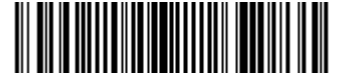




(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



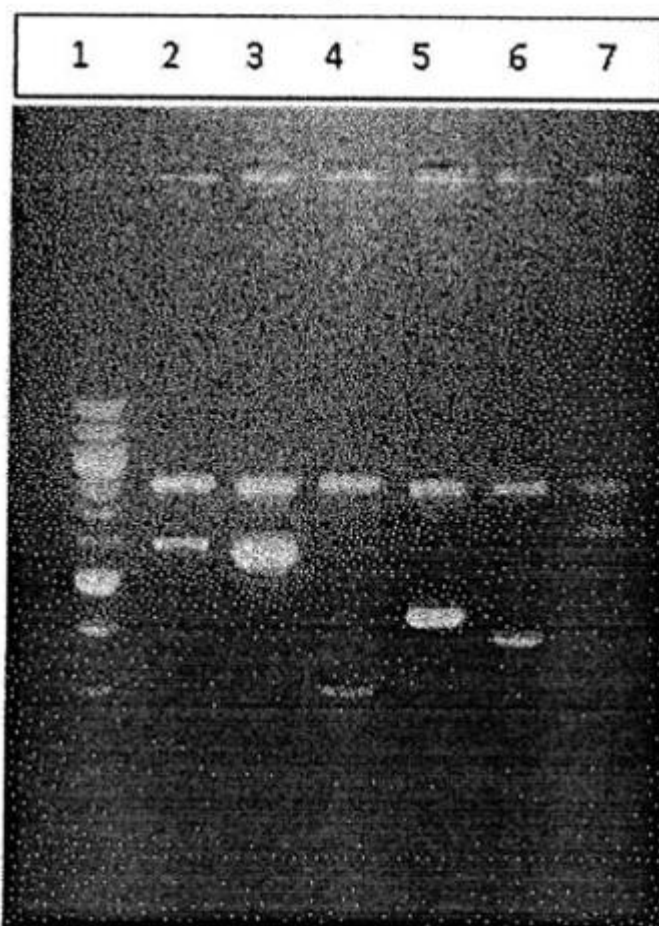
2-0002769

(51) **C12Q 1/68; C12N 15/11**
2020.01

(13) **Y**

-
- (21) 2-2021-00275 (22) 24/02/2017
(67) 1-2018-03249
(86) PCT/TH2017/000014 24/02/2017 (87) WO 2017/151072 A2 08/09/2017
(30) 1601001130 29/02/2016 TH
(45) 25/12/2021 405 (43) 25/01/2019 370A
(73) DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES (DMSC) (TH)
c/o Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand
(72) WICHUKCHINDA, Nuanjun (TH); MAHASIRIMONGKOL, Surakameth (TH);
TOKUNAGA, Katsushi (JP); TOYO-OKA, Rihito (JP).
(74) Công ty TNHH Dịch vụ Sở hữu trí tuệ KENFOX (KENFOX IP SERVICE
CO.,LTD.)
-

- (54) BỘ MÔI CHO KIỂU GEN LƯỖNG BỘI NAT2, PHƯƠNG PHÁP VÀ BỘ KIT DÙNG ĐỂ
PHÁT HIỆN KIỂU GEN LƯỖNG BỘI NAT2
(57) Giải pháp hữu ích này đề cập đến bộ môi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2 được chọn từ
ít nhất một trong số các đoạn môi NAT2*4, đoạn môi NAT2*5B, đoạn môi NAT2*6A,
đoạn môi NAT2*7B, đoạn môi NAT2*12A, và đoạn môi NAT2*13A. Bộ môi này được
ứng dụng cho phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction - PCR) để phân
tích kiểu gen lưỡng bội NAT2. Các kết quả PCR sau đó được sử dụng để thể hiện kiểu hình
axetyl hóa để đánh giá sự chuyển hóa của các loại thuốc liên quan đến arilamin ở các bệnh
nhân. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến phương pháp và bộ kit dùng để phát hiện kiểu
gen lưỡng bội NAT2.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực di truyền phân tử. Cụ thể hơn là, giải pháp hữu ích này đề cập đến bộ môi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2, phương pháp và bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh lao (TB) là bệnh truyền nhiễm qua đường hô hấp gây ra vấn đề sức khỏe công cộng ở nhiều quốc gia có điều kiện kinh tế xã hội nghèo nàn. Trong khi bệnh lao gây tử vong, nó có thể được điều trị dễ dàng bằng trị liệu hóa học tiêu chuẩn. Việc chẩn đoán về bệnh lao đã được yêu cầu phải có độ chính xác và hiệu quả cao, điều này dẫn đến việc các bệnh nhân lao phản ứng nhanh với việc điều trị thích hợp. Tuy nhiên, các loại thuốc TB, cụ thể là Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, và Streptomycin, đôi khi gây ra các tác dụng phụ, đặc biệt là viêm gan do thuốc gây ra. Có sự tương quan rõ ràng giữa tình trạng axetyl hóa chậm ở vật chủ và làm tăng viêm gan do thuốc gây ra.

N-axetyltransferaza2 (NAT2) là enzym chuyển hóa arilamin, hidrazin, isoniazid, v.v., gen NAT2 có chứa exon2 của 870 cặp bazơ và mã hóa 290 axit amin. Theo báo cáo, có ít nhất 108 kiểu gen đơn bội, và các kiểu phổ biến là *4, *5A, *5B, *5C, *6A, *6B, *7A, *7B, *12A, *12B, *12C, *13A, *14A, và *14B. Cụ thể là, NAT2*4, kiểu phổ biến nhất và kiểu đặc trưng, có hoạt tính xúc tác cao. Kiểu gen lưỡng bội NAT2, cặp kiểu gen đơn bội, phân loại riêng biệt thành ba kiểu hình, axetyl hóa nhanh, axetyl hóa trung bình và axetyl hóa chậm.

