thấy trên Bảng 3.

Bảng 3 - Nhận dạng các SNP và STR thông tin

Nhận dạng SNP thông tin				
rs1005533	rs1357617	rs2076848	rs4530059	rs763869
rs10092491	rs1360288	rs2107612	rs4606077	rs8037429
rs1015250	rs1382387	rs2111980	rs560681	rs8078417
rs1024116	rs1413212	rs214955	rs576261	rs826472
rs1028528	rs1454361	rs221956	rs6444724	rs873196

rs1029047	rs1463729	rs2269355	rs6811238	rs876724
rs1031825	rs1490413	rs2342747	rs6955448	rs891700
rs10488710	rs1493232	rs2399332	rs7041158	rs901398
rs10495407	rs1498553	rs251934	rs717302	rs907100
rs1058083	rs1523537	rs279844	rs719366	rs914165
rs10773760	rs1528460	rs2830795	rs722098	rs917118
rs10776839	rs159606	rs2831700	rs722290	rs938283
rs1109037	rs1736442	rs2920816	rs727811	rs964681
rs1294331	rs1821380	rs321198	rs729172	rs987640
rs12997453	rs1886510	rs338882	rs733164	rs9905977
rs13182883	rs1979255	rs354439	rs735155	rs993934
rs13218440	rs2016276	rs3780962	rs737681	rs9951171
rs1335873	rs2040411	rs430046	rs740598	
rs1336071	rs2046361	rs4364205	rs740910	
rs1355366	rs2056277	rs445251	rs7520386	

Các nhiễm sắc thể thường STR

D1S1656	CSF1PO	vWA	D21S11	D4S2408
D2S441	D7S820	D13S317	TPOX	D17S1301
D2S1338	D8S1179	Penta E	SE33	D9S1122
D3S1358	D10S1248	D16S539	Penta D	D6S1043
FGA	TH01	D18S51	D22S1045	Amelogenin
D5S818	D12S391	D19S433	D20S482	
X STRs				
DXS8378	DXS8377	DXS10101	DXS10148	DXS10146

DXS7132	DXS10135	DXS10134	DXS10079	
HPRTB	DXS10074	DXS7423	DXS10103	
Y STRs				
DYS456	DYS393	DYS437	DYS533	DYS449
DYS389I/II	DYS391	DYS438	DYS518	DYS522
DYS390	DYS439	DYS448	DYS570	DYS505
DYS458	DYS635	DYS576	DYS643	DYS627
DYS19	DYS392	DYS481	DYS460	DYF387S1a/b
DYS385a/b	YGATAH4	DYS549	DYS612	

Tất nhiên, việc thêm các SNP và STR có thể được thêm vào chuỗi trình tự trên. Các ví dụ về đích tiềm năng khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất chỉ thị trên Bảng 4.

Bảng 4 - Các ví dụ về việc thêm STR và SNP cho việc đa môi

Nhận dạng SNP thông tin				
rs1004357	rs1554472	rs2567608	rs521861	rs9606186
rs1019029	rs1872575	rs2811231	rs5746846	rs985492
rs1027895	rs2073383	rs2833736	rs590162	rs9866013
rs10500617	rs2175957	rs315791	rs6591147	
rs10768550	rs2255301	rs3744163	rs689512	
rs12480506	rs2270529	rs4288409	rs7205345	
rs13134862	rs2272998	rs464663	rs7229946	

rs1358856	rs2291395	rs4789798	rs7704770	
rs1410059	rs2292972	rs4796362	rs8070085	
rs1478829	rs2503107	rs4847034	rs9546538	
Các nhiễm sắc thể thường STR				
D1S1677	D3S4529	D18S853	D10S1435	
D11S4463	D6S1017	D14S1434	D5S2500	
D1S1627	D1GATA113	D2S1776		

Các đoạn mồi được thiết kế để chứa trình tự mồi PCR đặc hiệu gen ở đầu 3' và trình tự thể adaptor ở đầu 5'. Trong thử nghiệm này, các đoạn mồi trước chứa trình tự thể cho các adaptor TruSeq Custom Amplicon i5 và các đoạn mồi đảo ngược chứa trình tự thể cho các adaptor TruSeq Small RNA kit i7. Các thể có thể được sử dụng làm vị trí mồi khuếch đại cũng như vị trí mồi trình tự.

Trình tự thể i5 adaptor 5'TACACGACGCTCTTCCGATCT3' (SEQ ID số:403)

Trình tự thể i7 adaptor 5'CTTGGCACCCGAGAATTCCA3' (SEQ ID số:404)

Để cân bằng khuếch đại giữa các STR và SNP trong sự đa mồi, các thông số thiết kế mồi được sửa đổi đối với các SNP như được mô tả trong Ví dụ 1. Thiết lập ban đầu của các đoạn mồi SNP được thiết kế sử dụng Illumina's Design Studio là các đoạn mồi PCR cổ điển - trình tự ngắn với nhiệt độ nóng chảy cao và rất ít đến không có cấu trúc thứ cấp. Design Studio được sử dụng để thiết kế các TruSeq Custom Amplicon Probe và tạo ra phần bổ sung đảo ngược của mẫu dò dòng ra để tạo mồi PCR đảo ngược. Các đoạn mồi này, tuy nhiên, không được đa mồi tốt và một mồi xấu có thể biến mồi từ tốt thành xấu (ví dụ, tất cả mồi dime và không sản phẩm) (Fig.4) Trong việc thử để tạo các đoạn mồi tốt hơn cho sự đa mồi, Primer3 (phần mềm dùng chung) được sử dụng mà chứa dấu hiệu thư viện thiếu mồi. Nhận ra rằng

các đoạn mồi được thiết kế Primer3 được thực hiện ngay cả khi kém trong mảng đa mồi hơn các đoạn mồi Design Studio. Ngạc nhiên là, dữ liệu được tạo ra thể hiện là các đoạn mồi STR là sự đa mồi tốt. Nhận thấy rằng các cặp mồi được thiết kế kém được định hướng đến các đích STR không tạo ra các lỗi đa mồi như các đoạn mồi SNP. Các đoạn mồi STR dài, giàu AT, và có nhiệt độ nóng chảy thấp, ngược với những gì được biết đến là mồi "tốt".

Các đoạn mồi SNP được thiết kế lại theo các thông số sau đây của Ví dụ 1. Các đoạn mồi được trộn cùng nhau để thành tất cả mồi. Theo ví dụ này, cặp mồi 56 STR được trộn với các cặp mồi 75 iSNP, aSNP, và các SNP thông tin kiểu hình. Polymeraza (Hot-start Phusion II trong ví dụ này) được thêm vào mastermix của tất cả các thành phần được yêu cầu đối với PCR và các đoạn mồi được thêm. Hỗn hợp được truyền bằng ống nhỏ vào các giếng của tấm PCR, nhưng việc khuếch đại cũng có thể được thực hiện trong các ống, v.v... ADN được thêm vào tấm như ADN được làm sạch theo thể tích 15 microlit, tuy nhiên các chiết xuất được dung giải của máu hoặc các mẫu trong miệng từ các miếng gạc hoặc giấy lọc không được xử lý, hoặc trực tiếp từ máu hoặc các mẫu trong miệng trên FTA Cards, v.v... cũng có thể được sử dụng. Đối với thử nghiệm này, sử dụng ADN 2800M kiểm soát làm sạch ở 1ng và 100 pg. Các phản ứng được đưa vào PCR để xác định số chu kỳ (trong trường hợp ví dụ, 25 chu kỳ) theo quy trình sau đây:

95 °C	-	3 min	
96 °C	-	1 min	
54 °C	-	2 min*	*ramp 0.5 °C/sec
68 °C	-	45 sec **	**ramp 0.2 °C/sec
60 °C	-	30 min	
4 °C	-	hold	

Sau khi tuần hoàn, các tấm được loại bỏ khỏi chu kỳ nhiệt. Phản ứng được đưa vào 50 microlit có polymeraza (Kapa HiFi, Kapa Biosystems), PCR mastermix chứa tất cả các thành phần được yêu cầu cho PCR, và cặp adaptor (một i7 và một i5). Vòng thứ hai của PCR được thực hiện để xác định số chu kỳ (10 chu kỳ trong trường hợp ví dụ) để tạo ra các thư viện trình tự, theo quy trình sau đây:

98 °C	-	30 sec
98 °C	-	15 sec
66 °C	-	30 sec
72 °C	-	1 min
72 °C	-	5 min
10 °C	-	hold

Sau tuần hoàn, tấm chứa các thư viện hoàn thành được loại bỏ khỏi chu kỳ nhiệt. Ở điểm này, các mẫu có thể được tích huyết bằng thể tích và được làm sạch bằng mẫu đơn sử dụng các hạt có tính từ (SPRI) ví dụ. Các mẫu cũng có thể được làm sạch riêng. Vùng hoặc các thư viện riêng có thể được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp gốc qPCR, bằng cách sử dụng Bộ phân tích mảnh hoặc phân tích sinh học, hoặc bằng cách sử dụng PicoGreen và bộ đọc tấm (như trong trường hợp ví dụ). Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết vô số các tùy chọn cho việc định lượng thư viện. Nếu các thư viện được làm sạch riêng, chúng có thể chuẩn hóa đến 2nM mỗi nồng độ và được tích huyết theo thể tích.

Các vùng của thư viện được làm sạch được làm biến tính, được pha loãng, tập hợp và được sắp theo trình tự trên dụng cụ giải trình tự MiSeq với việc chạy trình tự chu kỳ 350 và các số đọc hai chỉ số. Sau khi giải trình tự, các mẫu được đa môi lại theo các trình tự adaptor và được phân tích qua đường ống dẫn Forensics Genomics (Illumina, Inc.) Các số đọc STR được tách khỏi các số đọc SNP và được phân tích độc lập. Các STR được phân tích sử dụng các thuật giải được mô tả trong các công bố đơn Patent trước (PCT/US2013/30867, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn trong toàn bộ tài liệu). (Các) số lặp và sự biến đổi trình tự bất kỳ được báo cùng với các số đọc. Các SNP được phân tích sử dụng bản kê khai và các số lặp và sự biến đổi trình tự được báo cùng với các số đọc. Sự cân bằng tương đối giữa các alen (%tối thiểu/tối đa), sự cân bằng giữa vị trí (%CV), tỷ lệ lỗi và tỷ lệ vạch giả được tính toán đối với vị trí STR. Các kết quả cho các STR trong ngân hàng đa môi ban đầu được thể hiện trên Fig. 5A-C. Sự cân bằng (80% cân bằng trung bình), vạch giả (~3%) và tỷ lệ lỗi (nhỏ hơn 5%) đáp ứng các yêu cầu thiết kế đầu vào đối với vị trí bao gồm trong ví dụ này. %CV (~142%) được tính toán sử dụng toàn bộ vị trí 56. Mặc dù các đoạn môi được sử dụng thể hiện sự cân bằng vị trí bên trong, sự tối ưu của môi còn

được dự đoán để cải thiện sự cân bằng vị trí bên trong. Số lần đếm đối với vị trí đã biết trùng với các kết quả được công bố đối với 2800M. Các kết quả đối với các SNP được thể hiện trên Fig. 5D-E. Sự bao trùm, số lần đếm alen, vạch giả và các thành phần lạ đối với vị trí STR 56 trong sự đa môi lớn được thể hiện trên Fig. 6. Biểu đồ này tương tự các điện di đồ được tạo bởi kỹ thuật CE. Các cột tương tự với các pic đối với alen được xác định (trục X) và đếm số lần đọc (trục Y) tương tự với RFU. Sự bao trùm đối với các SNP ở nơi bất kỳ từ 10 đến 2500X phụ thuộc vào SNP, tuy nhiên mọi SNP mà được đa môi được đếm và thực hiện số lần đếm chính xác.

Ví dụ 3 - Hồ sơ ADN đối với vụ án hình sự

Ví dụ này mô tả thử nghiệm theo quy trình làm việc trên Fig. 3. Ví dụ này kết hợp UMI thành các đoạn môi, như nó có thể được giả thiết rằng các mẫu thu được từ các cá thể mà sự nhận biết của chúng không được biết đến.

Đối với thử nghiệm này, các STR được tạo đa môi với các iSNP, các aSNP và các SNP thông tin kiểu hình như được thấy trên Bảng 5.

Bảng 5 - Các nghiên cứu STR và SNP.

Nhận dạng SNP thông tin				
rs1005533	rs1357617	rs2076848	rs4530059	rs763869
rs10092491	rs1360288	rs2107612	rs4606077	rs8037429
rs1015250	rs1382387	rs2111980	rs560681	rs8078417
rs1024116	rs1413212	rs214955	rs576261	rs826472
rs1028528	rs1454361	rs221956	rs6444724	rs873196
rs1029047	rs1463729	rs2269355	rs6811238	rs876724
rs1031825	rs1490413	rs2342747	rs6955448	rs891700
rs10488710	rs1493232	rs2399332	rs7041158	rs901398
rs10495407	rs1498553	rs251934	rs717302	rs907100

rs1058083	rs1523537	rs279844	rs719366	rs914165
rs10773760	rs1528460	rs2830795	rs722098	rs917118
rs10776839	rs159606	rs2831700	rs722290	rs938283
rs1109037	rs1736442	rs2920816	rs727811	rs964681
rs1294331	rs1821380	rs321198	rs729172	rs987640
rs12997453	rs1886510	rs338882	rs733164	rs9905977
rs13182883	rs1979255	rs354439	rs735155	rs993934
rs13218440	rs2016276	rs3780962	rs737681	rs9951171
rs1335873	rs2040411	rs430046	rs740598	
rs1336071	rs2046361	rs4364205	rs740910	
rs1355366	rs2056277	rs445251	rs7520386	
Các nhiễm sắc thể thường STR				
D1S1656	CSF1PO	vWA	D21S11	D4S2408
D2S441	D7S820	D13S317	TPOX	D17S1301
D2S1338	D8S1179	Penta E	SE33	D9S1122
D3S1358	D10S1248	D16S539	Penta D	D6S1043
FGA	TH01	D18S51	D22S1045	Amelogenin
D5S818	D12S391	D19S433	D20S482	
X STRs				
DXS8378	DXS8377	DXS10101	DXS10148	DXS10146
DXS7132	DXS10135	DXS10134	DXS10079	
HPRTB	DXS10074	DXS7423	DXS10103	
Y STRs				
DYS456	DYS393	DYS437	DYS533	DYS449

DYS389I/II	DYS391	DYS438	DYS518	DYS522
DYS390	DYS439	DYS448	DYS570	DYS505
DYS458	DYS635	DYS576	DYS643	DYS627
DYS19	DYS392	DYS481	DYS460	DYF387S1a/b
DYS385a/b	YGATAH4	DYS549	DYS612	
Các SNP thông tin kiểu hình				
N29insA	rs1805006	rs1110400	rs12203592	rs2378249
rs11547464	rs1805007	rs28777	rs1042602	rs12896399
rs885479	rs1805009	rs16891982	rs1800407	rs1393350
rs1805008	Y152OCH	rs12821256	rs2402130	rs683
rs1805005	rs2228479	rs4959270	rs12913832	
Các SNP thông tin nguồn gốc				
rs10497191	rs17642714	rs2238151	rs4471745	rs7554936
rs1079597	rs1800414	rs2593595	rs459920	rs7657799
rs11652805	rs1834619	rs260690	rs4833103	rs7722456
rs1229984	rs1871534	rs2814778	rs4891825	rs798443
rs12439433	rs1876482	rs310644	rs4918664	rs7997709
rs12498138	rs1919550	rs3737576	rs671	rs870347
rs12913832	rs192655	rs3811801	rs6754311	rs917115
rs1426654	rs200354	rs3814134	rs6990312	rs9522149
rs1462906	rs2024566	rs3823159	rs7226659	
rs1572018	rs2042762	rs3827760	rs7251928	
rs16891982	rs2166624	rs3916235	rs7326934	
rs174570	rs2196051	rs4411548	rs735480	

Ví dụ này bao gồm các UMI đối bằng các đoạn mỗi STR. Đối với các ví dụ này, chỉ các đoạn mỗi STR chứa các UMI, tuy nhiên cả hai mỗi STR và SNP có thể bao gồm UMI nếu muốn và tùy chọn này không loại trừ từ thực tiễn. Đối với ví dụ này tuy nhiên chỉ các đoạn mỗi STR kết hợp các UMI nhằm mục đích chứng minh. Sự nhận dạng phân tử đơn nhất được đưa ra trong hai chu kỳ PCR (Fig. 3). Thứ nhất, như Ví dụ 2, các đoạn mỗi PCR chứa trình tự mỗi PCR đặc hiệu gen ở đầu 3' và trình tự thể adaptor ở đầu 5', giống như đối với các trình tự thể được sử dụng ở Ví dụ 2 đối với trình tự i5 và i7. Trong thử nghiệm này, các UMI được đặt giữa trình tự mỗi đặc hiệu gen và trình tự thể. Trong trường hợp của ví dụ này, có năm bazơ ngẫu nhiên được sử dụng cho UMI trên cả mỗi xuôi và đảo ngược. Các đoạn mỗi được trộn cùng nhau để thành tất cả mỗi. Hỗn hợp mỗi bao gồm 26 cặp mỗi STR nhiễm sắc thể thường và 86 cặp mỗi SNP (92 SNP được thực hiện). Polymeraza (Hot-start Phusion II trong ví dụ này) được thêm vào mastermix của tất cả các thành phần được yêu cầu đối với PCR và các đoạn mỗi được thêm. Hỗn hợp được chuyển bằng ống nhỏ vào các giếng của tấm PCR. ADN được thêm vào tấm ADN được làm sạch, tối ưu 1ng. Như trong Ví dụ 2, ADN được làm sạch từ 2800M đối chứng được thử nghiệm ở 1ng. Hỗn hợp phản ứng đa mỗi được đưa vào hai chu kỳ PCR theo quy trình sau:

98C	3 min	
98C	2 min	
54C	12 min	ramp 0.2C/sec
72C	4 min	2 cycles
4C	hold	

Sau khi tuần hoàn, các mẫu được loại bỏ khỏi chu kỳ nhiệt và protein liên kết ADN mạch đơn E. coli (SSB) được thêm vào phản ứng. Dự định rằng SSB giảm các dimer mỗi bằng các đoạn mỗi đặc hiệu gen đánh dấu không được sử dụng và ngăn việc khuếch đại bất kỳ nhiều hơn từ các đoạn mỗi này. SSb được ủ bằng mẫu trên đá, ngoài ra cũng có thể sử dụng RT hoặc việc ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau quá trình ủ này, polymeraza (Hot-start Phusion II trong ví dụ này) được bổ sung vào mastermix của tất cả thành phần yêu cầu đối với PCR, và mastermix được bổ sung vào mẫu có cặp

adaptor (các adaptor i7 và i5) và được tuần hoàn đối với số được xác định chu kỳ (trong thử nghiệm này là 34 chu kỳ), theo quy trình sau đây:

95C	3 min
95C	30 sec
66C	30 sec
72C	1 min
72C	5 min
10C	hold

Các mẫu được làm sạch bằng các hạt SPRI, và các thư viện riêng có thể được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp gốc qPCR, bằng cách sử dụng Bộ phân tích mảnh (như trong trường hợp của ví dụ) hoặc phân tích sinh học, hoặc bằng cách sử dụng PicoGreen và bộ đọc tấm. Các thư viện được chuẩn hóa tới 2nM mỗi nồng độ và được tích huyết theo thể tích.

Các vùng của thư viện được làm sạch được làm biến tính, được pha loãng, tập hợp và được sắp theo trình tự sử dụng MiSeq với việc chạy trình tự chu kỳ 350x100 và các số đọc hai chỉ số. Sau khi sắp xếp trình tự, dữ liệu được xác định được báo trong Ví dụ 2. Tuy nhiên, khi các đoạn mỗi chứa UMI, các UMI được sử dụng để giảm giữ liệu bằng cách sử dụng PCR hai lần để loại bỏ trình tự và các lỗi PCR và các thành phần lạ. Các SNP được phân tích sử dụng bản kê khai và các số lặp và sự biến đổi trình tự được báo cùng với các số đọc. Sự cân bằng tương đối giữa các alen (%tối thiểu/tối đa), sự cân bằng giữa vị trí (%CV), tỷ lệ lỗi, và tỷ lệ vạch giả (chỉ các STR) được tính toán. Các kết quả đối với 7A-E. Sự bao trùm, số lần đếm alen, vạch giả và các thành phần lạ đối với vị trí STR 26 trong đa mỗi lớn được thể hiện trên Fig. 8. Biểu đồ này tương tự các điện di đồ được tạo bởi CE. Các cột tương tự với các pic và đếm số lần đọc tương tự với RFU. Sự bao trùm đối với các SNP ở nơi bất kỳ từ 10 đến 5500X phụ thuộc vào SNP, tuy nhiên mọi SNP mà được đa mỗi được đếm và được tạo kết quả hữu ích.

Một kết quả mà được tạo bởi các nghiên cứu này mà vạch giả được thể hiện là thành phần lạ của PCR. Việc này được giả thuyết bởi nhiều nhà điều tra (và việc trượt polymeraza được chỉ ra ở các bệnh ung thư ruột kết ở người), nhưng điều này

không được chứng minh đối với các thử nghiệm của pháp y. Các UMI có thể được sử dụng để thể hiện vạch giả mà thật ra là thành phần lạ của PCR. Các sản phẩm mà có $n+1$ hoặc $n-1$ lần lặp có cùng UMI là các sản phẩm có số lần lặp hiệu chỉnh (Fig. 9). Trên Fig. 9A mỗi vị trí thể hiện các kết quả không có hiệu chỉnh UMI so với Fig. 9B mà hiệu chỉnh UMI được thực hiện. Như được chứng minh, với việc không có hiệu chỉnh UMI sự cân bằng giữa các alen là không tốt như khi hiệu chỉnh UMI được thực hiện. Hơn nữa, có nhiều vạch giả đáng kể mà rõ ràng không có hiệu chỉnh UMI. Phần cột trên đường giữa cột chỉ sai số trình tự trong khi đó dưới đường chỉ trình tự hiệu chỉnh nằm trong trình tự STR. Sai số được giảm đáng kể với sự hiệu chỉnh UMI. Ví dụ, vị trí SE3 có sai số mà được loại bỏ bằng sự hiệu chỉnh UMI. Sự hiệu chỉnh sai số có thể vô cùng quan trọng đối với vụ án hình sự để tạo ra hồ sơ ADN chính xác nhất có thể.

