(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) **1-0030424**

(51)[7] **C12Q 1/68**; G01N 33/53

(13) **B**

(21) 1-2019-05905

(22) 24/10/2019

(45) 25/12/2021 405

(43) 25/12/2019 381A

(73) Công ty TNHH MTV Nhà máy Công nghệ sinh học và Thiết bị y tế (BIMEDTECH) (VN)
Lô I-9-8, đường D2, khu Công nghệ cao thành phố Hồ Chí Minh, phường Long Thạnh Mỹ, quận 9, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Thị Thanh Tâm (VN); Nguyễn Văn Khiêm (VN); Huỳnh Nguyên Bửu Châu (VN); Trần Duy Hưng (VN); Phạm Thị Nhung (VN); Vũ Thị Thơm (VN); Phạm Thu Hằng (VN); Bạch Quốc Khánh (VN); Dương Quốc Chính (VN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Toàn Cầu (GLOBAL IP CO., LTD.)

(54) CHIP SINH HỌC ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN GÂY BỆNH TAN MÁU BẨM SINH VÀ KIT ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện 24 đột biến trên gen alpha-globin và beta-globin gây bệnh tan máu bẩm sinh và kit dùng để phát hiện đột biến gen này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các đoạn mồi và đoạn dò dùng trong chip sinh học và phương pháp phát hiện đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh (thalassemia).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ di truyền ứng dụng trong y học. Cụ thể sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh (thalassemia) trên cơ sở vi mảng ADN (DNA microarray). Sáng chế cũng đề cập đến kit để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, các đoạn mồi và quy trình phát hiện đột biến gen này bằng kit theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rối loạn hemoglobin là các bệnh di truyền thường gặp nhất trên thế giới, đặc biệt là ở những nơi dịch bệnh sốt rét đã xảy ra. Những rối loạn này bao gồm các bệnh hemoglobin (gây ra do sự thay đổi cấu trúc trong các chuỗi protein globin của hemoglobin, ví dụ như bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm) và thalassemia (do sự rối loạn biểu hiện globin). Những rối loạn này gây ra thiếu máu, thời gian sống của hồng cầu ngắn/sự tan máu, và các bệnh lý hệ thống khác phụ thuộc vào sự có mặt của các đột biến cụ thể.

Bệnh tan máu bẩm sinh (hay còn gọi là bệnh thalassemia) là bệnh rối loạn máu di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường gây ra do giảm/mất sự tổng hợp một trong hai chuỗi α-globin (HBA) hoặc β-globin (HBB) của phân tử hemoglobin. Dựa vào chuỗi globin bị ảnh hưởng, bệnh tan máu bẩm sinh được chia thành 2 thể là alpha thalassemia (α-thalassemia) và beta thalassemia (β-thalassemia).

Giảm biểu hiện có thể do mất cấu trúc gen; hoặc các đột biến dẫn đến việc giảm sự tổng hợp, xử lý hoặc tính ổn định của ARN; hoặc các đột biến dẫn đến việc giảm sự tổng hợp hoặc tính ổn định của protein. Giảm biểu hiện một trong các chuỗi globin dẫn đến sự tích lũy quá mức các polypeptit mã hóa các bởi các gen không chức năng. Sự mất cân bằng chuỗi này gây ra sự trưởng thành của hồng cầu bất thường dẫn đến bệnh thiếu máu hồng cầu nhỏ, một trong những triệu chứng đặc trưng nhất của bệnh tan máu bẩm sinh.

Bệnh tan máu bẩm sinh thể nhẹ không gây ra sự thiếu máu; các thể nặng hơn có thể gây ra thiếu máu hồng cầu nhỏ, tan máu, sự tải nạp sắt, và phụ thuộc truyền máu.

Bệnh tan máu bẩm sinh là gánh nặng sức khỏe đối với cộng đồng do đó việc sàng lọc người mang gen và tư vấn di truyền đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sinh ra những đứa trẻ bị bệnh đặc biệt là thể nặng.

Đã có nhiều kỹ thuật nhằm phát hiện các biến thể heamoglobin gây bệnh tan máu bẩm sinh, ví dụ sắc lý lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) hoặc điện di mao quản (Capillary electrophoresis - CE). Hiện đã có nhiều phương pháp khác nhau dựa trên kỹ thuật PCR có thể được sử dụng để phát hiện đột biến gen globin bao gồm phân tích điểm lai, phân tích điểm lai ngược, hệ thống đột biến khuếch đại chịu nhiệt (amplification refractory mutation system - ARMS), điện di biến tính (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), gap-PCR, phân tích enzym giới hạn (restriction endonuclease - RE), real-time PCR, giải trình tự Sanger, pyrosequencing, khuếch đại đầu dò đa mồi dựa vào phản ứng nối (multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA) và hệ thống vi mảng (microarray). Tuy nhiên, đặc trưng của các phương pháp này thường hạn chế bởi một hoặc một vài đột biến cụ thể. Để xác định tất cả các đột biến liên quan đến bệnh tan máu bẩm sinh cần nhiều xét nghiệm phức tạp và tốn kém.

Kỹ thuật vi mảng (microarray) đã được phát triển để chẩn đoán các đột biến liên quan đến bện tan máu bẩm sinh. Trong kỹ thuật này, các trình tự ADN đặc hiệu được phủ hoặc tổng hợp lên các vi mảng 2D hoặc 3D bằng cách gắn cộng hóa trị hoặc không công hóa trị ADN lên bề mặt tấm nền. Các vi mảng ADN thường sử dụng dung dịch đầu dò là hỗn hợp các axit nucleic đã đánh dấu và việc liên kết (bằng cách lai) trình tự đích và đầu dò nhằm đánh giá nồng độ tương đối của mảnh axit nucleic trong dung dịch. Bằng việc tạo ra một số lượng rất lớn các điểm "spot" của ADN, một vi mảng ADN có thể được sử dụng để định tính và định lượng một số lượng lớn các trình tự axit nucleic khác nhau trong dung dịch.

Chip sinh học cũng đã được phát triển trên cơ sở lai ngược các oligonucleotit. Kỹ thuật này cho phép phát hiện đồng thời nhiều đột biến thalassaemia. Tuy nhiên, với mỗi kỹ thuật khác nhau cần các đoạn dò, đoạn mồi đặc hiệu tương ứng với các đột biến để sao cho có thể phát hiện đặc hiệu các đoạn đột biến trong lượng lớn các đoạn gen cần phát hiện. Việc này đòi hỏi phải phát triển được các đoạn dò và các đoạn mồi cho phép tối ưu điều kiện thực hiện PCR cũng như điều kiện lai nhằm phát hiện được

độc lập, tránh được các hiện tượng âm tính, dương tính giả do việc không tối ưu các điều kiện lai.

Đã có một số công bố chi tiết mô hình chip ADN sử dụng để xác định kiểu gen của người mang gen β-thalassaemia và bệnh nhân β-thalassaemia. Phương pháp SBE-tag (tagged single-based extension) với vi mảng thủy tinh hoặc vi lỏng đã được phát triển để phát hiện 17 đột biến β-globin và phương pháp tương tự APEX (arrayed primer extension) cũng được sử dụng để phát hiện 23 đột biến. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, với kỹ thuật gen, việc phát hiện các đột biến rải rác tương đối dễ do có thể phát triển được các đoạn dò và đoạn mồi với các đặc trưng và điều kiện tương đương cho phép thực hiện trong cùng một điều kiện. Tuy nhiên, đối với bệnh tan máu bẩm sinh, các đột biến tập trung trong một số vùng và rất khó để phát triển được các đoạn mồi, đoạn dò đặc hiệu đủ để phân biệt được các đột biến độc lập. Do đó, hiện chưa có kỹ thuật cũng như vi chip nào được phát triển để có thể phát hiện được đồng thời 24 đột biến liên quan đến bệnh tan máu bẩm sinh.

Do đó, cần có nhu cầu phát triển chip, kit và phương pháp chẩn đoán cho phép chẩn đoán đồng thời 24 đột biến liên quan đến liên quan đến bệnh tan máu bẩm sinh với khả năng phát hiện đặc hiệu, nhanh chóng và chính xác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện 24 đột biến trên gen alpha-globin và beta-globin gây bệnh tan máu bẩm sinh và kit dùng để phát hiện đột biến gen này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các đoạn mồi và đoạn dò dùng trong chip sinh học và phương pháp phát hiện đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó chip này bao gồm:

- vi mảng (microarray) phát hiện đột biến alpha-globin, trong đó vi mảng này bao gồm tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300µm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250µm, trên mỗi vi điểm này được gắn độc lập:

+ đầu dò bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.13, theo thứ tự xác định;

+ đối chứng dương có trình tự nêu trong SEQ ID NO.44;

+ đối chứng âm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.45;

+ đối chứng huỳnh quang có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46; và

+ đối chứng nhuộm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47;

- vi mảng (microarray) phát hiện đột biến beta-globin, trong đó vi mảng này bao gồm tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300µm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250µm, trên mỗi điểm này được gắn độc lập:

+ đầu dò bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.43, theo thứ tự xác định;

+ đối chứng dương có trình tự nêu trong SEQ ID NO.44;

+ đối chứng âm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.45;

+ đối chứng huỳnh quang có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46; và

+ đối chứng nhuộm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế có vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin và vi mảng phát hiện đột biến beta-globin được gắn trên cùng một tấm nền là thủy tinh borosilicat được phủ epoxy, aldehyt hoặc amino.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế có các trình tự đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên các vi điểm theo cách không tiếp xúc với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 40µM.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế có mỗi đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên ít nhất trên 3 vi điểm khác nhau xác định trước trên vi mảng tương ứng.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế được bố trí trên tấm nền với lượng từ 2 đến 16 chip/tấm nền.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kit để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó kit này chứa ít nhất một chip sinh học theo sáng chế và các dung dịch đệm, dung dịch PCR.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit theo sáng chế bao gồm các thành phần sau:

Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
Chip	Biochip	Chip sinh học, 2 tấm nền, mỗi tấm 8 chip	16 chip
Dung dịch đệm	HS	Dung dịch lai bao gồm SSC 3X, SDS 0,5% trong nước MiliQ	3ml
	WS1	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X, SDS1% trong nước MiliQ	12ml
	WS2	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X trong nước MiliQ	7ml
	RS	Dung dịch tráng bao gồm TBS 1X, Tween20 0,5% trong nước MiliQ	40ml
	DS	Dung dịch nhuộm bao gồm Cy5-Streptavidin 1mg/ml trong nước MiliQ	4µL
	PC	Dung dịch chứng bao gồm 10µM trình tự nêu trong SEQ ID NO.71 trong nước MiliQ	5µL
Dung dịch PCR	Mix1	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 SEA: SEQ ID NO.48 và SEQ ID NO.49, 0,1-0,2µM mỗi loại; Mồi V1 α4.2: SEQ ID NO.50 và SEQ ID NO.51, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 THAI: SEQ ID NO.52 và SEQ ID NO.49, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix2	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 α3.7: SEQ ID NO.53 và SEQ ID NO.54, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 alpha2: SEQ ID NO.55 và SEQ ID NO.56, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix3	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 beta1: SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.58, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 beta2: SEQ ID NO.59 và SEQ ID NO.60, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix4	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 SEA: SEQ ID NO.61, 0,1-0,2µM; Mồi V2 α4.2: SEQ ID NO.62, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 THAI: SEQ ID NO.63, 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL
	Mix5	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 α3.7: SEQ ID NO.64, 0,1-0,2µM; Mồi V2 2-1 alpha2: SEQ ID NO.65, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 2-2 alpha2: SEQ ID NO.66, , 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL
	Mix6	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U	16x22,5

Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
		Mồi V2 1-1 beta1: SEQ ID NO.67; Mồi V2 1-2 beta2: SEQ ID NO.68; Mồi V2 2-1 beta1: SEQ ID NO.69; và Mồi V2 2-2 beta2: SEQ ID NO.70.	µL

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch đệm, dung dịch PCR được đựng trong các lọ có màu sắc khác nhau hoặc được đánh dấu để phân biệt.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này được đóng gói kèm hướng dẫn sử dụng.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến các đoạn dò dùng để phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó các đoạn dò này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.43.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến các đoạn mồi dùng để phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó các đoạn mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47 đến SEQ ID NO.70.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Chiết ADN từ mẫu bệnh phẩm bằng cách thu nhận mẫu và chiết để thu ADN tổng số và định lượng về nồng độ khoảng từ 1 đến 100ng/µL;

b) khuếch đại các đoạn gen quan tâm từ ADN tổng số bằng cách tiến hành ba phản ứng PCR đa mồi với ba nhóm đột biến bao gồm:

- nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7 với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.48 đến SEQ ID NO.52;

- nhóm vùng alpha với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.53 đến SEQ ID NO.56; và

- nhóm vùng beta với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.47 đến SQ ID NO.60;

c) gắn nhãn biotin vào các đoạn gen quan tâm bằng cách tiến hành PCR vòng 2 với ba sản phẩm PCR tương ứng vòng 1 theo nhóm bao gồm:

- nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7 với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.61 đến SEQ ID NO.63;

- nhóm vùng alpha với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.64 đến SEQ ID NO.66; và

- nhóm vùng beta với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.67 đến SEQ ID NO.70;

d) lai với các đoạn dò đặc hiệu bằng cách cho sản phẩm thu được từ nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7 và nhóm vùng alpha lai với vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin của vi chip được cố định trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.13 và nhóm vùng beta lai với vi mảng phát hiện đột biến beta-globin của vi chip được cố định trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.43; và

e) xác định đột biến bằng cách ủ các vi mảng sau khi lai với đoạn nucleotit gắn huỳnh quang nêu trong SEQ ID NO.46 và đọc kết quả trên máy đọc huỳnh quang để xác định đồng thời 24 đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ tương tác giữa lam kính phủ chất nền và đầu dò – oligonuclotit cải biến amin đầu 5'.

Hình 2 là sơ đồ tấm nền gồm 8 chip trong một phương án cụ thể của kit theo sáng chế. Mỗi chip được in thành hai vi mảng độc lập để có thể xét nghiệm đồng thời cho 8 mẫu bệnh phẩm.

Hình 3 là hình vẽ mô tả một phương án cụ thể của phương án in ma trận đầu dò trên chip bao gồm hai vi mảng.

Hình 4. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến IVS I-5 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biên CD 26 dạng dị hợp.

Hình 5. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến CD 17 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến IVS II-654 dạng dị hợp.

Hình 6. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến CD 17 ở dạng đồng hợp.

Hình 7. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến CD 41/42 dạng đồng hợp.

Hình 8. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến CD 8/9 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến IVS I-1 dạng dị hợp.

Hình 9. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến Init CD dạng dị hợp.

Hình 10. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến SEA dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến 4.2 dạng dị hợp.

Hình 11. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến THAI dạng dị hợp.

Hình 12. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến HbQs dạng dị hợp.

Hình 13. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó thể hiện đột biến HbPak dạng dị hợp.

Hình 14. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến SEA dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến c.2delT dạng bán dị hợp.

Hình 15. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến -28 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến -90 dạng dị hợp.

