



(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)



1-0033671

(51)⁷ C12M 1/38; C12Q 1/68; B01L 3/00;
B01L 7/00

(13) B

(21) 1-2017-02014

(22) 30/10/2015

(86) PCT/KR2015/011605 30/10/2015

(87) WO2016/068663 06/05/2016

(30) 10-2014-0149495 30/10/2014 KR

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/08/2017 353A

(73) 1. EWHHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION (KR)

52, Ewhayeodae-gil Seodaemun-gu Seoul 03760, Republic of Korea

2. KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (KR)

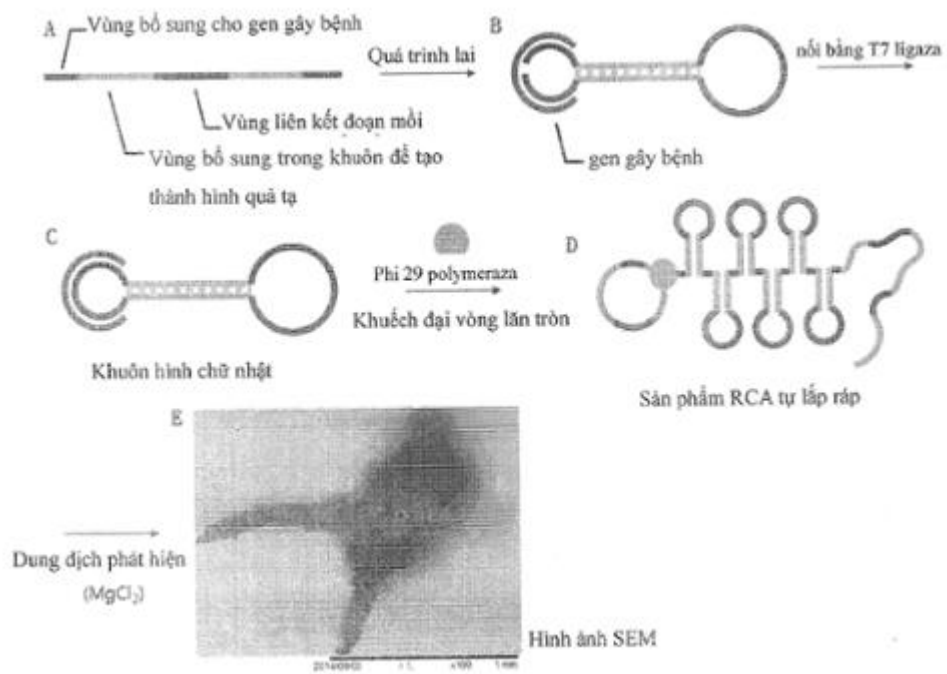
291, Daehak-ro Yuseong-gu Daejeon 64141, Republic of Korea

(72) LEE, Hyukjin (KR); LEE, Haeshin (KR); LEE, Ho Yeon (KR); JUNG, Il Young (KR).

(74) Công ty TNHH Dương và Trần (DUONG & TRAN CO., LTD)

(54) DỤNG CỤ VI LÔNG PHÁT HIỆN GEN ĐÍCH, BỘ KIT DỤNG CỤ VI LÔNG
PHÁT HIỆN GEN ĐÍCH VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN GEN ĐÍCH SỬ DỤNG
DỤNG CỤ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dụng cụ vi lông để chẩn đoán gen đích một cách dễ dàng và chính xác có khả năng được phát hiện bằng mắt thường bằng cách khuếch đại gen đích để chặn một cách có chọn lọc đường dẫn chất lỏng trong dụng cụ vi lông. Cụ thể là, sáng chế bao gồm cả quá trình khuếch đại đẳng nhiệt gen đích thông qua kỹ thuật khuếch đại vòng lăn tròn, dụng cụ vi lông phát hiện các gen gây bệnh, và phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ này. Do đó, dụng cụ vi lông theo sáng chế có thể phát hiện thuận tiện một gen đích duy nhất, như một tác nhân gây bệnh duy nhất, hoặc phát hiện đồng thời, một số gen đích, như một số tác nhân gây bệnh, mà không cần đến các dụng cụ cơ học phức tạp.



Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến dụng cụ chẩn đoán để phát hiện gen đích, phương pháp sản xuất dụng cụ này, và phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích mà phát hiện nhiều loại tác nhân gây bệnh thông qua việc phát hiện các gen đặc hiệu của bệnh, phương pháp sản xuất dụng cụ này, và phương pháp phát hiện sử dụng dụng cụ này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích mà có khả năng xác định phát hiện gen đích bằng mắt thường bằng cách khuếch đại gen đích đặc hiệu của bệnh để chặn có chọn lọc kênh của dụng cụ vi lỏng, phương pháp sản xuất dụng cụ này, và phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ này.

Nghiên cứu này đã được tiến hành với sự hỗ trợ của Chương trình phát triển công nghệ y sinh và Chương trình nghiên cứu khoa học cơ bản thuộc Quỹ nghiên cứu Quốc gia Hàn Quốc do Bộ Khoa học tài trợ, Công nghệ thông tin và Kế hoạch tương lai Hàn Quốc và Dự án nghiên cứu và phát triển Y tế và Công nghệ Y tế thuộc Viện phát triển công nghiệp Y tế Hàn Quốc do Bộ Y tế và Phúc lợi tài trợ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều phương pháp trên cơ sở phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) khác nhau đã được báo cáo là các kỹ thuật phát hiện gen. Phương pháp phản ứng tổng hợp chuỗi thời gian thực mô hình ống nghiệm đơn giản (SDT/RT-PCR - simple-direct tube RT-PCR) sử dụng trực tiếp PCR và phương pháp IC/RT-PCR (RT-PCR miễn dịch bất cặp) bao gồm phương pháp miễn dịch để loại bỏ chất ức chế phản ứng PCR và làm tăng độ nhạy đã được phát triển để được sử dụng cho việc phát hiện gen.

Cụ thể, mục đích ban đầu là để giải quyết các bệnh truyền nhiễm gây ra do nhiều loại tác nhân gây bệnh là virus và vi khuẩn khác nhau và ngăn chặn sự tiến triển và sự lan rộng của các bệnh này, cần thiết phải chẩn đoán một cách nhanh chóng và chính xác bệnh truyền nhiễm cùng với tác nhân đặc hiệu của bệnh. Nếu có thể chẩn đoán các bệnh nhân bị nhiễm tác nhân gây bệnh truyền nhiễm trong giai đoạn tiềm tàng trước khi xuất hiện bất kỳ triệu chứng nào, thì có thể ngăn chặn hiệu quả mức độ lây lan của bệnh truyền nhiễm nhằm tránh được thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế và xã

hội.

Các phương pháp được phát triển cho đến thời điểm này đòi hỏi nhiều thời gian và nguồn nhân lực trong việc nuôi cấy và phát hiện các tác nhân gây bệnh dùng để chẩn đoán, không có đủ độ chính xác để xác định sự truyền nhiễm, đòi hỏi máy hoặc dụng cụ cần có nguồn điện bên ngoài bao gồm máy luân nhiệt, và gặp khó khăn trong việc phát hiện đồng thời nhiều các tác nhân gây bệnh.

Trong phương pháp chẩn đoán sử dụng bộ kit PCR, về cơ bản cần phải có máy luân nhiệt và rất khó để đáp ứng nhiệt độ tuần hoàn, thời gian, các điều kiện của các dung dịch đệm, và các yếu tố tương tự trong PCR, do đó dẫn đến khó khăn cho việc phát hiện đồng thời nhiều các tác nhân gây bệnh.

Do đó, thật cần thiết phải phát triển một phương pháp thuận tiện và chính xác để phát hiện gen đích, như gen đích đặc hiệu của bệnh với chi phí và thời gian phát hiện giảm.

Tài liệu liên quan: Công bố đơn sáng chế Hàn Quốc số 2010-0053831

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dụng cụ vi lỏng chẩn đoán gen đích tức là có khả năng phát hiện một cách thuận tiện và chính xác gen đích trong môi trường bất kỳ mà không cần nguồn điện bên ngoài hoặc một dụng cụ đặc biệt bao gồm máy luân nhiệt, phương pháp sản xuất dụng cụ này, và phương pháp phát hiện sử dụng dụng cụ này.

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích, phương pháp sản xuất dụng cụ này, và phương pháp phát hiện sử dụng dụng cụ này. Sau đây, mỗi đối tượng của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích

Theo một ví dụ cụ thể, sáng chế đề xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích bao gồm: tấm; cửa vào được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài; kênh thứ nhất được nối với cửa vào mẫu để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này; kênh thứ hai được nối với kênh thứ nhất; cửa ra được nối với kênh thứ hai; lớp phủ bề mặt trên kênh thứ hai; đoạn môi được cố định trên lớp phủ bề mặt của kênh thứ hai; và khuôn liên kết bổ sung với đoạn môi này, trong đó khuôn bao gồm vùng liên kết bổ sung với gen đích, vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này, và vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ, các vùng liên kết bổ sung với gen đích được tạo thành riêng biệt tại hai đầu của khuôn này, và vùng liên kết này bổ sung với đoạn môi này được tạo ra giữa các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành

hình dạng quả tạ, mà được tạo thành riêng biệt.

Tức là, dụng cụ vi lỏng này phát hiện gen đích theo sáng chế là dụng cụ bao gồm tấm, cửa vào, kênh thứ nhất, và cửa ra được nối với kênh thứ hai. Kênh thứ hai của dụng cụ có lớp phủ bề mặt, đoạn môi được cố định trên lớp phủ bề mặt, và khuôn (khuôn để phát hiện gen đích) liên kết với đoạn môi được cố định. Khuôn có cấu trúc tuyến tính của 'vùng liên kết gen đích thứ nhất-vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất (để tạo thành hình dạng quả tạ)-vùng liên kết đoạn môi-vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai (để tạo thành hình dạng quả tạ)-vùng liên kết gen đích thứ hai.' Tức là, trong cấu trúc này, vùng liên kết đoạn môi của khuôn liên kết với đoạn môi được cố định trên dụng cụ này, 'vùng liên kết gen đích thứ nhất-vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất (để tạo thành hình dạng quả tạ) có mặt ở một đầu của vùng liên kết đoạn môi này, và 'vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai (để tạo thành hình dạng quả tạ)-vùng liên kết gen đích thứ hai' có mặt ở đầu kia của vùng liên kết đoạn môi này.