Ví dụ 4 - Hồ sơ ADN sử dụng 12 cá thể mẫu

Phương pháp và vật liệu

ADN từ 12 cá thể mẫu (Mẫu #: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17) và một bộ gen đối chứng (2800M) được thử nghiệm theo quy trình làm việc của Fig. 3. Thử nghiệm này kết hợp UMI vào các đoạn môi STR như được mô tả trong Ví dụ 3. Hai bản sao của mỗi mẫu được phân tích bằng bộ kit Illumina® ForenSeq DNA Signature Library Prep trên máy giải trình tự MiSeq. Một ng ADN được sử dụng cho mỗi lần tái bản sử dụng hỗn hợp môi ADN B: Thu hỗn hợp các mẫu, mà chứa các đoạn môi đối với 61 STR cùng với Amelogenin, 95 SNP có thông tin đối về tương đồng, 56 SNP có thông tin về tổ tiên, 22 SNP có thông tin về kiểu hình (2 SNP tổ tiên cũng được sử dụng đối với việc dự đoán về kiểu hình).

Các cài đặt mặc định

STR: ngưỡng phân tích = 6,5%; ngưỡng giải thích = 15%. STR: ngưỡng phân tích = 3%; ngưỡng giải thích = 15%.

Các số lần đếm trình tự mức cao, như sự bao trùm và vị trí được đếm, đối với hồ sơ ADN của 12 cá thể mẫu được thể hiện trên Fig. 12. Như có thể thấy, mọi vị trí

được thực hiện bởi ít nhất 100000 lần đọc ở cả hai lần tái bản. Chỉ hai mẫu tạo ra số lần đếm STR hỏng (1 trong tổng số 61). Tất cả trong 173 SNP được đếm thành công trong tất cả cá thể trong cả hai lần tái bản. Số lần đếm STR mẫu của hai cá thể mẫu được thể hiện trên Fig. 16. Số lần đếm SNP mẫu của hai cá thể mẫu được thể hiện trên Fig. 17. Fig. 13 thể các thống kê về quần thể, như xác suất trùng ngẫu nhiên (RMP - random match probability) của Viện quốc gia về các tiêu chuẩn và công nghệ (NIST - National Institute of Standards và Technology) các STR tự động, tần suất kiểu gen đơn bội tin cậy 95% của NIST Y-STR, RMP của dbSNP iSNP, và RMP của các STR từ dữ liệu Y-STR của Mỹ.

Các kiểu hình, như màu mắt và màu tóc của 12 cá thể mẫu và cá thể đối chứng được dự đoán dựa trên kiểu hình của các pSNP trong thử nghiệm, và so với các kiểu hình tự báo (Fig. 14). Quan sát mức cao của sự tương quan giữa các kiểu hình được dự đoán và được báo.

Tổ tiên của 12 cá thể mẫu được dự đoán sử dụng kiểu gen của 56 aSNP trong thử nghiệm. Các điểm PCA1 và PCA3 của mỗi cá thể mẫu được tính toán, và vẽ sơ đồ dựa vào các mẫu đối chứng trên biểu đồ tổ tiên. Như được thể hiện trên Fig. 15, tổ tiên của các cá thể mẫu có thể được dự đoán dựa trên vị trí trên biểu đồ tổ tiên. Mười bốn điểm xentrait bao gồm trong biểu đồ tổ tiên (các chu kỳ). Dựa trên các điểm xentrait gần nhất, tổ tiên của mỗi cá thể mẫu được dự đoán.

Thử nghiệm hồ sơ ADN cũng thể hiện mức cao của cân bằng nội ở cả hai vị trí STR và vị trí SNP, như có thể thấy trên Fig. 18, và mức độ thấp của vạch giả, như có thể thấy trên Fig. 19.

Sáu trong 12 cá thể cùng với 2800M có ít nhất một vị trí dị hợp tử cùng kích thước, mà thể hiện trên Fig. 20. Vị trí dị hợp tử cùng kích thước được xác định là STR mà có cùng số lặp lại, hai trình tự khác nhau, mà được cân bằng ngang nhau. Sử dụng thông tin trên các biến dị trong STR D8S1179, 13 alen của Mẫu 15 được bắt nguồn từ bà, Mẫu 17 (Fig. 21). Thông tin biến dị tương tự trong STR D13S317 được sử dụng để vạch ra các alen của Mẫu 15 Tuy nhiên, trong trường hợp này nguồn gốc của một trong hai alen không thể được chắc chắn (Fig. 22).

Ví dụ 5 - Hồ sơ ADN dùng cho việc tìm kiếm lại, pháp y, hoặc sử dụng huyết thống.

Ví dụ này được dựa trên quy trình làm việc được mô tả trong Hướng dẫn ForenSeq™ DNA Signature Prep (Illumina, San Diego, CA), nội dung mà được kết hợp ở đây được viện dẫn trong toàn bộ tài liệu).

Hoặc là ADN được làm sạch hoặc là dịch thủy phân thô có thể được sử dụng cho ví dụ này. Đối với ADN được làm sạch, mỗi 1ng mẫu được pha loãng thành 0,2 ng/μl với nước không chứa nucleaza. Đối với dịch thủy phân thô, mỗi 2 μl mẫu được pha loãng với 3μl nước không chứa nucleaza. Master Mix được thiết lập cho tám hoặc nhiều phản ứng. Đối với mỗi phản ứng, 5,4μl Hỗn hợp phản ứng ForenSeq PCR1, 0,4 μl Hỗn hợp ForenSeq Enzyme và 5,8 μl Hỗn hợp mẫu ADN (A hoặc B) được bổ sung vào ống 1,5 ml microcentrifuge. Bổ sung 10μl Master Mix được chuyển vào mỗi giếng của tấm PCR, và ADN hoặc dịch thủy phân. Hỗn hợp phản ứng đa mẫu được đưa vào PCR theo quy trình sau:

98°C trong thời gian 3 phút.

8 chu kỳ:

96°C trong thời gian 45 giây.

80°C trong thời gian 30 giây.

54°C trong thời gian 2 phút., với chế độ biến đổi đặc hiệu

68°C trong thời gian 2 phút., với chế độ biến đổi đặc hiệu

10 chu kỳ:

96°C trong thời gian 30 giây.

68°C trong thời gian 3 phút., với chế độ biến đổi đặc hiệu

68°C trong thời gian 10 phút.

Giữ ở 10°C.

Sau khi tuần hoàn, các mẫu được loại bỏ khỏi chu kỳ nhiệt. Hỗn hợp ForenSeq PCR2 Reaction được bổ sung vào các mẫu có cặp adaptor (các adaptor i7 và i5) và được tuần hoàn trong 15 chu kỳ, theo quy trình sau đây:

98°C trong thời gian 30 giây.

15 chu kỳ:

98°C trong thời gian 20 giây.

66°C trong thời gian 30 giây.

68°C trong thời gian 90 giây.

68°C trong thời gian 10 phút.

Giữ ở 10°C.

Các mẫu được làm sạch bằng Các hạt làm sạch mẫu, và các thư viện được chuẩn hóa và được tích huyết theo thể tích. Các thư viện được tích huyết được pha loãng trong Bộ đệm lai (HT1 - Hybridization Buffer), bổ sung Đối chứng giải trình tự ở người (HSC - Human Sequencing Control), và nhiệt được biến tính chuẩn bị cho giải trình tự.

Ví dụ 6 - Kiểu gen có ADN phân hủy

Fig. 23 thể hiện các kết quả kiểu gen sử dụng ADN được cắt và/hoặc ADN được xử lý DNaza điển hình ADN phân hủy. Như đã thể hiện, hơn 50% vị trí STR và SNP được đếm chính xác bằng ADN được cắt. Xác suất trùng ngẫu nhiên (RMP) là 10^{-19} đạt được có ADN nhỏ hơn 100bp. Tổ tiên hiệu chỉnh cũng được dự đoán sử dụng ADN phân hủy.

Ví dụ 7 - Độ nhạy kiểu gen

Các Fig. 24 và 25 thể hiện các kết quả độ nhạy kiểu gen ở mức đầu vào ADN dưới nanogram từ 7,82pg đến 1ng. Như đã thể hiện, 100% alen được đếm thành công

ở 125 ng ADN đầu vào đối với cả hai STR và SNP. Hơn 50% alen được đếm thành công ở mức thấp bằng 7,82pg ADN đầu vào. Cân bằng nội lớn hơn 70% đối với vị trí hầu hết vị trí ở 1ng ADN đầu vào.

Tất cả các số biểu thị số lượng của các thành phần, các điều kiện phản ứng, và tương tự được sử dụng trong bản mô tả là để hiểu là được sửa đổi trong tất cả các trường hợp bằng thuật ngữ "khoảng". Do đó, trừ khi được chỉ ra là sự trái ngược, các thông số tính toán được đề cập ở đây là sự gần đúng mà có thể thay đổi dựa vào các đặc tính mong muốn được tìm kiếm để thu được. Ít nhất, và không thử để giới hạn ứng dụng của học thuyết tương đương với phạm vi của các yêu cầu bảo hộ bất kỳ trong quyền ưu tiên yêu cầu bảo hộ của bản mô tả bất kỳ đối với sáng chế, mỗi thông số tính toán được phân tích khi xem xét các con số đáng kể và các phương pháp làm tròn thông thường.

Tất cả các viện dẫn được trích dẫn ở đây, bao gồm nhưng bị giới hạn đối với các ứng dụng, sáng chế và tài liệu tham khảo được công bố và chưa được công bố, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn trong toàn bộ tài liệu tham khảo và tạo nên một phần bản mô tả này. Để các công bố đơn và patent mở rộng hoặc các sáng chế được kết hợp bằng cách viện dẫn trái với bộ lọc chứa trong bản mô tả, bản mô tả nhằm thay thế và/hoặc ưu tiên so với vật liệu thay thế bất kỳ.

Trích dẫn của các đơn công bố hoặc tài liệu trên không chỉ ra là cho phép bất kỳ đề cập trên trong tình trạng kỹ thuật thích hợp, không tạo ra sự cho phép bất kỳ như nội dung hoặc ngày của đơn công bố hoặc tài liệu này.

Mặc dù sáng chế được mô tả đầy đủ trong sự kết hợp với các phương án sáng chế có viện dẫn đến các hình vẽ đi kèm, lưu ý rằng sự thay đổi và các sửa đổi khác nhau sẽ trở nên rõ ràng đối với những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Sự thay đổi và sửa đổi này được hiểu là bao gồm trong phạm vi sáng chế. Các phương án khác nhau của sáng chế nên được hiểu rằng chúng được thể hiện bằng cách chỉ theo ví dụ, và không bằng cách theo giới hạn. Tương tự như vậy, các sơ đồ khác nhau có thể mô tả kiến trúc ví dụ hoặc kết cấu khác cho sáng chế, mà được thực hiện để hỗ trợ việc hiểu các dấu hiệu và chức năng mà có thể bao gồm trong sáng chế. Sáng chế

không được giới hạn đối với các kiến trúc ví dụ minh họa hoặc các kết cấu, nhưng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kiến trúc thay thế và các kết cấu khác. Ngoài ra, nhờ sáng chế được mô tả trên về các phương án ví dụ và việc thực hiện khác nhau, nó được hiểu rằng các dấu hiệu và chức năng khác nhau được mô tả trong một hoặc nhiều phương án cá thể không bị giới hạn trong ứng dụng của họ đối với phương án cụ thể mà cũng được mô tả. Thay vào đó có thể, được áp dụng, một mình hoặc kết hợp nhiều, đối với một hoặc nhiều phương án khác theo sáng chế, mà có hoặc không có các phương án được mô tả như vậy, và có hoặc không có các dấu hiệu được thể hiện là một phần phương án được mô tả. Do đó bề rộng và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi bất kỳ phương án ví dụ được đề cập trên.

Thuật ngữ và cụm từ được sử dụng trong tài liệu này, và do đó các phương án, trừ khi được quy định rõ ràng, nên được hiểu theo nghĩa mở ngược lại đối với nghĩa giới hạn. Như các ví dụ đề cập trên: thuật ngữ "bao gồm" nên được hiểu nghĩa là "bao gồm, mà không phải giới hạn" hoặc tương tự; thuật ngữ "ví dụ" được sử dụng để thực hiện các trường hợp ví dụ minh họa của các thuật ngữ trong cuộc thảo luận, không phải là liệt kê toàn diện hoặc giới hạn của chúng, và các tính từ như "thông thường", "truyền thống", "thường", "chuẩn", "đã biết", và các thuật ngữ có nghĩa tương tự, nên được hiểu là giới hạn thuật ngữ được mô tả trong khoảng thời gian nhất định, hoặc thuật ngữ có sẵn trong thời gian nhất định. Nhưng thay vì các thuật ngữ này nên được hiểu bao gồm thông thường, truyền thống, thường, hoặc kỹ thuật tiêu chuẩn mà có thể có sẵn, được biết đến hiện nay, hoặc ở bất kỳ thời gian nào trong tương lai. Tương tự như vậy, nhóm thuật ngữ được liên kết bằng liên từ "và" không nên được hiểu là được yêu cầu mà mỗi và mọi thuật ngữ trong số các thuật ngữ này có mặt trong nhóm, nhưng thay vì nên được hiểu là "và/hoặc" rõ ràng trong ngữ cảnh hoặc quy định khác. Tương tự, nhóm thuật ngữ được liên kết bằng liên từ "hoặc" không nên được hiểu là được yêu cầu duy nhất qua lại trong nhóm đó, thay vì nên được hiểu là "và/hoặc" rõ ràng trong ngữ cảnh hoặc quy định khác. Hơn nữa, mặc dù các thuật ngữ, các chi tiết hoặc thành phần trong sáng chế có thể được mô tả hoặc được bảo hộ ở số ít, số nhiều được dự tính để nằm trong phạm vi của sáng chế trừ khi giới hạn đối với số ít được quy định rõ ràng. Ví dụ, "ít nhất một" có thể đề cập số ít

hoặc số nhiều và không bị giới hạn một trong hai. Sự có mặt của các từ mở rộng và các cụm từ như "một hoặc nhiều", "ít nhất", "nhưng không bị giới hạn ở", hoặc các cụm từ tương tự trong một số trường hợp sẽ không được hiểu nghĩa là trường hợp thu hẹp được chỉ ra hoặc được yêu cầu trong các trường hợp mà cụm từ mở rộng có thể có mặt.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm đoạn mồi, bao gồm:

bộ đoạn mồi thứ nhất bao gồm các đoạn mồi mà lai đặc hiệu với trình tự đích thứ nhất và khuếch đại mảnh thứ nhất có chiều dài mảnh thứ nhất, trong đó trình tự đích thứ nhất chứa dạng đa hình của nucleotit đơn (SNP), và trong đó các đoạn mồi mà lai đặc hiệu với trình tự đích thứ nhất lai ở vị trí của trình tự đích thứ nhất mà chặn SNP và không lai với SNP; và

bộ mồi thứ hai bao gồm các đoạn mồi mà lai đặc hiệu với trình tự đích thứ hai và khuếch đại mảnh thứ hai có chiều dài mảnh thứ hai, trong đó chiều dài mảnh thứ nhất là ngắn hơn chiều dài mảnh thứ hai, và trong đó trình tự đích thứ hai chứa đoạn lặp nối tiếp; và

trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm bao gồm bộ đoạn mồi thứ nhất và thứ hai chứa một hoặc nhiều trình tự thể, và trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm có nhiệt độ nóng chảy thấp, có chiều dài ít nhất 24 nucleotit, chứa trình tự nucleotit polyme đồng nhất, hoặc sự kết hợp của chúng, và trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm có nhiệt độ nóng chảy thấp và có chiều dài ít nhất 24 nucleotit.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều trình tự thể còn chứa thể mồi, thể bắt giữ, thể giải trình tự, thể nhận diện phân tử đơn nhất, hoặc sự kết hợp của các thể.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong bộ đoạn mồi thứ nhất có chiều dài ít nhất là 24 nucleotit.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nóng chảy thấp là nhiệt độ nhỏ hơn 60 độ C.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó bộ đoạn mồi thứ nhất còn chứa các đoạn mồi bổ sung mà lai đặc hiệu với một hoặc nhiều trình tự đích bổ sung bao gồm có chọn lọc ít nhất là 29 SNP.

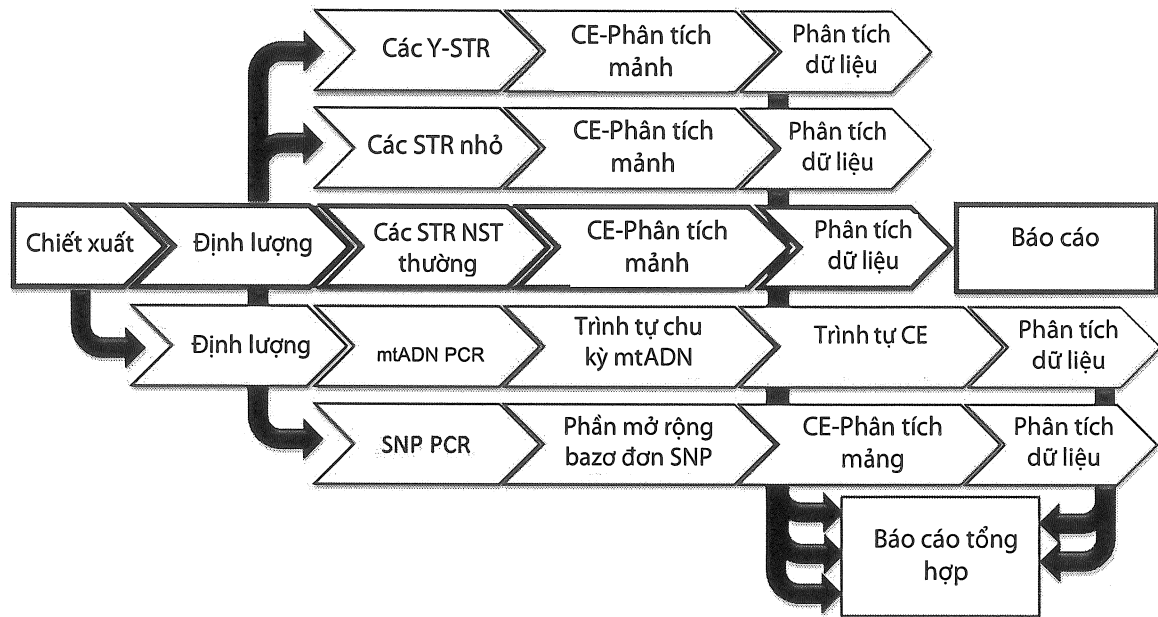
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đoạn lặp nối tiếp là đoạn lặp nối tiếp ngắn (STR), đoạn lặp nối tiếp trung bình (ITR), hoặc biến dị của các đoạn lặp lại.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó bộ mồi thứ hai còn chứa các đoạn mồi bổ sung mà lai đặc hiệu với một hoặc nhiều trình tự đích bổ sung bao gồm có chọn lọc ít nhất là 23 trình tự đoạn lặp nối tiếp.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm đoạn mồi có chiều dài nằm trong khoảng từ 24 đến 38 nuclotit.
9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm đoạn mồi có nhiệt độ nóng chảy mà nhỏ hơn 58 độ C.
10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các đoạn mồi trong chế phẩm đoạn mồi có nhiệt độ nóng chảy khoảng 54 độ C.