Hình 16. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến SEA dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến HbCs dạng bán dị hợp.

Hình 17. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến SEA dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến 3.7 dạng dị hợp.

Hình 18. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến CD 4142 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến CD 147 dạng dị hợp.

Hình 19. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến CD 26 dạng đồng hợp, (C) thể hiện đột biến 3.7 dạng dị hợp.

Hình 20. Ảnh chụp vi mảng của chip của một kết quả điển hình trong Ví dụ 3, trong đó (A) thể hiện đột biến CD 95 dạng dị hợp, (B) thể hiện đột biến CD 26 dạng dị hợp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện 24 đột biến trên gen alpha-globin và beta-globin gây bệnh tan máu bẩm sinh (bệnh Thalasemia) và kit dùng để phát hiện đột biến gen này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các đoạn mồi, đoạn dò dùng trong chip sinh học và phương pháp phát hiện đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh này.

Bệnh thiếu máu tan máu bẩm sinh là bệnh rối loạn máu di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường gây ra do giảm sự biểu biện một trong 2 chuỗi α-globin (HBA) hoặc β-globin (HBB) của phân tử hemoglobin. Có 24 đột biến liên quan đến bệnh thiếu máu tan máu bẩm sinh bao gồm đột biến điểm và đột biến mất đoạn, bao gồm:

Đột biến mất đoạn gồm bốn đột biến trên gen α-globin bao gồm đột biến mất đoạn SEA, THAI, α4.2 và α3.7, đột biến này còn được gọi là đột biến α-thalassaemia. Đột biến này có tỷ lệ cao ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, và đặc biệt là các nước Đông Nam Á. α-thalassaemia được mô tả bởi sự bất thường của gen α-globin dẫn đến giảm sản xuất chuỗi α-globin, một trong những yếu tố cấu tạo chính heamoglobin của hồng cầu. Khoảng 95% trường hợp α-thalassemia là do đột biến mất đoạn lớn ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$, $--^{THAI}$ và $--^{FIL}$,...) và phần còn lại là do đột biến điểm (a2IntCD, C2.delT, CD 142 HbCs, CD 142 HbPak, CD 125 HbQs...). Alpha thalassemia có 4 dạng phổ biến và biểu hiện của α-thalassaemia tương quan với số lượng gen α-globin bị ảnh hưởng. Gen α-globin (HBA) nằm ở đầu tận cùng xa trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 16, vị trí 16p13.3, và chịu trách nhiệm cho việc sản xuất chuỗi α-globin. Mỗi nhiễm sắc thể đơn bội chứa 2 gen có cấu trúc giống nhau (HBA1 và HBA2) mã hóa các chuỗi protein giống hệt nhau tạo ra 4 bản sao alen khi tổ hợp với các nhiễm sắc thể tương đồng khác.

Alpha thalassaemia thể ẩn (Silent carrier αlpha thalassaemia): Ở trạng thái này, một gen HBA trên nhiễm sắc thể bị mất dẫn đến còn 3 gen trong tổng số 4 gen (αα/α-) được gọi là dạng α^+ thalassemia (hoặc mất đoạn *trans* α-thalassemia). Dạng này chủ yếu liên quan đến việc mất trình tự 3,7 kb ($-\alpha^{3,7}$) gây ra sự hợp nhất gen HBA2-HBA1. Một vài điểm gián đoạn khác (breakpoint) cũng liên quan đến α^+ thalassemia ($-\alpha^{4,2}$, $-\alpha^{20,5}$). Điều này xảy ra có thể là do sự phân chia không cân bằng trong suốt quá trình phân bào. Ngoài các đột biến mất/xóa đoạn, các đột biến điểm điểm như a2IntCD, C2.delT, CD 142 HbCs (HbCs), CD 142 HbPak (HbPak), CD 125 HbQs (HBQs) là nguyên nhân chính gây ra α^+ thalassemia. Mất cân bằng chuỗi gây ra do các đột biến trên là khá nhẹ vì bệnh nhân có thể không bị hồng cầu nhỏ, khỏe mạnh về mặt huyết học ngoại trừ đôi khi có chỉ số hồng cầu thấp.

Alpha thalassemia thể nhẹ (Alpha thalassemia trait): Điều này do việc mất 2 gen HBA trên một nhiễm sắc thể (αα/--) hoặc mất một gen HBA trên mỗi nhiễm sắc thể (α-/α-), được gọi là α^0 thalassemia hoặc mất đoạn *cis* α-thalassemia ($--^{SEA}$, $--^{THAI}$, $--^{FIL}$, $--^{MED}$), gây ra mức độ mất cân bằng lớn hơn, bởi vì sự biểu hiện của gen HBA giảm 50%. Alpha thalassemia thể nhẹ phổ biến nhất ở Đông Nam Á, Ấn Độ và một vài phần Trung Đông. Tình trạng này được đặc trưng bởi thiếu máu nhẹ và chỉ số hồng cầu thấp.

Bệnh Hb H: Mất 3 gen HBA (--/α-) do sự kết hợp của α^0-thalassemia và α^+ thalassemia trong đó bệnh lý chủ yếu liên quan đến sự dư thừa chuỗi β dẫn đến hình thành dạng tetramer của β-globin (β4) thúc đẩy sự tan máu. Sự mất cân bằng chuỗi globin liên quan đến kiểu gen này khiến cho bệnh nhân thường bị thiếu máu nặng, hồng cầu nhỏ (thể tích hạt trung bình MCV - mean corpuscular volume là 55-60 fL), tan máu mãn tính, lách to, vàng da và các chỉ số hồng cầu bất thường. Trường hợp mất 3 gen HBA do tổ hợp di truyền của α^0 thalassemia và α^+ thalassemia đột biến điểm có biểu hiện nặng hơn so với tổ hợp di truyền của α^0 thalassemia và α^+ thalassemia mất đoạn. Do đó triệu chứng lâm sàng của người bị bệnh HbH dao động từ thiếu máu nhẹ đến thiếu máu nặng truyền máu phụ thuộc đến tử vong sớm ở trẻ.

Alpha thalassemia thể nặng (Alpha thalassemia major): Tình trạng này do việc mất tất cả các gen HBA trên cả 2 nhiễm sắc thể số 16 (--/--) dẫn đến dạng nghiêm trọng của alpha thalassemia đồng hợp tử. Tình trạng này dẫn đến hội chứng thai phù

tích dịch Hb Barts' không thích ứng được với cuộc sống ngoài tử cung và tử vong ngay sau khi sinh.

Trái ngược với sự lặp lại được tìm thấy trong alpha thalassemia; chỉ có một gen beta globin (HBB) trên nhiễm sắc thể số 11. Gen *HBB* dài 1606 bazơ, chứa 3 exon và được định vị trên cánh tay ngắn (?? cDNA) nhiễm sắc thể 11 hướng về đầu 3' của vùng 70 kb được gọi là locus β globin. Gen *HBB* mã hóa cho chuỗi β-globin, một protein là thành phần thiết yếu của haemoglobin người trưởng thành. Thiếu hụt chất lượng của gen *HBB* dẫn đến giảm hoặc dừng hoàn toàn việc tổng hợp chuỗi β-globin gây ra bệnh β-thalassaemia (do sự phiên mã, xử lý hoặc tính ổn định của ARN bất thường, hoặc các đột biến vô nghĩa dẫn đến việc sản xuất protein bất thường hoặc sự phân rã ARN qua trung gian vô nghĩa). Trái ngược với α-thalassemia, khoảng 90% β-thalassemia là do đột biến điểm. Tuy nhiên, trong một vài năm gần đây, một vài mất đoạn mới của gen HBB đã được xác định và trở nên phổ biến hơn. Người ta ước tính rằng, khoảng 10% đột biến β-thalassaemia là do mất độ lớn gen *HBB*. Đến nay, có 868 đột biến của gen *HBB* đã được mô tả ảnh hưởng định tính và định lượng đến tổng hợp β-globin, thống kê trên cơ sở dữ liệu HbVar (http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3). Những đột biến này bao gồm đột biến điểm, chèn/xóa đoạn nhỏ và sự tái sắp xếp gen lớn hơn. Có khoảng dưới 20 biến thể chiếm đa số alen β-thalassemia bao gồm −29 A→G; −28 A→G; codon 0 T→G; codon 8/9 +G; codon 17 A→T; codon 19 A→G; codon 26/HbE G→A; codon 27/28 +C; IVSI,1 G→T; IVSI,5 G→C; codon 35 −C; codon 41/42 −TTCT; codon 43 G→T; codon 71/72 +A; IVSII, 654 C→T; và xóa đoạn Δ619bp. Ba biến thể đơn được tính toán cho khoảng 2/3 β-thalassemias trong vùng kết hợp: IVSI,5 G→C (33%); codon 41/42 −TTCT (27%); và IVSI,1 G→T (9%).

β -Thalassemia có thể được chia thành β^0 thalassemia (chuỗi β-globin không được sản xuất từ alen đột biến) và β^+ thalassemia (số lượng chuỗi β-globin sản xuất bị giảm). Dạng dị hợp tử của các loại alen có hồng cầu nhỏ được gọi là β-thalassemia thể nhẹ. Dạng dị hợp tử kết hợp của 2 alen β^+ thalassemia hoặc một alen β^+ và một alen β^0 có kiểu hình nặng hơn và được gọi là β-thalassemia thể trung với các triệu chứng bao gồm thiếu máu, tan huyết, dư thừa sắt và thỉnh thoảng cần truyền máu. Cá thể với 2 alen β^0 là dạng nặng nhất và được gọi là β-thalassemia thể nặng dẫn đến thiếu máu

phụ thuộc vào truyền máu, dư thừa sắt truyền máu nặng yêu cầu liệu pháp tạo chelat, và tuổi thọ ngắn hơn.

Theo sáng chế, đột biến điểm gây ra bệnh thiếu máu tan máu bẩm sinh trên gen globin bao gồm 20 đột biến, trong đó có 5 đột biến trên α-globin và 15 đột biến trên β-globin.

Năm đột biến điểm trên α-globin bao gồm các đột biến IntCD, c2DelT, HbCs, HbPak và HbQs.

Mười lăm đột biến điểm trên β-globin bao gồm các đột biến điểm -90, -88, -28, CD8/9, CD 17, CD 26, IVS I-1, IVS I-5, CD 35, CD 41/42, CD 43, CD 71/72, CD 95, IVS II-654 và CD 147.

Các phương pháp như chiết tách ADN, PCR hoặc các kỹ thuật lai là các kỹ thuật đã biết và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, các đoạn mồi, đoạn dò có thể tổng hợp bằng phương pháp hóa học thông dụng trong lĩnh vực. Ngoài ra, các hóa chất và các dung dịch sử dụng trong công nghệ sinh học, ví dụ SSC, SDS, TBS, dNTP, Taq polymeraza, nước MiliQ là các hóa chất đã biết và được sử dụng rộng rãi và có thể mua được trên thị trường. Khi đề cập đến các kỹ thuật này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể thực hiện mà không cần các chỉ dẫn cụ thể, trừ khi có quy định hoặc hướng dẫn cụ thể.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chip sinh học để phát hiện bệnh đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó chip này bao gồm vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin và vi mảng phát hiện đột biến beta-globin.

Các đầu dò được sử dụng để gắn trên các vi mảng của vi chip theo sáng chế được thiết kế đặc hiệu để gắn lên tấm nền và bắt cặp đặc hiệu với đoạn gen quan tâm. Các đầu dò này bao gồm trình tự dò bắt cặp đặc hiệu với các đột biến quan tâm và phía đầu 5' của trình tự dò này được gắn thêm 12T để tạo thành chuỗi nối và đầu cải biến 5AmMc6 để thích hợp cho việc gắn lên tấm nền. Các đầu dò này được chuẩn bị với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 40μM trong dung dịch đệm thích hợp bao gồm muối natri citrat, betain, natri dodecyl sulfat, đệm phosphat, sarkosyl hoặc Tween20.

Tấm nền để sản xuất chip sinh học là các lam kính thủy tinh borosilicat được phủ chất nền epoxy, aldehyt, hoặc amino. Các đầu dò đặc hiệu cho các đột biến là các

đoạn nucleotit đặc hiệu được thiết kế phù hợp với từng đột biến sẽ được in lên trên các vi mảng của lam kính nhờ vào công nghệ in không tiếp xúc. Theo đó các đầu dò được phân phối lên các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300 µm, phân bố cách đều nhau từ 100 đến 250 µm trên cùng một ma trận điểm với thể tích vài trăm nanolit. Các đầu dò sẽ tạo liên kết chất phủ nền lam kính qua quá trình ủ trong điều kiện kiểm soát nhiệt độ từ 20 đến 25°C kết hợp độ ẩm từ 50 đến 70%. Với các đột biến mất đoạn thì mỗi đột biến sẽ thiết kế một đầu dò đặc hiệu tương ứng và một đầu dò dạng nguyên bản DEL_WT dùng chung cho cả bốn đột biến để xác định kiểu gen. Với các đột biến điểm, mỗi vị trí đột biến sẽ có hai đầu dò đặc hiệu tương ứng: một đầu dò để xác nhận dạng nguyên bản và một đầu dò để xác nhận dạng đột biến.

Vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin trên chip sinh học được thiết kế trên tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300µm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250µm, trên mỗi vi điểm này được gắn độc lập các đầu dò phát hiện đột biến α4.2, SEA, α3.7, THAI, HbCs, HbQs, α2 C2.delT, α2 IntCD, Hb Pak. Ngoài ra, trên vi mảng này cũng thiết kế đầu dò nguyên bản DEL_WT và các đầu dò phát hiện phức hợp đột biến HbCs/Hb Pak, α2 C2.delT/ α2 IntCD.

Đầu dò phát hiện đột biến α4.2 có trình tự NTTTTTTTTTTTGTTTCGCTGTTGTTTTCC (SEQ ID NO.1). Đầu dò phát hiện đột biến SEA có trình tự NTTTTTTTTTTTCCGGACCCATCACTCAGCTTCTC (SEQ ID NO.2). Đầu dò phát hiện đột biến α3.7 có trình tự NTTTTTTTTTTTGGGAAAAAACTCAGGCACACA (SEQ ID NO.3). Đầu dò phát hiện đột biến THAI có trình tự NTTTTTTTTTTTAAATGCCTGTGGTCAAAGCTCTCC (SEQ ID NO.4). Đầu dò phát hiện đột biến HbCs có trình tự NTTTTTTTTTTTCTCCAGCTTGACGGTAT (SEQ ID NO.6). Đầu dò phát hiện đột biến HbQs bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTCTTGTCCAGGGAGGC (SEQ ID NO.7) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTCTTGTCCGGGGAGGC (SEQ ID NO.8). Đầu dò phát hiện đột biến α2 C2.delT có trình tự NTTTTTTTTTTTGAACCCACCAGGTGCTGT (SEQ ID NO.10). Đầu dò phát hiện đột biến α2 IntCD có trình tự NTTTTTTTTTTTAACCCACCCTGGTGCTG (SEQ ID NO.11). Đầu dò phát hiện đột biến Hb Pak có trình tự

NTTTTTTTTTTTTGCTCCAGCATATATGG. Ngoài ra, vi mảng còn bố trí hai đầu dò để phát hiện tổ hợp đột biến HbCs/Hb Pak và α2 C2.delT/α2 IntCD có trình tự NTTTTTTTTTTTCTCCAGCTGAACGGTAT (SEQ ID NO.5) và NTTTTTTTTTTTTACCCACCATGGTGCTGT (SEQ ID NO.9), tương ứng. Để làm đối chứng, vi mảng còn có đầu dò dạng nguyên bản (DEL_WT) để so sánh chung cho cả bốn đột biến mất đoạn có trình tự NTTTTTTTTTTTGGATAGAGAGAACCCAGGCAC (SEQ ID NO.13). Trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-13 nêu trên, N chỉ đầu cải biến 5AmMC6.