Khi các gen đích có mặt trong mẫu, các gen đích liên kết với cả vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai của khuôn này. Sau đó, vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất và vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai trở nên gần nhau để tạo thành liên kết bổ sung với gen đích. Do đó, như được thấy từ phần B của FIG.2, khuôn này chuyển thành dạng hình quả tạ có một điểm cắt ở giữa vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai.

Tức là, dụng cụ vi lỏng này phát hiện gen đích theo sáng chế là dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích mà bao gồm: tấm; cửa vào được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài; kênh thứ nhất được nối với cửa vào mẫu để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này; kênh thứ hai được nối với kênh thứ nhất; và cửa ra được nối với kênh thứ hai, trong đó kênh thứ hai có lớp phủ bề mặt; đoạn môi được cố định trên lớp phủ bề mặt; khuôn để phát hiện gen đích liên kết với đoạn môi được cố định này; khuôn để phát hiện gen đích bao gồm vùng liên kết đoạn môi bổ sung với đoạn môi này, vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất liên kết với một đầu của vùng liên kết đoạn môi này-vùng liên kết gen đích thứ nhất, và vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai liên kết với đầu kia của vùng liên kết đoạn môi-vùng liên kết gen đích thứ hai

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, kênh thứ hai có thể có hình dạng được nối với kênh thứ nhất và chia thành hai hay nhiều nhánh, tốt hơn là từ 2 đến 20 nhánh. Số lượng các nhánh của kênh thứ hai có thể thay đổi theo số lượng khuôn của các gen đích được phát hiện để chẩn đoán gen đặc hiệu của bệnh. Ví dụ, khi có hai khuôn gen

đích, số lượng các nhánh của kênh thứ hai có thể là hai, hoặc ba bao gồm các nhánh cho khuôn gen đích và nhóm đối chứng. Ví dụ, khi có một khuôn gen đích, số lượng các nhánh của kênh thứ hai có thể là một, hoặc hai bao gồm các nhánh cho khuôn gen đích và cho nhóm đối chứng.

Số lượng các cửa ra mẫu có thể bằng với số lượng các nhánh của kênh thứ hai. Ví dụ, số lượng các cửa ra mẫu có thể là hai hay nhiều cửa ra, tốt hơn là từ 2 đến 20 cửa ra, bằng với số lượng các nhánh của kênh thứ hai.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, để làm giảm sự cố định của đoạn môi này trên kênh thứ hai, kênh thứ hai có thể được phủ để có nhóm chức để kết hợp với đoạn môi này. Hơn nữa, đoạn môi này có thể được biến đổi để có nhóm chức để kết hợp với nhóm chức trên kênh thứ hai.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng theo sáng chế có thể được phủ bằng pyrogallol amin, ví dụ, 5-hydroxydopamin HCl.

Một đầu của đoạn môi này có thể được biến đổi để có các nhóm chức khác nhau, ví dụ, một hay nhiều gốc được chọn từ nhóm bao gồm thiol, amin, hydroxyl, carboxyl, isothioxyanat, NHS este, aldehyt, epoxit, cacbonat, HOBt este, glutaraldehyt, carbamat, imidazol carbamat, maleimit, aziridin, sulfon, vinylsulfon, hydrazin, phenyl azit, benzophenon, anthraquinon, và dien.

Theo một phương án của sáng chế, lớp phủ của kênh thứ hai có thể là 5-hydroxydopamin HCl, và một đầu của đoạn môi này có thể được biến đổi thành nhóm thiol hoặc amin.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn có thể được thiết kế để đạt được các chiều dài và trình tự khác nhau theo chiều dài của gen đích, ví dụ, gen gây bệnh, và chiều dài của đoạn môi. Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn này có thể có chiều dài từ 40 đến 160 mer. Theo sáng chế, khi khuôn quá ngắn, thì khuôn này là không ổn định; khi khuôn quá dài, hiệu quả của kỹ thuật khuếch đại vòng lăn tròn (RCA) có thể giảm.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, trong khuôn này, các vùng liên kết bổ sung với gen gây bệnh được tạo thành riêng biệt tại hai đầu của khuôn này, các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ được tạo thành riêng biệt để tiếp giáp với các vùng liên kết bổ sung với gen gây bệnh ở cả hai đầu, và vùng liên kết đoạn môi bổ sung với đoạn môi này được tạo ra giữa vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành hình dạng quả tạ (xem phần A của FIG.2).

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn này có thể là khuôn có tổng chiều

dài từ 40 đến 160 mer bao gồm các vùng liên kết có chiều dài từ 10 đến 40 mer bổ sung với gen đích, vùng liên kết có chiều dài từ 10 đến 40 mer bổ sung với đoạn môi này, và các vùng liên kết có chiều dài từ 20 đến 80 mer bổ sung trên khuôn bổ sung để tạo thành dạng hình quả tạ.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, dung dịch mẫu được đưa vào dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích có thể là mẫu dịch của cơ thể, như máu, nước bọt và nước tiểu, thực phẩm, nguồn cung cấp nước, và các dung dịch mẫu khác, như các mẫu nước hoặc đất, để phân tích sự ô nhiễm nước, sự ô nhiễm đất, hoặc yếu tố tương tự.

Ngoài ra, dung dịch chỉ chứa các axit nucleic được chiết từ các dung dịch mẫu khác có thể được đưa vào dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích. Ở đây, quá trình chiết không chỉ giới hạn ở một phương pháp cụ thể mà có thể được thực hiện bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng, như chiết phenol-clorofom, hoặc phương pháp chiết lỏng-rắn sử dụng chất mang. Ngoài ra, quá trình chiết có thể sử dụng phương pháp chiết proteinaza K/phenol, phương pháp chiết proteinaza K/phenol/clorofom, thủy phân bằng kiềm, phương pháp alkaline-natri dodecyl sulfat (SDS), hoặc phương pháp sử dụng enzym tiêu khuẩn. Ngoài ra, phương pháp chiết axit nucleic có bán trên thị trường, QIAamp (do hãng QIAGEN, Đức sản xuất), có thể được sử dụng. Ví dụ, có thể sử dụng phenol và hỗn hợp phenol/clorofom.

Theo sáng chế, gen đích, ví dụ, trình tự hoặc phân tử của axit nucleic, có thể là ADN hoặc ARN mạch đơn hoặc mạch kép hoặc có thể là mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa. Do đó, trình tự axit nucleic có thể là ADN mạch kép, ADN mạch đơn, ADN mạch đơn hỗn hợp, ADN mạch kép hỗn hợp, ADN mạch kép được tạo ra từ ADN mạch đơn (ví dụ, sử dụng quá trình dung hợp, thường biến, enzym helicaza, hoặc quá trình tương tự), A-, B-, hoặc Z-ADN, ADN mạch ba, ARN, ARN mạch đơn, ARN mạch kép, ARN mạch đơn và ARN mạch kép hỗn hợp, ARN mạch kép được tạo ra từ ARN mạch đơn (ví dụ, sử dụng quá trình dung hợp, thường biến, enzym helicaza, hoặc quá trình tương tự), ARN thông tin (mARN), ARN ribosom (rARN), ARN vận chuyển (tARN), ARN xúc tác, snARN, microARN, hoặc axit protein-nucleic (APN).

Sáng chế không chỉ giới hạn ở loại hoặc nguồn cung cấp gen đích được sử dụng, ví dụ, axit nucleic (ví dụ, trình tự hoặc phân tử (ví dụ, trình tự đích và/hoặc các oligonucleotit)). Khi được sử dụng liên quan đến trình tự axit nucleic, các thuật ngữ "nucleotit" và "bazo" được dùng thay thế nhau trừ khi có quy định cụ thể khác trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích bao gồm: dụng

cụ vi lỏng phát hiện gen đích; dNTP; enzym ligaza; và enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt.

Trong bộ kit này, dNTP, enzym ligaza, và enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt này có thể được bao gồm trong chế phẩm khuếch đại để khuếch đại sản phẩm gen (axit nucleic). Chế phẩm khuếch đại này dùng để chỉ hỗn hợp chứa tất cả các thành phần để khuếch đại axit nucleic và có thể còn bao gồm axit nucleic polymeraza (enzym), dung dịch đệm cần thiết cho việc hoạt hóa hoặc phản ứng axit nucleic polymeraza, bốn loại dNTP, cofactor, và/hoặc cơ chất. Enzym axit nucleic polymeraza này có thể là ADN polymeraza, ARN polymeraza, transcriptaza ngược (enzym phiên mã ngược), và dạng kết hợp của chúng.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, chế phẩm khuếch đại này cung cấp chế phẩm khuếch đại axit nucleic bao gồm ADN polymeraza, dung dịch đệm phản ứng, và các dNTP.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, ADN polymeraza có thể được chọn từ nhóm bao gồm ADN polymeraza I của E. Coli, đoạn Klenow, phi29 ADN polymeraza, Vent ADN polymeraza, T4, T7 ADN polymeraza, và Taq polymeraza.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, dung dịch đệm (chất đệm) có thể là các dung dịch đệm của hãng New England Biolabs (NEB), ví dụ, dung dịch đệm MEB 4, dung dịch đệm Bst ADN polymeraza, dung dịch đệm T4 ADN ligaza, dung dịch đệm T7 ADN ligaza, và các dung dịch đệm tương tự, mà không chỉ giới hạn ở những loại này.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích có thể còn bao gồm chế phẩm phát hiện để phát hiện sự tạo thành hydrogel của các sản phẩm gen được khuếch đại được phát hiện bởi dụng cụ vi lỏng này hoặc sự thay đổi độ đục.

Ngoài ra, chế phẩm phát hiện có thể là thuốc nhuộm để hỗ trợ nhận diện bằng mắt thường sản phẩm gen đã khuếch đại, mà có thể biểu thị màu và bao gồm, ví dụ, GelRed, các hạt Streptavidin, thuốc nhuộm xanh trypan, thuốc nhuộm xanh Evans, nhuộm hematoxylin-eosin, tím tinh thể, hoặc xanh metylen, mà không chỉ giới hạn ở đó.