Phương pháp thông thường để phát hiện các kiểu gen lưỡng bội NAT2, phương pháp Sanger, để xác định trình tự của gen NAT2, gen NAT này nằm ở vùng mã hóa, exon2. Phương pháp này bắt đầu bằng sự khuếch đại gen đích và sau đó xác định trình tự nucleotit bằng cách phát hiện các nucleotit kết thúc chuỗi. Trình tự ADN được thể hiện bằng trình tự ADN tự động và các phương pháp tính toán để suy ra các kiểu gen đơn bội. Các yêu cầu về tần suất kiểu gen đơn bội NAT2, máy giải trình tự ADN, phần mềm, và các chuyên gia cũng khiến phương pháp này bất tiện.

Do đó, cần phải phát triển bộ mồi NAT2, phương pháp và bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2 mà có thể xác định kiểu hình axetyl hóa có độ nhạy cao và tính đặc hiệu bất kể là thiết bị đặc biệt, phòng thí nghiệm đặc biệt, phần mềm, hoặc các chuyên gia.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích này đề xuất các phương án của bộ mồi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2. Theo nhiều phương án, các đoạn mồi có thể được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn mồi NAT2*4, đoạn mồi NAT2*5B, đoạn mồi NAT2*6A, đoạn mồi NAT2*7B, đoạn mồi NAT2*12A và đoạn mồi NAT2*13A, các đoạn mồi thường được tìm thấy trong quần thể thông thường. Các đoạn mồi đã được ứng dụng cho PCR để phát hiện một cách hiệu quả kiểu gen lưỡng bội NAT2 riêng biệt, dẫn đến độ nhạy và tính đặc hiệu cao. Sản phẩm phản ứng được phân tích định tính bằng điện di thông qua gel agarosa và sau đó kiểu gen lưỡng bội NAT2 được hiển thị hóa bằng ánh sáng UV, bất kể suy luận thống kê như thế nào.

Ngoài ra, các phương án này có thể gồm phương pháp và bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2. Phương pháp để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2 bao gồm việc chiết xuất ADN từ mẫu sinh học của đối tượng để thu được mẫu ADN; thực hiện thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic bằng cách tiếp xúc các đoạn mồi NAT2 được thiết kế được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn mồi NAT2*4, đoạn mồi NAT2*5B, đoạn mồi NAT2*6A, đoạn mồi NAT2*7B, đoạn mồi NAT2*12A, và đoạn mồi NAT2*13A với mẫu ADN này; và xác định kiểu gen lưỡng bội NAT2 trong mẫu ADN này.

Các phương án này cũng có thể bao gồm bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2 mà bao gồm bộ mồi được chọn từ các đoạn mồi như được đề cập trên đây, đoạn mồi đối chứng PCR, và hỗn hợp hoặc thuốc thử PCR.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện các sản phẩm PCR trên điện di gel.

FIG.2 thể hiện các kết quả mẫu của kiểu gen lưỡng bội NAT2.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phần dưới đây sẽ mô tả các phương án đại diện hoặc ưu tiên của giải pháp hữu ích này kết hợp với các hình vẽ và phần mô tả kèm theo. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các hình vẽ và mô tả tương ứng với các phương án này nhằm mục đích làm rõ và giúp hiểu được giải pháp hữu ích, và có thể hình dung được rằng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan có thể đưa ra các sửa đổi khác mà không nằm ngoài phạm vi của giải pháp hữu ích như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Để giúp hiểu hơn nội dung của phần mô tả chi tiết, một số định nghĩa được đưa ra ở đây. Thuật ngữ "kiểu gen đơn bội" đề cập tới sự kết hợp cụ thể của tất cả SNP xảy ra trên cùng một nhiễm sắc thể (đồng hợp tử) và thuật ngữ "kiểu gen lưỡng bội" là hai kiểu gen đơn bội hoặc một kiểu gen lưỡng bội trên dị hợp tử. Đối với giải pháp hữu ích này, các kiểu gen đơn bội NAT2 được phát hiện bởi phương pháp được bộc lộ, nhưng để thể hiện kiểu hình axetyl hóa, kiểu gen lưỡng bội hoặc hai kiểu gen đơn bội, được xác định cho kết quả cuối cùng. Tuy nhiên, ở một số ngữ cảnh, cặp/các cặp các kiểu gen đơn bội và hai kiểu gen đơn bội có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Các phương án này mô tả các đoạn môi được thiết kế, phương pháp, và bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2. Các phương án này phát hiện hiệu quả các kiểu gen đơn bội NAT2 bằng cách ứng dụng bộ môi cho PCR sao cho cả kiểu gen và kiểu hình axetyl hóa của đối tượng được xác định định tính trong phản ứng với việc điều trị bằng axetyl hóa (chẳng hạn như điều chỉnh sự chuẩn bị liều lượng an toàn của nhóm axetyl hóa, đảm bảo việc điều trị bằng axetyl hóa, đặc biệt là trong trường hợp tác dụng gây tổn thương cho gan, ngừng việc điều trị bằng axetyl hóa, và v.v.).