Vi mảng phát hiện đột biến beta-globin trên chip sinh học được thiết kế trên tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300μm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250μm, trên mỗi vi điểm này được gắn độc lập các đầu dò phát hiện đột biến -90, -88, -28, CD8/9, CD 17, CD 26, IVS I-1, IVS I-5, CD 35, CD 41/42, CD 43, CD 71/72, CD 95, IVS II-654 và CD 147.

Đầu dò phát hiện đột biến -88 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTGGAGCCACACCCTAGGGT (SEQ ID NO.14) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTGGAGCCACATCCTAGGGT (SEQ ID NO.15). Đầu dò phát hiện đột biến -28 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTCTGGGCATAAAAGTCAGGG (SEQ ID NO.16) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTCTGGGCATAGAAGTCAGGG (SEQ ID NO.17). Đầu dò phát hiện đột biến IVS I-1 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTCTGGGCAGGTTGGTATCAA (SEQ ID NO.18) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTCTGGGCAGTTTGGTATCAA (SEQ ID NO.19). Đầu dò phát hiện đột biến CD 26 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTGGTAGTGAGGCCT (SEQ ID NO.20) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTGGTGGTAAGGACCT (SEQ ID NO.21). Đầu dò phát hiện đột biến IVS I-5 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTCAGGTTGGTATCAAGG (SEQ ID NO.22) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTGCAGGTTGCTATCAAGG (SEQ ID NO.23). Đầu dò phát hiện đột biến CD 35 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTCCAAGGGTAGACCA (SEQ ID NO.24) và trình tự

phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTGTCCAAGGTTAGACCAC (SEQ ID NO.25). Đầu dò phát hiện đột biến CD 95 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTGCAGCTTGTCACA (SEQ ID NO.26) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTGTGCAGCTTTGTCACAC (SEQ ID NO.27). Đầu dò phát hiện đột biến CD 71/72 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAGGCACC (SEQ ID NO.28) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAAGGCACC (SEQ ID NO.29). Đầu dò phát hiện đột biến IVS II-654 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGCAATAGCAAT (SEQ ID NO.30) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGTAATAGCAAT (SEQ ID NO.31). Đầu dò phát hiện đột biến CD 8/9 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTAGGAGAAGTCTGCCGT (SEQ ID NO.32) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTAGGAGAAGGTCTGCCGT (SEQ ID NO.33). Đầu dò phát hiện đột biến -90 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTGAGCCACACCCTAG (SEQ ID NO.34) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTGGAGCCATACCCTAGG (SEQ ID NO.35). Đầu dò phát hiện đột biến CD 41/42 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTAGGACTCAAAGAACCTCT (SEQ ID NO.36) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTAAGGACTCAACATCTGGGT (SEQ ID NO.37). Đầu dò phát hiện đột biến CD 43 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTCAAAGGACTCAAAGAACCT (SEQ ID NO.38) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTCAAAGGACTAAAAGAACCT (SEQ ID NO.39). Đầu dò phát hiện đột biến CD 147 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTAGTATCACTAAGCTCG (SEQ ID NO.40) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTAGTATCACTCTAAGCT (SEQ ID NO.41). Đầu dò phát hiện đột biến CD 17 bao gồm trình tự phát hiện dạng nguyên bản (WT) NTTTTTTTTTTTTGTGGTGCAAGGTGAA (SEQ ID NO.42) và trình tự phát hiện dạng đột biến (MT) NTTTTTTTTTTTTGTGGTGCTAGGTGAAC

(SEQ ID NO.43). Trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO.14-43 nêu trên, N chỉ đầu cải biến 5AmMC6.

Bảng 1. Danh sách các đầu dò xác định đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh trên chip sinh học

Tên đột biến	Trình tự	SEQ ID NO
α4.2	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTTTCGCTGTTGTTTTCC	1
SEA	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCGGACCCATCACTCAGCTTCTC	2
α3.7	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGAAAAAACTCAGGCACACA	3
THAI	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAAATGCCTGTGGTCAAAGCTCTCC	4
HbCs/Hb Pak	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTCCAGCTGAACGGTAT	5
HbCs	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTCCAGCTTGACGGTAT	6
HbQs	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTTGTCCAGGGAGGC	7
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTTGTCCGGGGAGGC	8
α2 C2.delT/ α2 IntCD	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTACCCACCATGGTGCTGT	9
α2 C2.delT	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGAACCCACCAGGTGCTGT	10
α2 IntCD	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAACCCACCCTGGTGCTG	11
Hb Pak	5AmMC6/ TTTTTTTTTTTTGCTCCAGCATATATGG	12
DEL_WT	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGATAGAGAGAACCCAGGCAC	13
-88	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCACACCCTAGGGT	14
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCACATCCTAGGGT	15
-28	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCATAAAAGTCAGGG	16
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCATAGAAGTCAGGG	17
IVS I-1	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCAGGTTGGTATCAA	18
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCAGTTTGGTATCAA	19
CD 26	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGTAGTGAGGCCT	20
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGTGGTAAGGACCT	21
IVS I-5	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAGGTTGGTATCAAGG	22
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCAGGTTGCTATCAAGG	23
CD 35	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCAAGGGTAGACCA	24
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTCCAAGGTTAGACCAC	25
CD 95	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCAGCTTGTCACA	26

Tên đột biến	Trình tự	SEQ ID NO
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGCAGCTTTGTCACAC	27
CD 71/72	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAGGCACC	28
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAAGGCACC	29
IVS II-654	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGCAATAGCAAT	30
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGTAATAGCAAT	31
CD 8/9	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGAGAAGTCTGCCGT	32
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGAGAAGGTCTGCCGT	33
-90	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGAGCCACACCCTAG	34
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCATACCCTAGG	35
CD 41/42	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGACTCAAAGAACCTCT	36
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAAGGACTCAACATCTGGGT	37
CD 43	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAAAGGACTCAAAGAACCT	38
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAAAGGACTAAAAGAACCT	39
CD 147	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGTATCACTAAGCTCG	40
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGTATCACTCTAAGCT	41
CD 17	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGGTGCAAGGTGAA	42
	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGGTGCTAGGTGAAC	43

Ngoài ra, trên mỗi vi mảng còn có các trình tự dò làm đối chứng dương, đối chứng âm, đối chứng huỳnh quang và đối chứng nhuộm, trong đó đối chứng dương có trình tự NTTTTTTTTTTTGCCTCAAGTATGAGT (SEQ ID NO.44) với N là 5AmMC6, đối chứng âm có trình tự NTTTTTTTTTTTTATGGCTACGAATTGGCT (SEQ ID NO.45) với N là 5AmMC6, đối chứng huỳnh quang có trình tự 5AmMC6/TTTTTTTTTTTTN (SEQ ID NO.46) với N là Cy5 và đối chứng nhuộm có trình tự 5AmMC6/TTTTTTTTTTTTN (SEQ ID NO.47) với N là biotin.

Bảng 2. Danh sách các đoạn đối chứng trên vi mảng của chip sinh học xác định đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh

Tên đối chứng	Trình tự	SEQ ID NO
Chứng dương	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCCTCAAGTATGAGT	44
Chứng âm	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTATGGCTACGAATTGGCT	45
Chứng huỳnh quang	5AmMC6/TTTTTTTTTTTT/3Cy5	46
Chứng nhuộm	5AmMC6/TTTTTTTTTTTT/Bio	47

Chứng huỳnh quang được sử dụng để kiểm soát quá trình in, đây là trình tự oligonucleotit được gắn phân tử phát huỳnh quang Cy5. Chứng âm được sử dụng để kiểm soát quá trình lai hóa là trình tự oligonuleotit không lai hóa với bất cứ gen nào trong hỗn hợp lai hóa. Chứng dương là trình tự oligonucleotit chỉ lai hóa đặc hiệu với trình tự bổ sung của nó. Chứng nhuộm để kiểm soát quá trình nhuộm, các oligonucleotit gắn phân tử Biotin.

Theo đó, mỗi chip sinh học được tạo thành từ hai vi mảng có thể xác định toàn bộ 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh dựa trên ma trận đầu dò được in trên vi điểm xác định trước. Tuy nhiên, theo kỹ thuật này, hoàn toàn có thể xác định các đột biến trên beta-globin và/hoặc alpha-globin độc lập dựa trên các vi mảng độc lập. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, có thể tạo ra chip để phát hiện một hoặc nhiều đột biến trong số 24 đột biến đã nêu bằng cách loại bỏ một hoặc nhiều đoạn dò tương ứng trên vi mảng.

Theo các phương án cụ thể, chip sinh học theo sáng chế được dùng để xác định đột biến bất kỳ trong số các đột biến α4.2, SEA, α3.7, THAI, HbCs, HbQs, α2 C2.delT, α2 IntCD, Hb Pak, HbCs/Hb Pak, α2 C2.delT/α2 IntCD, -90, -88, -28, CD8/9, CD 17, CD 26, IVS I-1, IVS I-5, CD 35, CD 41/42, CD 43, CD 71/72, CD 95, IVS II-654 và CD 147.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế bao gồm vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin và vi mảng phát hiện đột biến beta-globin được gắn độc lập trên các tấm nền là thủy tinh borosilicat được phủ epoxy, aldehyt hoặc amino. Trường hợp này, chip sinh học có thể được sử dụng để phát hiện độc lập đột biến alpha-globin và/hoặc beta-globin.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế bao gồm vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin và vi mảng phát hiện đột biến beta-globin được gắn trên cùng một tấm nền là thủy tinh borosilicat được phủ epoxy, aldehyt hoặc amino. Trong trường hợp này, chip sinh học được sử dụng để phát hiện cả đột biến alpha-globin và beta-globin.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế có các trình tự đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên các vi điểm theo cách không tiếp xúc với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 40μM.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế có mỗi đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên ít nhất trên 3 vi điểm khác nhau xác định trước trên vi mảng tương ứng. Việc gắn này nhằm mục đích xác định sai số trong quá trình lai để tăng mức độ tin cậy trong quá trình phát hiện đột biến. Ngoài ra, tùy theo mục đích, có thể gắn mỗi đầu dò này trên 5, 10, 15, 20 hoặc 30 vi điểm khác nhau theo ma trận điểm xác định trước.

Theo một phương án ưu tiên, chip sinh học theo sáng chế được bố trí trên tấm nền với lượng từ 2 đến 100 chip/tấm nền. Theo các phương án ưu tiên, các chip sinh học này được bố trí trên tấm nền với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 chip để có thể phát hiện được với số lượng mẫu tương ứng cho mỗi xét nghiệm. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, mỗi tấm nền này bao gồm 5, 8, 10, 12, 14 hoặc 16 chip.

Mỗi tấm nền chứa các chip được bảo quản trong hộp nhựa đựng trong túi nhôm đóng gói chân không, mỗi tấm nền này, ví dụ gồm 8 chip với 16 vi mảng, mỗi chip này có thể chẩn đoán được đồng thời 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh trên alpha-globin và beta-globin trong một lần xét nghiệm. Khi đó, mỗi tấm nền có thể xét nghiệm được 24 đột biến cho 8 mẫu bệnh phẩm từ 8 bệnh nhân độc lập.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kit để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó kit này chứa ít nhất một chip sinh học theo sáng chế và các dung dịch đệm, dung dịch PCR.

Các dung dịch đệm được sử dụng trong kit để rửa, làm sạch và lai mẫu ADN với mẫu dò. Dung dịch đệm theo sáng chế bao gồm các dung dịch lai (HS), dung dịch rửa 1 (WS1), dung dịch rửa 2 (WS2), dung dịch tráng (RS), dung dịch nhuộm (DS) và dung dịch chứng (DC) trong nước MiliQ. Nước MiliQ là nước siêu tinh khiết với thành phần về cơ bản chỉ có hydro và oxy, trong đó:

Dung dịch lai (HS) bao gồm SSC 3X, SDS 0,5% trong nước MiliQ.

Dung dịch rửa 1 (WS1) bao gồm SSC 1X, SDS1% trong nước MiliQ.

Dung dịch rửa 2 (WS2) bao gồm SSC 1X trong nước MiliQ.

Dung dịch tráng (RS) bao gồm TBS 1X, Tween20 0,5% trong nước MiliQ.

Dung dịch nhuộm (DS) bao gồm Cy5-Streptavidin 1mg/ml trong nước MiliQ.

Dung dịch chứng (PC) bao gồm 10µM trình tự NACTCATACTTGAGGC (SEQ ID NO.71), với N là Biosg trong nước MiliQ.

Các dung dịch đệm được pha chế và bảo quản trong điều kiện vô bào, nhiệt độ bảo quản ở 2°C đến 8°C, thời hạn sử dụng trong vòng 1 năm kể từ ngày sản xuất.

Dung dịch PCR theo sáng chế bao gồm các thành phần cần thiết để thực hiện phản ứng PCR, các dung dịch này bao gồm các dung dịch PCR vòng 1 và dung dịch PCR vòng 2 để nhân nhanh các đoạn gen quan tâm SEA, α4.2, THAI (ký hiệu Mix1 và Mix4), đột biến α 3.7 và nhóm alpha (ký hiệu Mix2 và Mix5) và nhóm các đột biến beta (ký hiệu Mix3 và Mix6).

Dung dịch Mix1 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 1 để nhân nhanh các gen đích bao gồm dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại, trong đó:

Cặp mồi để nhân đoạn đột biến SEA (mồi V1 SEA) có trình tự sau:

V1L SEA: 5'-TCCTGCCCTCACTGCAATAAATGGA-3' (SEQ ID NO.48); và

V1R SEA: 5'-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3' (SEQ ID NO.49)

Cặp mồi để nhân nhanh đột biến α4.2 (mồi V1 α4.2) có trình tự sau:

V1L α4.2: 5'-TAGAGCATTGCTGGTCATGC-3' (SEQ ID NO.50); và

V1R α4.2: 5'-TCTGCCACGCTCTACTGACT-3' (SEQ ID NO.51)

Cặp mồi để nhân nhanh đột biến THAI (mồi V1 THAI) có trình tự sau:

V1L THAI: 5'- TGCCTGTGGTCAAAGCTCTC-3' (SEQ ID NO.52) và

V1R SEA: 5'-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3' (SEQ ID NO.49).

Cần lưu ý rằng, đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49 (V1R SEA) được sử dụng chung làm đoạn mồi để nhân đoạn đột biến SEA và đột biến THAI.