FIG. 1

A



B

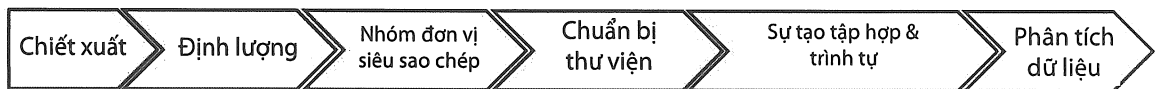


FIG. 2

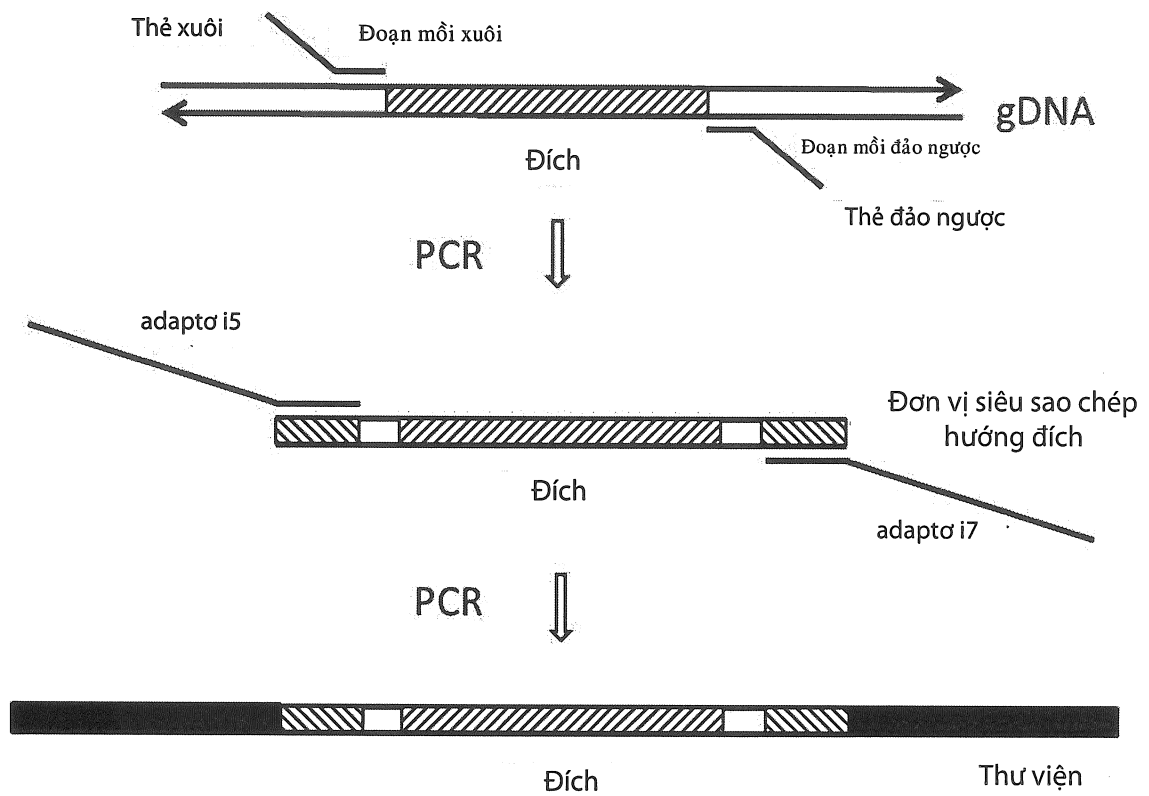


FIG. 3

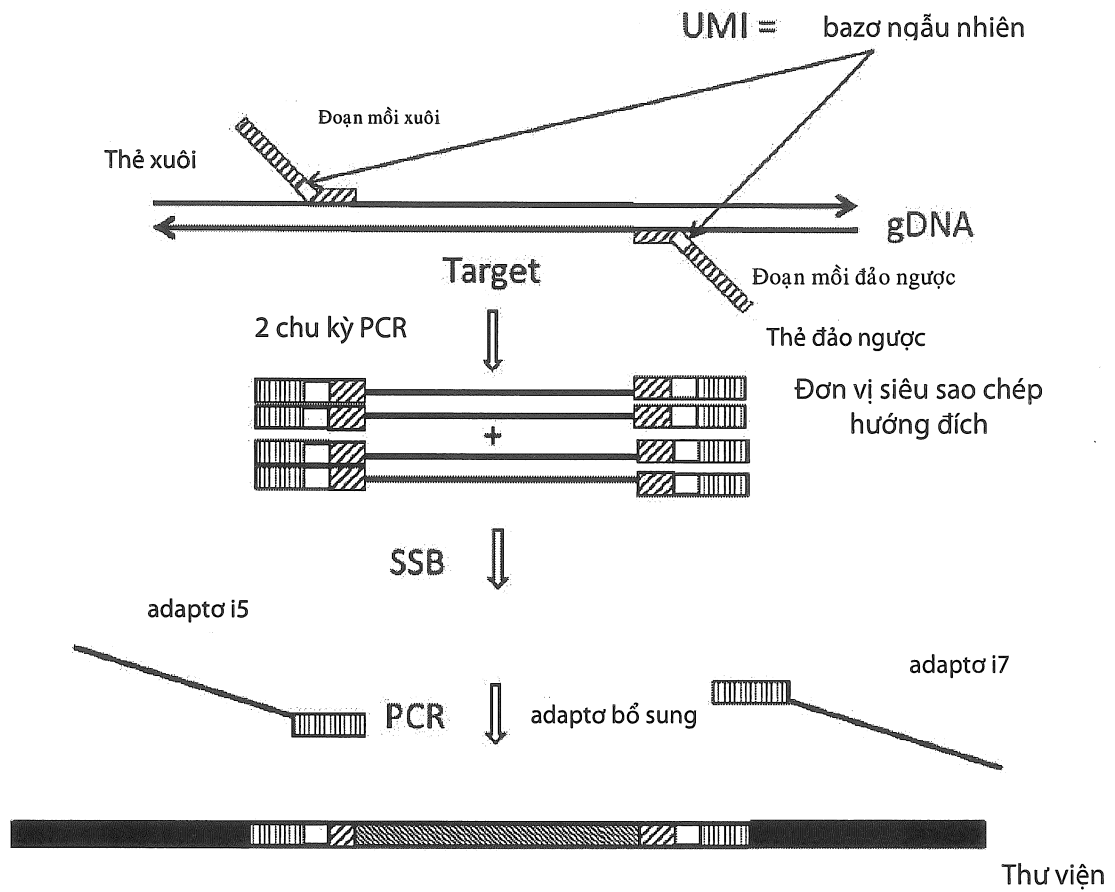


FIG. 4

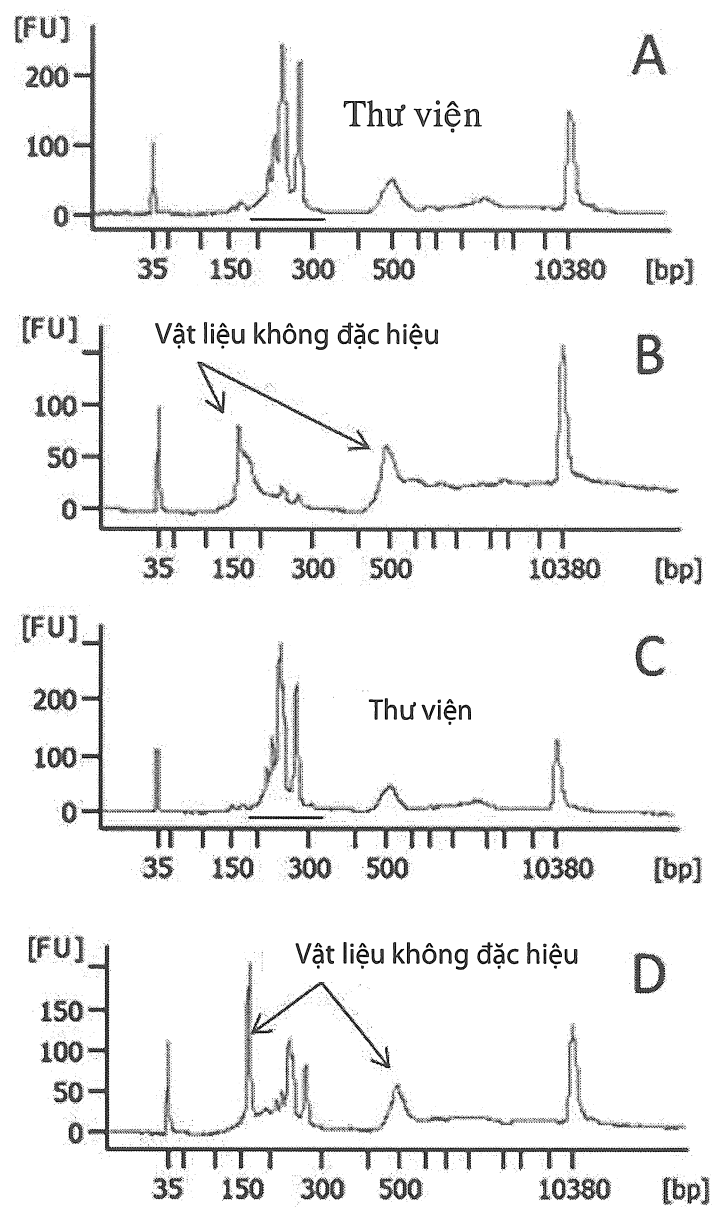


FIG. 5

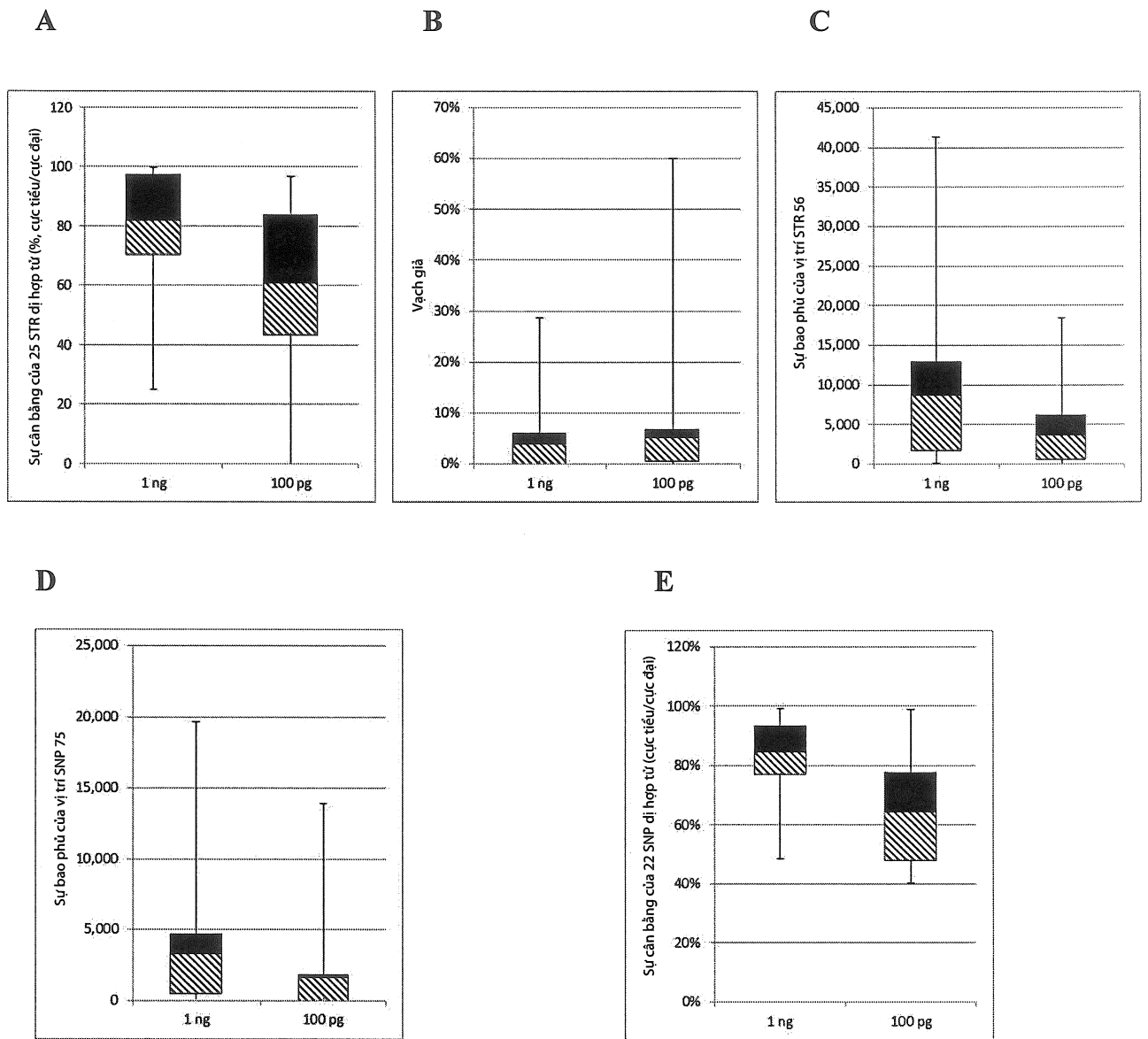


FIG. 6

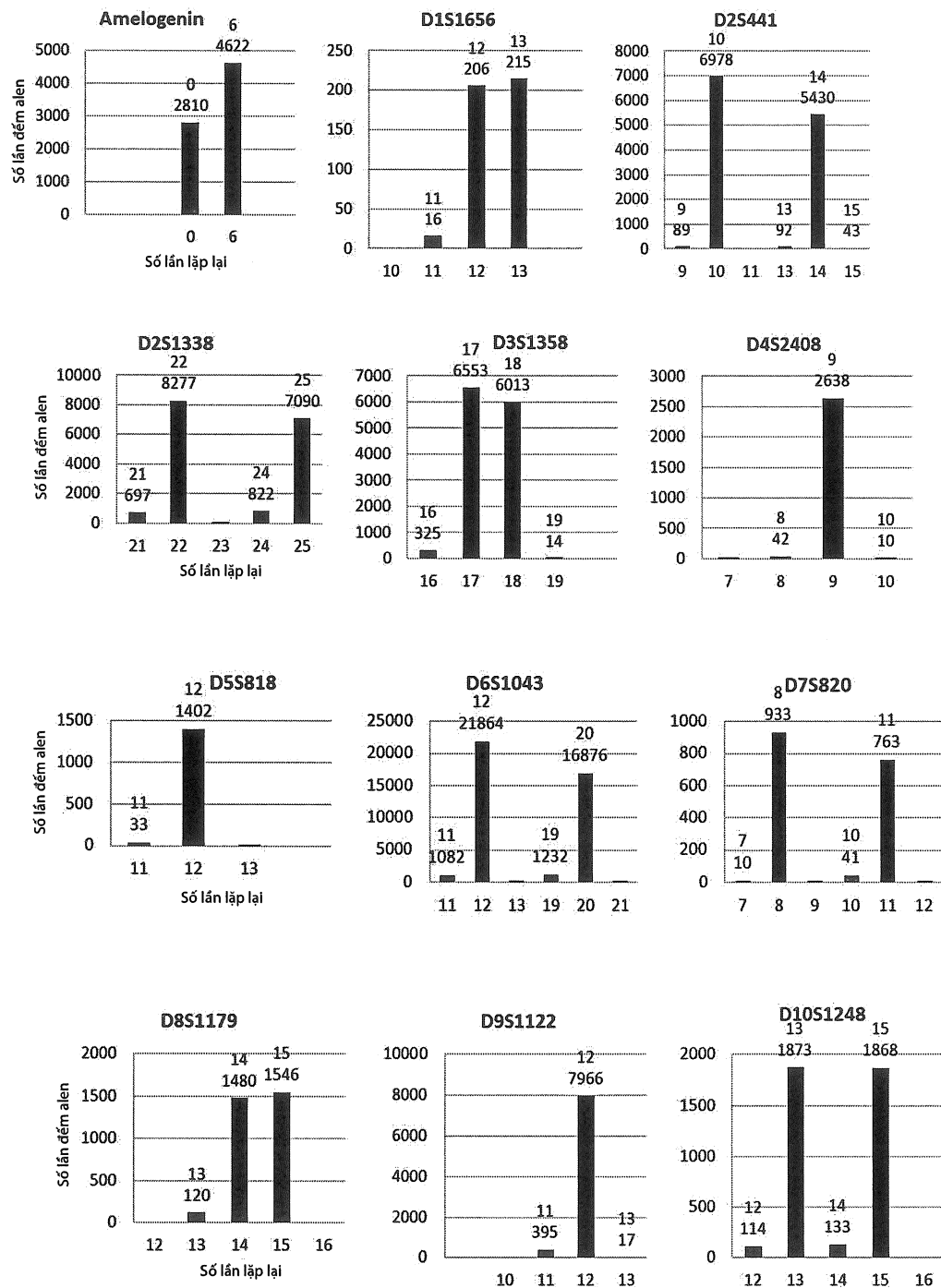


FIG. 6 (Tiếp theo)

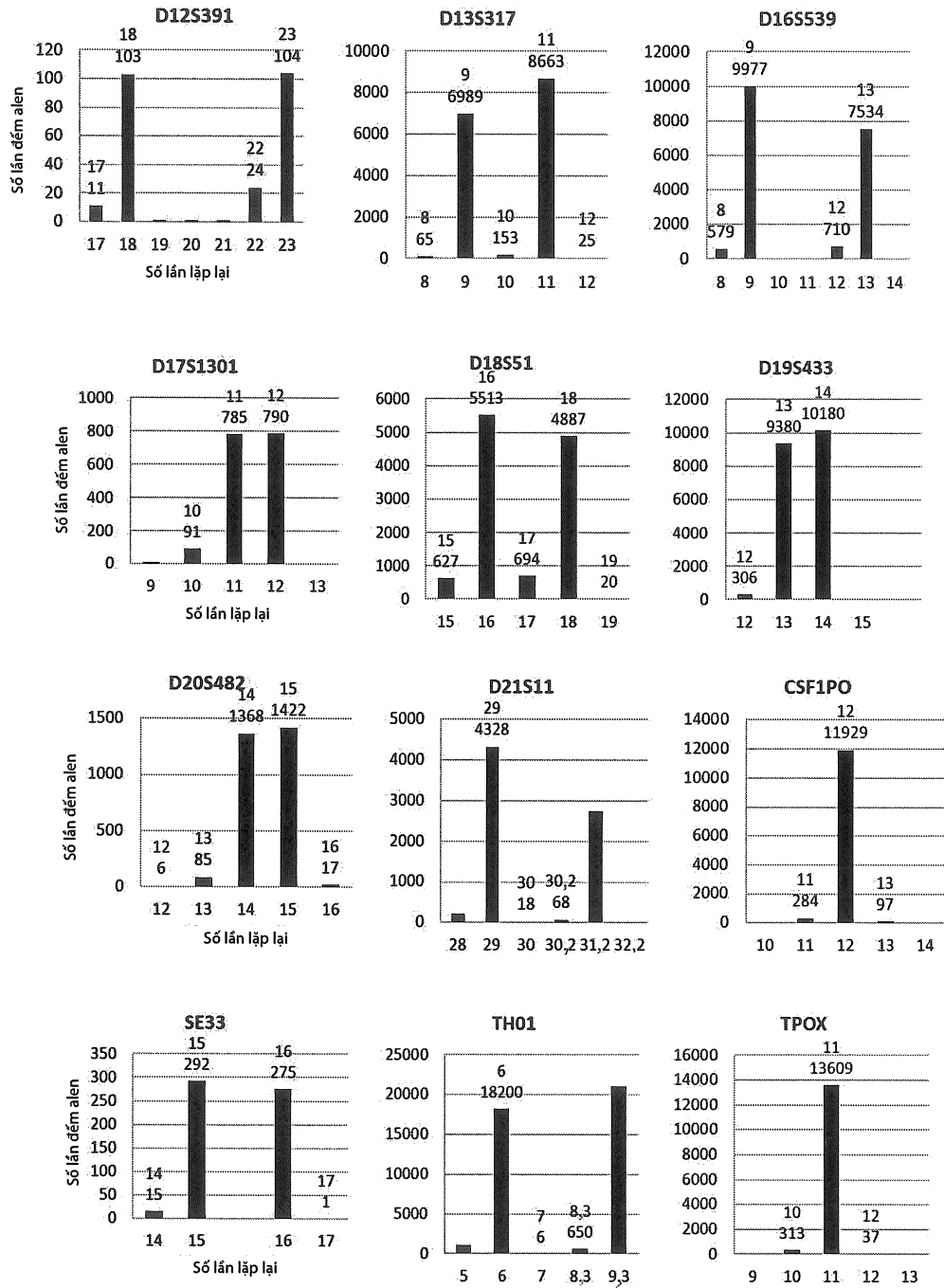


FIG. 6 (Tiếp theo)

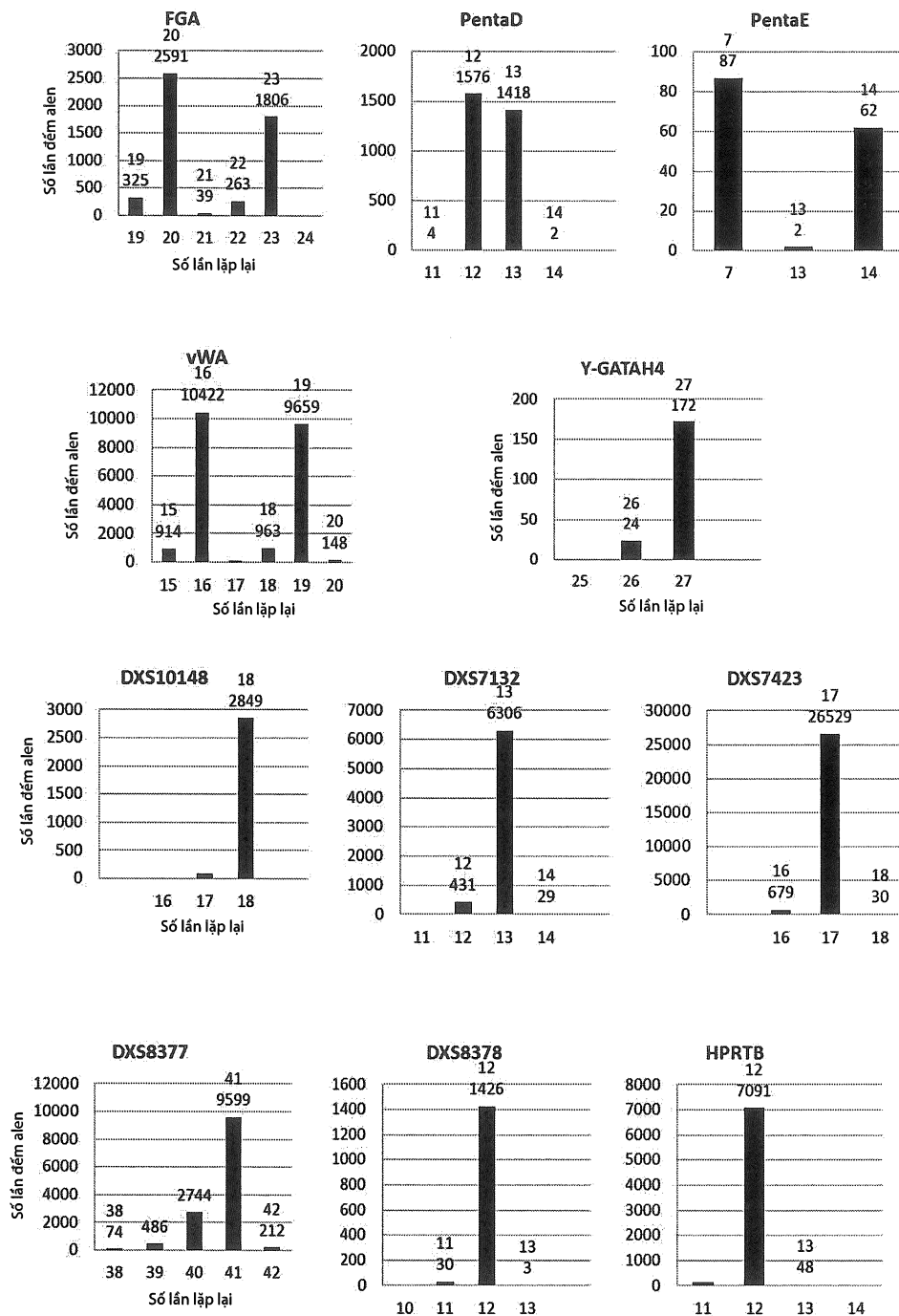


FIG. 6 (Tiếp theo)