Các khía cạnh của bộ môi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2

Theo các phương án khác, giải pháp hữu ích này đề cập đến bộ môi được thiết kế để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2. Về cơ bản, bộ môi này bao gồm nhiều đoạn môi NAT2, các đoạn môi NAT2 được chọn ít nhất từ các đoạn môi NAT2*4, đoạn môi NAT2*5B, đoạn môi NAT2*6A, đoạn môi NAT2*7B, đoạn môi NAT2*12A, và đoạn môi NAT2*13A. Trình tự của mỗi NAT2 đoạn môi được liệt kê trong bảng 1.

Các đoạn môi	Kích cỡ (bp)	Trình tự (3'-5')	Kích cỡ sản phẩm (bp)
--------------	--------------	------------------	-----------------------

TIMP1-F	29	AGT TTC TCA TTG CTG GTG AGG CAC CGT CC	817
TIMP1-R	29	AGC CAT CAG GGA ACA GGC TTG GAC TAG CC	
4F-282C	36	GGT TTT CAG ACC ACA ATG TTA GGA GGG TAT	588
4R-803A	38	TTT GAC CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TT	
5F-3410C	30	CAT GGT TCA CCT TCT CCT GCA GGT GAC AAC	582
5R-587G	35	TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA ATT AGT AAG GGC TC	
6F-341T	22	ACC TTC TCC TGC AGG TGA CAA T	300
6R-590A	28	TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT T	
7F-481C	26	GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC	431
7F-857A	35	TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA AAT AGT AGG	
12F-481C	26	GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC	387
12F-803G	38	CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TC	
13F-282T	29	AGA CCA CAA TGT TAG GAG GGT ATT TTG AT	366 641
13R1-	28	TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT C	
590G	36	GTT TAT TTT GTT CCT TAT TCT AAA TAG TAA	
13R2-857G		GGG CTC	

Bảng 1: Kích cỡ và trình tự của các đoạn mồi NAT2 và các đoạn mồi TIMP1 đặc hiệu

Theo nhiều phương án, việc thiết kế và lựa chọn các đoạn mồi đặc hiệu với các kiểu gen đơn bội NAT2 thường được tìm thấy trong quần thể vượn vật, cụ thể là *4, *5B, *6A, *7B, *12A, và *13A để lựa chọn trình tự của vị trí đa hình đơn nucleotit (Single Nucleotit Polymorphism - SNP) trên vị trí cụ thể của gen NAT2, chẳng hạn như 282, 341, 481, 590, 803, và 857, bằng cách bắt đầu với đơn vị mã ATG khởi đầu mà các trình tự bazơ có bố cục phù hợp. Bằng việc so sánh với các trình tự bazơ của mỗi kiểu gen đơn bội NAT2, trình tự cụ thể là bazơ cuối cùng ở đầu cuối 3' của đoạn mồi để khuếch đại kiểu gen đơn bội đích hoàn toàn. Các đoạn mồi được thiết kế được xác nhận bằng ADN đã biết các kiểu gen đơn

bội NAT2 rồi, và điều chỉnh độ dài đoạn mồi của chúng để làm giảm các kết quả dương tính sai và âm tính sai. Ngoài ra, cặp bazơ ở vị trí -2 của đầu cuối 3' được thay đổi để liên kết không bổ sung giữa đoạn mồi và ADN không phải là mục tiêu ở 3' đầu cuối được tách ra, dẫn đến các đoạn mồi đặc hiệu với các kiểu gen đơn bội NAT2.

FIG.1 thể hiện các sản phẩm PCR trên điện di gel. Các kích thước khác nhau của mỗi sản phẩm PCR có lợi cho việc hạn chế sự hiểu sai về các kiểu gen đơn bội NAT2. Đường 1 đến 7 tương ứng thể hiện thang ADN, NAT2*4(588bp), NAT2*5B (582bp), NAT2*6A (300bp), NAT2*7 (431bp), NAT2*12A (387bp), và NAT2*13A (366bp và 641bp).

Số lượng các đoạn mồi NAT2 được sử dụng để thể hiện kiểu hình axetyl hóa phụ thuộc vào sự tác động của các kiểu gen đơn bội NAT2 bao gồm *4, *5B, *6A, *7B, *12A, và *13A trong dân số của quốc gia đó. Ví dụ như, theo đề xuất, sự tác động của *4, *5B, *12A, và *13A được tìm thấy cụ thể trong một quần thể, chỉ có bốn kiểu đoạn mồi NAT2 được thử nghiệm để xác định kiểu hình axetyl hóa của quần thể đó. Tuy nhiên, theo báo cáo, trong quần thể vượn vật, sáu kiểu gen đơn bội, cụ thể là *4, *5B, *6A, *7B, *12A, và *13A. Do đó toàn bộ bộ mồi bao gồm tất cả sáu kiểu gen đơn bội để tạo ra các kiểu gen lưỡng bội cho các kiểu gen axetyl hóa của các đối tượng.

Các khía cạnh của phương pháp phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2

Theo các phương án nhất định, giải pháp hữu ích này đề cập đến phương pháp kiểu gen lưỡng bội NAT2. Về cơ bản, phương pháp này bao gồm các bước chiết xuất ADN của hệ gen từ mẫu sinh học của đối tượng để thu được mẫu ADN; thực hiện thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic bằng cách tiếp xúc NAT2 đoạn mồi được thiết kế được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn mồi NAT2*4, đoạn mồi NAT2*5B, đoạn mồi NAT2*6A, đoạn mồi NAT2*7B, đoạn mồi NAT2*12A, và các đoạn mồi NAT2*13A với mẫu ADN này; và xác định kiểu gen lưỡng bội NAT2 trong mẫu ADN này.