Hơn nữa, chế phẩm phát hiện có thể là dung dịch muối nồng độ cao, mà làm tăng sự kết bông của các sản phẩm gen được khuếch đại dẫn đến sự thay đổi độ đục hoặc kết tủa, do đó trợ giúp việc xác định bằng mắt thường các sản phẩm gen đã khuếch đại. Dung dịch muối nồng độ cao này có thể là dung dịch muối vô cơ, ví dụ, dung dịch chứa nước magie clorua ($MgCl_2$), dung dịch chứa nước amoni clorua

(NH_4Cl), dung dịch chứa nước amoni axetat (NH_4OAc), dung dịch chứa nước natri clorua (NaCl), dung dịch chứa nước amoni sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), hoặc dung dịch nước chứa dung dịch axit amin trung tính, mà không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, chế phẩm phát hiện này có thể là thuốc thử huỳnh quang.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, kênh thứ hai của dụng cụ có thể có đường kính sao cho các sản phẩm gen đã khuếch đại (khối) kết bông để chặn kênh thứ hai. Kênh thứ hai có thể có đường kính trong khoảng từ 1 μm đến 5 mm theo một ví dụ cụ thể, và có thể có đường kính trong khoảng từ 50 μm đến 5 mm theo một ví dụ cụ thể khác. Theo cách khác, kênh thứ hai có thể có đường kính trong khoảng từ 0,25 mm đến 2 mm theo một ví dụ cụ thể, và có thể có đường kính trong khoảng từ 0,5 mm đến 1,5 mm theo một ví dụ cụ thể khác.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các sản phẩm gen được khuếch đại (khối) có thể có đường kính trong khoảng từ khoảng 0,5 μm đến khoảng 50 μm . Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các sản phẩm gen được khuếch đại (khối) có thể kết bông để tạo thành hydrogel, do đó có đường kính trong khoảng từ khoảng 50 μm đến 5 mm. Theo một ví dụ cụ thể khác của sáng chế, các sản phẩm gen được khuếch đại có thể kết bông để có đường kính trong khoảng từ khoảng 0,25 mm đến 2 mm.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, bề mặt của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng có thể bao gồm một chất bất kỳ trong số polydimetylsiloxan, vàng (Au), các oxit kim loại (SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , và thiếc indi oxit), gốm, và các polyme tổng hợp (polycacbonat, copolyme olefin mạch vòng, polytetrafloroetylen (PTFE), polystyren, và polyetylen).

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, vật liệu phủ có thể bao gồm lớp phủ monome hoặc polyme hydroxybenzen. Ngoài ra, vật liệu phủ có thể bao gồm, ví dụ, lớp phủ polyme catecholamin. Các monome hoặc polyme hydroxybenzen có các đặc tính bề mặt tốt và do đó có thể dễ dàng phủ bằng một loạt các vật liệu bao gồm các kim loại quý, các oxit kim loại, gốm, và các polyme tổng hợp. Các ví dụ cụ thể về các monome hoặc polyme hydroxybenzen này có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở dopamin, 5-hydroxydopamin HCl, norepinephrin, epinephrin, pyrogallol amin, 3,4-dihydroxyphenylalanin, catechin, các tannin, pyrogallol, pyrocatechol, heparin-catechol, chitosan-catechol, poly(etylen glycol)-catechol, poly(etylenimin)-catechol, poly(metyl metacrylat)-catechol, và axit hyaluronic-catechol.

Ngoài ra, vật liệu phủ có thể là nhóm vinyl.

Không có sự giới hạn về các phương pháp phủ. Ví dụ, chế phẩm phủ có thể

được điều chế và có thể được đưa vào kênh thứ hai để phủ bề mặt của kênh thứ hai. Một ví dụ khác, kênh thứ hai có thể được phủ bằng lớp phủ chứa nhóm vinyl bằng phương pháp lắng đọng pha hơi.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, dụng cụ vi lỏng theo sáng chế cho phép xác định các sản phẩm gen được khuếch đại của gen đích bằng mắt thường. Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, phương pháp phát hiện như vậy có thể được xác định bằng mắt thường khi các sản phẩm gen được khuếch đại kết bông để tạo thành hydrogel hoặc độ đục được thay đổi.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, gen đích được phát hiện có thể thu được từ động vật, thực vật, vi khuẩn, virus, hoặc nấm. Tốt hơn, nếu gen đích có thể thu được từ tác nhân gây bệnh, như vi khuẩn, virus hoặc nấm.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, gen đích được phát hiện có thể là gen gây bệnh. Gen đích có thể là tất cả các tác nhân gây bệnh có trình tự axit nucleic đã biết. Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các tác nhân gây bệnh là hữu dụng để phát hiện dịch cúm gia cầm, SARS, *Escherichia coli* O157:H7, vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumonia*, *Plasmodium*, *Salmonella*, virus Hepatitis A,B,C,D và E, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, virus Ebola, và virus MERS-Cov. Ngoài ra, theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các tác nhân gây bệnh còn hữu ích dùng để phát hiện tác nhân gây bệnh kháng kháng sinh, như *Streptococcus pneumonia*, *enterococcus*, *staphylococcus*, *Plasmodium falciparum*, và vi khuẩn lao hoặc vi khuẩn sốt rét ở các nước đang phát triển.

Bảng 1 dưới đây minh họa các loại và trình tự phát hiện được của các gen đích phát hiện được, ví dụ, các tác nhân gây bệnh, và trình tự của các khuôn bao gồm cả phần bổ sung các vùng liên kết vào đó theo một ví dụ cụ thể của sáng chế (kiểu chữ in đậm: vùng liên kết bổ sung với gen đích của tác nhân gây bệnh, kiểu chữ in nghiêng: vùng bổ sung trên khuôn, kiểu chữ in nghiêng gạch dưới: vùng liên kết bổ sung với đoạn mồi).

[Bảng 1]

Loại tác nhân gây bệnh	Số trình tự	Trình tự khuôn (5' → 3')	Số trình tự	Trình tự gen đích của tác nhân gây bệnh
Salmonella	1	5'-phosphat-TG CTA TGC CGA CTC AAT	5	5'-GAG TCG GCA TAG CAC ACT CA-

		<i>CGA AGT ACT CAG</i> <i>CGT AAG TTT AGA</i> <i>GGC AT <u>TA GCA TGC</u></i> <i><u>TAG TAT CGA CGT</u></i> <i><u>CCC</u> ACG TAC CAA</i> <i>CAA CTT ACG CTG</i> <i>AGT ACT TCG ATT TG</i> <i>AGT G-3'</i>		phosphat-3'
Yersinia enterocolitica	2	5'-phosphat-GC TCA CCC CAG TAA AAT <i>CGA AGT ACT CAG</i> <i>CGT AAG TTT AGA</i> <i>GGC AT <u>TA GCA TGC</u></i> <i><u>TAG TAT CGA CGT</u></i> <i><u>CCC</u> ACG TAC CAA</i> <i>CAA CTT ACG CTG</i> <i>AGT ACT TCG ATT</i> AG CTT TAC-3'	6	5'-TTA CTG GGG TGA GCG TAA AGC T-phosphat-3'
Francisella tularensis	3	5'-phosphat-TG TTT CCA GTA TTT AAT <i>CGA AGT ACT CAG</i> <i>CGT AAG TTT AGA</i> <i>GGC AT <u>TA GCA TGC</u></i> <i><u>TAG TAT CGA CGT</u></i> <i><u>CCC</u> ACG TAC CAA</i> <i>CAA CTT ACG CTG</i> <i>AGT ACT TCG ATT</i> TTT CCT CCG A-3'	7	5'-AAA TAC TGG AAA CAT CGG AGG AAA- phosphat-3'
Yersinia pestis	4	5'-phosphat-TC GAA TGC CAA CAA AAT <i>CGA AGT ACT CAG</i> <i>CGT AAG TTT AGA</i> <i>GGC AT <u>TA GCA TGC</u></i> <i><u>TAG TAT CGA CGT</u></i> <i><u>CCC</u> ACG TAC CAA</i> <i>CAA CTT ACG CTG</i> <i>AGT ACT TCG ATT</i> CTC TGA ACA-3'	8	5'-TTG TTG GCA TTC GAT GTT CAG AG-phosphat-3'

Trong trường hợp này, với vai trò là đoạn môi, phần bổ sung dạng liên kết vào các trình tự khuôn, 5'-Thiol-AAA AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA 3' (Số trình tự 9), có thể được sử dụng.

Bảng 2 dưới đây minh họa loại và trình tự phát hiện được của các gen đích phát hiện được, ví dụ, các tác nhân gây bệnh, và trình tự của các khuôn bao gồm cả phần bổ sung các vùng liên kết vào đó theo Ví dụ 3 của sáng chế.

[Bảng 2]

Loại tác nhân gây bệnh	Số trình tự	Trình tự khuôn (5' → 3')	Số trình tự	Trình tự gen đích của tác nhân gây bệnh
Bacillus anthracis	10	5'-phosphat TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA phosphat-3'
Virut Ebola	11	5'-phosphat GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'	13	5'-CGC GTG CGT CGT GCG ATT TCT CGT T-phosphat-3'

Bảng 3 dưới đây minh họa trình tự của gen đích phát hiện được của virut MERS-CoV phát hiện được, và trình tự của khuôn bao gồm cả phần bổ sung vùng liên kết vào đó theo Ví dụ 5 của sáng chế.

[Bảng 3]

Loại tác nhân gây bệnh	Số trình tự	Trình tự khuôn (5' → 3')	Số trình tự	Trình tự gen đích của tác nhân gây bệnh
MERS-CoV	16	5'-5phosphat/ AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC	17	5'-CG GAG AUG UGC CCU GGG UAU/3phosphat-3'

		GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT ATA CCC 3'		
--	--	---	--	--

Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế có thể dùng cho một loại tác nhân gây bệnh bất kỳ, mà không chỉ giới hạn ở các loại tác nhân nêu trên. Trình tự gen gây bệnh ngẫu nhiên được chọn từ các gen gây bệnh đã biết, và hai trình tự có khả năng liên kết với trình tự gen gây bệnh có một điểm cắt được đặt vào giữa chúng được điều chế để dùng làm các trình tự vùng liên kết gen đích của khuôn (vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai). Theo cách này, chỉ bằng cách thay thế các trình tự vùng liên kết gen đích của khuôn, dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích mà có thể phát hiện nhiều loại gen gây bệnh có thể sản xuất.