Dung dịch Mix2 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 1 để nhân nhanh các gen đích bao gồm α3.7 và vùng Alpha 2 (bao gồm α2 C2del T, α2 IntCD, HbQs, Hb Cs và HbPak) dung dịch đệm này chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại, trong đó:

Cặp mồi để nhân đoạn đột biến α3.7 (mồi V1 α3.7) có trình tự sau:

V1L α3.7: 5'-CTTTCCCTACCGAGAGCCAGGTT-3' (SEQ ID NO.53); và

V1R α3.7: 5'-GCCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3' (SEQ ID NO.54).

Cặp mồi để nhân nhanh đột biến vùng alpha 2 (α2 C2del T, α2 IntCD, HbQs, Hb Cs và HbPak) (mồi V1 alpha2) có trình tự sau:

V1L alpha2: 5'- ACTCTTCTGGTCCCCACAG-3' (SEQ ID NO.55); và

V1R alpha2: 5'- GTTGGCACATTCCGGGA-3' (SEQ ID NO.56).

Dung dịch Mix3 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 1 để nhân nhanh các gen đích vùng beta 1 (bao gồm -90, -88, -28, CD 8/9, CD 17, CD 26, IVS I 1, IVS I 5, CD 35, CD 4142, CD 43, CD 7172, CD 95) và beta 2(CD 147, IVS II 654) dung dịch đệm này chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại, trong đó:

Cặp mồi để nhân đoạn đột biến beta1 (mồi V1 beta1) có trình tự sau:

V1L beta1: 5'- GGACAGGTACGGCTGTCA -3' (SEQ ID NO.57); và

V1R beta2: 5'- TATCCCCTTCCTATGACATGA-3' (SEQ ID NO.58).

Cặp mồi để nhân nhanh đột biến vùng beta 2 (mồi V1 beta2) có trình tự sau:

V1L beta2: 5'-ATGCCTCTTTGCACCATTCT-3' (SEQ ID NO.59); và

V1R beta2: 5'-CAGTTAAGTAGTTGGACTTAGGGA-3' (SEQ ID NO.60).

Dung dịch Mix4 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 2 để gắn đầu Biotin vào các trình tự được khuếch đại bởi dung dịch Mix1, dung dịch này bao gồm dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại. Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến SEA (V2 SEA) có trình tự NGCGATCTGGGCTCTGTGTTCT (SEQ ID NO.61) với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn Biotin vào đoạn đột biến α4.2 (V2 α4.2) có trình tự NCACCTACTCCGGAGGCT (SEQ ID NO.62), với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn Biotin vào đoạn đột biến THAI (V2 THAI) có trình tự NGATCTGCACCTCTGGGTAGGTTC (SEQ ID NO.63), với N là 5Biosg.

Dung dịch Mix5 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 2 để gắn đầu Biotin vào các trình tự được khuếch đại bởi dung dịch Mix2, dung dịch này bao gồm dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại. Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến α3.7 (V2 α3.7) có trình tự N CTCTCAGGGCAGAGGATCAC (SEQ ID NO.64) với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn Biotin vào đoạn đột biến alpha2 (V2 2-1 alpha2) có trình tự NTTGAGGGTGGCCTGTGGG (SEQ ID NO.65), với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn

Biotin vào đoạn đột biến alpha2 (V2 2-2 alpha2) có trình tự N CACTGCCTGCTGGTGAC (SEQ ID NO.66), với N là 5Biosg.

Dung dịch Mix6 là dung dịch đệm phản ứng PCR vòng 2 để gắn đầu Biotin vào các trình tự được khuếch đại bởi dung dịch Mix3, dung dịch này bao gồm dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U/phản ứng, 0,1-0,2µM mồi mỗi loại. Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến beta1 (V2 1-1 beta1) có trình tự N (SEQ ID NO.67) với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến beta2 (V2 1-2 beta2) có trình tự N CTGACTCTCTCTGCCTATTGG (SEQ ID NO.68) với N là 5Biosg, Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến beta1 (V2 2-1 beta1) có trình tự NTCCAGCCTTATCCCAACC (SEQ ID NO.69) với N là 5Biosg. Đoạn mồi để gắn nhãn Biotin vào đoạn đột biến beta2 (V2 2-2 beta1) có trình tự NCCACCAGTGCAGGCT (SEQ ID NO.70) với N là 5Biosg.

Các dung dịch PCR được pha chế và bảo quản trong điều kiện vô bào, nhiệt độ bảo quản ở -20°C đến -15°C, thời hạn sử dụng trong vòng 1 năm kể từ ngày sản xuất. Khi sử dụng, dung dịch PCR được tan đông trong điều kiện môi trường trong phòng.

Bảng 3. Danh sách các đoạn mồi đặc hiệu trong kit phát hiện đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh

Vùng gen đích	**Trình tự mồi**	**SEQ ID NO**
SEA	5’-TCCTGCCCTCACTGCAATAAATGGA-3’	48
	5’-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3’	49
α4.2	5’-TAGAGCATTGCTGGTCATGC-3’	50
	5’-TCTGCCACGCTCTACTGACT-3’	51
THAI	5’- TGCCTGTGGTCAAAGCTCTC-3’	52
	5’-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3’	49
α3.7	5’-CTTTCCCTACCGAGAGCCAGGTT-3’	53
	5’-GCCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3’	54
Alpha 2	5’- ACTCTTCTGGTCCCCACAG-3’	55
	5’- GTTGGCACATTCCGGGA-3’	56
Beta 1	5'- GGACAGGTACGGCTGTCA -3'	57
	5'- TATCCCCTTCCTATGACATGA-3'	58
Beta 2	5’-ATGCCTCTTTGCACCATTCT-3’	59
	5’-CAGTTAAGTAGTTGGACTTAGGGA-3’	60

Bảng 4. Danh sách các đoạn mồi đặc hiệu gắn Biotin cho các vùng gen đích được khuếch đại

Vùng gen đích	Trình tự mồi gắn	SEQ ID NO
SEA	5Biosg/GCGATCTGGGCTCTGTGTTCT	61
α4.2	5Biosg/CACCTACTCCGGAGGCT	62
THAI	5Biosg/GATCTGCACCTCTGGGTAGGTTC	63
α3.7	5Biosg/CTCTCAGGGCAGAGGATCAC	64
Alpha 2-1	5Biosg/TTGAGGGTGGCCTGTGGG	65
Alpha 2-2	5Biosg/CACTGCCTGCTGGTGAC	66
Beta 1-1	5Biosg/TCTGTCTCCACATGCCCAG	67
Beta 1-2	5Biosg/CTGACTCTCTCTGCCTATTGG	68
Beta 2-1	5Biosg/TCCAGCCTTATCCCAACC	69
Beta 2-2	5Biosg/CCACCAGTGCAGGCT	70

Theo một phương án thực hiện cụ thể, kit theo sáng chế bao gồm các thành phần sau:

Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
Chip	Biochip	Chip sinh học	16 chip
Dung dịch đệm	HS	Dung dịch lai bao gồm SSC 3X, SDS 0,5% trong nước MiliQ	3ml
	WS1	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X, SDS1% trong nước MiliQ	12ml
	WS2	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X trong nước MiliQ	7ml
	RS	Dung dịch tráng bao gồm TBS 1X, Tween20 0,5% trong nước MiliQ	40ml
	DS	Dung dịch nhuộm bao gồm Cy5-Streptavidin 1mg/ml trong nước MiliQ	4µL
	PC	Dung dịch chứng bao gồm 10µM trình tự nêu trong SEQ ID NO.71 trong nước MiliQ	5µL
Dung dịch PCR	Mix1	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 SEA: SEQ ID NO.48 và SEQ ID NO.49, 0,1-0,2µM mỗi loại; Mồi V1 α4.2: SEQ ID NO.50 và SEQ ID NO.51, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 THAI: SEQ ID NO.52 và SEQ ID NO.49, 0,1-	16x9µL

Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
		0,2µM mỗi loại.	
	Mix2	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 α3.7: SEQ ID NO.53 và SEQ ID NO.54, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 alpha2: SEQ ID NO.55 và SEQ ID NO.56, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix3	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 beta1: SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.58, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 beta2: SEQ ID NO.59 và SEQ ID NO.60, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix4	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 SEA: SEQ ID NO.61, 0,1-0,2µM; Mồi V2 α4.2: SEQ ID NO.62, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 THAI: SEQ ID NO.63, 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL
	Mix5	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 α3.7: SEQ ID NO.64, 0,1-0,2µM; Mồi V2 2-1 alpha2: SEQ ID NO.65, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 2-2 alpha2: SEQ ID NO.66, , 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL
	Mix6	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 1-1 beta1: SEQ ID NO.67; Mồi V2 1-2 beta2: SEQ ID NO.68; Mồi V2 2-1 beta1: SEQ ID NO.69; và Mồi V2 2-2 beta2: SEQ ID NO.70.	16x22,5 µL

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch đệm, dung dịch PCR được đựng trong các lọ có màu sắc khác nhau hoặc được đánh dấu để phân biệt. Việc đánh dấu này nhằm đảm bảo quá trình sử dụng không bị lẫn các ống với nhau khiến PCR lần hai không thực hiện được, cụ thể đối với PCR vòng 2, phải đảm bảo sản phẩm PCR của Mix1 được sử dụng với Mix4, Mix2 được sử dụng với Mix5 và Mix3 được sử dụng với Mix6, tương ứng.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này được đóng gói kèm hướng dẫn sử dụng. Theo đó kit được đóng gói riêng bao gồm tấm nền gồm một hoặc nhiều chip được đóng trong túi nhôm kín đựng trong hộp nhựa kín. Các dung dịch đệm được đựng trong các lọ nhựa thể tích từ 0,5 đến 60 ml và được đựng trong hộp có các ngăn

chia, đánh số hoặc ký hiệu cho từng loại. Chip sinh học và dung dịch đệm được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ 2 đến 8°C. Các dung dịch PCR được đựng trong các ống 0,2mL với các màu sắc khác nhau phân biệt theo nhóm hoặc được đánh dấu tương ứng với mỗi nhóm. Mỗi dung dịch này được đựng trong một ô trong hộp và được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ -20°C đến -15°C.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến các đoạn dò dùng để phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó các đoạn dò này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.43 như được thể hiện trên Bảng1 nêu trên.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến các đoạn mồi dùng để phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó các đoạn mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47 đến SEQ ID NO.70 như thể hiện trên Bảng 3 và Bảng 4 nêu trên.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chiết ADN từ mẫu bệnh phẩm; b) khuếch đại các đoạn gen quan tâm từ ADN tổng số; c) gắn nhãn biotin vào các đoạn gen quan tâm; d) lai với các đoạn dò đặc hiệu; và e) xác định đột biến.

Trong bước chiết ADN từ mẫu bệnh phẩm, mẫu bệnh phẩm được chiết ADN bằng các kỹ thuật đã biết, tốt hơn bằng cách sử dụng các kit chiết ADN và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất để thu được ADN tổng số. Mẫu ADN này được sử dụng để làm mẫu để xác định đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh.

Mẫu ADN được định lượng trong dung dịch đệm đến nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 100ng/µL.

Trong bước khuếch đại các đoạn gen quan tâm từ ADN tổng số, tiến hành ba phản ứng PCR đa mồi với ba nhóm đột biến bao gồm:

Nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7, tiến hành PCR đa mồi với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.48 đến SEQ ID NO.52.

Nhóm vùng alpha, tiến hành PCR đa mồi với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.53 đến SEQ ID NO.56,

Nhóm vùng beta, tiến hành PCR đa mồi với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.47 đến SQ ID NO.60.

Mỗi PCR được thực hiện trong điều kiện chuẩn để thu được các đoạn ADN quan tâm tương ứng để làm khuôn gắn nhãn biotin.

Trong bước gắn nhãn biotin, để gắn nhãn biotin vào các đoạn gen quan tâm, tiến hành PCR vòng 2 với ba sản phẩm PCR tương ứng thu được từ bước PCR vòng 1 nêu trên theo nhóm bao gồm:

Nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7, tiến hành với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.61 đến SEQ ID NO.63 và ADN khuôn là sản phẩm thu được từ PCR vòng 1 tương ứng.

Nhóm vùng alpha, tiến hành với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.64 đến SEQ ID NO.66 và ADN khuôn là sản phẩm thu được từ PCR vòng 1 tương ứng.

Nhóm vùng beta, tiến hành với các đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO.67 đến SEQ ID NO.70 và ADN khuôn là sản phẩm thu được từ PCR vòng 1 tương ứng.

Sản phẩm thu được từ PCR vòng 2 được sử dụng để lai với các đoạn dò đặc hiệu. Các đoạn dò này được gắn trên các vi mảng của chip theo sáng chế.

Trong bước lai với các đoạn dò đặc hiệu, sản phẩm thu được từ nhóm SEA, α 4.2, THAI và α 3.7 và nhóm vùng alpha lai được cho lai với vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin của vi chip được cố định trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.13. Sản phẩm thu được từ nhóm vùng beta được cho lai với vi mảng phát hiện đột biến beta-globin của vi chip được cố định trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.43. Các điều kiện lai được thực hiện trong điều kiện lai bình thường trong điều kiện phòng.

Trong bước xác định đột biến bằng cách ủ các vi mảng sau khi lai với đoạn nucleotit gắn huỳnh quang nêu trong SEQ ID NO.46 và đọc kết quả trên máy đọc huỳnh quang để xác định đồng thời 24 đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh.

Theo kết quả đọc huỳnh quang và căn cứ trên ma trận gắn đầu dò của mảng trên chip sẽ xác định được các đột biến, từ đó có thể đưa ra được các kiểu gen như bình thường (không có đột biến), đột biến dạng dị hợp, đồng hợp hoặc bán dị hợp trên cơ sở xác định từng điểm đột biến tương ứng với các điểm phát huỳnh quang trên chip.

Quy trình cho phép chẩn đoán 24 đột biến trên gen globin một cách đồng thời với các điều kiện thực hiện rút ngắn và được chuẩn hóa bằng một tiến trình thực hiện

duy nhất sử dụng chip sinh học cho phép phát hiện chính xác từng đột biến trong số 24 đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất chip sinh học để phát hiện bệnh đột biến gen gây bệnh tan máu

Các đoạn dò đặc hiệu cho từng đột biến được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp hóa học, đầu 5' được gắn 12T tạo thành chuỗi nối và được gắn 5AmMC6 theo quy trình tổng hợp chuẩn. Các đoạn đối chứng được tổng hợp và gắn huỳnh quang Cyp hoặc Biotin tương ứng. Các đầu dò và đoạn đối chứng được chuẩn độ trong dung dịch đệm in Tween20 đến nồng độ 20μM/mL.

SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ cuối
1	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTTTCGCTGTTGTTTTCC	20μM/mL
2	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCGGACCCATCACTCAGCTTCTC	20μM/mL
3	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGAAAAAACTCAGGCACACA	20μM/mL
4	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAAATGCCTGTGGTCAAAGCTCTCC	20μM/mL
5	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTCCAGCTGAACGGTAT	20μM/mL
6	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTCCAGCTTGACGGTAT	20μM/mL
7	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTTGTCCAGGGAGGC	20μM/mL
8	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTTGTCCGGGGAGGC	20μM/mL
9	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTACCCACCATGGTGCTGT	20μM/mL
10	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGAACCCACCAGGTGCTGT	20μM/mL
11	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAACCCACCCTGGTGCTG	20μM/mL
12	5AmMC6/ TTTTTTTTTTTTGCTCCAGCATATATGG	20μM/mL
13	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGATAGAGAGAACCCAGGCAC	20μM/mL
14	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCACACCCTAGGGT	20μM/mL
15	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCACATCCTAGGGT	20μM/mL
16	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCATAAAAGTCAGGG	20μM/mL
17	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCATAGAAGTCAGGG	20μM/mL
18	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCAGGTTGGTATCAA	20μM/mL
19	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCTGGGCAGTTTGGTATCAA	20μM/mL
20	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGTAGTGAGGCCT	20μM/mL
21	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGTGGTAAGGACCT	20μM/mL
22	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAGGTTGGTATCAAGG	20μM/mL

23	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCAGGTTGCTATCAAGG	20µM/mL
24	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCAAGGGTAGACCA	20µM/mL
25	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTCCAAGGTTAGACCAC	20µM/mL
26	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCAGCTTGTCACA	20µM/mL
27	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGCAGCTTTGTCACAC	20µM/mL
28	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAGGCACC	20µM/mL
29	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCCATCACTAGAAGGCACC	20µM/mL
30	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGCAATAGCAAT	20µM/mL
31	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGGTTAAGGTAATAGCAAT	20µM/mL
32	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGAGAAGTCTGCCGT	20µM/mL
33	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGAGAAGGTCTGCCGT	20µM/mL
34	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGAGCCACACCCTAG	20µM/mL
35	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGGAGCCATACCCTAGG	20µM/mL
36	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGGACTCAAAGAACCTCT	20µM/mL
37	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAAGGACTCAACATCTGGGT	20µM/mL
38	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAAAGGACTCAAAGAACCT	20µM/mL
39	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTCAAAGGACTAAAAGAACCT	20µM/mL
40	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGTATCACTAAGCTCG	20µM/mL
41	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTAGTATCACTCTAAGCT	20µM/mL
42	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGGTGCAAGGTGAA	20µM/mL
43	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGTGGTGCTAGGTGAAC	20µM/mL
44	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTGCCTCAAGTATGAGT	20µM/mL
45	5AmMC6/TTTTTTTTTTTTATGGCTACGAATTGGCT	20µM/mL
46	5AmMC6/TTTTTTTTTTTT/3Cy5	20µM/mL
47	5AmMC6/TTTTTTTTTTTT/Bio	20µM/mL

Tạo chip sinh học

Tấm thủy tinh borosilicate được phủ chất nền epoxy và được cắt thành mảnh kích thước 75 x 25mm được chuẩn bị trước. Sau đó chuyển lên thiết bị in không tiếp xúc sciFLEXARAYER để in từng đoạn các vi mảng theo thứ tự:

Vi mảng trái (vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin) được in với lượng lần lượt 100µL/điểm các trình tự từ SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.44 đến SEQ ID NO.47 với mỗi điểm có đường kính khoảng 200µm, tạo thành dãy cách

đều nhau 200µm trên diện tích mặt (nêu kích thước dài x rộng). Trên tấm thủy tinh nền được in tổng 8 vi mảng trái tạo thành dãy vi mảng trái cách đều nhau.

Vi mảng phải (vi mảng phát hiện đột biến beta-globin) được in lần lượt 100µL/điểm các trình tự từ SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 đến SEQ ID NO.47 với mỗi điểm có đường kính khoảng 200µm, tạo thành dãy cách đều nhau 200µm trên diện tích mặt (nêu kích thước dài x rộng). Trên tấm thủy tinh nền được in tổng 8 vi mảng phải tương tạo thành dãy vi mảng trái cách đều nhau tương ứng với vi mảng trái.

Tấm nền được ủ trong điều kiện nhiệt độ khoảng 23°C, độ ẩm khoảng 60% trong 30 phút để các đoạn dò liên kết với tấm nền thủy tinh thông qua đầu liên kết 5AmMC6 với epoxy và làm khô các vi điểm in. Kết quả thu được các lam kính thủy tinh bao gồm 8 chip với mỗi chip bao gồm 2 vi mảng trái và phải. Tấm nền được bọc kín trong túi nhôm để bảo quản.

Ví dụ 2. Sản xuất kit để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu

Tổng hợp các đoạn mồi

Các đoạn mồi đặc hiệu cho từng nhóm đột biến được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp hóa học. Các đoạn mồi gắn Biosg vào đầu 5' theo quy trình tổng hợp chuẩn. Các đoạn mồi được chuẩn độ trong dung dịch đệm đến nồng độ 0,2µM/mL.

SEQ ID NO	Trình tự mồi	Nồng độ cuối
48	5'-TCCTGCCCTCACTGCAATAAATGGA-3'	0,2µM/mL
49	5'-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3'	0,2µM/mL
50	5'-TAGAGCATTGCTGGTCATGC-3'	0,2µM/mL
51	5'-TCTGCCACGCTCTACTGACT-3'	0,2µM/mL
52	5'- TGCCTGTGGTCAAAGCTCTC-3'	0,2µM/mL
49	5'-TTGAGACCATGCTTGCTTTGCAC-3'	0,2µM/mL
53	5'-CTTTCCCTACCGAGAGCCAGGTT-3'	0,2µM/mL
54	5'-GCCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3'	0,2µM/mL
55	5'- ACTCTTCTGGTCCCCACAG-3'	0,2µM/mL
56	5'- GTTGGCACATTCCGGGA-3'	0,2µM/mL
57	5'- GGACAGGTACGGCTGTCA -3'	0,2µM/mL
58	5'- TATCCCCTTCCTATGACATGA-3'	0,2µM/mL

59	5'-ATGCCTCTTTGCACCATTCT-3'	0,2µM/mL
60	5'-CAGTTAAGTAGTTGGACTTAGGGA-3'	0,2µM/mL
61	5Biosg/GCGATCTGGGCTCTGTGTTCT	0,2µM/mL
62	5Biosg/CACCTACTCCGGAGGCT	0,2µM/mL
63	5Biosg/GATCTGCACCTCTGGGTAGGTTC	0,2µM/mL
64	5Biosg/CTCTCAGGGCAGAGGATCAC	0,2µM/mL
65	5Biosg/TTGAGGGTGGCCTGTGGG	0,2µM/mL
66	5Biosg/CACTGCCTGCTGGTGAC	0,2µM/mL
67	5Biosg/TCTGTCTCCACATGCCCAG	0,2µM/mL
68	5Biosg/CTGACTCTCTCTGCCTATTGG	0,2µM/mL
69	5Biosg/TCCAGCCTTATCCCAACC	0,2µM/mL
70	5Biosg/CCACCAGTGCAGGCT	0,2µM/mL

Tạo dung dịch PCR

Các dung dịch PCR (Master mix) được tạo theo quy trình chuẩn, các thành phần dung dịch được pha chế và phân phối vào trong các ống nhỏ theo thành phần như sau

Ký hiệu	**Thành phần**	**Quy cách**
Mix1	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.50-52: 0,2µM mỗi loại SEQ ID NO.49: 0,4µM	Lọ màu tím 0,2mL chứa 9µL
Mix2	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.53-SEQ ID NO.56: 0,2µM mỗi loại	Lọ màu vàng 0,2mL chứa 9µL
Mix3	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.57-SEQ ID NO.60: 0,2µM mỗi loại	Lọ màu xanh da trời 0,2mL chứa 9µL
Mix4	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.61-SEQ ID NO.63: 0,2µM mỗi loại	Lọ màu nâu 0,2mL chứa 22,5µL
Mix5	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.64-SEQ ID NO.66: 0,2µM mỗi loại	Lọ màu xanh lá 0,2mL chứa 22,5µL
Mix6	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U SEQ ID NO.67-SEQ ID NO.70: 0,2µM mỗi loại	Lọ màu trắng 0,2mL chứa 22,5µL

Tạo dung dịch đệm

Các dung dịch đệm bao gồm dung dịch lai (HS), dung dịch rửa 1 (WS1), dung dịch rửa 2 (WS2), dung dịch tráng (RS), dung dịch nhuộm (DS) và dung dịch chứng (PC) được pha chế bằng cách pha định lượng các thành phần hóa chất trong nước tinh khiết (MiliQ) bao gồm:

Dung dịch lai (HS) bao gồm SSC 3X, SDS 0,5% trong nước MiliQ, dung dịch này được định lượng 3mL trong ống nhựa thể tích 4mL.

Dung dịch rửa 1 (WS1) bao gồm SSC 1X, SDS1% trong nước MiliQ, dung dịch này được định lượng 12mL trong ống nhựa thể tích 15mL.

Dung dịch rửa 2 (WS2) bao gồm SSC 1X trong nước MiliQ, dung dịch này được định lượng 7mL trong ống nhựa thể tích 8mL.

Dung dịch tráng (RS) bao gồm TBS 1X, Tween20 0,5% trong nước MiliQ, dung dịch này được định lượng 40 mL trong ống nhựa thể tích 60mL.

Dung dịch nhuộm (DS) bao gồm Cy5-Streptavidin 1mg/ml trong nước MiliQ, dung dịch này được định lượng 4µL trong ống nhựa 0,5mL.

Dung dịch chứng (PC) bao gồm 10µM/mL trình tự Biosg ACTCATACTTGAGGC (SEQ. ID NO.71) trong nước MiliQ được định lượng 5µL trong ống nhựa 0,5mL.

Các thành phần nêu trên được đóng gói với chip thu được theo Ví dụ 1 tạo kit dùng cho 8 mẫu bệnh phẩm. Các thành phần trên được chia vào 2 hộp giấy khác nhau, tương ứng với điều kiện bảo quản khác nhau gồm:

Hộp	Thành phần	Ký hiệu	Định lượng	Quy cách	Số lượng	Đóng gói
Hộp 1	Dung dịch đệm	HS	3mL	Ống nhựa 4mL	1	Hộp giấy có ngăn
		WS1	12 ml	Ống nhựa 15mL	1	
		WS2	7ml	Ống nhựa 8mL	1	
		RS	40ml	Ống nhựa 60mL	1	
		DS	4 µL	Ống nhựa 0,5mL	1	
		PC	5 µL	Ống nhựa 0,5ml	1	
	Biochip	Chip	2 tấm (8 chip/tấm)	Hộp nhựa 2 ngăn	1	Túi nhôm

Hộp 2	Dung dịch PCR	Mix 1	9 µL	Lọ 0,2 mL, màu tím	16	Hộp giấy có ngăn
		Mix 2	9 µL	Lọ 0,2 mL, màu vàng	16	
		Mix3	9 µL	Lọ 0,2 mL, màu xanh da trời	16	
		Mix 4	22,5 µL	Lọ 0,2 mL, màu nâu	16	
		Mix 5	22,5 µL	Lọ 0,2 mL, xanh lá	16	
		Mix 6	22,5 µL	Lọ 0,2 mL, màu trắng	16	

Kit được đóng gói kèm theo hướng dẫn sử dụng bao gồm hướng dẫn điều kiện bảo quản, hướng dẫn thực hiện PCR và lai cũng như sơ đồ ma trận in tương ứng với từng vị trí đột biến để người dùng có thể so sánh và đánh giá kết quả.

Ví dụ 3. Thử nghiệm phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh

Để thử nghiệm khả năng phát hiện đột biến gây bệnh tan máu di truyền của chip thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm với 50 mẫu bệnh phẩm từ 50 người mắc bệnh tan máu di truyền bằng kit thu được từ Ví dụ 2 nêu trên.

Mẫu bệnh phẩm được chiết để thu ADN tổng số bằng kit chiết ADN của Qiagen theo hướng dẫn của nhà cung cấp để thu được ADN tổng số. Mẫu ADN này được định lượng trong dung dịch đệm đến nồng độ 50ng/µL. Mẫu được bảo quản ở 4°C để sử dụng.

Khuếch đại gen quan tâm (PCR vòng 1):

Trong bước khuếch đại các đoạn gen quan tâm từ ADN tổng số, tiến hành ba phản ứng PCR đa mồi với ba nhóm đột biến với các ống PCR theo kit thu được từ Ví dụ 2:

Với mỗi mẫu, tiến hành hút 1µL mẫu bổ sung vào các dung dịch Mix1 (màu tím), Mix2 (màu vàng), Mix3 (màu xanh da trời), sau đó tiến hành ly tâm nhanh các ống này trong 2 giây và tiến hành PCR với chu trình nhiệt như sau:

		30 chu kỳ				
Nhiệt độ	95°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Thời gian	3 phút	45 giây	45 giây	30 giây	5 phút	∞

Sản phẩm PCR vòng 1 thu được này được bảo quản ở 4°C cho đến khi thực hiện PCR vòng 2.

Gắn Biotin vào đoạn gen quan tâm (PCR vòng 2):

Tiến hành PCR vòng 2 sử dụng sản phẩm PCR vòng 1 tương ứng làm khuôn với các ống theo thứ tự như sau:

Sản phẩm PCR vòng 1	PCR vòng 2
Mix1 (màu tím)	Mix4 (màu nâu)
Mix2 (màu vàng)	Mix5 (màu xanh lá)
Mix3 (màu xanh da trời)	Mix6 (màu trắng)

Hút 2,5 uL sản phẩm PCR vòng 1 vào các ống PCR mix của PCR vòng 2 tương ứng như trên, tiếp đó tiến hành ly tâm nhanh các ống PCR vòng 2 trong 2 giây. Tiến hành PCR vòng 2 với chu trình nhiệt như sau:

		20 chu kỳ			
Nhiệt độ	95°C	94°C	60°C	72°C	4°C
Thời gian	2 phút	45 giây	45 giây	30 giây	∞

Sản phẩm PCR vòng 2 thu được này được bảo quản ở 4°C nếu chưa tiến hành ngay bước lai hóa.

Lai và đọc kết quả xác định đột biến:

Tấm nền chứa chip sinh học của kit được đặt lên miếng silicon, căn lề khớp với buồng lai, sau đó kẹp chặt tấm nền này với buồng lai (Adaptor).

Dung dịch lai HS được làm ấm trong thiết bị ủ nhiệt 50°C trong 15 phút. Nạp 5µL dung dịch PC vào dung dịch lai HS, sau khi đảo nhẹ nhàng đồng nhất dung dịch, sau đó nạp 60µL dung dịch HS vào mỗi giếng. Sau đó chuyển buồng lai này vào máy ủ lắc Elisa ở nhiệt độ 50°C, tốc độ lắc 250 vòng/phút.

Sản phẩm PCR vòng 2 từng ống được biến tính ở 95°C trong 3 phút, sau đó làm lạnh nhanh trong PCR rack chiller ít nhất 1 phút.

Lấy buồng lai ra khỏi máy ủ lắc Elisa và hút 20 µL trong mỗi ống của sản phẩm PCR vòng 2 cho vào các giếng tương ứng như sau: Sản phẩm Mix4 (màu nâu) và Mix5 (màu xanh lá) cho vào giếng bên trái (vi mảng trái) và Mix6 (màu trắng) cho vào giếng bên phải (vi mảng phải).