Phù hợp với nhiều phương án, mẫu sinh học của đối tượng có liên quan được thu thập chủ yếu từ máu, niêm mạc miệng, nước bọt tiết ra, các mẫu mô, hoặc các đối tượng tương tự để chiết xuất ADN. Ví dụ như, máu ngoại vi của đối tượng được rút ít nhất từ 3 đến 5cc. để xử lý việc chiết xuất ADN của hệ gen. Mẫu ADN được chiết xuất từ mẫu sinh học được yêu cầu từ 2 đến 200ng với mỗi giếng thử nghiệm.

Theo một số phương án, thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic đã được thực hiện bằng cách tiếp xúc các đoạn mồi NAT2 được thiết kế được chọn từ ít nhất một trong số

các đoạn mồi NAT2*4, đoạn mồi NAT2*5B, đoạn mồi NAT2*6A, đoạn mồi NAT2*7B, đoạn mồi NAT2*12A, và các đoạn mồi NAT2*13A với mẫu ADN dưới các điều kiện nhất định. Mỗi kiểu đoạn mồi NAT2 đặc hiệu được được đặt vào ống nghiệm có chứa polymeraza ADN ổn định nhiệt để khuếch đại phân đoạn ADN ở điều kiện từ 92°C đến 98°C trong thời gian từ 3 đến 10 phút trong một chu kỳ, và tiếp theo từ 92°C đến 98°C trong từ 10 đến 30 giây, từ 58°C đến 68°C trong từ 10 đến 30 giây, và từ 68°C đến 74°C trong từ 20 đến 60 giây trong từ 30 đến 35 chu kỳ. Ngoài ra, thí nghiệm dựa trên axit nucleic được chọn từ PCR bội, PCR thời gian thực, khuếch đại đẳng nhiệt, khuếch đại ADN phụ thuộc vào helicaza, khuếch đại trung gian qua vòng lặp, và phản ứng chuỗi ligaza, để thực hiện việc phát hiện các kiểu gen đơn bội NAT2.

Ví dụ như, PCR được điều chế bằng cách trộn 5ul hỗn hợp PCR đa mồi KAPA2G Nhanh (2X) với các đoạn mồi đặc hiệu được chọn từ bộ mồi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2 và các đoạn mồi TIMP1 và sau đó, nước được thêm vào để tạo thành nồng độ đoạn mồi cuối cùng là 2uM trong 8 micrôlit phản ứng. Trong mỗi ống phản ứng, 2ul mẫu ADN (2 đến 200ng) được thêm vào và sau đó thực hiện PCR với chu trình nhiệt. PCR này được vận hành trong điều kiện của bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 35 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 20 giây, 64°C trong 20 giây, và 72°C trong 30 giây. Để xác định kết quả PCR, 1ul chất nhuộm tải được thêm vào toàn bộ 10ul phản ứng PCR, được trộn, và được truyền vào giếng thử nghiệm có 1,5% gel agarosa. Sau khi được chứa thang ADN 100bp cho mỗi gel, gel này được hoạt động trong 0,5X chất đệm TBE. Sau 20 phút áp vào dòng điện trực tiếp (100V), gel được điện di quan sát được sự xuất hiện của các dải cụ thể, cụ thể là các dải NAT2 và dải đối chứng TIMP1, bằng cách so sánh kích thước với thang ADN 100bp sử dụng hệ thống tư liệu gel.

Theo một số phương án, đoạn mồi TIMP1, với vai trò là đối chứng của phản ứng, được thêm vào cùng với các đoạn mồi NAT2 đặc hiệu để đảm bảo kiểm soát chất lượng của phương pháp này. Trình tự của các đoạn mồi TIMP1 được minh họa trong bảng 1. Các đoạn mồi TIMP1 này được nhân lên liên kết với gen TIMP1 trên nhiễm sắc thể X để tạo ra 817 cặp bazơ mà có thể phân biệt được với việc tạo ra các đoạn mồi NAT2 đặc hiệu. Như được thể hiện trên FIG.2, sự xuất hiện của dải TIMP1 để đảm bảo phản ứng được thực hiện hoàn toàn. Do đó, kết quả của các gen đích được thể hiện một cách chính xác.

Theo phần lớn các phương án, kiểu gen lưỡng bội NAT2 được xác định bằng phương pháp điện di gel và được hiển thị hóa các sản phẩm phản ứng bằng ánh sáng UV. Như được thể hiện trên FIG.1, từ đường 1 đến đường 7 tương ứng đề cập đến thang ADN, NAT2*4 (588bp), NAT2*5B (582bp), NAT2*6A (300bp), NAT2*7 (43 lbp), NAT2*12A (387bp), và NAT2*13A (366bp và 641bp).