Mặc dù dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế đủ khả năng xác định tác nhân gây bệnh thậm chí bằng mắt thường, những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan đến sáng chế có thể thực hiện sáng chế theo nhiều hình thức cụ thể tùy thuộc vào mục đích, mà không làm thay đổi các dấu hiệu đặc trưng cơ bản của sáng chế. Ví dụ, những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện sáng chế bằng cách bao gồm thêm cảm biến điện hóa đo dòng điện, điện áp, hiệu điện thế, và sự thay đổi điện trở giữa các điện cực, bộ cảm biến quang sử dụng các nguồn sáng khác nhau, như tia cực tím, ánh sáng thường, ánh sáng huỳnh quang, tia hồng ngoại, và nguồn ánh sáng Raman, cảm biến nano sử dụng các vật liệu kim loại, gốm, và polyme, hoặc cảm biến sinh học sử dụng các vật liệu nhạy cảm sinh học, như các enzym, kháng nguyên, và kháng thể, phụ thuộc vào mục đích để tăng độ nhạy phát hiện của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng

Phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế có thể bao gồm các bước thao tác sau đây:

(S1) chuẩn bị dụng cụ vi lỏng bao gồm tấm, cửa vào được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài vào, kênh thứ nhất được nối với cửa vào để chứa dung dịch mẫu được đưa vào, kênh thứ hai được nối với kênh thứ nhất, và cửa ra được nối với kênh thứ hai;

(S2) phủ bề mặt của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng;

(S3) cố định đoạn môi để liên kết với khuôn trên kênh thứ hai được phủ; và

(S4) liên kết với đoạn môi này, khuôn bao gồm vùng liên kết bổ sung với gen đích, vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này, và vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ.

Ở đây, các vùng liên kết bổ sung với gen đích được tạo thành riêng biệt tại hai đầu của khuôn này, và vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này được tạo ra giữa các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành hình dạng quả tạ, mà được tạo thành riêng biệt.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, bề mặt của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng có thể bao gồm một chất bất kỳ trong số polydimetylsiloxan, vàng (Au), các oxit kim loại (SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , và thiếc indi oxit), gốm, và các polyme tổng hợp (polycacbonat, copolyme olefin mạch vòng, polytetrafloroetylen (PTFE), polystyren, và polyetylen).

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, trong bước phủ (S2) của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng, vật liệu phủ của kênh thứ hai có thể được phủ bằng vật liệu thấm nước để trợ giúp các giọt nước di chuyển và có thể là nhiều loại vật liệu có nhóm chức để cố định đoạn môi này trên kênh thứ hai. Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, để làm giảm sự cố định của đoạn môi này trên kênh thứ hai, kênh thứ hai có thể được phủ trên bề mặt để có nhóm chức để kết hợp với đoạn môi này. Hơn nữa, đoạn môi này có thể được biến đổi để có nhóm chức để kết hợp với nhóm chức trên kênh thứ hai.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, vật liệu phủ của kênh thứ hai có thể bao gồm lớp phủ monome hoặc polyme hydroxybenzen. Ngoài ra, vật liệu phủ có thể bao gồm, ví dụ, lớp phủ polyme catecholamin. Các monome hoặc polyme hydroxybenzen có các đặc tính bề mặt tốt và do đó có thể dễ dàng phủ bằng một loạt các vật liệu bao gồm các kim loại quý, các oxit kim loại, gốm, và các polyme tổng hợp. Các ví dụ cụ thể về các monome hoặc polyme hydroxybenzen này có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở dopamin, 5-hydroxydopamin HCl, norepinephrin, epinephrin, pyrogallol amin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, catechin, các tannin, pyrogallol, pyrocatechol, heparin-catechol, chitosan-catechol, poly(etylen glycol)-catechol, poly(etylenimin)-catechol, poly(metyl metacrylat)-catechol, và axit hyaluronic-catechol. Ngoài ra, nhóm vinyl có thể còn được sử dụng để phủ.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng theo sáng chế có thể được phủ bằng pyrogallol amin, ví dụ, 5-hydroxydopamin HCl.

Phương pháp phát hiện để phát hiện gen gây bệnh sử dụng dụng cụ vi lỏng

Phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế có thể bao gồm các bước thao tác sau đây:

(S1) chuẩn bị dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích;

(S2) đưa dung dịch mẫu vào kênh thứ nhất; và

(S3) thêm dNTP, ligaza, và enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt vào kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, phương pháp này có thể còn bao gồm bước (S4) cho phép các sản phẩm gen đã khuếch đại kết bông tạo thành hydrogel có đường kính trong khoảng từ 50 μm đến 5 mm trên kênh thứ hai và cửa ra.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn này có thể được thiết kế để có các chiều dài và trình tự khác nhau theo chiều dài của gen gây bệnh, và chiều dài của đoạn môi. Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn này có thể có chiều dài từ 40 đến 160 mer. Theo sáng chế, khi khuôn quá ngắn, thì khuôn này là không ổn định; khi khuôn quá dài, có thể làm giảm hiệu quả của RCA.

Theo sáng chế, đoạn môi dùng để chỉ cả đoạn môi để cố định khuôn trên kênh thứ hai và đoạn môi là vật liệu khởi đầu để khuếch đại gen.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, khuôn của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích có thể tạo thành dạng hình quả tạ.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, trong bước (S3), khi dNTP, ligaza, và axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt này được thêm vào, quá trình khuếch đại vòng lẫn tròn (RCA) xảy ra khi có mặt của gen đích trong dung dịch mẫu. Tức là, khi gen đích liên kết với vùng liên kết bổ sung với gen đích của khuôn này, thì khuôn này tạo thành dạng hình quả tạ và quá trình khuếch đại có thể xảy ra do enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt. Quá trình RCA này có thể xảy ra ở nhiệt độ trong phòng, ví dụ, 15°C đến 35°C, tốt hơn là 25°C đến 35°C, và 30°C theo một phương án.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, sản phẩm được khuếch đại thu được từ quá trình RCA có thể là sản phẩm RCA mạch đơn rồi hình tròn có ba chân.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các gen đã khuếch đại này có thể tạo ra sản phẩm gen mạch đơn rồi. Tham khảo FIG.2, sản phẩm gen đích được khuếch đại có thể tạo ra mạch đơn rồi hình khóa dán (Velcro) nối tiếp có phần hình tròn dạng móc và chiều dài. Chiều dài này có thể từ 0,5 μm đến 50 μm . Sản phẩm gen đích được khuếch đại hoàn toàn có thể có hình giá ba chân có các phần hình tròn và các chân có chiều dài.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, sản phẩm mạch đơn rồi có thể tạo thành hydrogel.

Ngoài ra, theo một phương án, quá trình khuếch đại bằng kỹ thuật RCA và phản ứng tạo thành hydrogel có thể xảy ra trong 3 giờ hoặc lâu hơn, và thời gian phản ứng có thể là ba giờ.

Theo ví dụ cụ thể khác của sáng chế, phương pháp này có thể còn bao gồm bước (S5) thêm thuốc nhuộm, dung dịch muối nồng độ cao, hoặc thuốc thử huỳnh quang.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, thuốc nhuộm, dung dịch muối nồng độ cao, hoặc thuốc thử huỳnh quang có thể dùng để dễ phát hiện gen đích và có thể là một loại bất kỳ trong số các loại sau: GelRed, các hạt Streptavidin, thuốc nhuộm xanh trypan, thuốc nhuộm xanh Evans, thuốc nhuộm hematoxylin-eosin, thuốc tím tinh thể, xanh metylen, dung dịch chứa nước magie clorua ($MgCl_2$), dung dịch chứa nước amoni clorua (NH_4Cl), dung dịch chứa nước amoni axetat (NH_4OAc), dung dịch chứa nước natri clorua ($NaCl$), dung dịch chứa nước amoni sulfat ($(NH_4)_2SO_4$), và dung dịch axit amin trung tính. Ví dụ, thuốc nhuộm, GelRed hoặc các hạt Streptavidin liên kết chặt chẽ với biotin, có thể được sử dụng. Ngoài ra, chế phẩm phát hiện có thể là dung dịch muối nồng độ cao, như $MgCl_2$ và NH_4Cl .

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, dung dịch mẫu được phát hiện có thể được nạp trên cửa vào mẫu và có thể chảy qua kênh thứ nhất và kênh thứ hai.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Dụng cụ theo sáng chế có khả năng phát hiện thuận tiện một gen đích duy nhất, như một tác nhân gây bệnh duy nhất, hoặc phát hiện đồng thời nhiều gen đích, như nhiều tác nhân gây bệnh, ở nhiệt độ trong phòng mà không cần dụng cụ đặc biệt nào và không bị ảnh hưởng bởi nguồn ánh sáng và năng lượng điện bên ngoài.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất dụng cụ phát hiện tác nhân gây bệnh có hiệu quả về mặt thời gian và chi phí, có thể mang lại dụng cụ, và có khả năng chẩn đoán nhanh chóng mà không cần dụng cụ phát hiện đắt tiền.

Do vậy, dụng cụ theo sáng chế không chỉ có khả năng chẩn đoán các tác nhân gây bệnh, như bệnh lao hoặc sốt rét ở các nước đang phát triển, hoặc chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm khác nhau (ví dụ, virus Ebola và virus MERS) đang đe dọa thế giới mà còn có khả năng phát hiện nhanh và thuận tiện các tác nhân gây bệnh liên quan đến vấn đề khủng bố bằng vũ khí sinh học và ô nhiễm môi trường, do vậy có tính ứng dụng

thực tiễn cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 minh họa hình chiếu từ trên xuống (bên trái) và hình phối cảnh (bên phải) của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế.

FIG.2 minh họa quy trình phát hiện gen đích sử dụng khuôn dạng hình quả tạ để phát hiện gen đích theo sáng chế. A, B, C, D, và E mỗi hình đại diện cho một bước thao tác của quy trình này.

FIG.3 minh họa quy trình chuẩn bị dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích và phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ này theo sáng chế. A, B, C, D, E, và F mỗi hình đại diện cho một bước thao tác của quy trình này.

FIG.4 minh họa kết quả điện di thể hiện quá trình nối của khuôn (Khuôn_B_A) trong ống để phát hiện vi khuẩn *Bacillus anthracis*.

FIG.5 là hình ảnh SEM (kính hiển vi điện tử quét - Scanning Electron Microscope (SEM)) cho thấy rằng sản phẩm RCA được xác định trong ống bằng cách sử dụng khuôn cho vi khuẩn *Bacillus anthracis* (Khuôn_B_A) trong (1) theo phương án thử nghiệm 2.