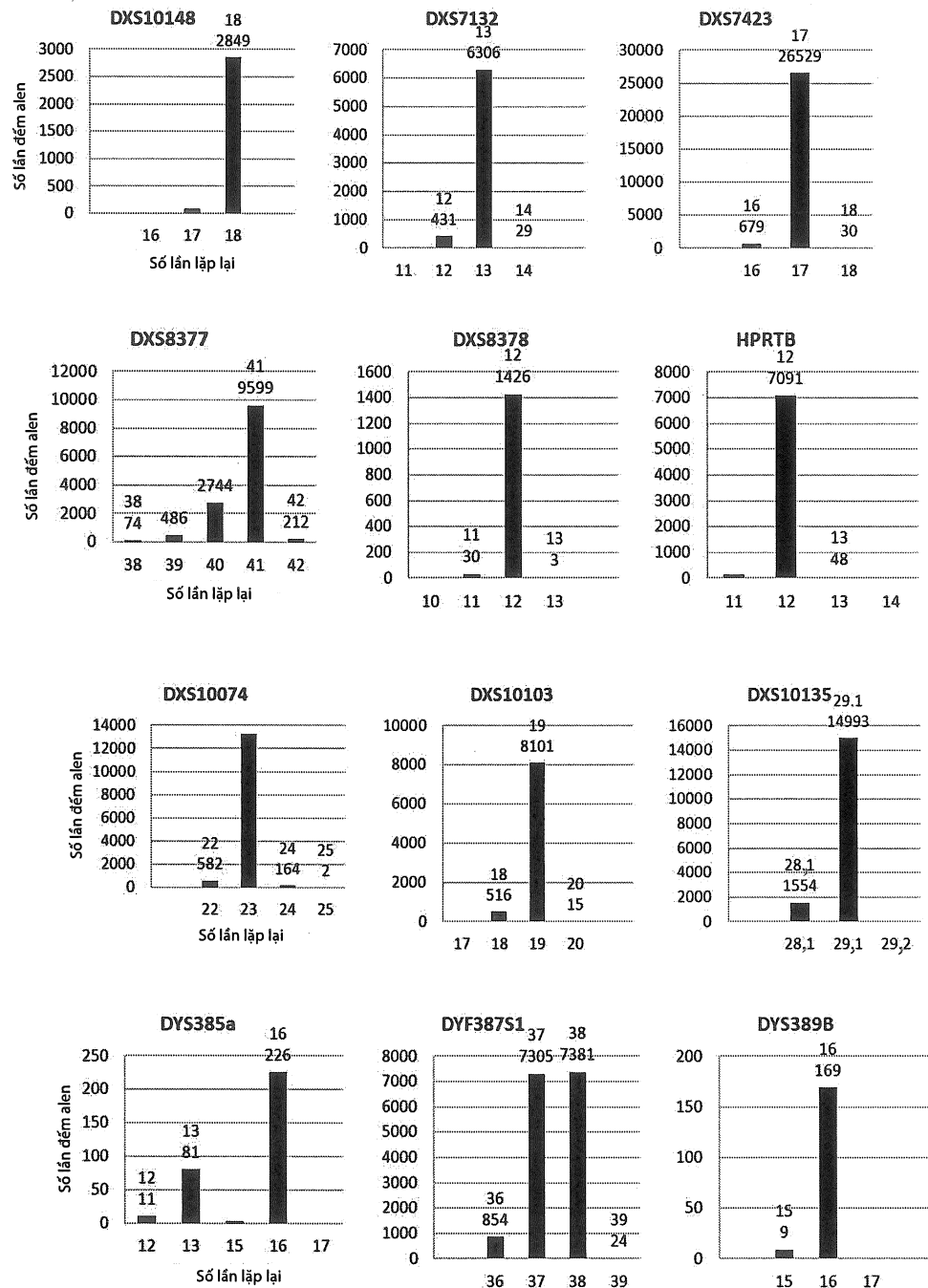


FIG. 6 (Tiếp theo)

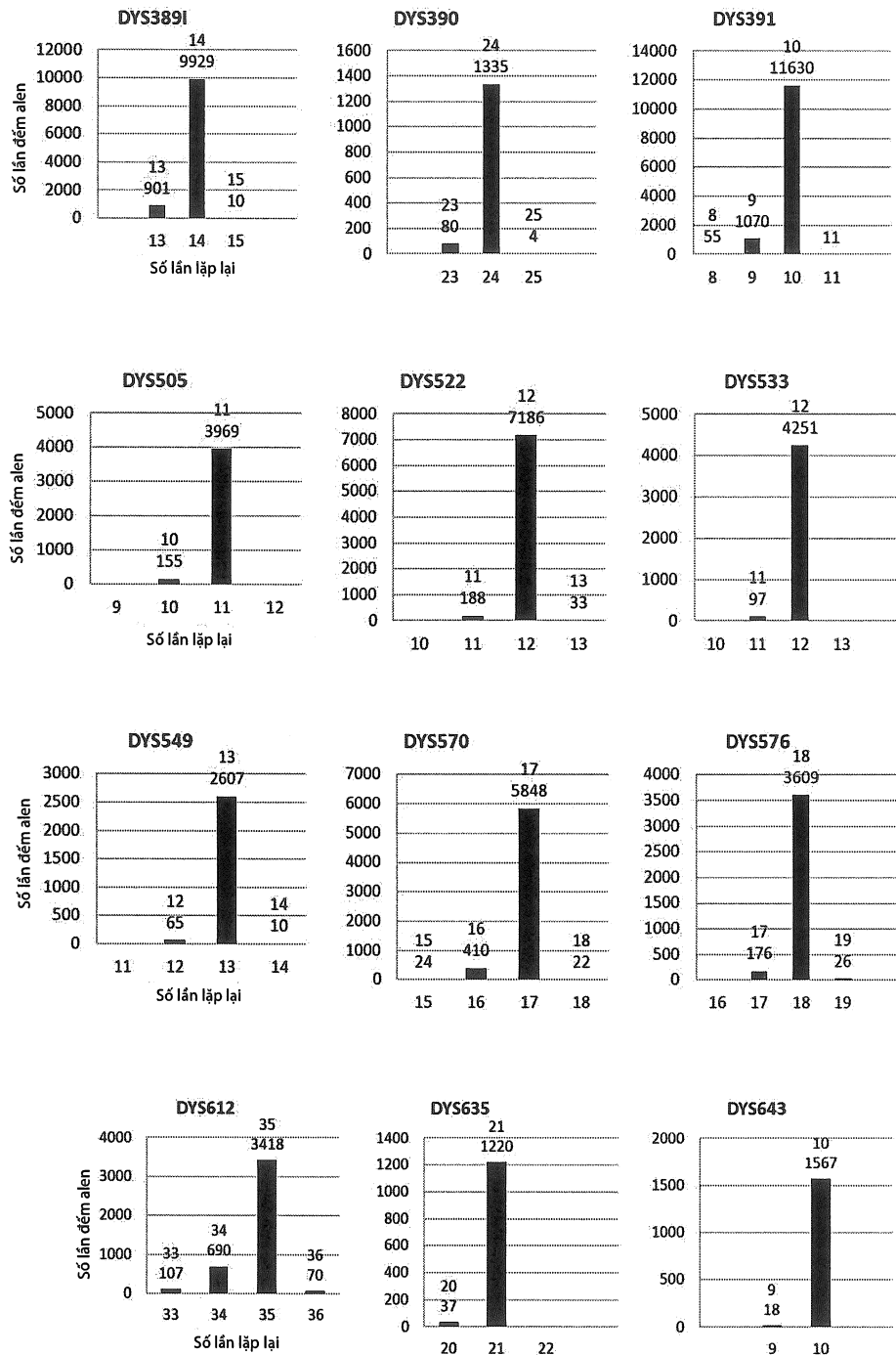
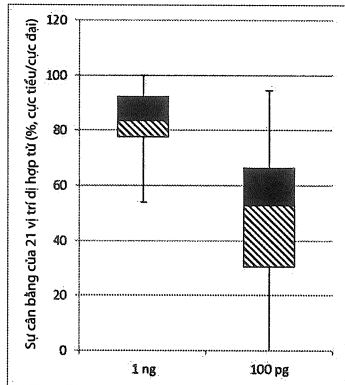
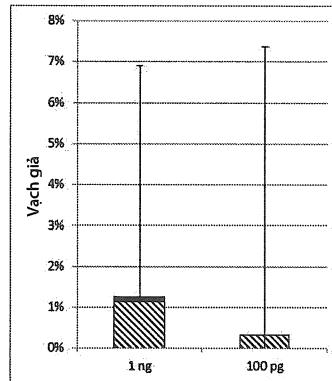


FIG. 7

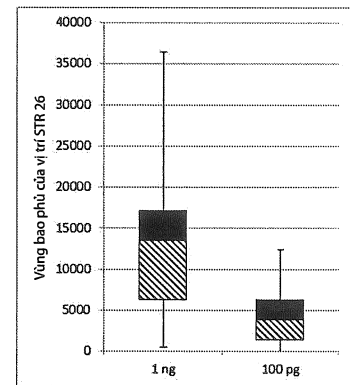
A



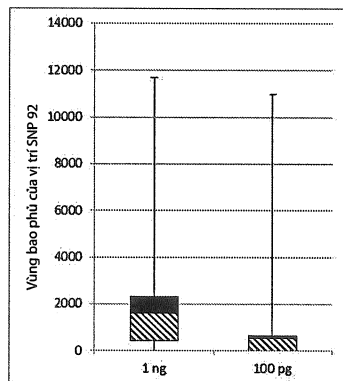
B



C



D



E

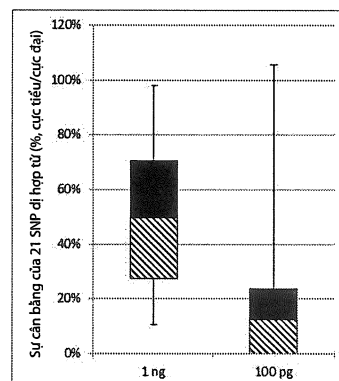


FIG. 8

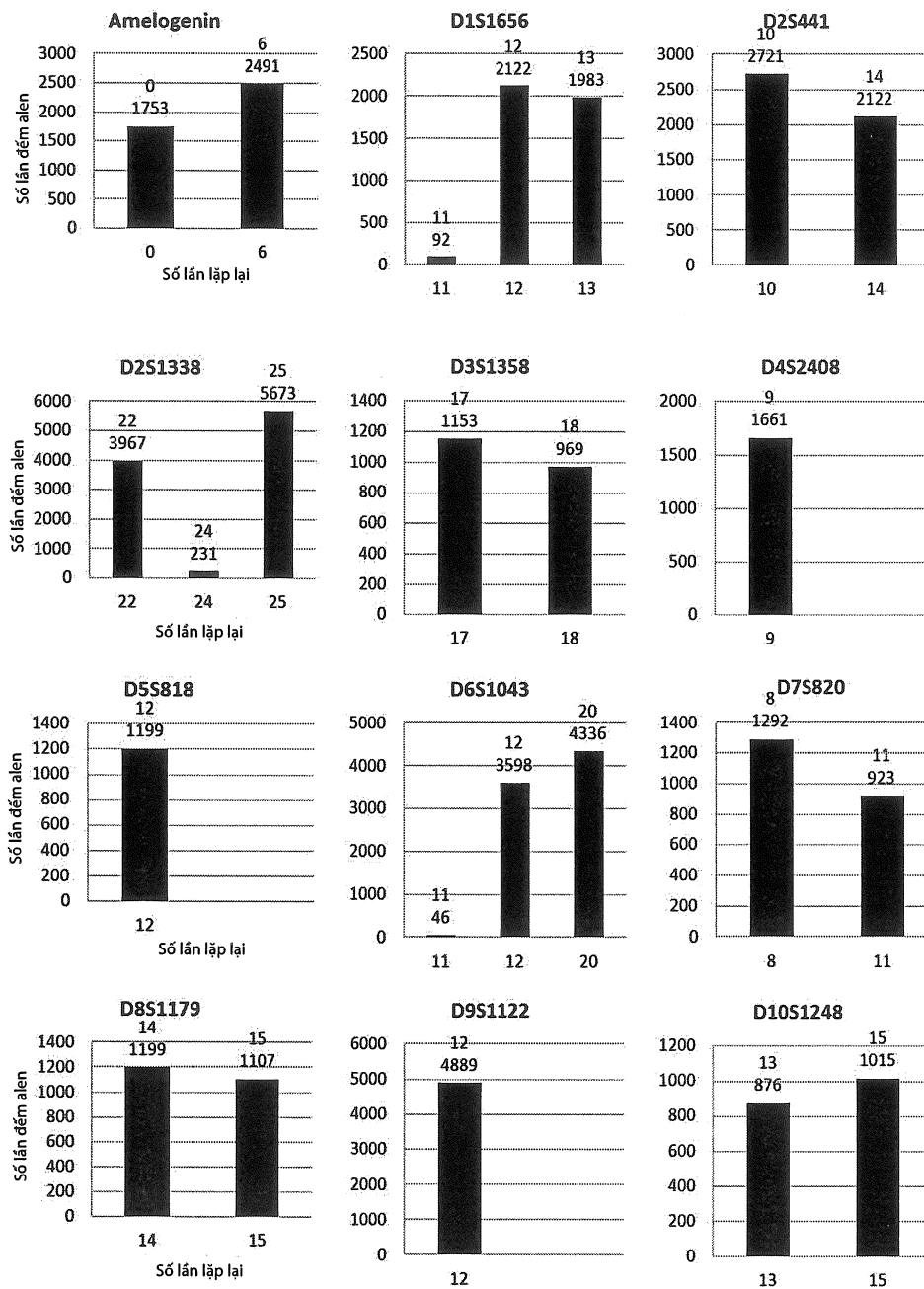


FIG. 8 (Tiếp theo)

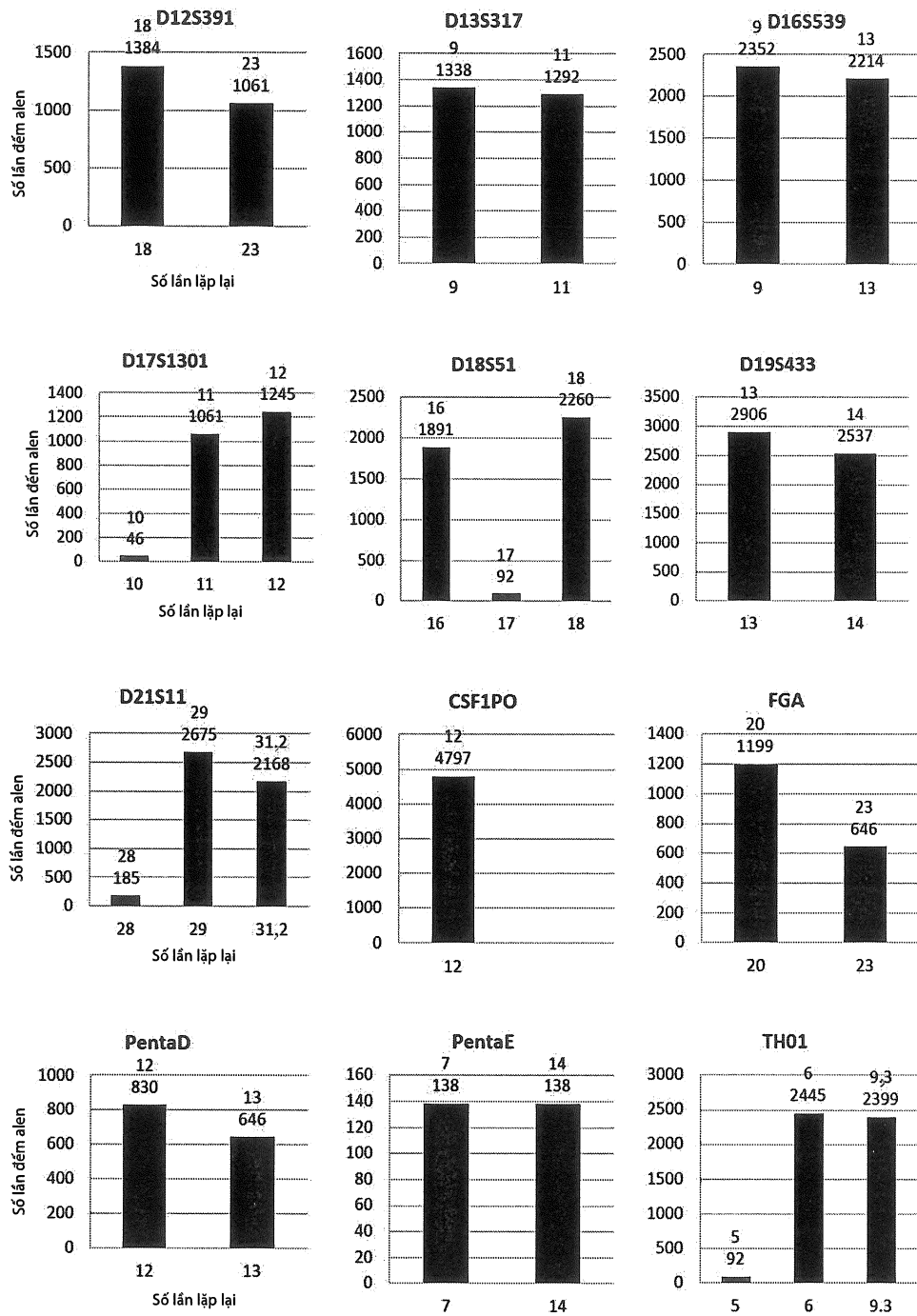


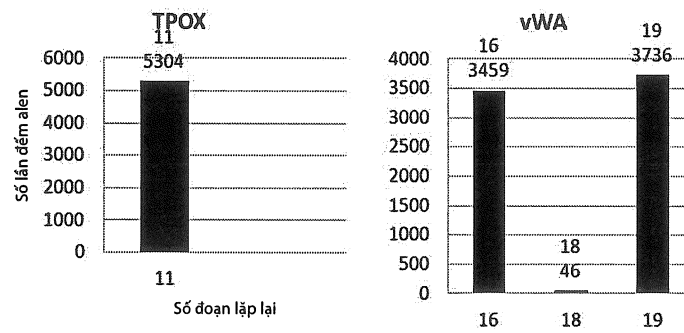
FIG. 8 (Tiếp theo)

FIG. 9

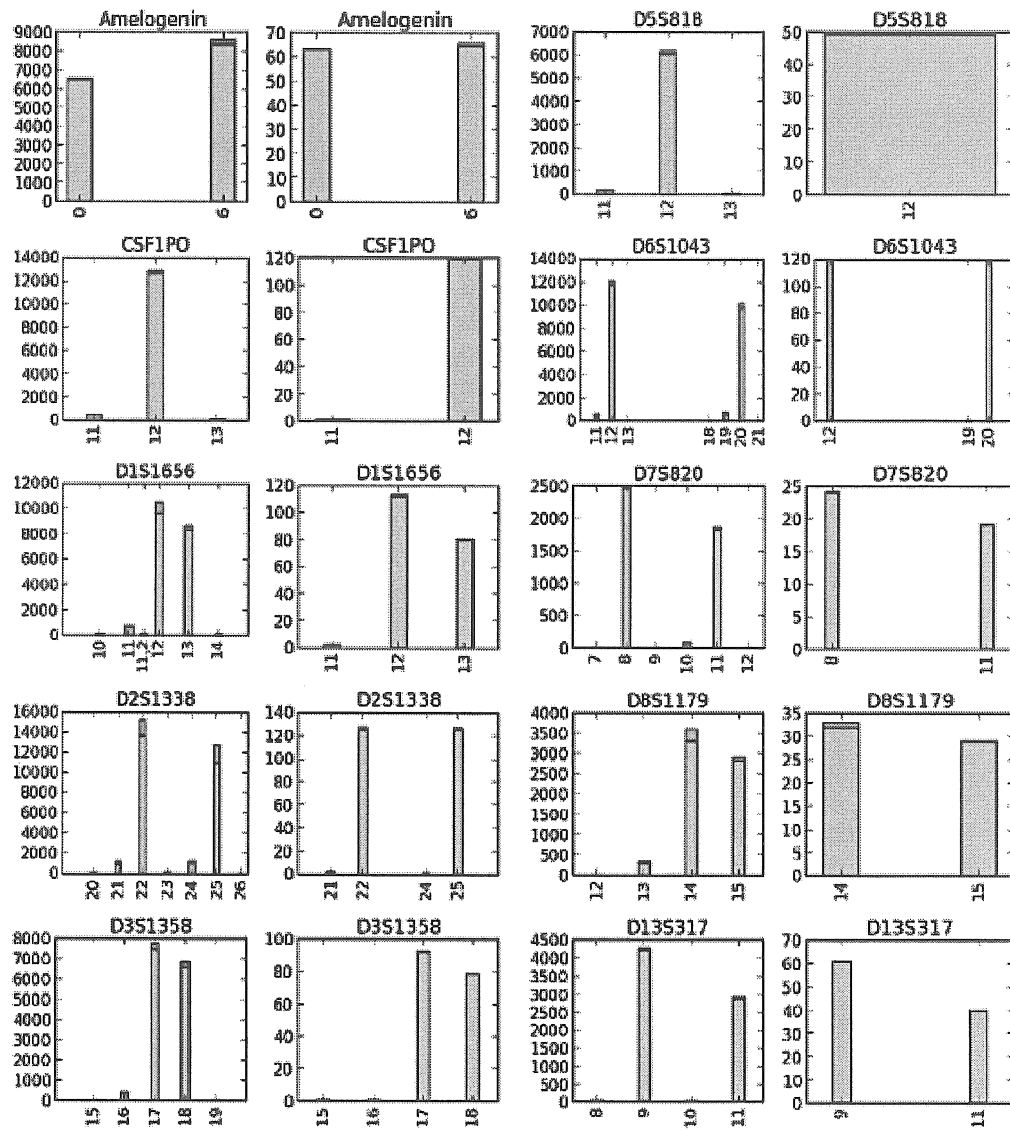


FIG. 9 (Tiếp theo)