Theo các phương án, phương pháp tạo ra kiểu gen lưỡng bội NAT2 được bắt đầu từ việc chuẩn bị bộ mỗi NAT2 được thiết kế, bộ mỗi này được chọn ít nhất một từ các đoạn mỗi NAT2*4, đoạn mỗi NAT2*5B, đoạn mỗi NAT2*6A, đoạn mỗi NAT2*7B, đoạn mỗi NAT2*12A, và các đoạn mỗi NAT2*13A. Ngoài ra, đoạn mỗi TIMP1 được thêm vào để kiểm soát phản ứng. Trình tự của mỗi đoạn mỗi NAT2 và đoạn mỗi TIMP1 được liệt kê trong bảng 1. Cả hai bộ mỗi được sử dụng để tiếp xúc với ADN của hệ gen được chiết xuất từ mẫu sinh học của đối tượng liên quan và hỗn hợp PCR trong môi trường nhất định của phản ứng PCR và sau đó các kết quả PCR được phân tích trên kiểu gen lưỡng bội NAT2. Phân tích trên kiểu gen lưỡng bội NAT2

Sau các mẫu ADN tiếp xúc với bộ mỗi NAT2 để xử lý thí nghiệm dựa trên axit nucleic, chẳng hạn như PCR, điện di gel được áp dụng cho các kết quả phản ứng. Được hiển thị hóa bằng ánh sáng UV, các kết quả PCR được thể hiện tương ứng ở bảng sau đây:

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*4, dải của NAT2*4(588bp) ở đường 1 được thể hiện để biểu thị hoạt tính axetyl hóa cao.

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*5B, dải của NAT2*5B (582bp) ở đường 2 được thể hiện để biểu thị hoạt tính axetyl hóa thấp.

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*6A, hai dải của NAT2*6A (300bp) và NAT2*13A (64 lbp) ở đường 3, và đường 6 được chứng minh để biểu thị hoạt tính axetyl hóa thấp.

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*7 hai dải của NAT2*7 (43 lbp) và NAT2*13A (366 bp) ở đường 4, và đường 6 được thể hiện để biểu thị hoạt tính axetyl hóa thấp.

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*12A, dải của NAT2*12A (387 bp) ở đường 5 được thể hiện để biểu thị hoạt tính axetyl hóa cao.

Đối với kiểu gen đơn bội NAT2*13A, hai dải của NAT2*13A (641 bp và 366bp) ở đường 6 được thể hiện để biểu thị hoạt tính axetyl hóa cao.

Kiểu hình	Phát hiện dải (số đường)	Hoạt tính axetyl hóa
NAT2*4	588bp (đường 1)	Cao
NAT2*5B	582bp (đường 2)	Thấp
NAT2*6A	300bp (đường 3) và 641bp (đường 6)	Thấp
NAT2*7B	431bp (đường 4) và 366bp (đường 6)	Thấp
NAT2*12A	387bp (đường 5)	Cao
NAT2*13A	641bp và 366bp (đường 6)	Cao

Bảng 2: Phát hiện dải và các kiểu axetyl hóa cho sáu kiểu gen đơn bội NAT2

Cặp hoạt tính axetyl hóa của các kiểu hình NAT2	Kiểu hình axetyl hóa
axetyl hóa cao-cao	Kiểu hình nhanh
axetyl hóa cao-thấp	Kiểu hình trung bình
axetyl hóa thấp-chậm	Kiểu hình chậm

Bảng 3: thể hiện kiểu hình axetyl hóa

Theo bảng 3, kiểu hình nhanh và kiểu hình chậm đề cập tương ứng với hai gen đẳng vị của hoạt tính axetyl hóa cao và hoạt tính axetyl hóa thấp, trong khi kiểu hình trung bình đề cập tới sự kết hợp của một hoạt tính axetyl hóa cao và một hoạt tính axetyl hóa thấp.

Ngoài ra, từ FIG.2a đến FIG.2h minh họa các sản phẩm PCR sau khi cho tiếp xúc điện di gel với ánh sáng UV. Như được đề cập trên đây, đường 1 đến đường 6 được đề cập tương ứng với thang ADN của NAT2*4, NAT2*5B, NAT2*6A, NAT2*7, NAT2*12A, và NAT2*13A. Ngoài ra, kết quả dương tính của TIMP1 (817bp), là PCR kiểm soát, biểu thị chất lượng và số lượng của mẫu ADN và hỗn hợp PCR, và đảm bảo hiệu suất của phản ứng PCR.

FIG.2a thể hiện các sản phẩm PCR ở đường 2 (583bp, đường 3 (300bp), và đường 6 (641 bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*5B và NAT2*6A, được hiểu là dị hợp tử NAT2*5/*6 thể hiện kiểu hình chậm.

FIG.2b thể hiện các sản phẩm PGR ở đường 1 (588bp), và đường 2 (582bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*4 và NAT2*5B, được hiểu là dị hợp tử NAT2*4/*5 thể hiện kiểu hình trung bình.

FIG.2c thể hiện các sản phẩm PGR ở đường 3 (300bp, đường 4 (641 bp), và đường 6 (cả 641 bp và 366bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*6A và NAT2*7B, được hiểu là dị hợp tử NAT2*6/*7 thể hiện kiểu hình chậm.

FIG.2d thể hiện các sản phẩm PGR ở đường 1 (588bp) và đường 6 (366bp và 641 bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*4 và NAT2*13A, được hiểu là dị hợp tử NAT2*4/*13A thể hiện kiểu hình nhanh.

FIG.2e thể hiện các sản phẩm PCR ở đường 3 (300bp) và đường 6 (641 bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*6A, được hiểu là đồng hợp tử NAT2*6 (*6/*6) thể hiện kiểu hình chậm.

FIG.2f thể hiện các sản phẩm PCR ở đường 4 và đường 6. Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*7 (431 bp) và NAT2*13A (366bp), được hiểu là đồng hợp tử NAT2*7 (*7/*7) thể hiện kiểu hình chậm.

FIG.2g thể hiện các sản phẩm PCR ở đường 4 (431bp, đường 5 (378bp), và đường 6 (366bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*7 và NAT2*12A, được hiểu là dị hợp tử NAT2*7/*12 thể hiện kiểu hình trung bình.