FIG.6 là hình ảnh SEM cho thấy rằng sản phẩm RCA được xác định trong ống bằng cách sử dụng khuôn cho virus Ebola (Khuôn_E) trong (2) theo phương án thử nghiệm 2.

FIG.7a thể hiện kết quả tạo thành hydrogel trong ống bằng khuôn đối với virus Ebola (Khuôn_E), và FIG.7b là đồ thị độ nhớt được đo bằng nhớt kế quay.

FIG.8a là hình ảnh AFM của kết quả RCA trong trường hợp cố định đoạn môi trên kênh thứ hai không được phủ của dụng cụ vi lỏng, và FIG.8b là hình ảnh AFM của kết quả RCA trong trường hợp cố định đoạn môi trên kênh thứ hai được phủ bằng 5-hydroxydopamin HCl.

FIG.9a là hình ảnh thể hiện kết quả phát hiện *Bacillus anthracis* sử dụng dụng cụ vi lỏng theo sáng chế, và FIG.9b là hình ảnh thể hiện kết quả xác định *Bacillus anthracis* sử dụng máy chụp ảnh gel (Gel DocTM EZ, Bio-Rad).

FIG.10a là hình ảnh thể hiện kết quả phát hiện đồng thời *Bacillus anthracis* và virus Ebola sử dụng dụng cụ vi lỏng theo sáng chế, và FIG.10b là hình ảnh thể hiện kết quả xác định vi khuẩn *Bacillus anthracis* và virus Ebola sử dụng máy chụp ảnh gel (Gel DocTM EZ, Bio-Rad).

FIG.11 thể hiện kết quả phát hiện *Bacillus anthracis* và virus Ebola sử dụng Streptavidin và dụng cụ vi lỏng theo sáng chế.

FIG.12 là hình sơ đồ cụ thể minh họa quá trình nối điểm cắt và RCA xảy ra trong khuôn liên kết với đoạn môi của dụng cụ vi lỏng theo sáng chế. A, B, C, D, và E mỗi hình đại diện cho một bước thao tác của phương pháp này.

FIG.13 là sơ đồ minh họa phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng theo sáng chế, dụng cụ này được sản xuất có ba kênh thứ hai (kênh đối chứng âm, kênh mẫu, và kênh đối chứng dương) như trong phương án thử nghiệm 5.

FIG.14 thể hiện kết quả phát hiện virus MERS bằng cách sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen MERS đích.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được hiểu rõ ràng hơn nhờ phân mô tả chi tiết các phương án có tham khảo các hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, các phương án sau được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa cho sáng chế, và phạm vi của sáng chế không chỉ được giới hạn ở các phương án sau và có thể bao gồm các phương án khác. Trong các hình vẽ, chiều rộng, chiều dài, và độ dày của các phần tử có thể được phóng to cho rõ ràng. Các số tham chiếu tương tự dùng để chỉ các phần tử tương tự xuyên suốt bản mô tả. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng khi một phần tử được gọi là nằm trên một phần tử khác, thì phần tử này có thể nằm trực tiếp trên một phần tử khác hoặc trên một phần tử xen kẽ.

<Phương án chuẩn bị 1> Sản xuất khuôn

(1) Sản xuất khuôn_BA

Khuôn đặc hiệu với *Bacillus anthracis* (Khuôn_BA), là khuôn liên kết đặc hiệu với *Bacillus anthracis* (Khuôn_BA, Số trình tự 10), được sản xuất trên cơ sở trình tự gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* (Integrated DNA Technology, San Jose, CA, USA). Khuôn_BA bao gồm: các vùng liên kết bổ sung với gen đích (gen gây bệnh của *Bacillus anthracis*), là các vị trí bổ sung gây bệnh (20 mer, các chữ in đậm trên nền trắng); các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ, mà là các vùng bổ sung trên khuôn (tổng số 21 mer $\times$ 2,42 mer, chữ in nghiêng); và vùng liên kết bổ sung với đoạn môi, vùng này là vùng cố định đoạn môi (37 mer), trong đó vùng liên kết này bổ sung với đoạn môi này được xác định bởi kiểu chữ nghiêng gạch dưới.

5'/5Phos/TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT
TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT
ACT TCG ATT TGA GCG-3'

(2) Sản xuất khuôn_E

Khuôn đặc hiệu với virus Ebola (Khuôn_E), là khuôn liên kết đặc hiệu với virus Ebola (Khuôn_E, Số trình tự 11), được sản xuất trên cơ sở trình tự gen gây bệnh của virus Ebola. Khuôn_E bao gồm: các vùng liên kết bổ sung với gen đích (gen gây bệnh của Virus Ebola), là các vị trí bổ sung gây bệnh (25 mer, các chữ in đậm trên nền trắng); các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ, mà là các vùng bổ sung trên khuôn (tổng số 21 mer × 2, 42 mer, chữ in nghiêng); và vùng liên kết bổ sung với đoạn môi, vùng này là vùng cố định đoạn môi (37 mer), trong đó vùng liên kết này bổ sung với đoạn môi này được xác định bởi kiểu chữ nghiêng gạch dưới.

5'/5Phos/GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA
GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT
TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC- 3'

<Phương án 1> Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích

Cấu hình minh họa của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế được mô tả với sự tham khảo FIG.1 đến FIG.3.

Tham khảo FIG.1, dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế bao gồm: tấm 100; cửa vào 101 được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài; kênh thứ nhất 102 được nối với cửa vào để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này; kênh thứ hai 103 được nối với kênh thứ nhất; và cửa ra 104 được nối với kênh thứ hai. Kênh thứ hai 103 được nối với kênh thứ nhất và có thể phân chia thành hai hay nhiều nhánh (ví dụ, ba nhánh). Tham khảo FIG.3, dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế bao gồm đoạn môi được cố định trên kênh thứ hai; và khuôn bổ sung với đoạn môi này. Tham khảo FIG.2, khuôn bao gồm vùng liên kết bổ sung với gen đích (ví dụ, bổ sung với tác nhân gây bệnh), vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này (vùng liên kết đoạn môi), và vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành hình dạng quả tạ (khuôn có dạng hình quả tạ). Ngoài ra, các vùng liên kết bổ sung với gen đích được tạo thành riêng biệt tại hai đầu của khuôn này, và vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này được tạo thành giữa các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành hình dạng quả tạ, mà các vùng này được tạo thành riêng biệt. Tức là, như được minh họa trên phần A của FIG.2, khuôn có cấu trúc tuyến tính của 'vùng liên kết gen đích thứ nhất-vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất-vùng liên kết đoạn môi-vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai-vùng liên kết gen đích thứ hai.' Như được minh họa trên phần A của FIG.12, vùng liên kết đoạn môi này của khuôn liên kết bổ sung với đoạn

môi được cố định trên kênh thứ hai.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho sự cố định của đoạn môi này trên kênh thứ hai, kênh thứ hai có thể được phủ ngoài để có một nhóm chức kết hợp với đoạn môi này. Ngoài ra, đoạn môi này có thể được biến đổi để có một nhóm chức kết hợp với nhóm chức trên kênh thứ hai.

<Phương án 2> Sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích (dụng cụ phát hiện gen gây bệnh)

Phương án 2-1: Phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất (phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*))

Bước thao tác 1: Thao tác chuẩn bị dụng cụ vi lỏng

Theo một phương án của sáng chế, dụng cụ vi lỏng (Tủ nuôi cấy dùng cho kỹ thuật hiển vi không được phủ loại 1 III 3 trong một - 1 III ³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber (ibidi)) được chuẩn bị để sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích (dụng cụ vi lỏng phát hiện gen gây bệnh). Dụng cụ vi lỏng theo sáng chế bao gồm tấm 100; cửa vào 101 được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài; kênh thứ nhất 102 được nối với cửa vào để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này; kênh thứ hai 103 được nối với kênh thứ nhất; và cửa ra 104 được nối với kênh thứ hai (xem FIG.1). Kênh thứ hai 103 có thể được nối với kênh thứ nhất và có thể phân thành hai hay nhiều nhánh (ví dụ, ba nhánh).

Bước thao tác 2: Thao tác phủ kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng

Hòa tan 5-hydroxydopamin HCl 1mg/ml (Sigma Aldrich) trong dung dịch đệm Tris 10mM (UltraPure 1M Tris-HCl 1M, pH 8,0, Invitrogen). Tiếp theo, điều chỉnh độ pH của sản phẩm thu được đến 8, theo đó điều chế được chế phẩm phủ. Kênh thứ hai của dụng cụ (1 III ³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber (ibidi)) được nạp đầy bằng chế phẩm phủ. Sau hai giờ, rửa kênh thứ hai bằng cách sử dụng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Bước thao tác 3: Thao tác cố định (kết hợp) đoạn môi liên kết với khuôn trên kênh thứ hai được phủ

Đoạn môi-5SS-polyA9 (Primer-5SS-polyA9) (BIONEER, Số trình tự 9) được sử dụng làm đoạn môi.

Sau khi điều chế 100 pmol đoạn mồi và DTT 5M (DL-Dithiothreitol, Sigma Aldrich), trộn 100 pmol đoạn mồi này và 5 μ l DTT 5 M, và thêm DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE) vào dung dịch này để được tổng thể tích là 50 μ l. Hỗn hợp này được xử lý bằng DTT trong bốn giờ để phá vỡ liên kết disulfua của đoạn mồi này, sau đó loại bỏ DTT còn lại bằng cách sử dụng ống Amicon 3K (Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K, MILLIPORE) (Eppendorf Centrifuge 5415R) (thực hiện ly tâm tổng cộng hai lần để loại bỏ triệt để DTT, bao gồm ly tâm lần thứ nhất trong 25 phút ở tốc độ 132.000 vòng trên phút và 4°C và ly tâm lần thứ hai trong 25 phút ở tốc độ 132.000 vòng trên phút và 4°C có bổ sung 40 μ l DDW). 5 μ l dung dịch thu được sau khi loại bỏ DTT được đưa vào mỗi nhánh trong số ba nhánh của kênh thứ hai 103 (kênh 1: nhánh bên trái của kênh thứ hai của FIG.1, kênh 2: nhánh giữa của kênh thứ hai của FIG.1, và kênh 3: nhánh bên phải của kênh thứ hai của FIG.1) và được giữ lại trong hai giờ, tiếp theo là rửa bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Bước thao tác 4: Thao tác kết hợp khuôn bao gồm vùng liên kết bổ sung với gen đích, vùng liên kết bổ sung với đoạn mồi, và vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo ra hình dạng quả tạ có đoạn mồi (thao tác kết hợp đoạn mồi-khuôn)

Tham khảo FIG.1, khuôn được gắn với kênh thứ hai 103 qua mỗi cửa ra 104, theo đó kết hợp và cố định mỗi khuôn với đoạn mồi được cố định trên kênh thứ hai 103 có các nhánh. Đối với đối chứng âm, không có khuôn nào được gắn với kênh thứ hai. Cụ thể là, khuôn cho *Bacillus anthracis* (Khuôn_B_A, Số trình tự 10) được gắn với kênh 2 của kênh thứ hai có ba nhánh (nhánh giữa của kênh thứ hai của FIG.1), và kênh 1 và kênh 3 được sử dụng là các đối chứng âm. Cụ thể là, thêm 1X PBS (Gibco của hãng Life Technologies) vào 0,2 μ l (=20 pmol) 100Khuôn_B_A đến thể tích 5 μ l và được đưa vào kênh 2, trong khi 6 μ l 1X PBS (Gibco bởi của Life Technologies) được đưa vào kênh 1 và kênh 3. Sau khi giữ trong hai giờ, kênh thứ hai được rửa bằng DDW (Hệ thống lọc nước / LABOGENE).