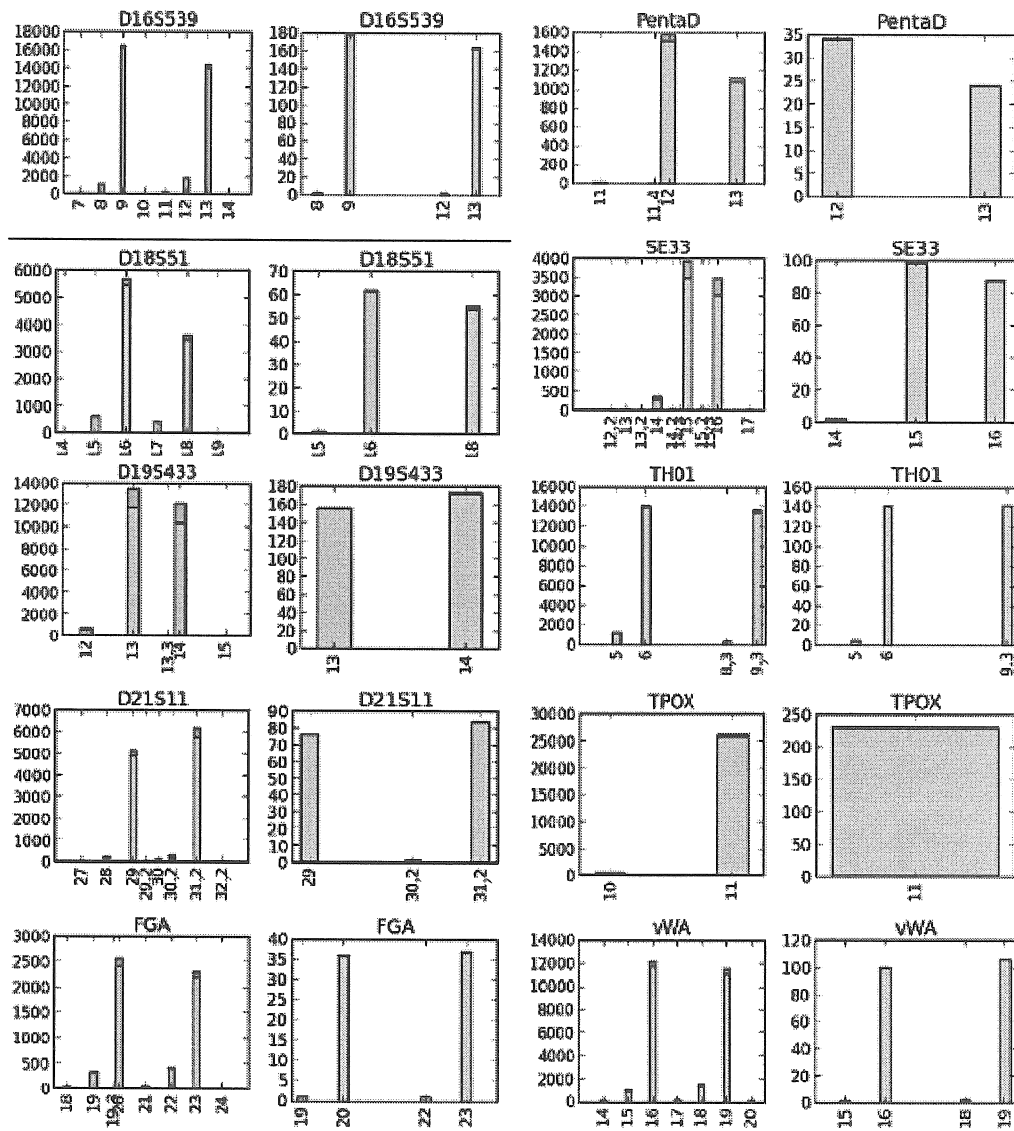
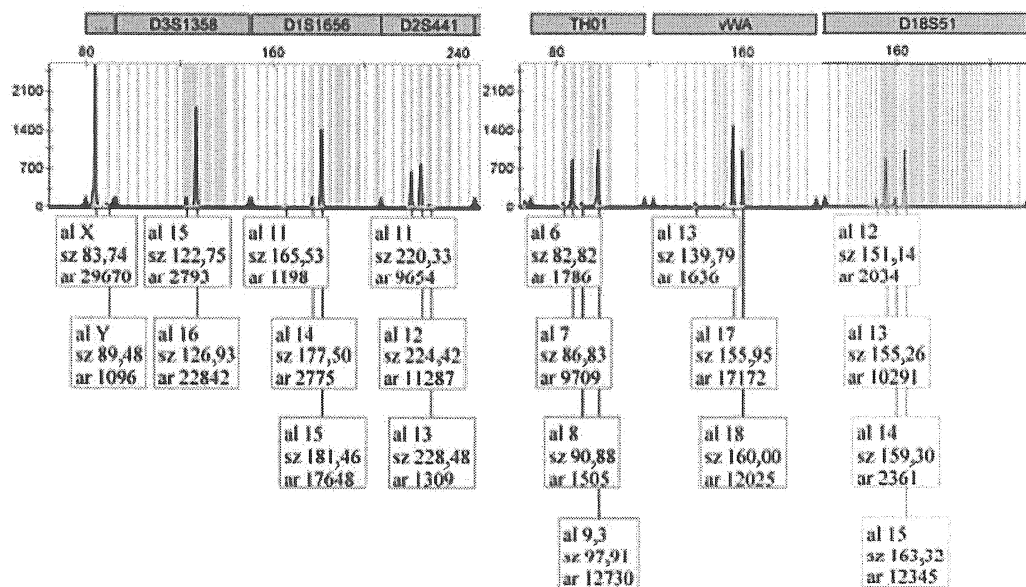


FIG. 10

A



B

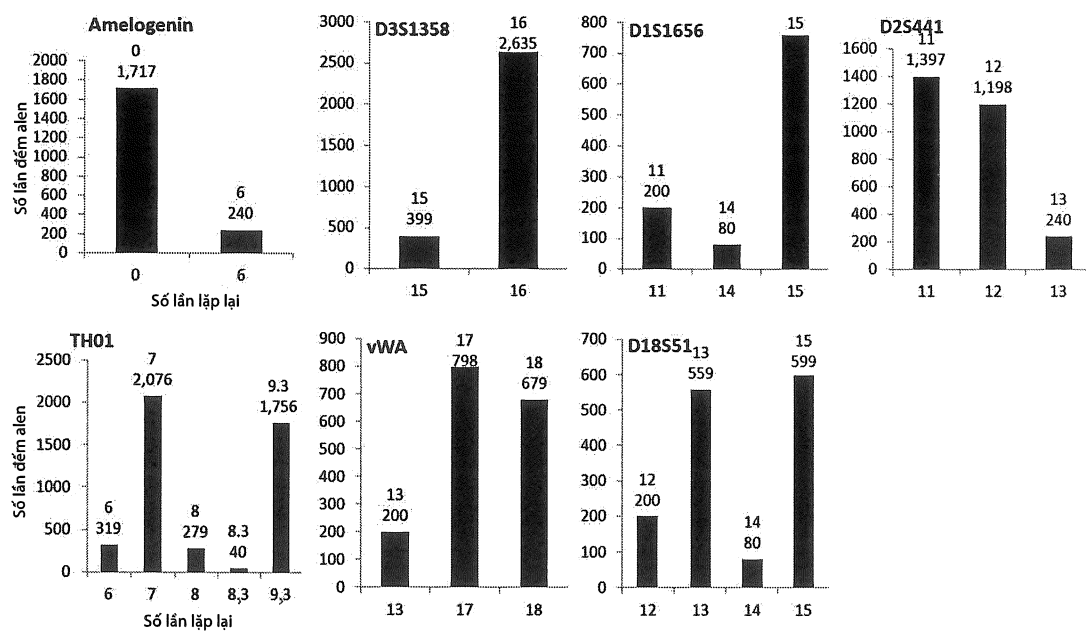


FIG. 11

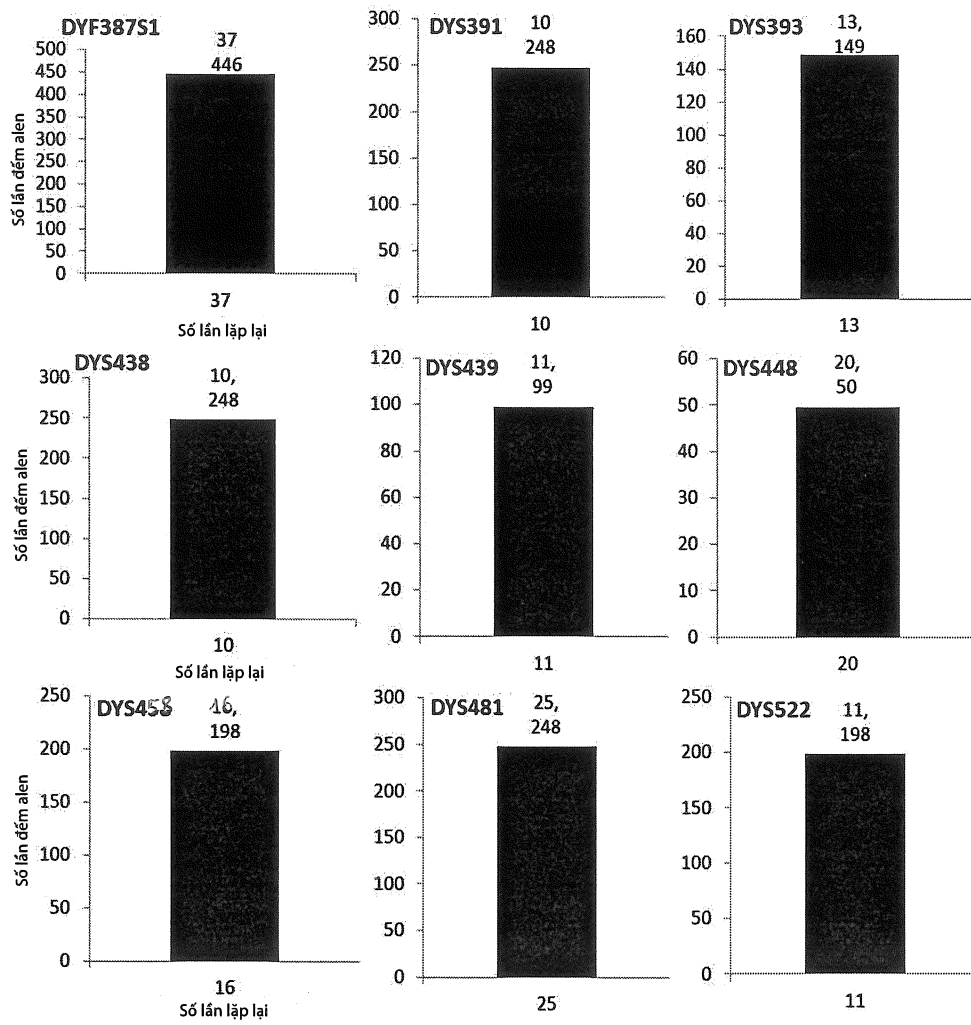
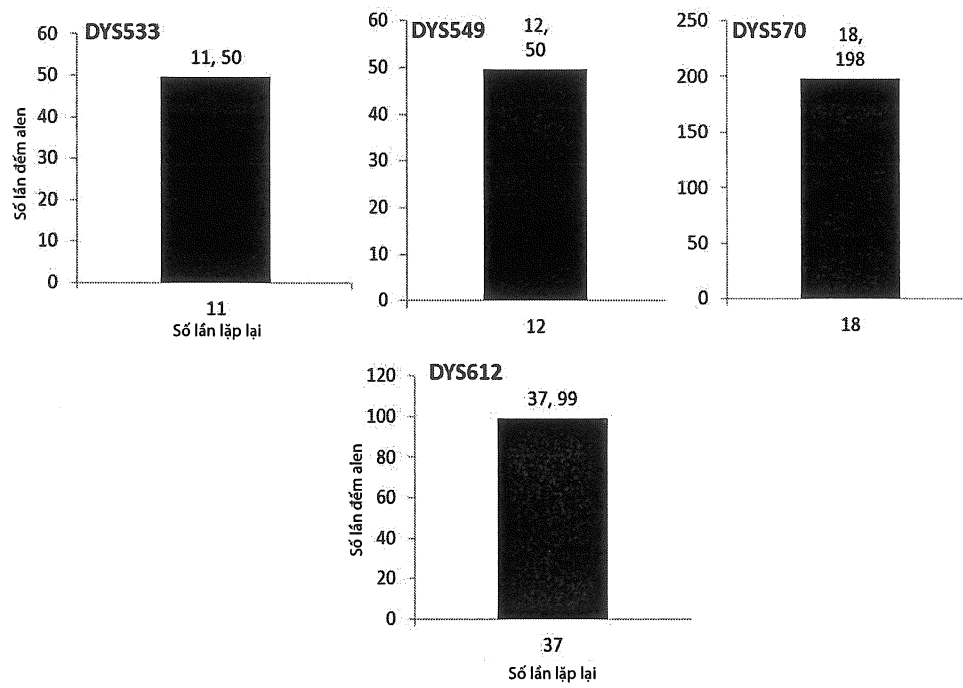


FIG. 11 (Tiếp theo)

	Giới tính (Amelogenin)		Số đọc được xếp đối với STR		Số đọc được xếp đối với SNP		# Vị trí STR được đếm		# Vị trí SNP được đếm	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
Mẫu 1	X,Y	X,Y	203068	248442	149466	181778	61	61	173	173
Mẫu 3	X	X	216055	257742	212633	240954	37	37	173	173
Mẫu 4	X,Y	X,Y	207488	205907	178985	169305	60	60	173	173
Mẫu 5	X	X	199073	248681	205600	252732	37	37	173	173
Mẫu 6	X,Y	X,Y	257850	281531	108997	129134	61	61	173	173
Mẫu 7	X,Y	X,Y	312646	273206	156677	120709	61	61	173	173
Mẫu 10	X	X	182882	321643	130252	235847	37	37	173	173
Mẫu 13	X	X	266863	319394	183128	207556	37	37	173	173
Mẫu 14	X	X	257545	180804	221688	155998	37	37	173	173
Mẫu 15	X,Y	X,Y	232712	251490	150815	184715	37	37	173	173
Mẫu 16	X,Y	X,Y	275702	213553	176862	126154	61	60	173	173
Mẫu 17	X	X	159708	235314	106760	193307	37	37	173	173
2800M	X,Y	X,Y	327295		125254		61		173	
NTC	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0

FIG. 12

Mẫu	RMP STR tự động của NIST	Tần suất kiểu gen đơn bội tin cậy 95% của NIST Y-RST	dbSNP iSNPs RMP	Y-STR DB của Mỹ (xác suất trùng)
Mẫu 1	1,05E-36	8,32E-03	3,98E-45	-2,58
Mẫu 3	4,90E-33		2,51E-46	
Mẫu 4	7,41E-37	8,32E-03	7,94E-41	-2,58
Mẫu 5	2,82E-37		1,00E-43	
Mẫu 6	1,45E-34	8,32E-03	6,31E-45	-2,58
Mẫu 7	4,17E-36	8,32E-03	1,58E-42	-2,58
Mẫu 10	3,55E-38		3,98E-44	
Mẫu 13	1,58E-37		7,94E-43	
Mẫu 14	2,00E-37		1,26E-44	
Mẫu 15	8,71E-38		1,58E-40	
Mẫu 16	6,03E-42	8,32E-03	1,26E-44	-2,58
Mẫu 17	4,07E-34		7,94E-46	
2800M	5,75E-33	8,32E-03	1,58E-44	-2,58

FIG. 13

Dự đoán											Các đặc tính thể cho	
Màu mắt					Màu tóc					Màu mắt	Màu tóc	
	Xanh lam	Trung gian	Nâu	Nâu	Đỏ	Đen	Vàng hoe	Sáng	Tối			
Mẫu 1	8%	14%	79%	47%	0%	12%	41%	74%	26%	Nâu	Nâu	
Mẫu 3	0%	1%	99%	35%	0%	63%	3%	3%	97%	Nâu	Nâu tối	
Mẫu 4	1%	3%	97%	30%	0%	68%	2%	3%	97%	Nâu	Đen	
Mẫu 5	2%	23%	75%	79%	4%	8%	10%	60%	40%	Nâu đỏ	Nâu	
Mẫu 6	3%	6%	91%	66%	0%	18%	16%	54%	46%	Nâu	Nâu	
Mẫu 7	0%	0%	100%	6%	0%	94%	0%	0%	100%	Nâu đậm	Đen	
Mẫu 10	49%	22%	29%	36%	0%	14%	50%	82%	18%	Xanh lam	Nâu/Vàng hoe	
Mẫu 13	0%	1%	99%	32%	0%	67%	1%	2%	98%	Nâu đậm	Đen	
Mẫu 14	2%	9%	88%	60%	1%	34%	4%	10%	90%	Nâu đậm	Nâu đậm	
Mẫu 15	1%	4%	95%	33%	0%	66%	0%	0%	100%	Nâu đậm	Nâu đậm	
Mẫu 16	0%	0%	100%	16%	0%	84%	0%	0%	100%	Nâu đậm	Đen	
Mẫu 17	85%	8%	6%	63%	8%	11%	19%	62%	38%	Xanh lam	Nâu sáng/Vàng hoe	
2800M	5%	12%	83%	43%	0%	5%	52%	88%	12%			