FIG.2h thể hiện các sản phẩm PCR ở đường 1 (588 bp, đường 4 (431 bp), và đường 6 (366 bp). Do đó, các mẫu ADN, cụ thể là NAT2*4 và NAT2*7B, được hiểu là dị hợp tử NAT2*4/*7B.

Độ nhạy và tính đặc hiệu của phương pháp sử dụng bộ mồi được thiết kế NAT2

Để so sánh độ chính xác khi sử dụng các phương án này, các đoạn mồi NAT2 đặc hiệu với ứng dụng PCR, và phương pháp thông thường này, trình tự Exon2 và kiểu gen đơn bội bằng suy luận tính toán, các mẫu của 520 mẫu vật, 520 kiểu gen lưỡng bội hoặc 1040 kiểu gen đơn bội, được thu thập để xác thực độ chính xác của các kết quả sản phẩm theo các phương án của giải pháp hữu ích. Điều được nhận thấy là 1035 kiểu gen đơn bội của các phương án này đã khớp một cách chính xác với phương pháp thông thường. Do đó, độ chính xác là 99,5 phần trăm. Số lượng năm kiểu gen đơn bội không khớp được phân tích như sau:

Thể hiện kiểu gen của các phương án này	Thể hiện kiểu gen của phương pháp thông thường	Hoạt tính axetyl hóa
*5B	*5C	Thấp
*5B	*5C	Thấp

*5B	*5C	Thấp
*7B	*7C	Thấp
*4	*11A	Cao

Bảng 4: Thể hiện năm kiểu gen đơn bội không khớp

Liên quan tới bảng 4, có thể quan sát được rằng thậm chí nếu có 5/1040 kết quả kiểu gen sai từ các phương án này, các kiểu của kiểu hình axetyl hóa vẫn giữ nguyên. Điều này có nghĩa là các kết quả kiểu hình cuối cùng là hoàn toàn đúng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Mẫu sinh học của đối tượng được thu thập từ máu để chiết xuất ADN của hệ gen được yêu cầu từ 2 đến 200ng cho mỗi giếng thử nghiệm. PCR đã được thực hiện với mẫu ADN này dưới các điều kiện cụ thể. Ví dụ như, 50mM Kali Clorua, 20mM Tris-HCl độ pH8,30 đến 9,0, 0,1% Triton-X, 3,0mM Magiê Clorit, 200microM hỗn hợp dNTP, 0,1 microM đoạn mồi TIMPIF, 0,1 microM đoạn mồi TIMPIR, 0,3 microM đoạn mồi F, 0,3 microM đoạn mồi R, và 0,5 đơn vị ADN polymeraza.

Mỗi kiểu trong sáu đoạn mồi được thiết kế từ, cụ thể là *4, *5B, *6A, *7B, *12A, và *J3A, như được thể hiện trên bảng 1, được thực hiện riêng biệt trong mỗi ống nghiệm. Phản ứng PCR được điều chỉnh ở điều kiện bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 35 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 20 giây, 65°C trong 20 giây, và 72°C trong 30 giây. Kết quả biểu hiện các kiểu gen lưỡng bội NAT2 được xác định bằng cách thực hiện điện di gel và sử dụng ánh sáng UV.

Việc sử dụng lâm sàng của các phương án này

Thực hiện PCR với các đoạn mồi NAT2 được thiết kế được sử dụng lâm sàng để phân loại kiểu hình axetyl hóa trên bệnh nhân, cụ thể là axetyl hóa chậm, axetyl hóa trung bình, và axetyl hóa nhanh. Ba kiểu hình biểu thị bệnh nhân có khả năng chuyển hóa axetyl hóa. Ngoài ra, các loại thuốc axetyl hóa đề cập tới arilamin, và nửa hidrazin, đặc biệt là, isoniazit là một trong những loại thuốc đầu tiên dùng để điều trị TB.

Với mục đích sàng lọc, nó có thể dự đoán được hiệu quả của phản ứng điều trị bằng axetyl hóa. Ví dụ như, phương pháp này có thể được áp dụng cho các bệnh nhân TB trước khi điều trị. Trong trường hợp là kiểu hình chậm, việc điều trị INH bị tránh để ngăn ngừa tác

dụng phụ (ví dụ như viêm gan) cho các bệnh nhân. Tuy nhiên, đối với kiểu hình nhanh, mức độ máu của liều lượng INH tiêu chuẩn có thể không đáp ứng khả năng chữa được bệnh.

Với mục đích xác nhận sự phát triển của độc tố hoặc tác dụng phụ trong quá trình điều trị bằng axetyl hóa, các bệnh nhân TB có thể phát triển bệnh viêm gan trong quá trình điều trị INH; bác sĩ phải đưa ra quyết định xem liệu đó có phải là viêm gan do INH gây ra hay không hay là tình trạng trùng hợp. Nếu kiểu hình của bệnh nhân không phải là axetyl hóa chậm, INH vẫn được tiếp tục một cách hợp lý.

Các khía cạnh của bộ kit dùng để phát hiện cặp kiểu gen đơn bội NAT2

Bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2 bao gồm bộ mồi được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn mồi NAT2*4, đoạn mồi NAT2*5B, đoạn mồi NAT2*6A, đoạn mồi NAT2*7B, đoạn mồi NAT2*12A, và đoạn mồi NAT2*13A; đoạn mồi kiểm soát PCR; và hỗn hợp PCR.