Phương án 2-2: Phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích (phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen gây bệnh (*Bacillus anthracis* và virus Ebola))

Bước thao tác 1: Thao tác chuẩn bị dụng cụ vi lỏng

Theo một phương án của sáng chế, dụng cụ vi lỏng (1 III ³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber (ibidi)) được chuẩn bị để sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen

đích (dụng cụ vi lỏng phát hiện gen gây bệnh). Dụng cụ vi lỏng theo sáng chế bao gồm tấm 100; cửa vào 101 được tạo ra trên tấm này và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài; kênh thứ nhất 102 được nối với cửa vào để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này; kênh thứ hai 103 được nối với kênh thứ nhất; và cửa ra 104 được nối với kênh thứ hai (xem FIG.1). Kênh thứ hai 103 có thể được nối với kênh thứ nhất và có thể phân chia thành hai hay nhiều nhánh (ví dụ, ba nhánh).

Bước thao tác 2: Thao tác phủ kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng

Hòa tan 1mg/ml 5-hydroxydopamin HCl (Sigma Aldrich) trong dung dịch đệm Tris 10mM (UltraPure 1M Tris-HCl 1M, pH 8,0, Invitrogen). Tiếp theo, điều chỉnh độ pH của sản phẩm thu được đến 8, bằng cách đó điều chế chế phẩm phủ. Kênh thứ hai của dụng cụ (1 III³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber (ibidi)) được nạp đầy bằng chế phẩm phủ. Sau hai giờ, rửa kênh thứ hai bằng cách sử dụng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Bước thao tác 3: Thao tác cố định (kết hợp) đoạn môi liên kết với khuôn trên kênh thứ hai được phủ

Đoạn môi-5SS-polyA9 (Primer-5SS-polyA9) (BIONEER, Số trình tự 9) được sử dụng làm đoạn môi.

Sau khi điều chế 100 pmol đoạn môi và DTT 5M (DL-Dithiothreitol, Sigma Aldrich), trộn 100 pmol đoạn môi này và 5 µl DTT 5 M, và thêm DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE) vào dung dịch này để được tổng thể tích 50 µl. Hỗn hợp này được xử lý bằng DDT trong bốn giờ để phá vỡ liên kết disulfua của đoạn môi, sau đó loại bỏ DTT còn lại bằng cách sử dụng ống Amicon 3K (Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K, MILLIPORE) (Eppendorf Centrifuge 5415R) (thực hiện ly tâm tổng cộng hai lần để loại bỏ triệt để DTT, bao gồm ly tâm lần thứ nhất trong 25 phút ở tốc độ 132.000 vòng trên phút và 4°C và ly tâm lần thứ hai trong 25 phút ở tốc độ 132.000 vòng trên phút và 4°C có bổ sung 40 µl DDW). 5µl dung dịch sau khi loại bỏ DTT đi vào mỗi nhánh trong số ba nhánh của kênh thứ hai 103 (kênh 1: nhánh bên trái của kênh thứ hai của FIG.1, kênh 2: nhánh giữa của kênh thứ hai của FIG.1, và kênh 3: nhánh bên phải của kênh thứ hai của FIG.1) và được giữ lại trong hai giờ, tiếp theo là rửa bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Do vậy, đoạn môi này có thể được cố định trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng (xem phần A của FIG.3).

Bước thao tác 4: Thao tác kết hợp khuôn bao gồm vùng liên kết bổ sung với gen đích, vùng liên kết bổ sung với đoạn môi, và vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo ra hình dạng quả tạ có đoạn môi (thao tác kết hợp đoạn môi-khuôn)

Tham khảo FIG.1, khuôn được gắn với kênh thứ hai 103 qua mỗi cửa ra 104, theo đó kết hợp và cố định mỗi khuôn với đoạn môi được cố định trên kênh thứ hai 103 có các nhánh. Đối với đối chứng âm, không có khuôn nào được gắn với kênh thứ hai. Cụ thể là, khuôn cho virus Ebola (Khuôn_E) được gắn với kênh 2 của kênh thứ hai có ba nhánh (nhánh giữa của kênh thứ hai của FIG.1), khuôn cho *Bacillus anthracis* (Khuôn_B_A) được gắn với kênh 3 của kênh thứ hai (nhánh bên trái của kênh thứ hai của FIG.1), và kênh 1 được sử dụng là đối chứng âm. Cụ thể là, thêm 1X PBS (Gibco của hãng Life Technologies) vào 0,24 μ l (=24 pmol) 100Khuôn_E (Số trình tự 11) đến thể tích 6 μ l và đi vào kênh 3. Thêm 1X PBS (Gibco của hãng Life Technologies) vào 0,2 μ l (=20 pmol) 100Khuôn_B_A (Số trình tự 10) đến thể tích 5 μ l và đi vào kênh 2, trong khi 6 μ l 1X PBS (Gibco của hãng Life Technologies) được đưa vào kênh 1 và kênh 3. Sau khi được giữ lại trong hai giờ, rửa kênh thứ hai bằng DDW (Hệ thống lọc nước / LABOGENE).

Do vậy, đoạn môi được cố định trên kênh thứ hai có thể được kết hợp với các khuôn này (xem phần B của FIG.3). Các khuôn khác nhau để nhận diện các gen đặc hiệu của bệnh có thể liên kết với đoạn môi được cố định trên các nhánh tương ứng của kênh thứ hai, do đó phát hiện các gen đích khác nhau một cách đồng thời.

<Phương án 3> Phương pháp xác định gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích

Nguyên tắc phát hiện gen đích

Phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích dựa trên nguyên tắc trong đó khuôn có dạng hình quả tạ dạng đóng kín có điểm cắt biến mất được nối chỉ khi có mặt gen đích (ví dụ, gen gây bệnh) và sau đó được khuếch đại bằng kỹ thuật khuếch đại vòng lăn tròn (rolling circle amplification - RCA) để tạo cấu trúc chính xác tự lắp ráp của các hạt (xem FIG.2).

FIG.12 là sơ đồ cụ thể minh họa quá trình của FIG.3B đến FIG.3D. Tức là, FIG.12A cho thấy khuôn liên kết với đoạn môi được cố định trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo sáng chế. Khi các gen đích của tác nhân gây bệnh có trong mẫu chảy vào kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích, các

gen đích của tác nhân gây bệnh liên kết với cả vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai của khuôn này (FIG.12B và FIG.2B). Tại đây, khi các đầu đối diện nhau của vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai trở nên gần nhau hơn, chỉ một khoảng cách nhỏ, tức là, một điểm cắt, ở giữa hai đầu này. Đồng thời, vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất và vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai cũng trở nên gần nhau để tạo ra liên kết bổ sung. Các điểm cắt được nối với nhau bởi enzym ligaza là enzym kết nối các đầu 5' và 3' liền kề, sao cho khuôn này chuyển từ dạng kín hoàn toàn thành dạng hình quả tạ (FIG.12 và FIG.2C).

Enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt thực hiện quá trình khuếch đại RCA của axit nucleic sao chép lặp lại vô hạn sử dụng khuôn dạng đóng kín để phát hiện gen đích làm khuôn cho đến khi dNTP cạn kiệt (xem FIG.12D và FIG.2D). Khi phân sao chép được dịch chuyển khỏi khuôn để phát hiện gen đích, axit nucleic mạch thẳng có trình tự lặp lại của khuôn này để phát hiện gen đích được tạo ra. Vùng liên kết gen đích thứ nhất và vùng liên kết gen đích thứ hai của axit nucleic mạch thẳng này được kết hợp với các gen đích, và khối axit nucleic dài rồi được tạo ra bởi kỹ thuật RCA và được kết bông với lớp phủ của kênh thứ hai thành khối hydrogel lớn. Quan sát thấy rằng khối hydrogel được tạo thành có mặt trên kênh thứ hai và chặn cửa ra được nối với kênh thứ hai này.

Phương án 3-1: Phương pháp xác định gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất (phương pháp phát hiện gen đích của tác nhân gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*) sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất)

Bước thao tác 1: Thao tác chuẩn bị dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất (dụng cụ vi lỏng phát hiện gen gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*)) theo Phương án 2-1

Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất được cung cấp (chuẩn bị). Cụ thể là, dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất (dụng cụ vi lỏng phát hiện gen gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*)) được cung cấp theo Phương án 2-1.

Bước thao tác 2: Thao tác đưa dung dịch mẫu vào kênh thứ nhất

(1) Điều chế dung dịch mẫu

Mẫu (Tác nhân gây bệnh_BA, Số trình tự 12) được điều chế trên cơ sở trình tự gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* bằng cách đặt mua từ hãng Bioneer (Tinh chế bằng HPLC). Dung dịch mẫu được điều chế bằng cách sử dụng Tác nhân gây

bệnh_B_A 100 trong 1X PBS.

Bảng 4 dưới đây minh họa trình tự khuôn và gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* được sử dụng trong Phương án 3.