FIG. 14

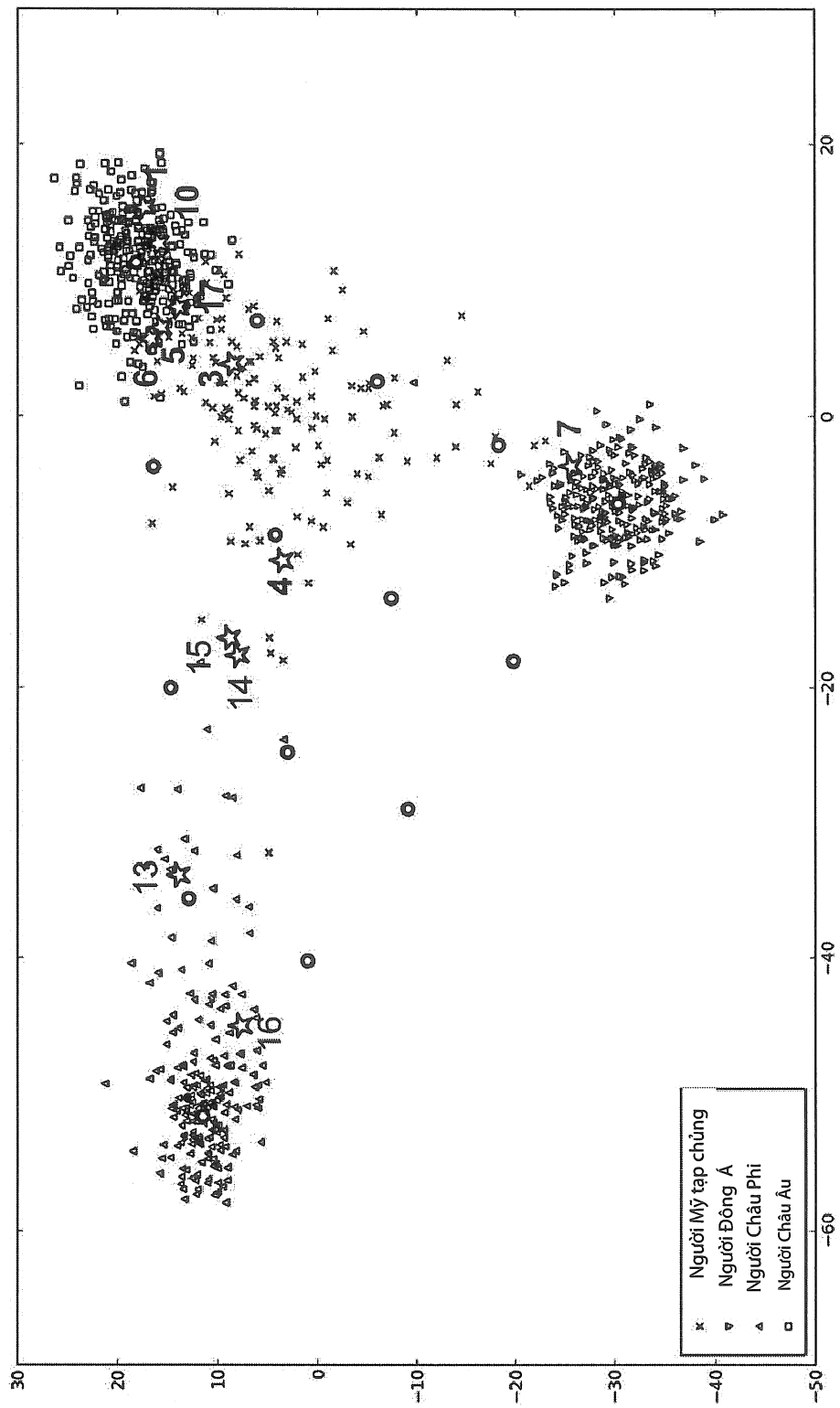


FIG. 15

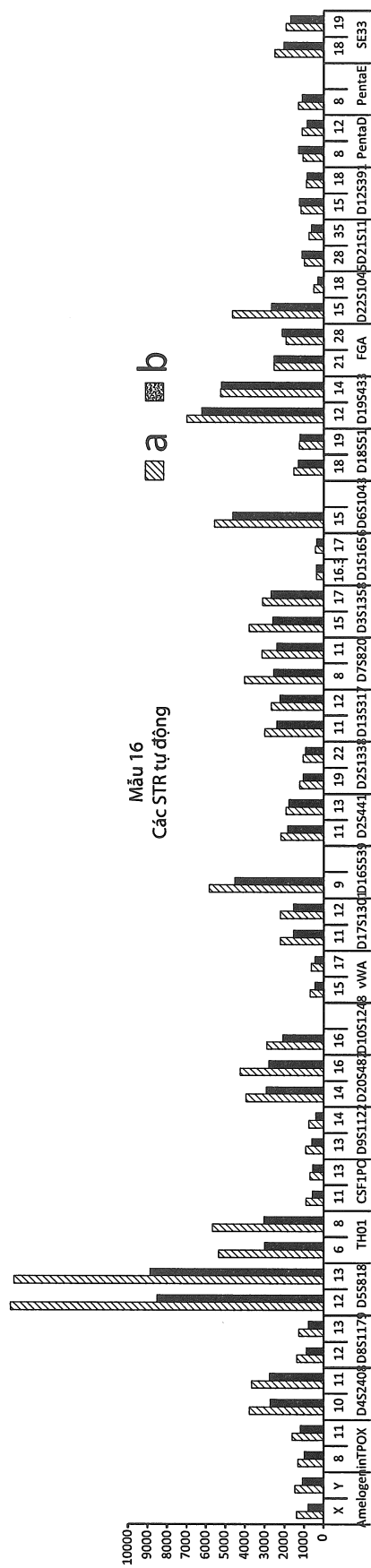


FIG. 16A

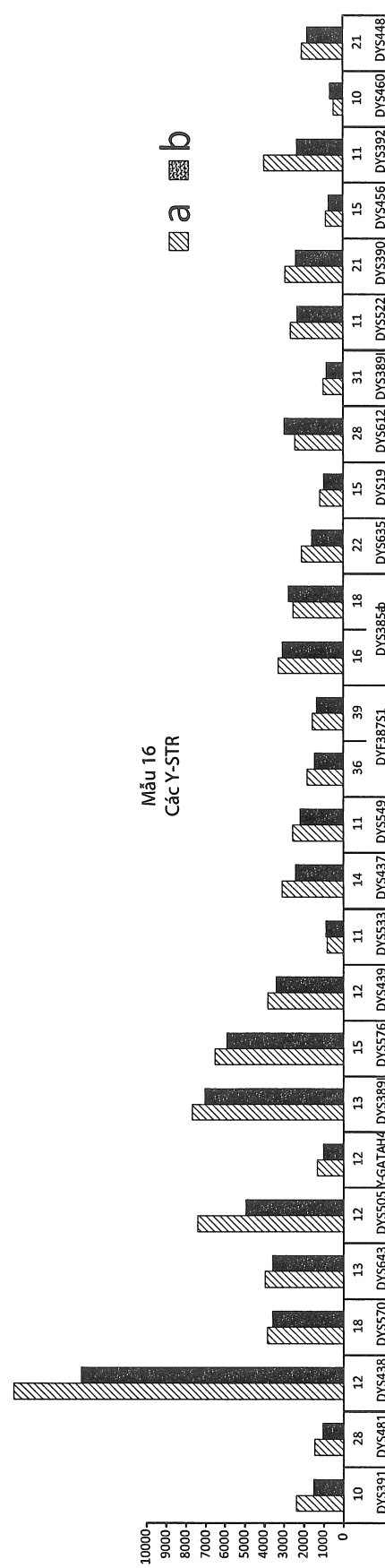


FIG. 16B

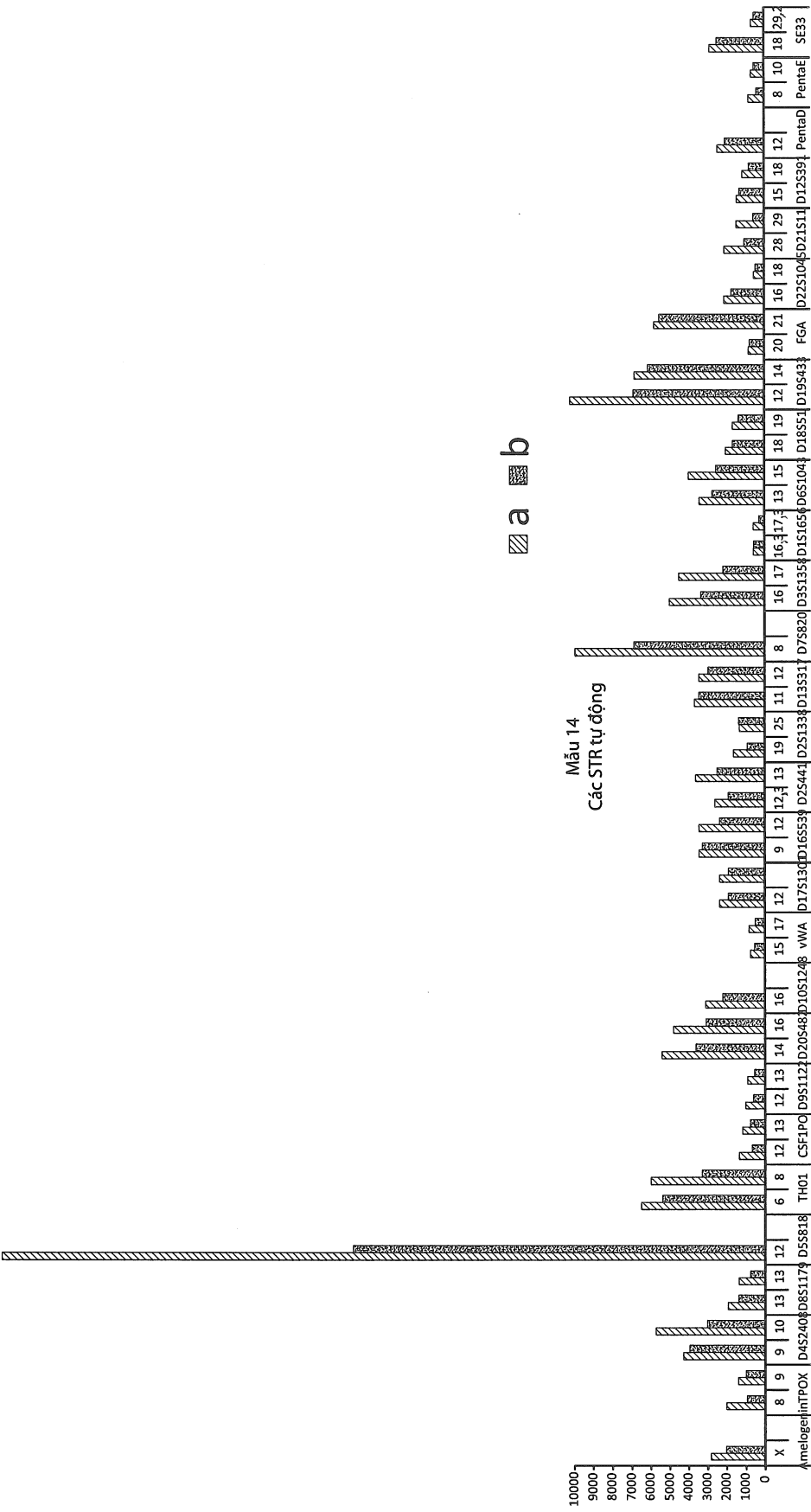


FIG. 16C

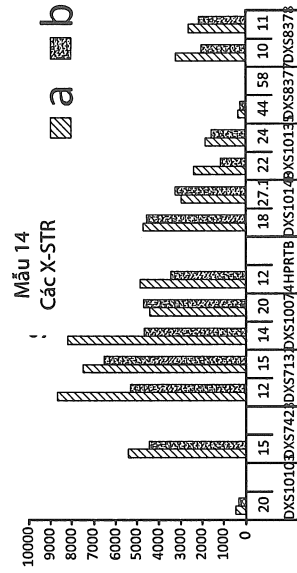


FIG. 16E

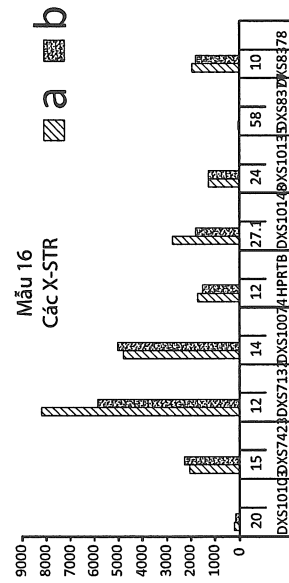


FIG. 16D

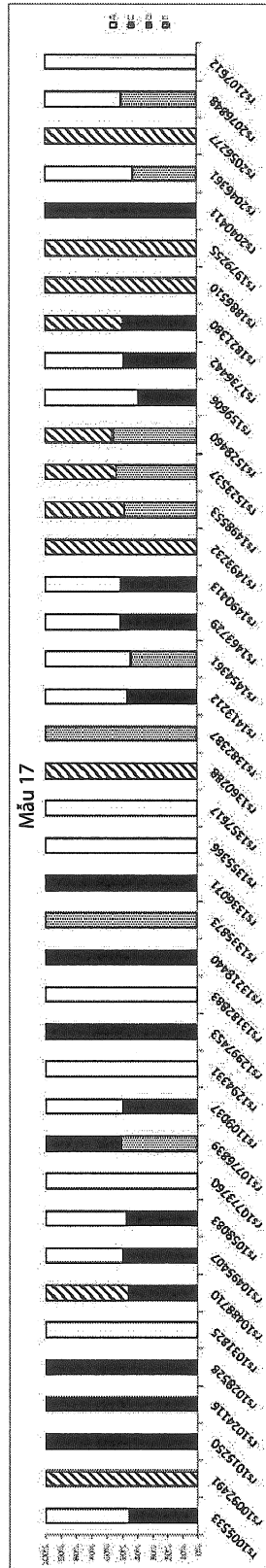


FIG. 17A

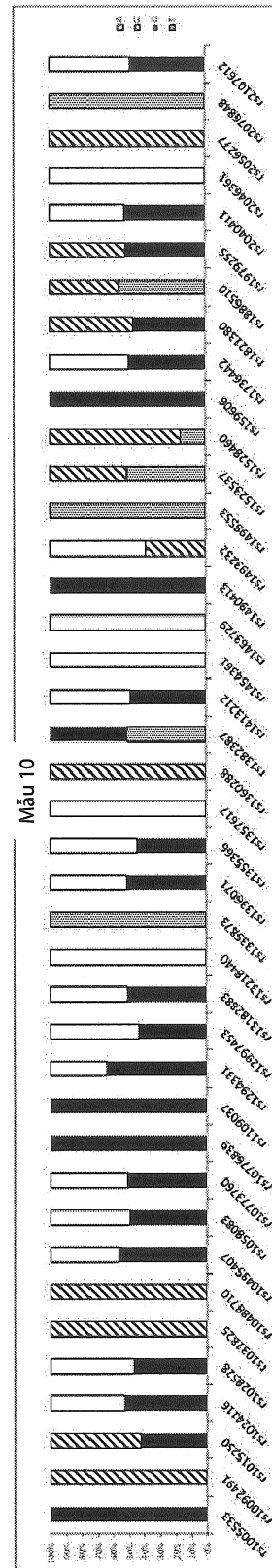


FIG. 17B

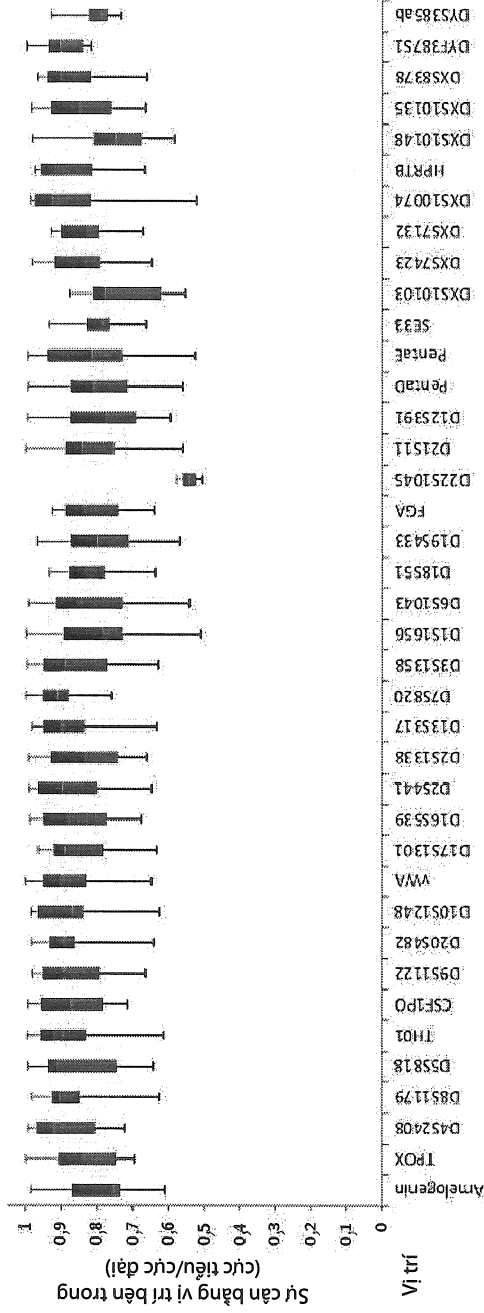


FIG. 18A

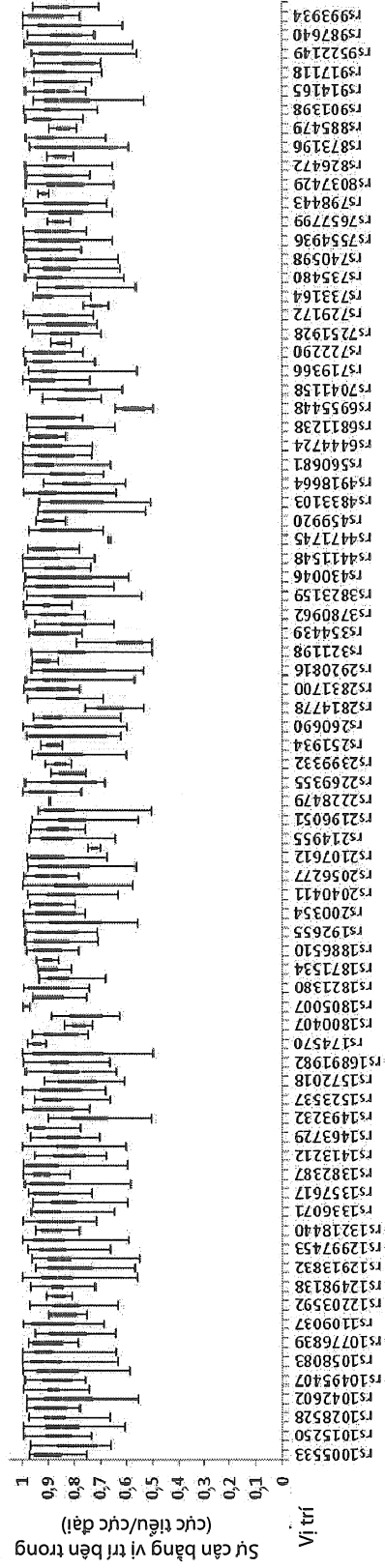


FIG. 18B

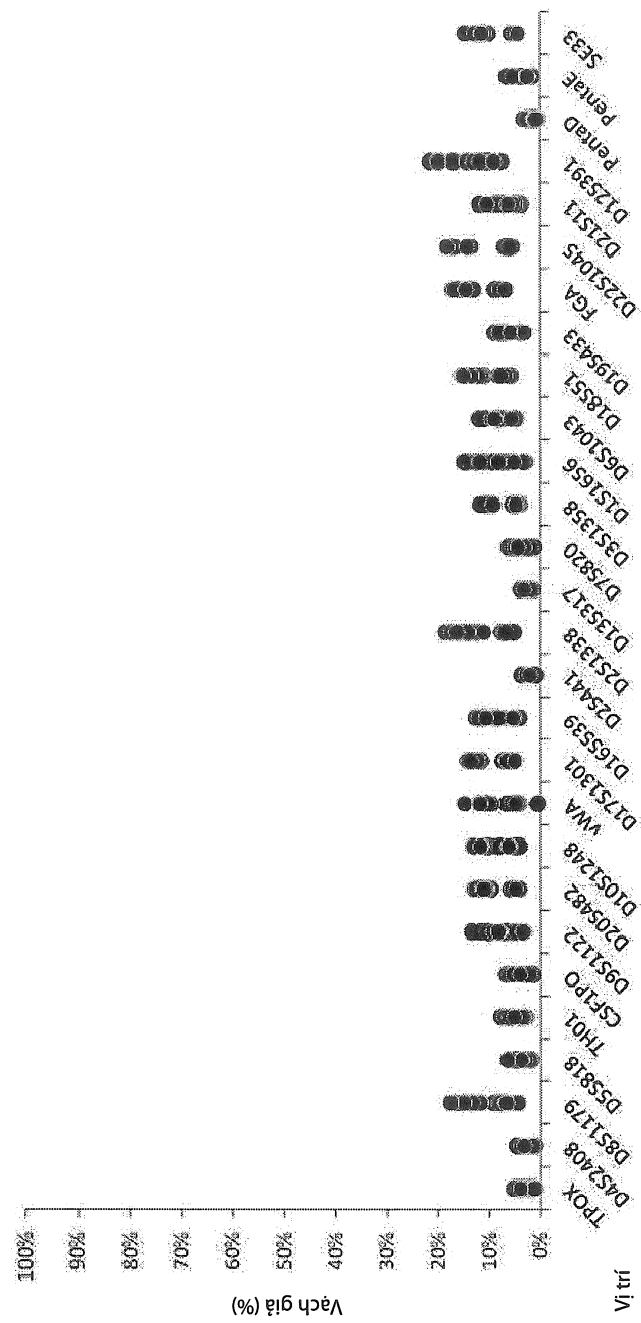
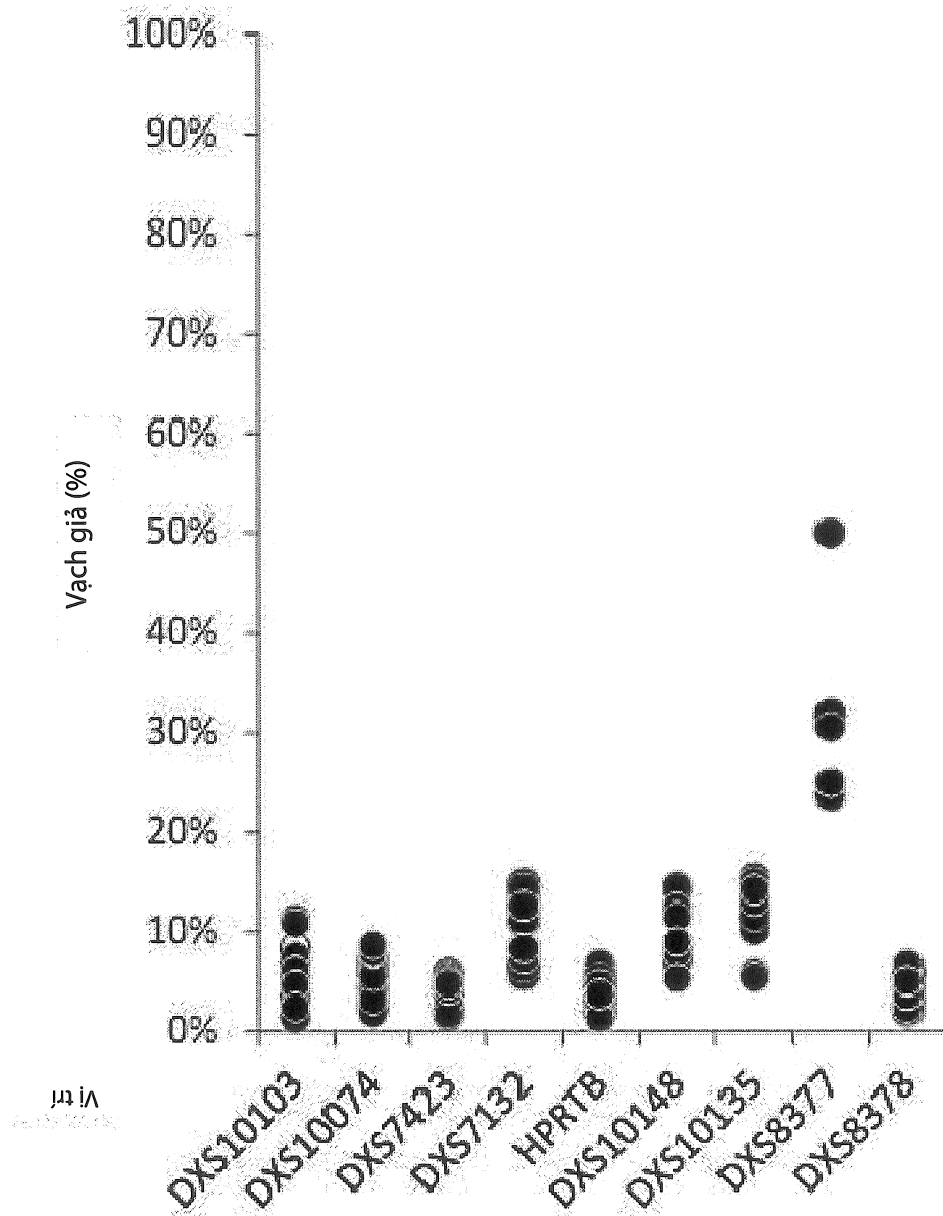