Các đoạn mồi đặc hiệu đối với mỗi kiểu gen đơn bội NAT2 (*4, *5B, *6A, *7B, *12B, và *13) được chọn từ bảng 1. Ngoài ra, TIMP1 được sử dụng làm đoạn mồi kiểm soát PCR để đảm bảo hiệu suất của phản ứng PCR, trong khi hỗn hợp PCR bao gồm Polymerase ADN, dNTP và chất đệm PCR.

Ví dụ như, bộ kit cung cấp ít nhất 6 ống (theo kiểu dài) hỗn hợp có sẵn (9 ul) chứa các đoạn mồi đặc hiệu với mỗi kiểu gen đơn bội NAT2 (*4, *5B, *6A, *7B, *12B, và *13) bao gồm các đoạn mồi TIMP1 cùng với Polymerase ADN, dNTP và chất đệm PCR.

Lượng 1 ul ADN (từ 10 đến 200 ng) được chuẩn bị trong mỗi ống, đóng nắp, trộn, quanh nhanh, và sau đó đưa vào chu trình nhiệt (máy PCR). Tình trạng PCR được đặt trước biên dạng nhiệt là: 95°C trong 5 phút trong một chu kỳ, và sau đó là 95°C trong 20 giây, 65°C trong 20 giây, và 72°C trong 30 giây trong 35 chu kỳ. Phản ứng này sau đó được giữ ở 15°C. Các sản phẩm khuếch đại được thử nghiệm bằng điện di keo agarose (1 đến 2%) và được hiển thị hóa bằng ánh sáng UV. Các sản phẩm khuếch đại cụ thể sau đó được xác định bằng cách so sánh với thang ADN như NAT2*4 (588bp), NAT2*5B (583bp), NAT2*6A (300bp), NAT2*7 (431bp), NAT2*12A (387bp), và NAT2*13A (366bp và 641bp).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bộ môi cho kiểu gen lưỡng bội NAT2, trong đó bộ môi này bao gồm ít nhất một trong số các đoạn môi NAT2*4, đoạn môi NAT2*5B, đoạn môi NAT2*6A, đoạn môi NAT2*7B, đoạn môi NAT2*12A và đoạn môi NAT2*13A.
2. Bộ môi theo điểm 1, trong đó các đoạn môi NAT2*4 được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GGT TTT CAG ACC AC A ATG TTA GGA GGG TAT TTT GAC-3' và 5'-CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TT-3'.
3. Bộ môi theo điểm 1, trong đó các đoạn môi NAT2*5B được chọn từ ít nhất một trong số 5'-CAT GGT TCA CCT TCT CCT GCA GGT GAC AAC-3' và 5'-TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA AAT AGT AAG GGC TC-3'.
4. Bộ môi theo điểm 1, trong đó các đoạn môi NAT2*6A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-ACC TTC TCC TGC AGG TGA CAA T-3' và 5'-TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT T -3 '.
5. Bộ môi theo điểm 1, trong đó các đoạn môi NAT2*7B được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC-3' và 5'-TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA AAT AGT AAG GGC TT-3'.
6. Bộ môi theo điểm 1, trong đó các đoạn môi NAT2*12A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC-3' và 5'-CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TC-3'.
7. Bộ môi theo điểm 1, trong đó đoạn môi NAT2*13A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-AGA CCA CAA TGT TAG GAG GGT ATT TTG AT-3', 5'- TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT C-3' và 5'-GTT TAT TTT GTT CCT TAT TCT AAA TAG TAA GGG CTC-3'.
8. Phương pháp phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

chiết xuất ADN từ mẫu sinh học của đối tượng để thu được mẫu ADN;

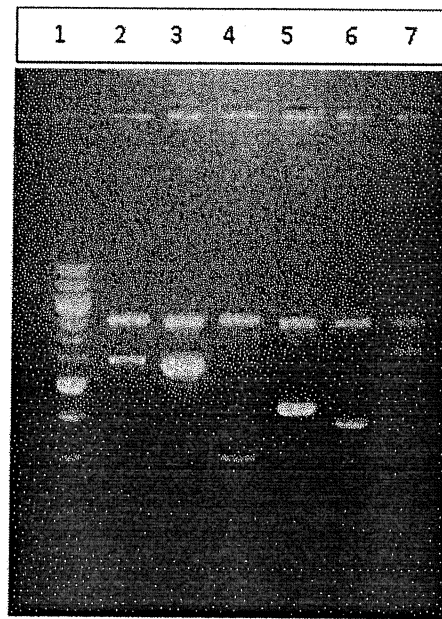
thực hiện thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic bằng cách tiếp xúc bộ môi được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn môi NAT2*4, đoạn môi NAT2*5B, đoạn môi NAT2*6A, đoạn môi NAT2*7B, đoạn môi NAT2*12A, và các đoạn môi NAT2*13A với mẫu ADN; và phân tích kiểu gen lưỡng bội NAT2 trong mẫu ADN này.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm thêm việc đưa mẫu đối chứng PCR vào thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó mẫu đối chứng PCR được đưa vào thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic là gen TIMP1.
11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó thí nghiệm khuếch đại dựa trên axit nucleic được chọn từ PCR đa môi, PCR thời gian thực, khuếch đại đẳng nhiệt, khuếch đại ADN phụ thuộc vào helicaza, khuếch đại trung gian qua vòng lặp và phản ứng chuỗi ligaza.
12. Phương pháp theo điểm 8, trong đó kiểu gen lưỡng bội NAT2 có thể phát hiện được bằng điện di trên gel.
13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó mẫu sinh học được chọn từ máu, tế bào ở miệng, nước bọt và mẫu mô.
14. Bộ kit dùng để phát hiện kiểu gen lưỡng bội NAT2, trong đó bộ kit này bao gồm:
 - bộ mỗi được chọn từ ít nhất một trong số các đoạn mỗi NAT2*4, đoạn mỗi NAT2*5B, đoạn mỗi NAT2*6A, đoạn mỗi NAT2*7B, đoạn mỗi NAT2*12A, và NAT2*13A;
 - đoạn mỗi đối chứng PCR; và
 - hỗn hợp PCR.
15. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mỗi NAT2*4 được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GGT TTT CAG ACC ACA ATG TTA GGA GGG TAT TTT GAC-3' và 5'-CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TT-3'.
16. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mỗi NAT2*5B được chọn từ ít nhất một trong số 5'-CAT GGT TCA CCT TCT CCT GCA GGT GAC AAC-3' và 5'-TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA AAT AGT AAG GGC TC-3'.
17. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mỗi NAT2*6A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-ACC TTC TCC TGC AGG TGA CAA T-3' và 5'-TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT T -3'.
18. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mỗi NAT2*7B được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC-3' và 5'-TTT ATT TTG TTC CTT ATT CTA AAT AGT AAG GGC TT-3'.

19. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mồi NAT2*12A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-GAC AGA AGA GAG AGG AAT CTG GTC CC-3' và 5'-CAC GAG ATT TCT CCC CAA GGA AAT CTT AAA TAT ATG TC-3'.

20. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mồi NAT2*13A được chọn từ ít nhất một trong số 5'-AGA CCA CAA TGT TAG GAG GGT ATT TTG AT-3', 5'-TTC ATA GAC TCA AAA TCT TCA ATT GGT C-3' và 5'-GTT TAT TTT GTT CCT TAT TCT AAA TAG TAA GGG CTC-3'.

21. Bộ kit theo điểm 14, trong đó các đoạn mồi đối chứng PCR là gen TIMP1.

**FIG. 1**

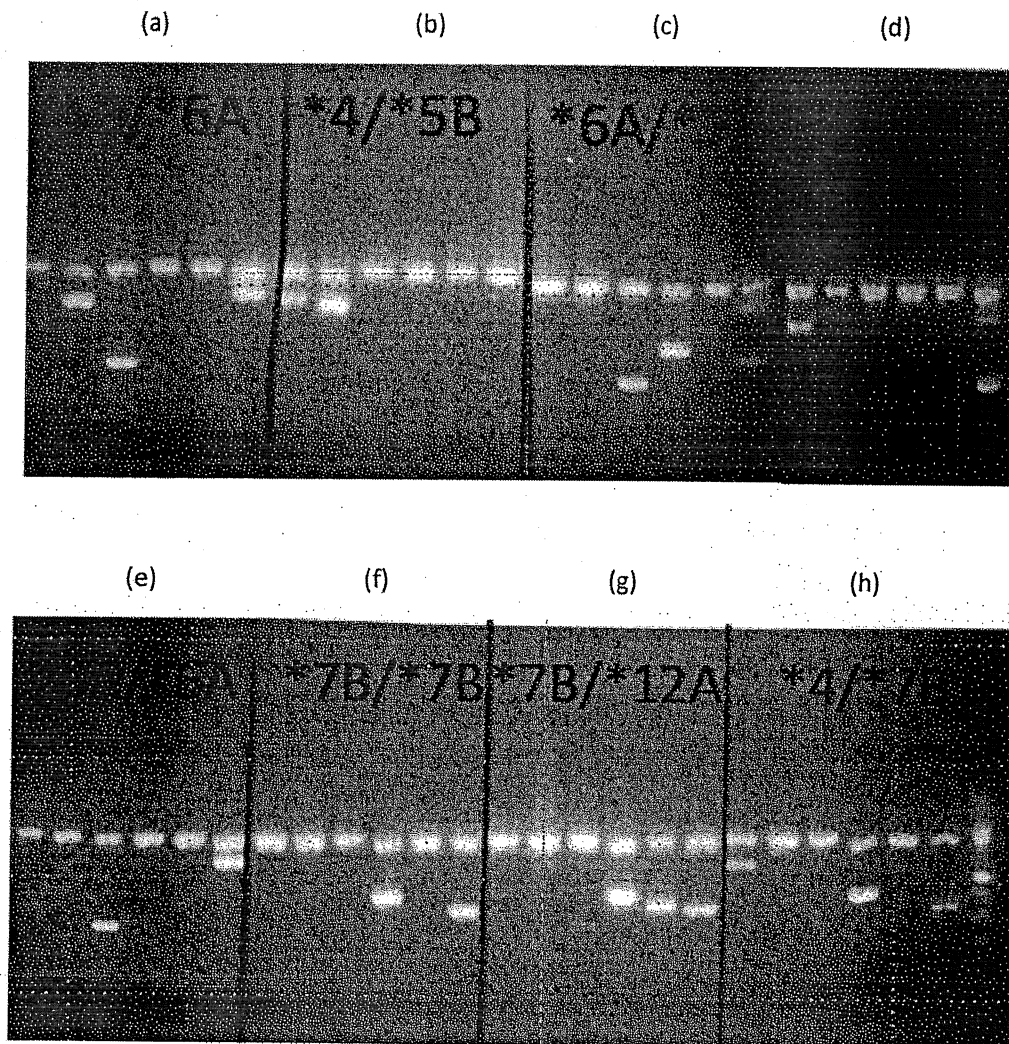


FIG. 2