[Bảng 4]

Loại tác nhân gây bệnh	Số trình tự	Trình tự khuôn (5' → 3')	Số trình tự	Trình tự gen gây bệnh
<i>Bacillus anthracis</i>	10	5'-phosphat TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA phosphat-3'

(2) Bước thao tác đưa dung dịch mẫu được điều chế trong bước (1) vào kênh thứ nhất

60 µl dung dịch mẫu được điều chế trong bước thao tác (1) được đưa vào kênh thứ nhất qua cửa vào của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất. Dung dịch mẫu, được đưa vào kênh thứ nhất của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất, được vận chuyển nhờ hiện tượng mao dẫn đến kênh thứ hai qua kênh thứ nhất. Sau khi giữ trong hai giờ, rửa dụng cụ này bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Bước thao tác 3: Nối gen đích duy nhất (gen gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*)) được bao gồm trong dung dịch mẫu và khuôn

Dung dịch mẫu được đưa vào kênh thứ nhất chảy vào kênh thứ hai do hiện tượng mao dẫn.

Tiếp theo, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất được nạp đầy bằng 30 µl 2X T7 ligaza, 5 µl T7 ligaza 5, 0,2 µl DTT 100 mM, và 24,8 µl DDW (Hệ thống lọc nước/LABOGENE). Để tránh sự bay hơi ẩm trong dụng cụ này, cho hỗn hợp này phản ứng với dung dịch mẫu trong vật chứa bằng nhựa được bịt kín bằng màng parafilm. Vật chứa bằng nhựa này được nạp đầy bằng mô đã được thấm ướt bằng nước và nước ở 25°C. Tiếp theo, các chất phản ứng được trải qua phản ứng trong điều kiện không lắc ở 25°C trong 3 giờ trong tủ ẩm lắc (VS-8480 (của hãng VISION SCIENTIFIC CO)).

Bước thao tác 4: Khuếch đại (kỹ thuật khuếch đại vòng lăn tròn) sản phẩm gen đã nói

Tiếp theo, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất được nạp đầy bằng 2 μ l dNTP 25 mM, 6 μ l dung dịch đệm phản ứng 10X T7 ligaza (Biolabs), 50 μ l phi 29 polymeraza (10 đơn vị/ μ l), 1 μ l pyrophosphatase, và 1 μ l DTT 100 mM. Thực hiện phản ứng trong vật chứa bằng nhựa được bịt kín bằng màng parafilm để tránh sự bay hơi ẩm trong kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất. Vật chứa bằng nhựa được nạp đầy bằng mô đã được thấm ướt bằng nước và nước ở 30°C. Tiếp theo, các chất phản ứng được phản ứng trong điều kiện không lắc ở 30°C trong 3 giờ trong tủ ẩm lắc (VS-8480 (của hãng VISION SCIENTIFIC CO)).

Bước thao tác 5: Phát hiện sản phẩm gen đích được khuếch đại (Xác định gen đích được phát hiện)

50 μ l dung dịch pha loãng GelRed (GelRed™, Biotium) tỷ lệ 1:1000 (được pha loãng bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE)) được thêm vào làm chế phẩm phát hiện qua cửa vào. Cho dung dịch pha loãng GelRed (GelRed™, Biotium) tỷ lệ 1:200 chảy vào kênh thứ hai qua kênh thứ nhất. Mặc dù GelRed (GelRed™, Biotium) được pha loãng với tỷ lệ 1:10000 thường được sử dụng, tỷ lệ của dung dịch Gelred pha loãng vẫn được điều chỉnh để nhìn thấy màu sắc bằng mắt thường và không chỉ giới hạn ở những tỷ lệ đó.

Tham khảo phần a của FIG.9, vết đỏ trên kênh 2 là màng ADN, và có thể phát hiện sản phẩm gen đích được khuếch đại bằng cách sử dụng thuốc nhuộm, như GelRed, làm chế phẩm phát hiện. Ngoài ra, tham khảo phần b của FIG.9, thật dễ dàng nhận ra bằng cách sử dụng máy chụp ảnh gel (Gel Doc™ EZ, Bio-Rad) rằng dòng chảy trên kênh 2 của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất bị chặn. Do vậy, xác định được rằng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất theo sáng chế cho phép phát hiện gen đích duy nhất, ví dụ, gen gây bệnh duy nhất (*Bacillus anthracis*), bằng mắt thường ở nhiệt độ ẩm, ví dụ, nhiệt độ 30°C, mà không cần sử dụng máy luân nhiệt và không cần nhiệt độ thay đổi đặc biệt.

Phương án 3-2: Phương pháp xác định gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích (phương pháp phát hiện gen đích duy nhất gây bệnh

(*Bacillus anthracis* và virus Ebola) sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích).

Bước thao tác 1: Thao tác chuẩn bị dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích (dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen gây bệnh (*Bacillus anthracis* và virus Ebola)) theo Phương án 2-2.

Dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích được cung cấp (chuẩn bị). Cụ thể là, dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích (dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen gây bệnh (*Bacillus anthracis* và virus Ebola)) được cung cấp theo Phương án 2-2.

Bước thao tác 2: Thao tác đưa dung dịch mẫu vào kênh thứ nhất

(1) Điều chế dung dịch mẫu

Mẫu (Tác nhân gây bệnh_BA, Số trình tự 12) được điều chế trên cơ sở trình tự gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* bằng cách đặt mua từ hãng Bioneer (Tinh chế bằng HPLC). Dung dịch mẫu được điều chế bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh_B_A 100 trong 1X PBS.

(2) Điều chế mẫu

Các mẫu (tác nhân gây bệnh_BA, Số trình tự 12 và tác nhân gây bệnh_E, Số trình tự 13) được điều chế trên cơ sở các trình tự gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* và virus Ebola bằng cách đặt hàng từ hãng Bioneer (tinh chế bằng HPLC). Dung dịch mẫu được điều chế bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh_B_A 100 trong 1X PBS. Ngoài ra, dung dịch mẫu được điều chế bằng cách sử dụng tác nhân gây bệnh_E 100 trong 1X PBS.

Bảng 5 dưới đây minh họa các khuôn này và các trình tự gen gây bệnh của *Bacillus anthracis* và virus Ebola được sử dụng trong Phương án 2.

[Bảng 5]

Loại nguồn gây bệnh	Số trình tự	Trình tự khuôn (5' → 3')	Số trình tự	Trình tự gen gây bệnh
<i>Bacillus anthracis</i>	10	5'-phosphat-TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA- phosphat-3'

		CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'		
Virut Ebola	11	5'-phosphat-GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG G TA GCA T GC TA G T AT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'	13	5'-CGC GTG CGT CGT GCG ATT TCT CGT T-phosphat-3'

(2) Bước thao tác đưa dung dịch mẫu được điều chế trong bước thao tác (1) vào kênh thứ nhất

60 µl dung dịch mẫu được điều chế trong bước thao tác (1) được đưa vào kênh thứ nhất qua cửa vào của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất. Dung dịch mẫu, được đưa vào kênh thứ nhất của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất, được chuyển tới kênh thứ hai qua kênh thứ nhất. 5 µl trong tổng số 20 µl Khuôn_E và 5 µl trong tổng số 20 µl Khuôn_B_A được đưa vào kênh 2 và kênh 3 của kênh thứ hai. Sau khi được giữ lại trong hai giờ, rửa dụng cụ này bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE).

Bước thao tác 3: Nối hai hay nhiều gen đích (hai hay nhiều gen gây bệnh (Bacillus anthracis và virut Ebola)) được bao gồm trong dung dịch mẫu và khuôn

Kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất được nạp đầy bằng 30 µl 2X T7 ligaza, 5 µl T7 ligaza 5, 0,2 µl DTT 100 mM, và 24,8 µl DDW (Hệ thống lọc nước/LABOGENE). Để tránh sự bay hơi ẩm trong dụng cụ, thực hiện phản ứng trong vật chứa bằng nhựa được bịt kín bằng màng parafilm. Vật chứa bằng nhựa được nạp đầy bằng mô đã được thấm ướt bằng nước và nước ở 25°C. Tiếp theo, các chất phản ứng được phản ứng trong điều kiện không lắc ở 25°C trong 3 giờ trong tủ ẩm lắc (VS-8480 (hãng VISION SCIENTIFIC CO)).

Do vậy, gen đích (gen gây bệnh) có mặt trong mẫu liên kết bổ sung với khuôn đặc hiệu này để tạo thành khuôn hình vòng (xem phần C của FIG.3).

Bước thao tác 4: Khuếch đại (kỹ thuật khuếch đại vòng lăn tròn) sản phẩm gen đã nối

<Phương pháp 1>

Tiếp theo, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích

được nạp đầy bằng 2 μ l dNTP 25 mM, 6 μ l dung dịch đệm phản ứng 10X T7 ligaza (Biolabs), 50 μ l phi 29 polymeraza (10 đơn vị/ μ l), 1 μ l pyrophosphatase, và 1 μ l DTT 100 mM. Thực hiện phản ứng trong vật chứa bằng nhựa được bịt kín bằng màng parafilm để tránh sự bay hơi ẩm trong kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích. Vật chứa bằng nhựa được nạp đầy bằng mô được thấm ướt bằng nước và nước ở 30°C. Tiếp theo, các chất phản ứng được phản ứng trong điều kiện không lắc ở 30°C trong 3 giờ trong tủ ẩm lắc (VS-8480 (hãng VISION SCIENTIFIC CO)).

<Phương pháp 2>

Tiếp theo, kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích được nạp đầy bằng 2 μ l dNTP 25 mM, 1 μ l Biotin-14-dCTP 0,4 mM, 2 μ l dung dịch đệm phản ứng 10X T7 ligaza (Biolabs), 5 μ l phi 29 polymeraza (500 đơn vị/ μ l), 1 μ l pyrophosphatase, 0,8 μ l DTT 100 mM, và 6,2 μ l DDW. Thực hiện phản ứng trong vật chứa bằng nhựa được bịt kín bằng màng parafilm để tránh sự bay hơi ẩm trong kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích. Vật chứa bằng nhựa được nạp đầy bằng mô được thấm ướt bằng nước và nước ở 30°C. Tiếp theo, cho các chất phản ứng phản ứng ở 30°C trong 3 giờ trong tủ ẩm lắc (VS-8480 (hãng VISION SCIENTIFIC CO)).

Gen đích (axit nucleic) có thể được khuếch đại bằng RCA theo Phương pháp 1 hoặc Phương pháp 2 (xem phần D của FIG.3).