FIG. 19A

*FIG. 19B*

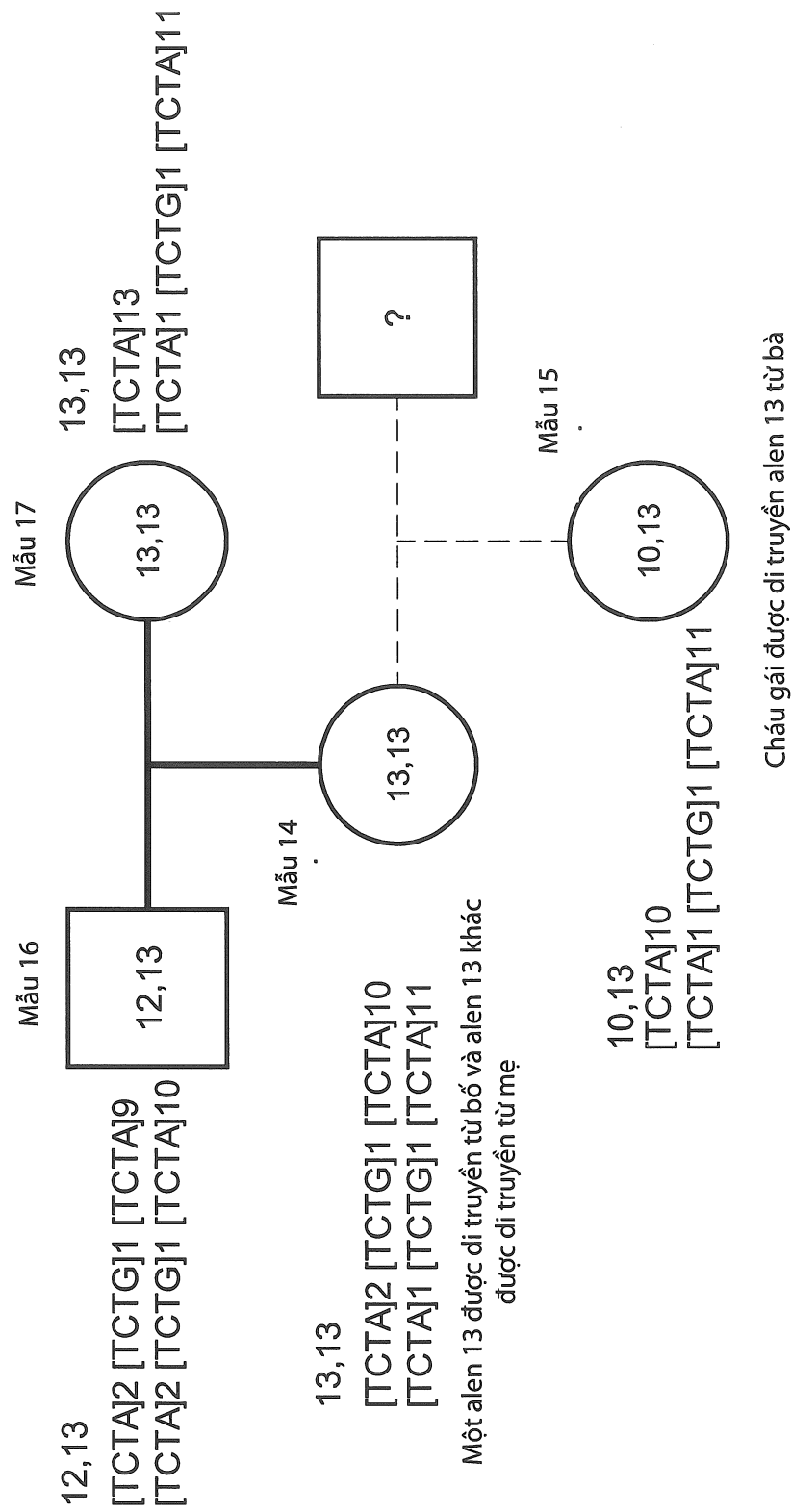
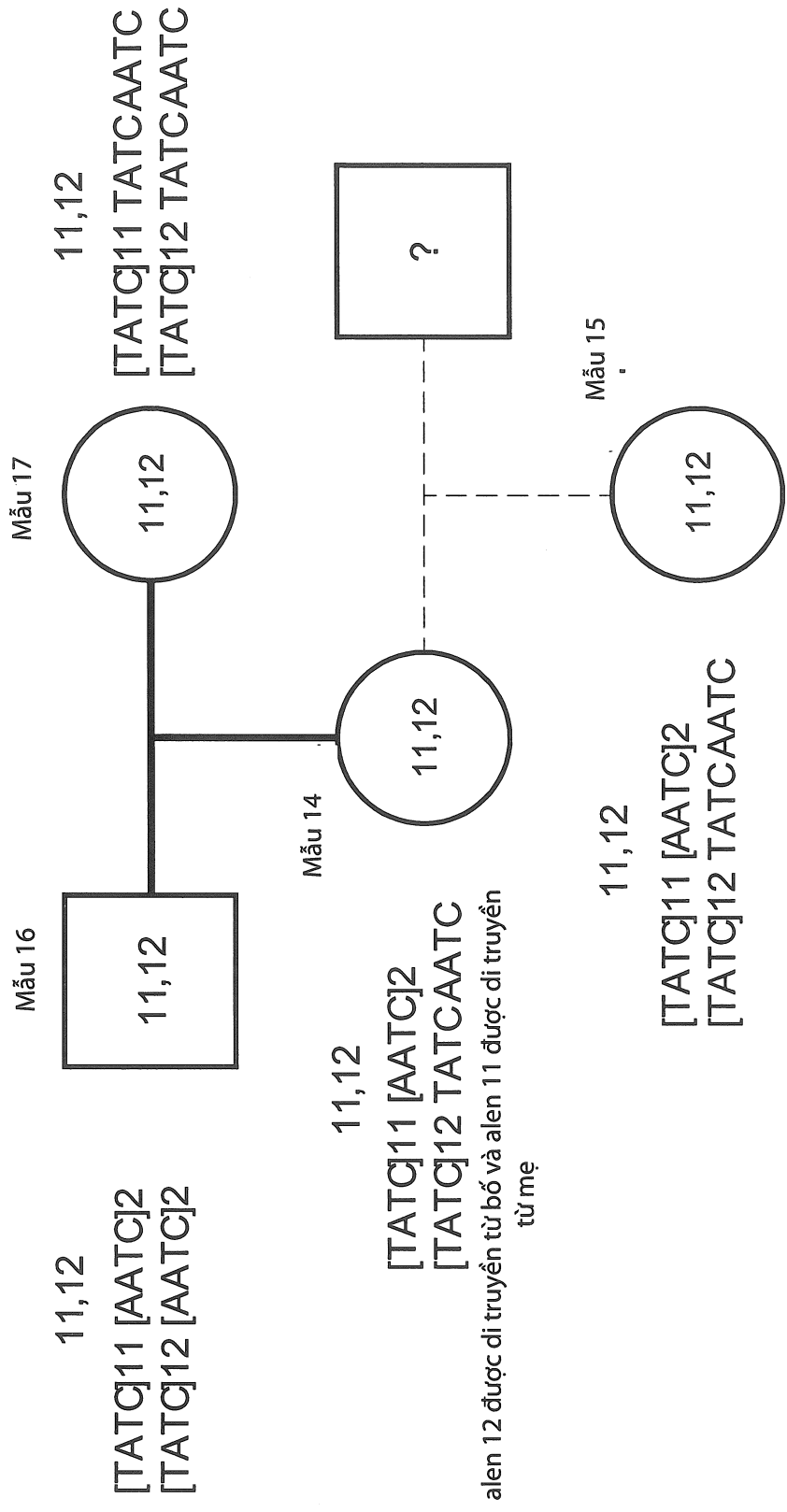


FIG.21



Không thể nói là alen đến từ mẹ

FIG.22

FIG. 23

Mẫu	Các STR được đếm	Các iSNP được được	Các alen STR được nhỏ giọt	Các alen SNP được nhỏ giọt	RMP*
Đối chứng ở nam	60	94	Không	Không	1 trong 5,6E +28
ADN ở nam được cắt	45/60	93/94	5	3	1 trong 2,3E+28
ADN ở nam được cắt + DNaza	28/60	81/94	5	8	1 trong 5,6E+28
Đối chứng ở nữ	36	94	Không	Không	1 trong 1,7E+29
ADN ở nữ được cắt	32/36	92/94	7	3	1 trong 3,11E+28
ADN ở nữ được cắt	21/36	77/94	11	17	1 trong 1,41E+16

Tổng các alen STR được đếm				
pg DNA	Bản sao			
	1	2	3	4
7,82	51	49	59	52
15,6	66	74	67	76
31,3	85	88	86	83
62,5	88	89	89	89
125	89	89	89	89
250	89	89	89	89
500	89	89	89	89
1000	89	89	89	89

FIG. 24A

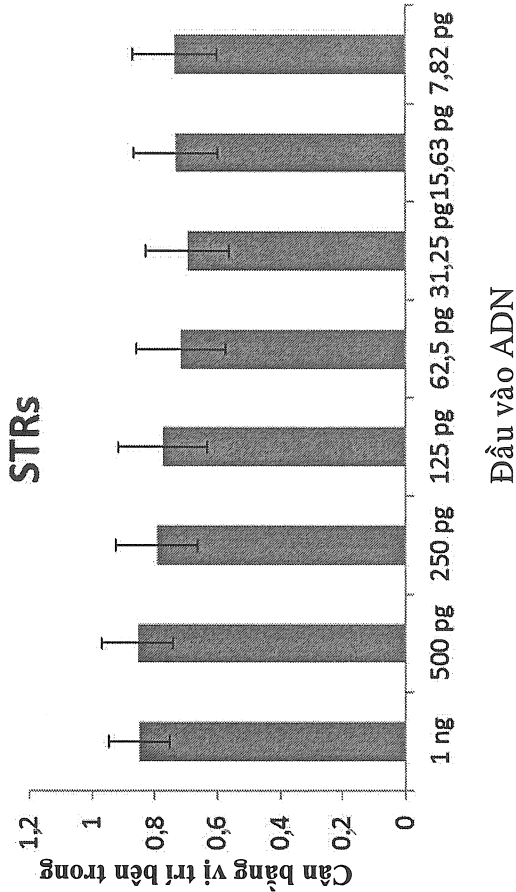


FIG. 24B

Tổng các alen SNP được đếm				
pg ADN	Bản sao			
	1	2	3	4
7,82	121	129	120	129
15,6	175	172	166	173
31,3	210	209	215	210
62,5	222	226	225	222
125	226	226	226	226
250	226	226	226	226
500	226	226	226	226
1000	226	226	226	226

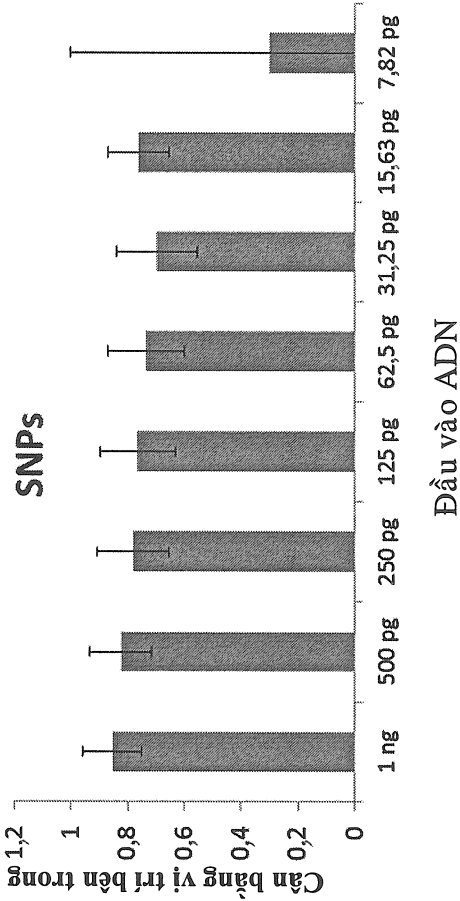


FIG. 25A

FIG. 25B

Danh mục trình tự

- <110> Illumina, Inc.
 Stephens, Kathryn M.
 Holt, Cydne
 Davis, Carey
 Jager, Anne
 Walichiewicz, Paulina
 Han, Yonmee
 Silva, David
 Shen, Min-Jui Richard
 Amini, Sasan
 Steemers, Frank J.
- <120> PHƯƠNG PHÁP VÀ CHẾ PHẨM DÙNG CHO HỒ SƠ ADN
- <130> ILLINC.276WO/IP-1192
- <150> 62/103,524
 <151> 2015-01-14
- <150> 62/043,060
 <151> 2014-08-28
- <150> 61/940,942
 <151> 2014-02-18
- <160> 404
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ
- <400> 1
 ccctgggctc tgtaaagaa 19
- <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ
- <400> 2
 atcagagcctt aaactgggaa gctg 24
- <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 3

acagtaactg ccttcataga tag

23

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 4

gtgtcagacc ctgttctaag ta

22

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 5

tgattttcct ctttggtatc cttatgtaat

30

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 6

acaacatttg tatctttatc tgtatcct

28

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 7

tttgtatttc atgtgtacat tcgtatc

27

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 8

acctatcctg tagattattt tcactgtg

28

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 9

ctctgagtga caaattgaga cctt	24
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 10	
ttaacttctc tgggtgtgg agatg	25
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 11	
tttggtgcac ccattaccg	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 12	
aggaggtga ggctgcaaaa	20
<210> 13	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 13	
caccaaatat tggtaattaa atgttacta tagac	35
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 14	
taaagggtat gatagaacac ttgtc	25
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 15	
caaaggcaga tccaagctc t	21
<210> 16	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 16	
tgtgtgtgca tctgtaagca t	21
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 17	
tggtgtgtat tccctgtgcc	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 18	
gcagtccaat ctgggtgaca	20
<210> 19	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 19	
ccaatctggt cacaacata ttaatgaa	28
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 20	
tttcccttgt ctgttatta aaggaac	27
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 21	
ttccattgg cctgttctc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	

<400> 22 ctgtacacag ggcttccgag	20
<210> 23 <211> 23 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 23 gctgagtgat ttgtctgtaa ttg	23
<210> 24 <211> 37 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 24 gaactcacag attaaactgt aacccaaaata aaattag	37
<210> 25 <211> 22 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 25 caatagtgtg caaggatggg tg	22
<210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 26 tctgtggttc tccagcttac	20
<210> 27 <211> 22 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 27 cttagggaac cctcactgaa tg	22
<210> 28 <211> 22 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 28 gtccttgtca gcgtttattt gc	22

<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 29	
ttgggttgag ccataggcag	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 30	
gcatccgtga ctctctggac	20
<210> 31	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 31	
gttatgggac tttctcagt ctccat	26
<210> 32	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 32	
gagactaata ggaggtagat agactgg	27
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 33	
gagactgtat tagtaaggct tctc	24
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 34	
cctggactga gccatgctcc	20
<210> 35	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 35	
cagtcctgtg ttagtcagga ttc	23
<210> 36	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 36	
tcaaggggtca actgtgtgat gt	22
<210> 37	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 37	
cttctgaaag cttctagttt acct	24
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 38	
ttgcttattt gtgggggtat ttca	24
<210> 39	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 39	
aagaattctc ttattgggt tattaattg	29
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 40	
aaattgtgga caggtgcggt	20
<210> 41	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	

<400> 41 ccatgtaaaa atacatgcat gtgtttattt atac	34
<210> 42 <211> 35 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 42 tgattaaaaa gaatgaaggt aaaaatgtgt ataac	35
<210> 43 <211> 34 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 43 ccaaatgttt atgattaatc tttaaattg gagg	34
<210> 44 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 44 gtaacaaggg ctacaggaat catgag	26
<210> 45 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 45 tcatccactg aaatgactga aaaatag	27
<210> 46 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 46 aggtaacataa cagttcaata gaaag	25
<210> 47 <211> 29 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 47 gagttattca gtaagttaaa ggattgcag	29

<210> 48
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 48
 gggagccagt ggattggaa acag 24

 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 49
 gcatggtgag gctgaagtag 20

 <210> 50
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 50
 ctaacctatg gtcataacga tttt 25

 <210> 51
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 51
 gatgataaga ataacagta tgtgacttgg 30

 <210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 52
 ataggttaga tagagatagg acagatgata 30

 <210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 53
 ccctaccgct atagtaactt gc 22

 <210> 54
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 54

cacgtctgta attccagctc cta

23

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 55

ggaagcgtgt actagagttc ttcag

25

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 56

ggacagcctc catatccaca tg

22

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 57

ttcctactgc cccaccttta ttg

23

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 58

tttatgggtct cagtgccct caga

24

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 59

tcataatcac atatcacatg agc

23

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 60

aaacagaacc aggggaatga a	21
<210> 61	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 61	
tgaaactaaa gtcaaatggg gctac	25
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 62	
taaggggtga cacctctctg gata	24
<210> 63	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 63	
cccagcctac atctaccact tcatg	25
<210> 64	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 64	
ctaattgtcg tatggacctt tggaaagc	28
<210> 65	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 65	
gtctccagta cccagctagc ttag	24
<210> 66	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 66	
tctccaacc tgccctttat ca	22
<210> 67	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 67
 ttgggctga cacagtggct 20

<210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 68
 ttgatcaaca caggaggttt gacc 24

<210> 69
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 69
 tataccactt tgatgtgac actagtttac 30

<210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 70
 cctgtctatg gtctcgattc aat 23

<210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 71
 tgcattgacag agggagattc t 21

<210> 72
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 72
 agaggggaaa tagtagaatg aggatg 26

<210> 73
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 73 gccaaactct attagtcaac gttc	24
<210> 74 <211> 24 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 74 ctggttctct agctcacata cagt	24
<210> 75 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 75 tttaccctta acaagaaaaa aagaagaa	28
<210> 76 <211> 24 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 76 cagtgtagaga agtgtagaaa gtgc	24
<210> 77 <211> 21 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 77 gacaccatgc caaacaacaa c	21
<210> 78 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 78 atctatctat tccaattaca tagtcc	26
<210> 79 <211> 30 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 79 tcattatacc tacttctgta tccaactctc	30

<210> 80
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 80
 ggaacacaat tatccctgag tagcag 26

 <210> 81
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 81
 ggtagcataa tagaaatttt atgagtggg 29

 <210> 82
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 82
 gaagacagac ttcaatatca cagaacatcg 30

 <210> 83
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 83
 gtgtatctat tcattcaatc atacaccc 28

 <210> 84
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 84
 ctccctgggt gcaagcaatt gcc 23

 <210> 85
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 85
 ccaaaaattag tggggaatag ttgaac 26

 <210> 86
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 86
 gtcgagatca caccattgca tttc 24

 <210> 87
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 87
 gcctggcttg gaattctttt accc 24

 <210> 88
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 88
 tttaagtctt taatctatct tgaattaata gattc 35

 <210> 89
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 89
 ctttaagagg agtctgctaa aaggaatg 28

 <210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 90
 tcaccagaag gttgcaagac 20

 <210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 91
 tctggcgaag taaccctaaac 20

 <210> 92
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 92 tcgagtcagt tcaccagaag g	21
<210> 93 <211> 17 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 93 ggaaccagtg agagccg	17
<210> 94 <211> 19 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 94 ctcagagtgc tgaaccag	19
<210> 95 <211> 32 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 95 gtatttatc atgatcagtt ctaactcaa cc	32
<210> 96 <211> 41 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 96 ctacctaata ttatctata tcattctaatt tatgtctctt c	41
<210> 97 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 97 ctctaaaggt ttttttggg ggcataag	28
<210> 98 <211> 32 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 98 gattaataca acaaaaattt ggtaatctga aa	32

<210> 99
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 99
 caacctaagc tgaaatgcag atattc 26

 <210> 100
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 100
 gttatgaaac gtaaaatgaa tgatgactag 30

 <210> 101
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 101
 gcagtctcat ttctggaga tgaagg 26

 <210> 102
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 102
 cttgggctga ggagttcaat c 21

 <210> 103
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 103
 gccagtaaga ataaaattac agcatgaag 29

 <210> 104
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 104
 gaataatcta ccagcaacaa tggct 25

 <210> 105
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 105

tgcccaatgg aatgctctct

20

<210> 106

<211> 33

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 106

gctccatctc aaacaacaaa aacacaaaaa atg

33

<210> 107

<211> 23

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 107

gggtcattga acctcatgct ctg

23

<210> 108

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 108

ccccccaaaa ttctactgaa gtaaa

25

<210> 109

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 109

taacaggata aatcacctat ctatgtat

28

<210> 110

<211> 23

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 110

gctgaggaga atttccaaat tta

23

<210> 111

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 111

cccgcaaact aactaggata aatctcta	28
<210> 112	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 112	
cgacatggga aatgtcagat cataagac	28
<210> 113	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 113	
ccagggagtg aaaaatcctt ttatcatc	28
<210> 114	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 114	
gaggatgaag gttagagcca gacct	25
<210> 115	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 115	
tgtggaataa actgaaggct aaagaaaa	28
<210> 116	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 116	
caagccctat gccaaggata taacaatg	28
<210> 117	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 117	
gaggttttac tgtattagga gttccac	28
<210> 118	

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 118
 cagatgtgag atgataattt cgttctcc 28

<210> 119
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 119
 ttgttcttct ccatccatt tcaccc 26

<210> 120
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 120
 cttgtacatt cccttatctg ctatgtgg 28

<210> 121
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 121
 ctctcttgg agtttatgt gttgctac 28

<210> 122
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 122
 ctctgatgat gtgcaagaaa ggtaggta 28

<210> 123
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 123
 tcagactatg ttttaaggag actatgagg 29

<210> 124
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 124 ctaagtatct accaatgtgc tacgtacc	28
<210> 125 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 125 cacgtggatg atatggtttc tcaagg	26
<210> 126 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 126 agcacctata tattatacct gaaagcat	28
<210> 127 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 127 cccatgattt tctgtggtg agaatttc	28
<210> 128 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 128 caccctctgt actttaattt gacttccc	28
<210> 129 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 129 gtttttcttc attcccatgt tgtgtac	27
<210> 130 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 130 cactcttctg aatcctggtc aacaac	26

<210> 131
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 131
 caagttatat catagagtct acgacccc 28