Phủ các giếng bằng parafilm để ngăn cản sự bay hơi, sau đó đặt buồng lai này vào máy ủ lắc Elisa, tiến hành lai trong 1 giờ ở 50°C, 250 vòng/phút.

Ủ dung dịch rửa WS1 và WS2 vào thiết bị ủ nhiệt ở 50°C trong khoảng 15 phút trước khi rửa.

Sau khi kết thúc bước lai, hút bỏ hỗn hợp lai bằng pipet bơm chân không, đặt đầu pipet ở góc trên cùng bên trái.

Lấy chai dung dịch WS1 ra khỏi thiết bị ủ nhiệt, lắc nhẹ nhàng để dung dịch đồng nhất và nạp 150 µL dung dịch rửa WS1 vào mỗi giếng.

Chuyển buồng lai vào máy lắc Elisa ở 50°C, 250 vòng/phút trong 5 phút, hút bỏ dung dịch rửa WS1 sử dụng pipet bơm chân không, đặt đầu pipet ở góc trên cùng bên trái. Bước rửa này được thực hiện lặp lại 2 lần.

Dung dịch WS2 sau khi ủ được lắc đồng nhất, sau đó nạp 150 µL vào mỗi giếng và chuyển buồng lai vào máy lắc Elisa ở 50°C, 250 vòng trong 5 phút.

Dung dịch nhuộm cho mỗi giếng được pha bằng cách bổ sung 100 µL dung dịch RS và 0,1 µL dung dịch DS. Sau khi trộn đều để dung dịch nhuộm được đồng nhất, tiến hành hút bỏ dung dịch WS2 bằng pipet bơm chân không, đặt đầu pipet ở góc trên cùng bên trái.

Nạp 100 µL dung dịch RS vào mỗi giếng và nhanh chóng hút ra bằng pipet bơm chân không rồi nạp tiếp 100 µL dung dịch nhuộm vào mỗi giếng.

Phủ các giếng bằng parafilm rồi đặt buồng lai lên máy lắc tiến hành lắc ở nhiệt độ phòng, 250 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi hút bỏ dung dịch nhuộm bằng pipet bơm chân không, tiến hành nạp 100 µL dung dịch RS vào mỗi giếng và nhanh chóng hút ra bằng pipet bơm chân không.

Tháo lam kính ra khỏi buồng lai và nhúng lam kính trong buồng rửa chứa khoảng 5 mL dung dịch RS và lắc ở nhiệt độ phòng, 250 vòng/phút trong 3 phút. Lam kính được lấy ra khỏi buồng rửa và đặt vào buồng rửa chứa khoảng 5 mL nước nucleaza. Tiến hành lắc ở nhiệt độ thường, 250 vòng/phút trong 20 giây và ly tâm trong 30 giây thu được lam kính đã được nhuộm và lai.

Sử dụng máy BimedReader FL2 (thiết bị đọc kết quả chuyên dụng cho bộ kit) để đọc kết quả trên lam kính. Kết quả thu được cho các trường hợp điển hình được thể hiện trong các hình từ Hình 4 đến Hình 20.

Kết quả cho thấy các hình ảnh thu được rõ nét, có khả năng phân biệt được dễ dàng, cho phép xác định được các đột biến liên gây bệnh tan máu bẩm sinh.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chip theo sáng chế có khả năng lai đặc hiệu với đồng thời 24 trường hợp đột biến gây bệnh tan máu bẩm sinh trên cơ sở gen, điều này mở ra một hướng xét nghiệm chẩn đoán bệnh tan máu bẩm sinh (thalassemia) một cách nhanh chóng và hiệu quả. Chip được cải tiến về các đoạn dò đặc hiệu tối ưu, cho phép thực hiện lai trong điều kiện thông thường mà vẫn đảm bảo độ tin cậy và chính xác.

Bằng cách tối ưu hóa và giảm lượng mẫu dò được in trên các tấm nền thủy tinh cho phép sản xuất hàng loạt chip với chi phí thấp, giúp tăng hiệu quả, giảm giá thành sản phẩm, cho phép người bệnh có khả năng tiếp cận với các xét nghiệm trên cơ sở chẩn đoán di truyền.

Bằng cách cải tiến, tối ưu hóa các đoạn mồi và các đoạn dò và phân phối hợp lý các đột biến trên các vi mảng tương ứng, điều này cho phép giảm được lượng phản ứng PCR, giảm lượng mồi trong mỗi phản ứng, kit cho phép nhân nhanh các đoạn gen quan tâm, chẩn đoán hiệu quả 24 đột biến giúp giảm các chi phí thực hiện, rút ngắn thời gian chẩn đoán bệnh tan máu bẩm sinh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chip sinh học để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó chip này bao gồm:

- vi mảng (microarray) phát hiện đột biến alpha-globin, trong đó vi mảng này bao gồm tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300µm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250µm, trên mỗi vi điểm này được gắn độc lập:

  + đầu dò bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.13, theo thứ tự xác định;

  + đối chứng dương có trình tự nêu trong SEQ ID NO.44;

  + đối chứng âm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.45;

  + đối chứng huỳnh quang có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46; và

  + đối chứng nhuộm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47;

- vi mảng (microarray) phát hiện đột biến beta-globin, trong đó vi mảng này bao gồm tấm nền có các vi điểm có đường kính từ 50 đến 300µm được bố trí theo dãy cách nhau khoảng từ 100 đến 250µm, trên mỗi điểm này được gắn độc lập:

  + đầu dò bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.43, theo thứ tự xác định;

  + đối chứng dương có trình tự nêu trong SEQ ID NO.44;

  + đối chứng âm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.45;

  + đối chứng huỳnh quang có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46; và

  + đối chứng nhuộm có trình tự nêu trong SEQ ID NO.47.

2. Chip sinh học theo điểm 1, trong đó vi mảng phát hiện đột biến alpha-globin và vi mảng phát hiện đột biến beta-globin được gắn trên cùng một tấm nền là thủy tinh borosilicat được phủ epoxy, aldehyt hoặc amino.

3. Chip sinh học theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các trình tự đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên các vi điểm theo cách không tiếp xúc với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 40µM.

4. Chip sinh học theo điểm 3, trong đó mỗi đầu dò hoặc đối chứng được gắn độc lập trên ít nhất trên 3 vi điểm khác nhau xác định trước trên vi mảng tương ứng.

5. Chip sinh học theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chip này được bố trí trên tấm nền với lượng từ 2 đến 16 chip/tấm nền.

6. Kit để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh, trong đó kit này chứa ít nhất một chip sinh học như được xác định trong các điểm từ 1 đến 5 và các dung dịch đệm, dung dịch PCR.

7. Kit theo điểm 5, trong đó kit này bao gồm các thành phần sau:

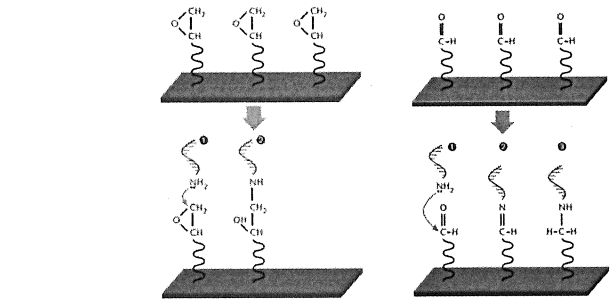
Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
Chip	Biochip	Chip sinh học, 2 tấm nền, mỗi tấm 8 chip	16 chip
Dung dịch đệm	HS	Dung dịch lai bao gồm SSC 3X, SDS 0,5% trong nước MiliQ	3ml
	WS1	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X, SDS1% trong nước MiliQ	12ml
	WS2	Dung dịch rửa bao gồm SSC 1X trong nước MiliQ	7ml
	RS	Dung dịch tráng bao gồm TBS 1X, Tween20 0,5% trong nước MiliQ	40ml
	DS	Dung dịch nhuộm bao gồm Cy5-Streptavidin 1mg/ml trong nước MiliQ	4µL
	PC	Dung dịch chứng bao gồm 10µM trình tự nêu trong SEQ ID NO.71 trong nước MiliQ	5µL
Dung dịch PCR	Mix1	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 SEA: SEQ ID NO.48 và SEQ ID NO.49, 0,1-0,2µM mỗi loại; Mồi V1 α4.2: SEQ ID NO.50 và SEQ ID NO.51, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 THAI: SEQ ID NO.52 và SEQ ID NO.49, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix2	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 α3.7: SEQ ID NO.53 và SEQ ID NO.54, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 alpha2: SEQ ID NO.55 và SEQ ID NO.56, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix3	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V1 beta1: SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.58, 0,1-0,2µM mỗi loại; và Mồi V1 beta2: SEQ ID NO.59 và SEQ ID NO.60, 0,1-0,2µM mỗi loại.	16x9µL
	Mix4	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 SEA: SEQ ID NO.61, 0,1-0,2µM; Mồi V2 α4.2: SEQ ID NO.62, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 THAI: SEQ ID NO.63, 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL

Loại	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Tổng
	Mix5	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 α3.7: SEQ ID NO.64, 0,1-0,2µM; Mồi V2 2-1 alpha2: SEQ ID NO.65, 0,1-0,2µM; và Mồi V2 2-2 alpha2: SEQ ID NO.66, , 0,1-0,2µM.	16x22,5 µL
	Mix6	Dung dịch đệm chứa 0,2mM dNTP, Taq polymeraza 1U Mồi V2 1-1 beta1: SEQ ID NO.67; Mồi V2 1-2 beta2: SEQ ID NO.68; Mồi V2 2-1 beta1: SEQ ID NO.69; và Mồi V2 2-2 beta2: SEQ ID NO.70.	16x22,5 µL

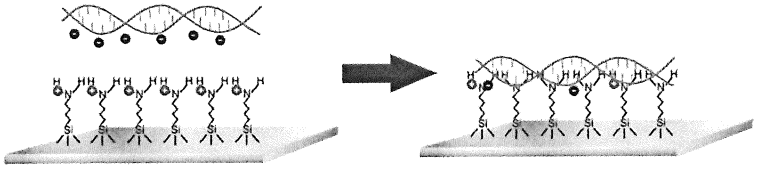
8. Kit theo điểm 6 hoặc 7, trong đó các dung dịch đệm, dung dịch PCR được đựng trong các lọ có màu sắc khác nhau hoặc được đánh dấu để phân biệt.

9. Kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó kit này được đóng gói kèm hướng dẫn sử dụng.

HÌNH 1

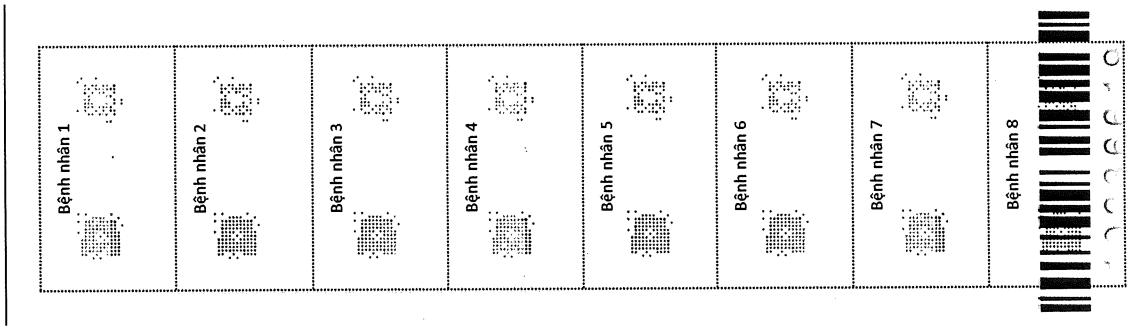


(A) (B)

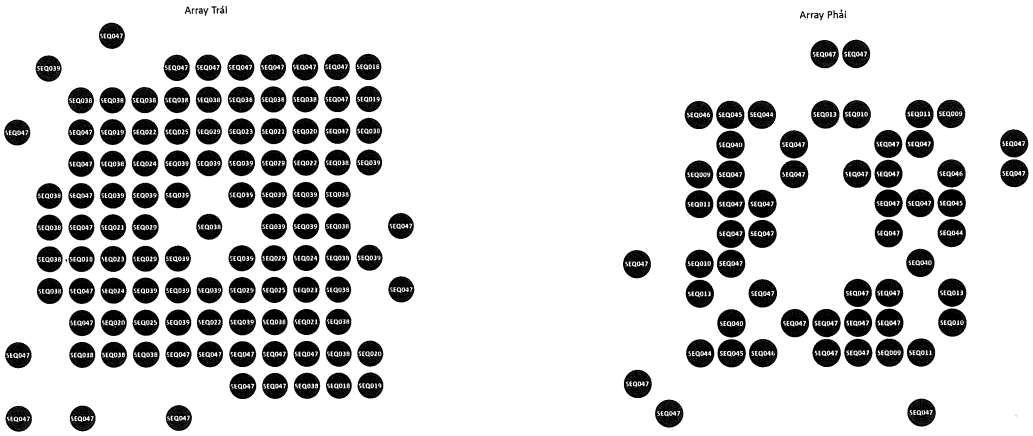


(C)

HÌNH 2

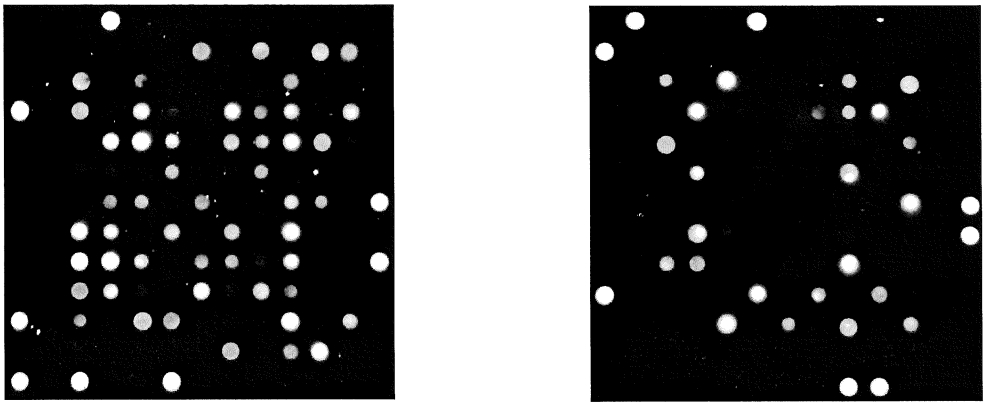


HÌNH 3



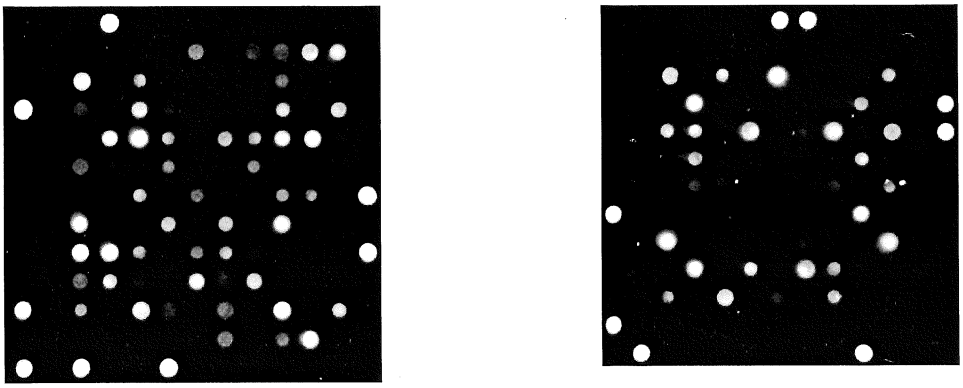
HÌNH 4

(A) **(B)**



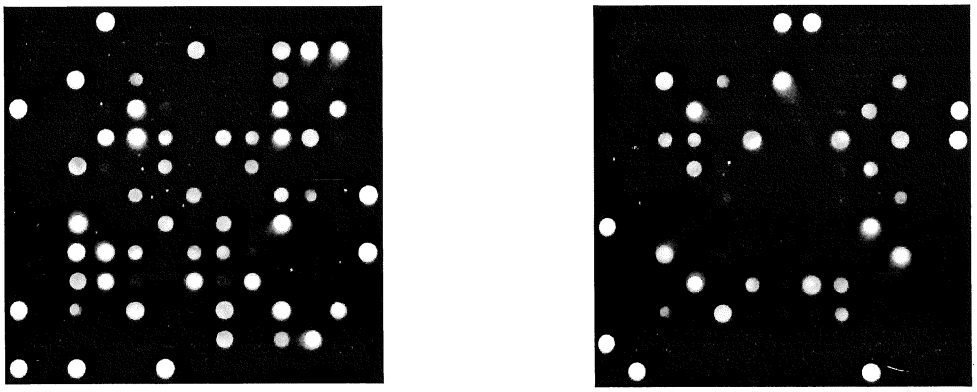
HÌNH 5

(A) (B)



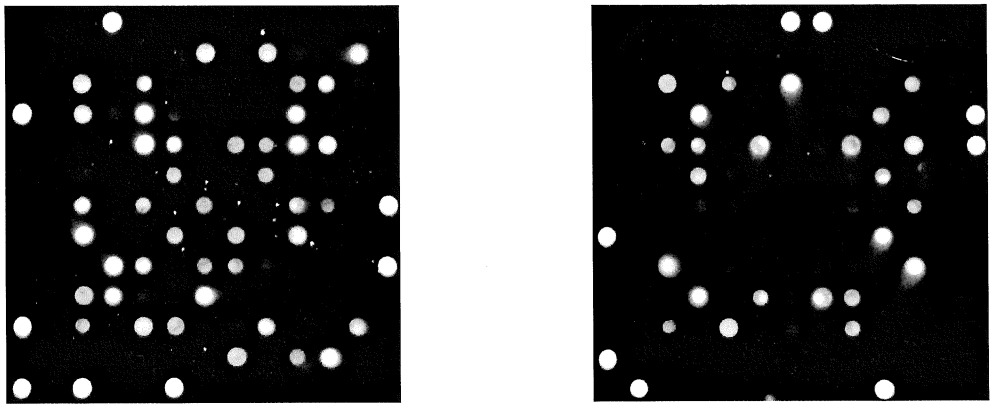
HÌNH 6

(A) **(B)**



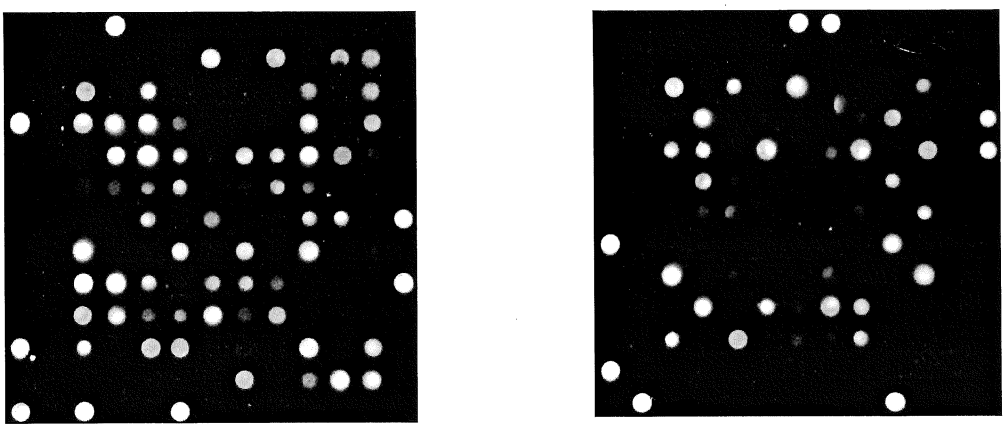
HÌNH 7

(A) **(B)**



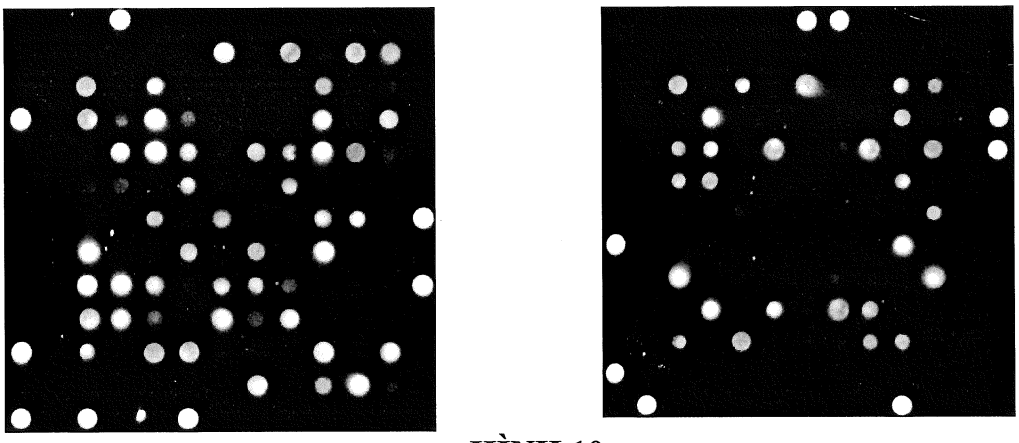
HÌNH 8

(A) **(B)**



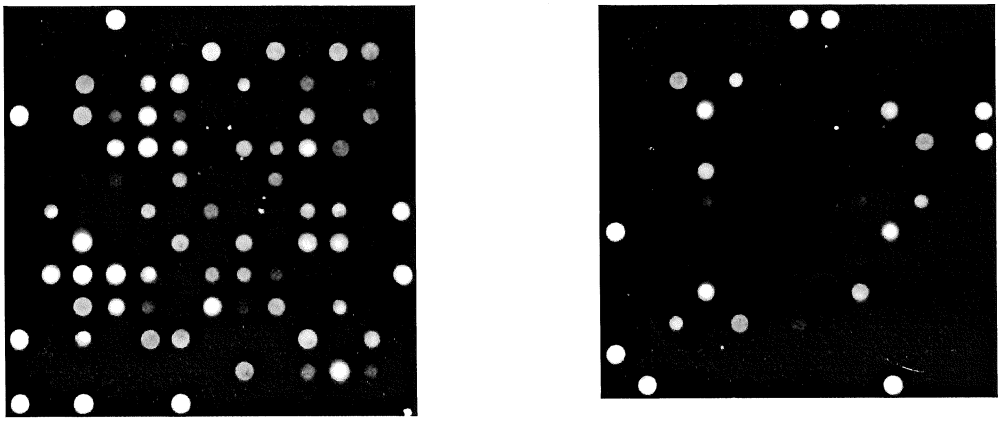
HÌNH 9

(A) **(B)**



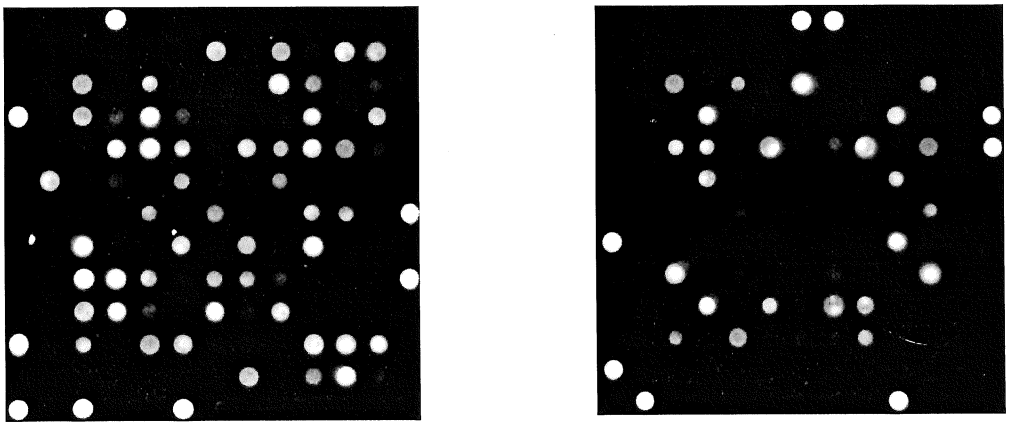
HÌNH 10

(A) (B)



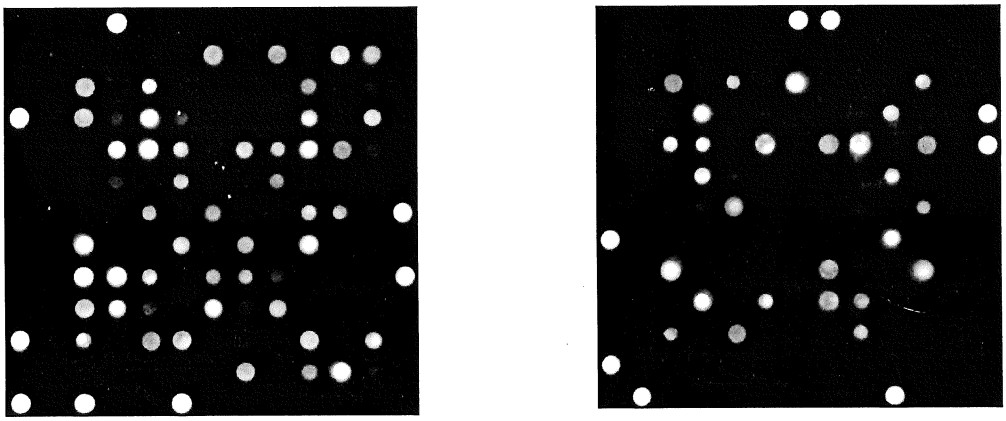
HÌNH 11

(A) (B)



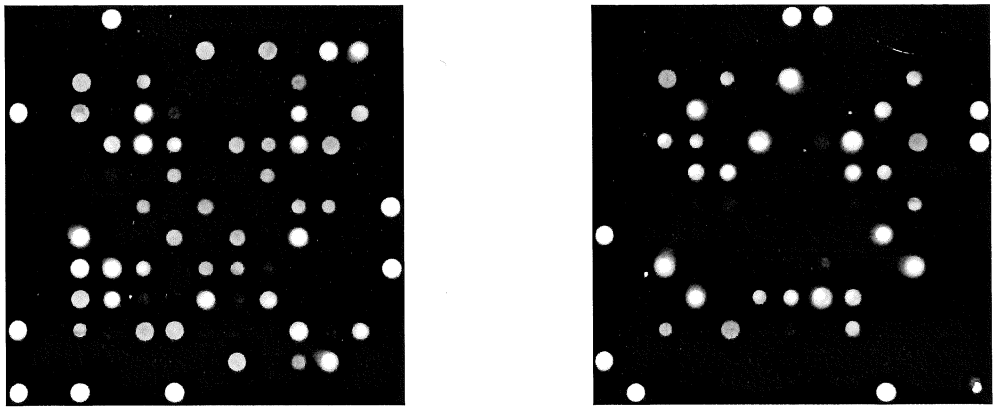
HÌNH 12

(A) (B)