 <210> 132
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 132
 ctgcaactat cagtctctgc ccttattc 28

 <210> 133
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 133
 gatgtgtctc aaactgttta ttgtgagg 28

 <210> 134
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 134
 gaactcattt atccagagac ctgttctc 28

 <210> 135
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 135
 cataatacaa cctgtctttg gagttact 28

 <210> 136
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 136
 gtgaccagta gttctatgag caagtatg 28

 <210> 137
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 137
 ccacattgta tggtttttag gcaccatg 28

<210> 138
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 138
 ctaataagtg ggacagttaa gagaaggc 28

<210> 139
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 139
 caagacaagc gattgaaaga agtggat 27

<210> 140
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 140
 ccttgtcaat cttctacca gagggtaa 28

<210> 141
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 141
 gaatcatagc ttgtgttgt caggg 25

<210> 142
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 142
 gaattacaag tattgcatc ccagcct 27

<210> 143
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 143 gaccaacttg gctttaacag atgcaaat	28
<210> 144 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 144 tccttacctt taagactttt cctatttg	28
<210> 145 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 145 cattatctcg tcatacttcc ctgtcttg	28
<210> 146 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 146 gcatcaaatt caccagtgaa attattga	28
<210> 147 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 147 atgagtacat tattcaactg ttttgag	28
<210> 148 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 148 cagccatgtt gtaaacattt ttacggtc	28
<210> 149 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 149 gcacattcta agaactgggtg attctatc	28

<210> 150
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 150
 gctagaaaaa gctgagatag ctgtgaag 28

 <210> 151
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 151
 ccttgaagct cattctttgt tgtccc 26

 <210> 152
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 152
 ctggacacca gaccaaaaac aaataacc 28

 <210> 153
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 153
 gtaattagag ggcagtgagg cttttaa 27

 <210> 154
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 154
 ctccagaagc tactgggata ttaattag 28

 <210> 155
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 155
 tgagccaaat cagcaatata ataggact 28

 <210> 156
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 156

cctagaacca caattatctg tctttggc 28

<210> 157

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 157

ccattgattc tctacagttc tgcaggta 28

<210> 158

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 158

ctccacactt tatacaggtg aaatctga 28

<210> 159

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 159

catTTTTctc tccttctgtc tcaccttc 28

<210> 160

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 160

gcttctcttt cccttatgta tctctctc 28

<210> 161

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 161

ggcttttgaa gaaaaacact aacctgtc 28

<210> 162

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 162

cacctatggg ctctcttat ttctcc	26
<210> 163	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 163	
catttgatag ccattgggt tgttcca	28
<210> 164	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 164	
ccatcacact atcctgacat gaacaaat	28
<210> 165	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 165	
gaagattgc atcccagtga aagcac	26
<210> 166	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 166	
gcactcata aagaatcagt caggatgc	28
<210> 167	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 167	
ggagaatcag gaaatagtca ctctctac	28
<210> 168	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 168	
catttgacct tctagccaaa tgaagtac	28
<210> 169	

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 169
 ggaattctg agaataacat tgcctctc 28

<210> 170
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 170
 catatgttgg gggagctaaa cctaatga 28

<210> 171
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 171
 cactgtgacc acagcatctt ttaactc 27

<210> 172
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 172
 gggtaaagaa atattcagca catccaaa 28

<210> 173
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 173
 gagtatccct tatctaaaat gctggtcc 28

<210> 174
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 174
 cttttctct taccggaact tcaacgac 28

<210> 175
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 175 cctcattaat atgaccaagg ctcctctg	28
<210> 176 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 176 tgactctaatt tggggatgtg gtaattag	28
<210> 177 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 177 gacctaacct ggagaaaacc ggaga	25
<210> 178 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 178 gtttctcttc tctgaacctt tgtctcag	28
<210> 179 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 179 gcaaacacac aaagataggt tcgagttt	28
<210> 180 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 180 catatcaagt gctttctgtt gacatttg	28
<210> 181 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 181 ctgaaaagtg ctacgtaaga ggtcattg	28

<210> 182
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 182
 catctgagtg tgagaagagc ctcaa 25

 <210> 183
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 183
 cccagcaaaa acttcttttc tccagtaa 28

 <210> 184
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 184
 gctaggaaag ttttctctct gggtcaca 28

 <210> 185
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 185
 gaatatctat gagcaggcag ttagcag 27

 <210> 186
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 186
 ctaatcagtg tcactatgtg tgagctat 28

 <210> 187
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 187
 catcatacag actcaaggag cttagctg 28

 <210> 188
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 188
 cttccaagc cttgaaaac acagaaaa 28

<210> 189
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 189
 gtacctata aatcacggag tgcagac 27

<210> 190
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 190
 caagtggtaa gagatgactg aggtcaa 27

<210> 191
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 191
 cttcttctct tagaaggaca ctggtcag 28

<210> 192
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 192
 gttatggagg attggaaga accagag 27

<210> 193
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 193
 gagctgttta agggtaaagg ggtagtta 28

<210> 194
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 194 gcagacaaaa ccatgacaat gatcttag	28
<210> 195 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 195 cccatgatga aacagtttgc actaaatg	28
<210> 196 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 196 ctcaatttct ttgtccctgc ttcatg	27
<210> 197 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 197 ttagaaattc cagatagagc taaaactg	28
<210> 198 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 198 gttaggaaaa gaacccaggt gtttt	25
<210> 199 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 199 gcaaaagtaa atacaaaggc atacttt	27
<210> 200 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 200 caatgcaaaa gaaaggtcct tactcgac	28

<210> 201
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 201
 catttctaaa ctctaaaaca aacattg 28

 <210> 202
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 202
 ggtccttaac ctattaaatt ttaatgag 28

 <210> 203
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 203
 gactttcaat ttatgtcagc atttaaaa 28

 <210> 204
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 204
 cctcttggtt gcattggatt ctcattg 27

 <210> 205
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 205
 tctccatgaa acttgggtta attttgc 27

 <210> 206
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 206
 tgtctggaag ttcgtcaaatt tgcag 25

 <210> 207
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 207

gtagcataaa acattccaaa aattcaat

28

<210> 208

<211> 30

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 208

tgctttaaag atacaggta tctgtattac

30

<210> 209

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 209

ctctccgta cttcttcct gccttt

26

<210> 210

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 210

gatcctgaga ttcacctcta gtcctt

26

<210> 211

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 211

ccgtaccagg tacctagcta tgtact

26

<210> 212

<211> 27

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 212

cttctgttt tgtccatctg aaattct

27

<210> 213

<211> 27

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 213

caaagttaag tatcaccatc cagctgg	27
<210> 214	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 214	
atagggatag ctgataagaa acatgacc	28
<210> 215	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 215	
cttaataaga cgctgcatct gccca	25
<210> 216	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 216	
tccaggagac attgttcat ataagtga	28
<210> 217	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 217	
agacactttt cagtatccat ttagaaac	28
<210> 218	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 218	
gtttcacatg tgcattgttt tgggt	25
<210> 219	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 219	
ccaaagctat tctctctttt ggggtgc	26
<210> 220	

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 220
 gaaagttcac ttcagatggtt caaagcc 27

<210> 221
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 221
 gggtttcagt ctgcaacaag atcttg 26

<210> 222
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 222
 tggagatcaa tatttagcct taacatat 28

<210> 223
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 223
 gactgtttct catcctgtta ttatttgt 28

<210> 224
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 224
 aacacacaga aacatcaagc tgagc 25

<210> 225
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 225
 ttcttgacat tctccttctt ctatctg 27

<210> 226
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 226 tatgacgcct ggatttcac aacaac	26
<210> 227 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 227 cagagactat ggatggatt taggtcaa	28
<210> 228 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 228 actttgtgtg gctgagagag agaaa	25
<210> 229 <211> 30 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 229 tgagtgtct ctgtatttc ttactctaag	30
<210> 230 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 230 attttggtc attgtgaca cttcacc	27
<210> 231 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 231 ggtgttaggg agacagcat gaatg	25
<210> 232 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 232 tgaaactttt caactctcct accgcc	26

<210> 233
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 233
 gttaaaattg ccactaatta tgtgtttt 28

 <210> 234
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 234
 aactgacct atgcagcaag atctttg 27

 <210> 235
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 235
 gatgcttgca aacaaagact gaaaagg 27

 <210> 236
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 236
 gtctgtgtgt cctctgagat gatgaatg 28

 <210> 237
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 237
 gggaggaaga aaacagagag tcttga 26

 <210> 238
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 238
 agtttgttg cttcttttga gaagtatc 28

 <210> 239
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 239
 ggcagatgaa gtagtagata tctggctg 28

<210> 240
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 240
 gttcagtgtc aatttgacc agatatt 27

<210> 241
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 241
 agacatagga cacaccattt tattgtct 28

<210> 242
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 242
 tcaaaatatt tggctaaact attgccgg 28

<210> 243
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 243
 ctggagttat taataaattg gattatatag c 31

<210> 244
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 244
 ttacctgttt tcctttgtg attccac 27

<210> 245
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 245 accaagtcaa gagctctgag agacat	26
<210> 246 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 246 acagtgaatg atattcagaa tattgtgc	28
<210> 247 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 247 gaacaaggtc aagatatcag ctttcacc	28
<210> 248 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 248 aggtcataca atgaatgggtg tgatgt	26
<210> 249 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 249 atccacccat gagaaatata tccacaa	27
<210> 250 <211> 31 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 250 acaattcaaa ttaatgtaaa aactgcaagt g	31
<210> 251 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 251 tagttctagt gtgggatctg actcc	25

<210> 252
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 252
 gaacatctgt tcaggttct ctccatc 27

 <210> 253
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 253
 gaaaggacta aattgttgaa cactggt 27

 <210> 254
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 254
 tgtgtgttt aaagccaggt ttgt 25

 <210> 255
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 255
 gatggactgg aactgaggat ttca 25

 <210> 256
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 256
 agctttagaa aggcatatcg tattaactg 29

 <210> 257
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 257
 ttatagtgg taaaggacag gcccc 25

 <210> 258
 <211> 29
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 258

acacatctgt tgacagtaat gaaatatcc 29

<210> 259

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 259

gtttaaactt ggataccatc cccaagac 28

<210> 260

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 260

atgagattgc tgggagatgc agatg 25

<210> 261

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 261

cacatttccc tcttgcggtt acatac 26

<210> 262

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 262

gacaagcctc gcttgagttt tcttt 25

<210> 263

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 263

tgtgagagtgc tcaccgaatt caacg 25

<210> 264

<211> 27

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 264

aaatagcaat ggctcgtcta tggtag	27
<210> 265	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 265	
tgctaagtaa ggtgagtggt ataatca	27
<210> 266	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 266	
ataaatatga tgtggctact ccctcat	27
<210> 267	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 267	
gctacacctc catagtaata atgtaagag	29
<210> 268	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 268	
tgaagcagct agagaactct gtacgt	26
<210> 269	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 269	
tttgtctct gttatattag tcacctatct c	31
<210> 270	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 270	
atagccctgc attcaaatcc caagtg	26
<210> 271	

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 271
 tccatttta taccactgca ctgaag 26

<210> 272
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 272
 gcagtaaaac atttcatca aattcca 28

<210> 273
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 273
 tctgggtgca aactagctga atatcag 27

<210> 274
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 274
 gaaaatctgg aggcaattca tgatgcc 27

<210> 275
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 275
 atacaatgat gatcacacgg gaccct 26

<210> 276
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 276
 ccatgaagat ggagtcaaca ttttaca 27

<210> 277
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 277 tcctaaccct tagtacgtta gatgtg	26
<210> 278 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 278 gaggtgattt ctgtgaggaa cgtcg	25
<210> 279 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 279 gtacattcac ttaacaggct ctctttcc	28
<210> 280 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 280 aattcatgag ctggtgtcca aggag	25
<210> 281 <211> 29 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 281 ataacagtct ccagagtata ttagcttag	29
<210> 282 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 282 gttcctctgg gatgcaacat gagag	25
<210> 283 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 283 gaaaggatga agaggggtgga tattggag	28

<210> 284
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 284
 ccaaacctca tcattcttta cctggatt 28

 <210> 285
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 285
 gtccaaagtc aagtgcagt atagttgg 28

 <210> 286
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 286
 acaatctttt ctgaatctga acagcttc 28

 <210> 287
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 287
 caaaggaagg catttcctaa tgatcttc 28

 <210> 288
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 288
 ctttgcttg ctttcttct tcagggaa 28

 <210> 289
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 289
 ctgcttcaag tgtatataaa ctcacagt 28

 <210> 290
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 290
 cctaggaaag cagtaactaa ttcaggag 28

<210> 291
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 291
 gcaatttgtt cacttttagt ttcgtagc 28

<210> 292
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 292
 ggcctaatat gcatgtgttc atgtctct 28

<210> 293
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 293
 cagagtttct catctacgaa agaggagt 28

<210> 294
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 294
 atcctagacc tccaggtgga atgatac 26

<210> 295
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 295
 cttggctgtc tcaatatttt ggagtaag 28

<210> 296
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 296	
gagtaaatga gctgtggttt ctctctta	28
<210> 297	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 297	
ctttccatgt ggacccttta acattcag	28
<210> 298	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 298	
gcatagtgag ctgttgatag agcttttg	28
<210> 299	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 299	
ctagaacaaa atcattggct ctcctagt	28
<210> 300	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 300	
gtctggtgag tactggctga atgtaaa	27
<210> 301	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 301	
ccagaggatg ctgctaaaca ttctacaa	28
<210> 302	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 302	
gctcatgcct ggaattcacc ttattttt	28

<210> 303
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 303
 ctaactagac atttgggccca ccttactt 28

 <210> 304
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 304
 gtctatggtg cctatagaat gtacaggt 28

 <210> 305
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 305
 ccctctcaag ttgtgagca aatatcac 28

 <210> 306
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 306
 ctctatcttg ctgcaatgga ctttcc 26

 <210> 307
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 307
 cctagaaaca gattttgaag ggctcttg 28

 <210> 308
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 308
 aaatgagggg catagggata aggga 25

 <210> 309
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 309

cctagaaatc tgatacgtta tcctatga

28

<210> 310

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 310

aggagagata tattcaacat gaacccaa

28

<210> 311

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 311

gaacatctct gaccagaaat ttccagta

28

<210> 312

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 312

gtgtagtgaa atccttagac ttaggtaa

28

<210> 313

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 313

aatacatgaa aaagtaatac atggggca

28

<210> 314

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 314

attaaatgtt tacttctatc tacaagga

28

<210> 315

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 315

cattttgtga aatgcaaagg gcaaattct	28
<210> 316	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 316	
gctgagaggc ttaattccat caagatga	28
<210> 317	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 317	
cccatacctaa acttagtttt atgggcag	28
<210> 318	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 318	
gtaacacatt ctcttggga agctagc	27
<210> 319	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 319	
cttagcttca gtgaaaatgg ttcctctc	28
<210> 320	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 320	
ctttcttagc tcctctccat ttctcttc	28
<210> 321	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 321	
gtctatgcag tgcttcaactg aggattat	28
<210> 322	

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 322
 ctctatctgc tcagagcctg cttaaaag 28

<210> 323
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 323
 ggaaaggata cagtgttgag caagatag 28

<210> 324
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 324
 gccaaactga ttctctttca aatgcttg 28

<210> 325
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 325
 agatgggggtt taccatgttt cccag 25

<210> 326
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 326
 gtacagtagt tagttccag actgatga 28

<210> 327
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 327
 gtaaatatct aactgtgttt ccctcagt 28

<210> 328
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 328
gaacccaaaag gaattaagag actagggg 28

<210> 329
<211> 27
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 329
ctgcttttac ggcttcttc tttcttc 27

<210> 330
<211> 26
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 330
cccacatcct tccatttat aggcaa 26

<210> 331
<211> 25
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 331
tacatgatcc taagggcagc aggaa 25

<210> 332
<211> 25
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 332
gtttggtgca tcctcttct ctctc 25

<210> 333
<211> 25
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 333
gactgtagtc acccctctc caaca 25

<210> 334
<211> 31
<212> DNA
<213> Người thông tuệ

<400> 334
agagtgaaat acatagaaaa gaaacttaa g 31

<210> 335
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 335
 atttgcgaga aacagataaa tattgaag 28

 <210> 336
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 336
 acaggaacaa agaatttgtt cttcatgg 28

 <210> 337
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 337
 ccttgattg tctcaggatg ttgca 25

 <210> 338
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 338
 ctgggatgtt tgtttggct ttgtg 25

 <210> 339
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 339
 attggtagta cactaatgga tatatgtgag 30

 <210> 340
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 340
 gaataaagtg aggaaaacac ggagttg 27

 <210> 341
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 341
 gagagaggca gaaaggaggg atgaa 25

<210> 342
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 342
 tactctgtct tcagtagctg ttcttgg 28

<210> 343
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 343
 ttagactcac caagatcaag atgaatgc 28

<210> 344
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 344
 atctcaataa agctgttcaa aacagaaag 29

<210> 345
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 345
 taaagaaaat gccatgggct gtaccc 26

<210> 346
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 346
 attgtgcagc agaacagagt gtagtg 26

<210> 347
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 347 attctttgca tagctcacga aatttccc	28
<210> 348 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 348 aaaatgagac ctgctatctt tgcagc	26
<210> 349 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 349 aaatgcagaa ctgccaaaag aaaccc	26
<210> 350 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 350 gagaatctgt gaatgccagg gtctg	25
<210> 351 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 351 atggattcat gtttcagaca tctaatt	27
<210> 352 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 352 atcactagaa agaaaagagt tcctattc	28
<210> 353 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 353 gaagtttaaa agagtgggaa catgggg	27

<210> 354
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 354
 ctacgtaagc aaaaatgatc acgcac 26

 <210> 355
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 355
 aacctgatgg ccctcattag tcctt 25

 <210> 356
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 356
 caccagattt ctaggaatag catgtgag 28

 <210> 357
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 357
 aagagcatag tgaggggta gacct 25

 <210> 358
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 358
 ctttatattt agtgtagaga tcagtctcc 29

 <210> 359
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 359
 tgagtccttt acctaattt ggtgtgc 27

 <210> 360
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 360

aatccaaagc aactctcttt tcaccac 27

<210> 361

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 361

tttactggaa ccctgatttt gttgga 26

<210> 362

<211> 26

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 362

tgccactgat atatcagtac ctgagt 26

<210> 363

<211> 27

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 363

acaatctcaa tcccccttaa tgttttc 27

<210> 364

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 364

gtgggcagag agagtaagag aacct 25

<210> 365

<211> 28

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 365

caaaccagat tctggcagaa tagttagc 28

<210> 366

<211> 25

<212> DNA

<213> Người thông tuệ

<400> 366

cttctctccc atctctcttc tccac	25
<210> 367	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 367	
agatcaaggg atctgtggga caataac	27
<210> 368	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 368	
ggggagtgat ttcaagcatc ctgatt	26
<210> 369	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 369	
catgagtttg aggtaagatg aaggaga	27
<210> 370	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 370	
tctctctcat cctagtgaat gccatc	26
<210> 371	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 371	
gggtgatgat ctaccttgca ggtata	26
<210> 372	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Người thông tuệ	
<400> 372	
ctcaaggccc tgggtctgaa attac	25
<210> 373	

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 373
 acatctccag ttaataattt ccactaac 28

<210> 374
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 374
 tggattgctc aacaaatagt gctaaaa 27

<210> 375
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 375
 catgcgacat ccaggtagct aaaatac 27

<210> 376
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 376
 atggataaaa atggaacttt caagagaa 28

<210> 377
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 377
 gttttatgta aagcttcgctc atatggct 28

<210> 378
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 378
 gttccaactt agtcataaag ttccctgg 28

<210> 379
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 379 gggtcttgat gttgtattga tgaggaag	28
<210> 380 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 380 cctaacagaa agtcactggt tgtatctg	28
<210> 381 <211> 26 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 381 tcactctggc ttgtactctc tctgtg	26
<210> 382 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 382 ggctggttc agtctggaga ctttattt	28
<210> 383 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 383 cttcacctcg atgacgatga tgatgat	27
<210> 384 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 384 gacaataaca gcacaaagga tggaaaag	28
<210> 385 <211> 25 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 385 gaaccagacc acacaatatc accac	25

<210> 386
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 386
 tctacctt tgatgtccc ttcgatag 28

 <210> 387
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 387
 cagagtttct catctacgaa agaggagt 28

 <210> 388
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 388
 cccagctttg aaaagtatgc ctagaact 28

 <210> 389
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 389
 ctgctcaag tgtatataaa ctcacagt 28

 <210> 390
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 390
 ttgttcatc cacttggtg ggtaaaag 28

 <210> 391
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 391
 taattaagct ctgtgttag gggtttt 27

 <210> 392
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 392
 caattctttg ttctttaggt cagtatat 28

 <210> 393
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 393
 tactcttcct cagtcccttc tctgc 25

 <210> 394
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 394
 tgagacagag catgatgac atggc 25

 <210> 395
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 395
 gcacaagtct aggaactact ttgcac 26

 <210> 396
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 396
 gaagtatttg aaccatacgg agccc 25

 <210> 397
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

 <400> 397
 tgaggaacac atccaaacta tgacac 26

 <210> 398
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Người thông tuệ

<400> 398 ttctcgccc tcatcatctg caatg	25
<210> 399 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 399 tcagttgatt tcatgtgatc ctcacag	27
<210> 400 <211> 27 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 400 gaataaagtg aggaaaacac ggagttg	27
<210> 401 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 401 attaccttct ttctaataca agcatatg	28
<210> 402 <211> 28 <212> DNA <213> Người thông tuệ	
<400> 402 acaggaacaa agaatttgtt cttcatgg	28
<210> 403 <211> 21 <212> DNA <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Trình tự thẻ adaptor i5	
<400> 403 tacacgacgc tcttcgatc t	21
<210> 404 <211> 20 <212> DNA <213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> Trình tự thể adaptor i7

<400> 404

cttggcaccg gagaattcca

20