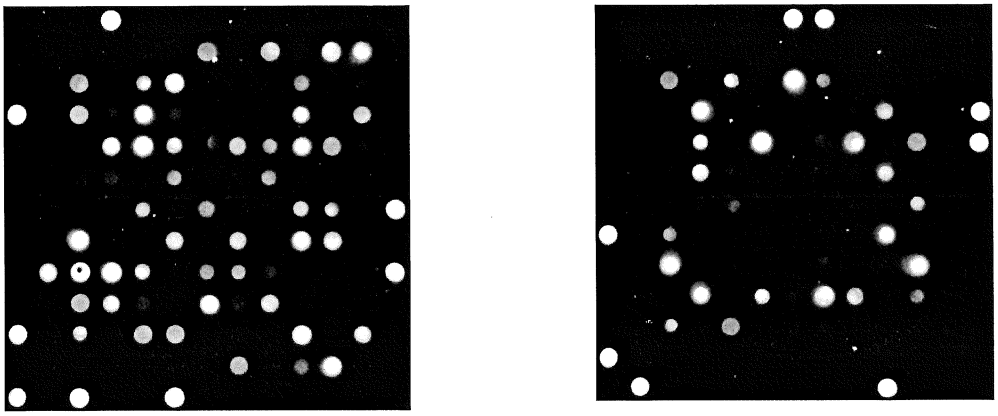
HÌNH 13

(A) **(B)**



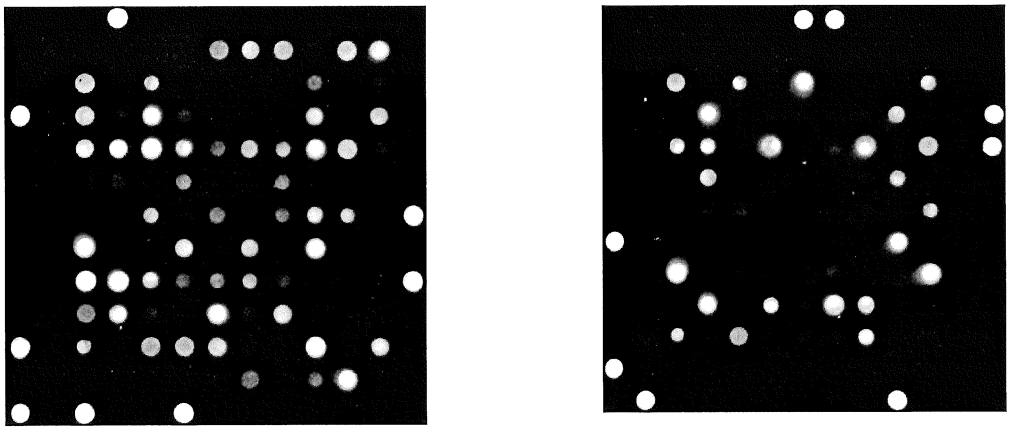
HÌNH 14

(A) **(B)**



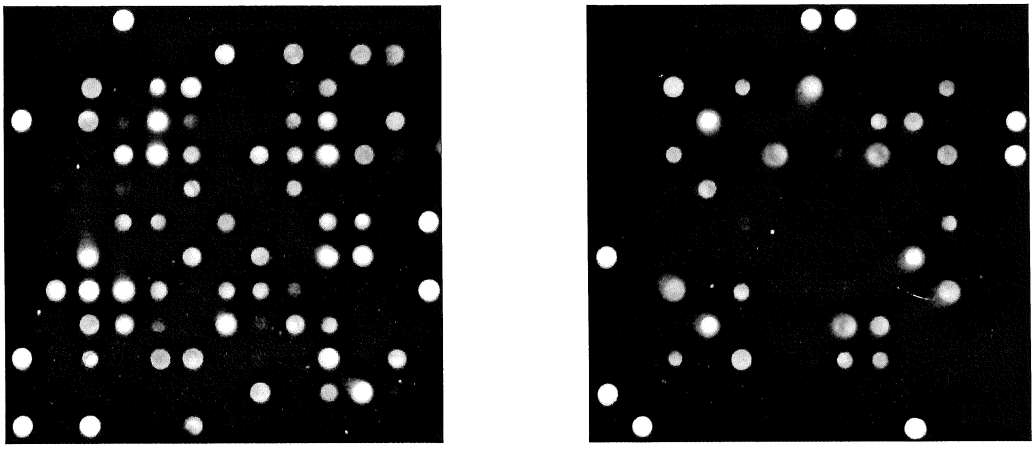
HÌNH 15

(A) **(B)**



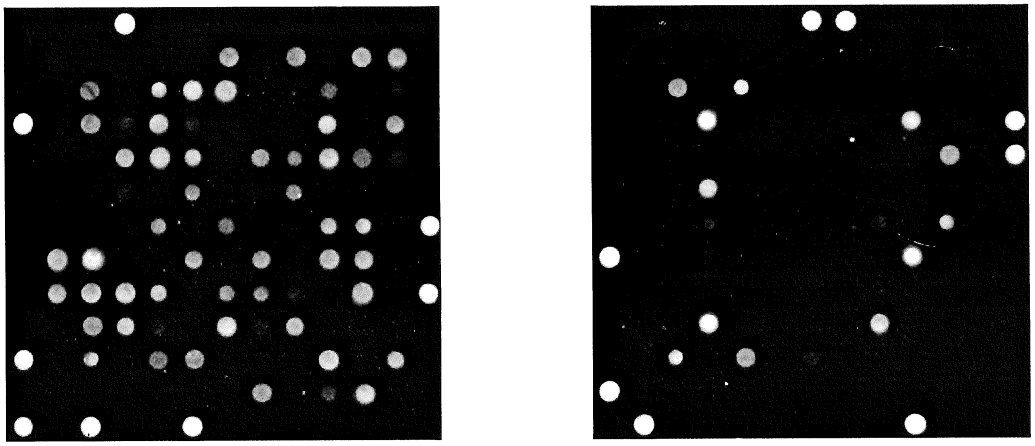
HÌNH 16

(A) **(B)**



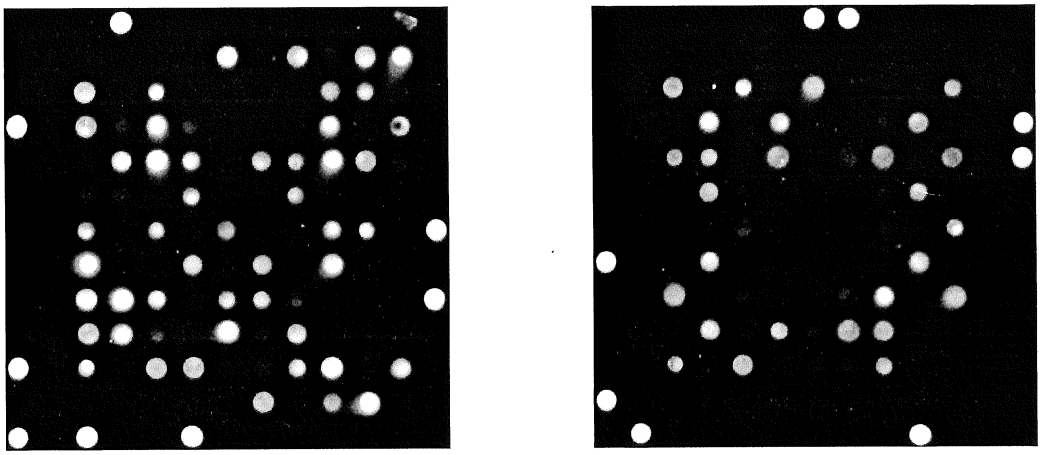
HÌNH 17

(A) **(B)**



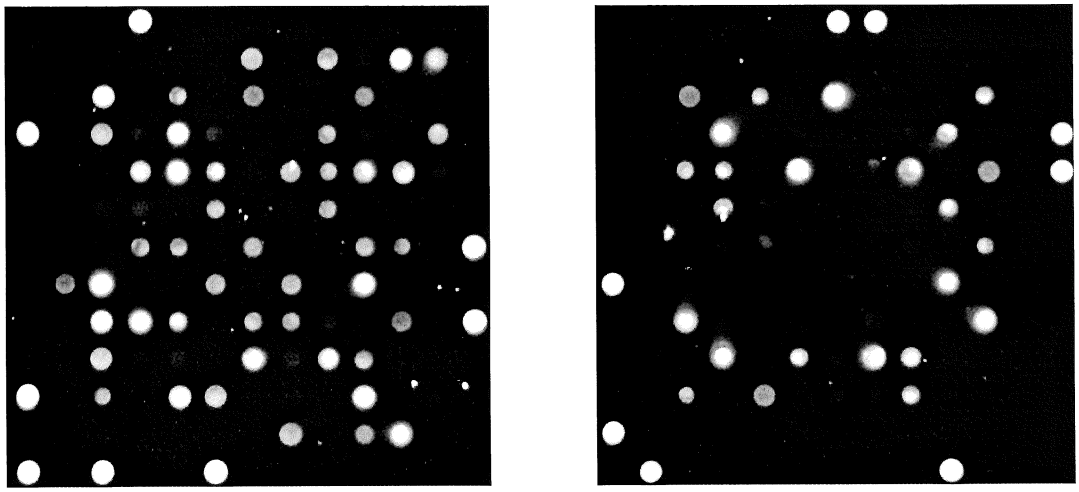
HÌNH 18

(A) **(B)**



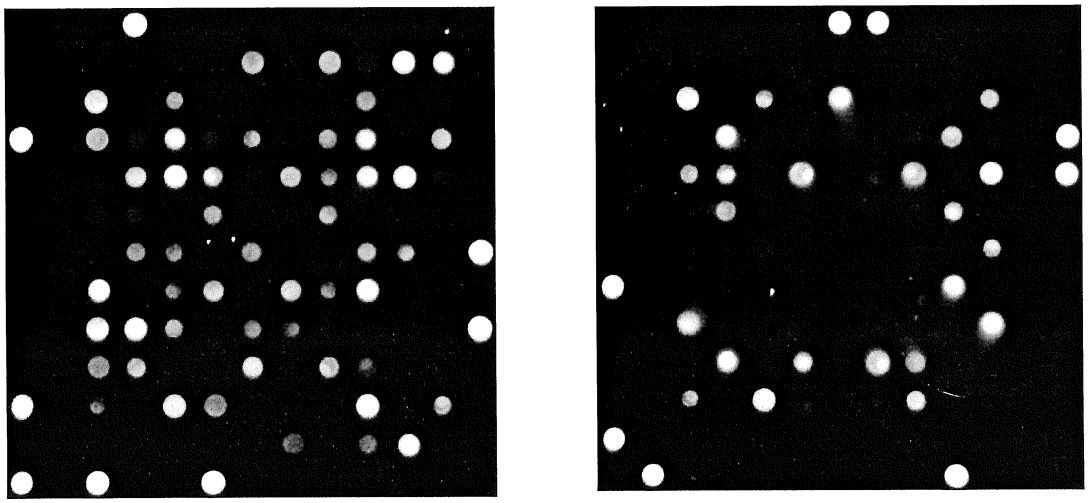
HÌNH 19

(A) **(B)**



HÌNH 20

(A) **(B)**



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Công ty Trách nhiệm hữu hạn MTV Nhà máy Công nghệ sinh học và Thiết bị y tế (BIMETECH)

<120> Chip sinh học để phát hiện đột biến gen gây bệnh tan máu bẩm sinh và kit để phát hiện đột biến gen này

<130>
<160> 70
<170>

<210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là AmMc6

<220>
<400> 1
NTTTTTTTTT TTTGTTTCGC TGTTGTTTTC C 31

<210> 2
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 2
NTTTTTTTTT TTTCCGGACC CATCACTCAG CTTCTC 36

<210> 3
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 3
NTTTTTTTTT TTTGGGAAAA AACTCAGGCA CACA 34

<210> 4
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 4
NTTTTTTTTT TTTAAATGCC TGTGGTCAAA GCTCTCC 37

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 5
NTTTTTTTTT TTTCTCCAGC TGAACGGTAT 30

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 6
NTTTTTTTTT TTTCTCCAGC TTGACGGTAT 30

<210> 7
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 7
NTTTTTTTTT TTTCTTGTCC AGGGAGGC 28

<210> 8
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 8
NTTTTTTTTT TTTCTTGTCC GGGGAGGC 28

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 9
NTTTTTTTTT TTTACCCACC ATGGTGCTGT 30

<210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 10
NTTTTTTTTT TTTGAACCCA CCAGGTGCTG T 31

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 11
NTTTTTTTTT TTTAACCCAC CCTGGTGCTG 30

<210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 12
NTTTTTTTTT TTTGCTCCAG CATATATGG 29

<210> 13
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 13
NTTTTTTTTT TTTGGATAGA GAGAACCCAG GCAC 34

<210> 14
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 14
NTTTTTTTTT TTTGGAGCCA CACCCTAGGG T 31

<210> 15
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 15
NTTTTTTTTT TTTGGAGCCA CATCCTAGGG T 31

<210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 16
NTTTTTTTTT TTTCTGGGCA TAAAAGTCAG GG 32

<210> 17
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 17
NTTTTTTTTT TTTCTGGGCA TAGAAGTCAG GG 32

<210> 18
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 18
NTTTTTTTTT TTTCTGGGCA GGTTGGTATC AA 32

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 19
NTTTTTTTTT TTTCTGGGCA GTTTGGTATC AA 32

<210> 20
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 20
NTTTTTTTTT TTTGGTAGTG AGGCCT 26

<210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 21
NTTTTTTTTT TTTGGTGGTA AGGACCT 27

<210> 28
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 22
NTTTTTTTTT TTTCAGGTTG GTATCAAGG 29

<210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 23
NTTTTTTTTT TTTGCAGGTT GCTATCAAGG 30

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 6
NTTTTTTTTT TTTCCAAGGG TAGACCA 27

<210> 25
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 25
NTTTTTTTTT TTTGTCCAAG GTTAGACCAC 30

<210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 26
NTTTTTTTTT TTTGCAGCTT GTCACA 26

<210> 27
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 27
NTTTTTTTTT TTTGTGCAGC TTTGTCACAC 30

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<400> 28
NTTTTTTTTT TTTCCATCAC TAGAGGCACC 30

<210> 29
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 29
NTTTTTTTTT TTTCCATCAC TAGAAGGCAC C 31

<210> 30
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 30
NTTTTTTTTT TTTGGGTTAA GGCAATAGCA AT 32

<210> 31
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 31
NTTTTTTTTT TTTGGGTTAA GGTAATAGCA AT 32

<210> 32
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 32
NTTTTTTTTT TTTAGGAGAA GTCTGCCGT 29

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 33
NTTTTTTTTT TTTAGGAGAA GGTCTGCCGT 30

<210> 34
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 34
NTTTTTTTTT TTTGAGCCAC ACCCTAG 27

<210> 35
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 35
NTTTTTTTTT TTTGGAGCCA TACCCTAGG 29

<210> 36
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 36
NTTTTTTTTT TTTAGGACTC AAAGAACCTCT 31

<210> 37
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 37
NTTTTTTTTT TTTAAGGACT CAACATCTGG GT 32

<210> 38
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 38
NTTTTTTTTT TTTCAAAGGA CTCAAAGAAC CT 32

<210> 39
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 39
NTTTTTTTTT TTTCAAAGGA CTAAAAGAAC CT 32

<210> 40
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 40
NTTTTTTTTT TTTAGTATCA CTAAGCTCG 29

<210> 41
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 41
NTTTTTTTTTT TTAGTATCAC TCTAAGCT 28

<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 42
NTTTTTTTTT TTGTGGTGCA AGGTGAA 27

<210> 43
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 43
NTTTTTTTTT TTTGTGGTGC TAGGTGAAC 29

<210> 44
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 44
NTTTTTTTTT TTTGCCTCAA GTATGAGT 28

<210> 45
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)

<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 45
NTTTTTTTTT TTTATGGCTA CGAATTGGCT 30

<210> 46
<211> 14
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò huỳnh quang

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(14)
<223> n1 là 5AmMC6, n14 là 3Cy5

<220>
<400> 46
NTTTTTTTTT TTTN 14

<210> 47
<211> 14
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn dò

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n1 là 5AmMC6, n14 là Bio

<220>
<400> 47
NTTTTTTTTT TTTN 14

<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 48
TCCTGCCCTC ACTGCAATAA ATGGA 25

<210> 49
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 49
NTTGAGACCA TGCTTGCTTT GCAC 24

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 50
TAGAGCATTG CTGGTCATGC 20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 51
TCTGCCACGC TCTACTGACT 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 52
TGCCTGTGGT CAAAGCTCTC 20

<210> 53

<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 53
CTTTCCCTAC CGAGAGCCAG GTT 23

<210> 54
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 54
GCCCATGCTG GCACGTTTCT GAGG 24

<210> 55
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 55
ACTCTTCTGG TCCCCACAG 19

<210> 56
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 56
GTTGGCACAT TCCGGGA 17

<210> 57
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Đoạn mồi

<220>
<400> 57
GGACAGGTAC GGCTGTCA 18

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 58
ATGCCTCTTT GCACCATTCT 20

<210> 59
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 59
TATCCCCTTC CTATGACATG A 21

<210> 60
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<400> 60
CAGTTAAGTA GTTGGACTTA GGGA 24

<210> 61
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 61
NGCGATCTGG GCTCTGTGTT CT 22

<210> 62
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 62
NCACCTACTC CGGAGGCT 18

<210> 63
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 63
NGATCTGCAC CTCTGGGTAG GTTC 24

<210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 64
NCTCTCAGGG CAGAGGATCA C 21

<210> 65
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 65
NTTGAGGGTG GCCTGTGGG 19

<210> 66
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 66
NCACTGCCTG CTGGTGAC 18

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 67
NTCTGTCTCC ACATGCCCAG 20

<210> 68
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 68
NCTGACTCTC TCTGCCTATT GG 22

<210> 69
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 69
TCCAGCCTTA TCCCAACC 18

<210> 70
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là 5AmMc6

<220>
<400> 70
NCCACCAGTG CAGGCT 16

<210> 71
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi

<220>
<221> dấu hiệu misc
<222> (1)..(1)
<223> n là Biosg

<220>
<400> 71
NACTCATACT TGAGGC 16