Bước thao tác 5: Phát hiện sản phẩm gen đích được khuếch đại (Xác định gen đích được phát hiện)

Sản phẩm gen mạch đơn rồi được khuếch đại vòng lăn tròn (xem phần E của FIG.3) có thể chặn theo cách chọn lọc từng nhánh của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng, và do đó có thể phát hiện gen này. Chế phẩm phát hiện có thể được thêm vào kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng, nhờ đó dễ dàng phát hiện gen đích (xem phần F của FIG.3).

<Phương pháp phát hiện liên quan đến Phương pháp 1 trong Bước thao tác 4>

50 μ l dung dịch pha loãng GelRed (GelRed™, Biotium) tỷ lệ 1:1000 (được pha loãng bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE)) được thêm vào làm chế phẩm phát hiện qua cửa vào. Dung dịch pha loãng GelRed (GelRed™, Biotium) tỷ lệ 1:80 được cho chảy vào kênh thứ hai qua kênh thứ nhất.

Tham khảo phần b của FIG.10, thật dễ dàng nhận ra bằng cách sử dụng máy

chụp ảnh gel (Gel DocTM EZ, Bio-Rad) rằng dòng chảy trên kênh 2 và kênh 3 của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích bị chặn. Do vậy, xác định được rằng dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích theo sáng chế có khả năng phát hiện đồng thời hai hay nhiều gen đích, ví dụ, hai hay nhiều gen gây bệnh (*Bacillus anthracis* và virus Ebola), bằng mắt thường ở nhiệt độ ẩm, ví dụ, nhiệt độ 30°C, mà không cần sử dụng máy luân nhiệt và không cần nhiệt độ thay đổi đặc biệt.

<Phương pháp phát hiện liên quan đến Phương pháp 2 trong Bước thao tác 4>

Các hạt Streptavidin được sử dụng làm chế phẩm phát hiện. Cụ thể là, thêm 50 µl dung dịch pha loãng Streptavidin Fluoresbrite YG Microspheres 2.0 Micro tỷ lệ 1:20 (được pha loãng bằng DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE)) vào qua cửa vào.

Tham khảo FIG.11, thật dễ dàng nhận ra rằng dòng chảy trên kênh 2 và kênh 3 của dụng cụ vi lỏng phát hiện hai hay nhiều gen đích bị chặn bởi một lớp không khí do sản phẩm RCA hoặc bị chặn bởi sản phẩm RCA còn được làm rối thêm bởi phản ứng biotin giữa sản phẩm RCA và streptavidin. Do vậy, xác định được rằng dụng cụ vi lỏng này phát hiện hai hay nhiều gen đích theo sáng chế cho phép phát hiện đồng thời hai hay nhiều gen đích, ví dụ, hai hay nhiều gen gây bệnh (*Bacillus anthracis* và virus Ebola), bằng mắt thường ở nhiệt độ ẩm, ví dụ, nhiệt độ 30°C, mà không cần sử dụng máy luân nhiệt và không cần nhiệt độ thay đổi đặc biệt.

<Phương án thí nghiệm 1> Xác định kết quả điện di của từng bước thao tác

Tiến hành một thí nghiệm để xác định sự liên kết và sự nối giữa Khuôn_BA được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1 và tác nhân gây bệnh bằng cách sử dụng kết quả điện di. Theo phương án thí nghiệm 1, thí nghiệm này đơn giản được thực hiện trong ống để xác định phản ứng giữa khuôn theo phương án chuẩn bị 1 và tác nhân gây bệnh. Ngoài ra, máy luân nhiệt được sử dụng cho các thử nghiệm trong các điều kiện phản ứng khác nhau. Ngoài ra, tiến hành một thí nghiệm để xác định sự liên kết và sự nối giữa Khuôn_E được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1 và tác nhân gây bệnh bằng cách sử dụng kết quả điện di. Trong thí nghiệm trong ống, do khuôn không được cố định vào đoạn môi, nên phosphat không được gắn vào đầu 3' của mỗi tác nhân gây bệnh, tức là, đầu 3' của gen gây bệnh.

(1) Xác định trong bước thao tác ghép

Khuôn cho 100 *Bacillus anthracis* (Khuôn_BA, Số trình tự 10) được pha loãng

bằng DEPC (Sigma-Aldrich) là dung môi vào trong 1Khuôn_BA. Lần lượt cho 3,2 µl DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE), 1 µl 10X PBS có độ pH 7,4 (Gibco của hãng Life Technologies), và 5 µl MgCl₂ 40 mM (Sigma-Aldrich) vào trong ống, thêm 0,8 µl (tức là, 0,8 pmol) 1Khuôn_BA vào ống này. Sau đó, giảm nhiệt độ trong một giờ từ 95°C xuống 4°C bằng cách sử dụng máy luân nhiệt (Bio-Rad T100™).

Tiếp theo, thêm 2 µl thuốc nhuộm tải mẫu (Dung dịch đệm tải mẫu dạng gel màu xanh dương đậm đặc 6 lần - Gel Loading Dye Blue 6X, Biolabs) vào, tiếp theo điện di trong PAGE 15% trong dung dịch đệm 1X Tris-borat-EDTA (TBE) (150 V, 45 phút) và nhuộm bằng GelRed (GelRed™, Biotium), theo đó xác định kết quả điện di bằng cách sử dụng Gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

Thí nghiệm để xác định bước thao tác ghép được tiến hành theo cách tương tự ngoại trừ việc sử dụng Khuôn_E (Số trình tự 11) thay cho Khuôn_BA.

(2) Xác định bước thao tác lai hóa

Tiến hành thí nghiệm như sau để xác định sự lai hóa giữa *Bacillus anthracis* (Tác nhân gây bệnh_BA Not Phosp, Số trình tự 14) trong mẫu với khuôn. Đầu tiên, lần lượt cho 2 µl DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE), 1 µl 10X PBS có độ pH 7,4 (Gibco của hãng Life Technologies), và 5 µl MgCl₂ 40 mM (Sigma-Aldrich) vào trong ống, thêm 1 µl 10 Tác nhân gây bệnh_BA_Not Phosp và 1 µl 10Khuôn_B_A vào ống này. Sau đó, giảm nhiệt độ trong một giờ từ 95°C xuống 4°C bằng cách sử dụng máy luân nhiệt (Bio-Rad T100™).

Tiếp theo, 1 µl (tức là 0,8 pmol) khuôn này được pha loãng bằng 9 µl 1X PBS để có tổng số thể tích là 10 µl, sau đó thêm 2 µl thuốc nhuộm tải mẫu (dung dịch đệm tải mẫu dạng gel màu xanh dương đậm đặc 6 lần, Biolabs) vào, tiếp theo điện di trong PAGE 15% trong dung dịch đệm 1X Tris-borat-EDTA (TBE) (150 V, 45 phút) và nhuộm bằng GelRed (GelRed™, Biotium), theo đó xác định kết quả điện di bằng cách sử dụng gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

Bước thao tác lai hóa được xác định theo cách tương tự ngoại trừ việc sử dụng Khuôn_E (Số trình tự 11), thay cho Khuôn_BA (Số trình tự 1), và sử dụng Khuôn_E_Not Phosp (Số trình tự 15), thay cho tác nhân gây bệnh_BA_Not Phosp (Số trình tự 14).

(3) Xác định bước thao tác nối

Lần lượt cho 2,4 µl DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE), 10 µl dung dịch

đệm phản ứng 2X T7 ligaza (Biolabs), 1,6 µl 100TÁC nhân gây bệnh_BA_Not Phosp (Số trình tự 14), và 0,8 µl 100Khuôn_BA (Số trình tự 10) vào trong ống, và giảm nhiệt độ trong năm phút từ 95°C xuống 4°C bằng cách sử dụng máy luân nhiệt (Bio-Rad T100™). Tiếp theo, thêm 0,2 µl DTT 100 mM (Bộ thuốc thử Epicenter RepliPhi Phi29 (0,1 µg/µl)) và 5 µl T7 ligaza (Biolabs) vào. Sau đó, duy trì nhiệt độ ở 25°C trong 13 giờ, ở 65°C trong 20 phút, và ở 10°C bằng cách sử dụng máy luân nhiệt (Bio-Rad T100™). Kết quả là, thu được 20 µl sản phẩm nối. Thêm 2 µl thuốc nhuộm tải mẫu (Dung dịch đệm tải mẫu dạng gel màu xanh dương đậm đặc 6 lần, Biolabs) vào 0,8 pmol sản phẩm nối, tiếp theo điện di trong PAGE 15% trong dung dịch đệm 1X Tris-borat-EDTA (TBE) (150 V, 45 phút) và nhuộm bằng GelRed (GelRed™, Biotium), theo đó xác định kết quả điện di bằng cách sử dụng gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

Bước thao tác nối được xác định theo cách tương tự ngoại trừ việc sử dụng Khuôn_E (Số trình tự 11), thay cho Khuôn_BA (Số trình tự 1), và sử dụng Khuôn_E_Not Phosp (Số trình tự 15), thay cho tác nhân gây bệnh_BA_Not Phosp (Số trình tự 14).

(4) Quá trình khuếch đại vòng lăn tròn

Lần lượt cho 7,2 µl DDW (Hệ thống lọc nước, LABOGENE), 2 µl dung dịch đệm phản ứng 10X T7 ligaza (Biolabs), và bộ thuốc thử Epicenter RepliPhi Phi29 (0,1 µg/µl) vào trong ống, thêm 2 µl (8 pmol) sản phẩm nối thu được trong bước thao tác nối vào. Sau đó, lần lượt thêm 2 µl dNTP 25 mM (bộ thuốc thử Epicenter RepliPhi Phi29 (0,1 µg/µl)), 0,8 µl DTT 100 mM (bộ thuốc thử Epicenter RepliPhi Phi29 (0,1 µg/µl)), 1 µl Pyrophosphatase (100 U/ml, Biolabs), và 5 µl Phi 29 polymerase (bộ thuốc thử Epicenter RepliPhi Phi29 (0,1 µg/µl)) vào. Sau đó, duy trì nhiệt độ ở 30°C trong 15 giờ, ở 65°C trong 10 phút, và ở 4°C bằng cách sử dụng máy luân nhiệt (Bio-Rad T100™).

(5) Xác định kết quả điện di

Trên cơ sở thang chuẩn ADN (thang chuẩn LMW nạp nhanh, Biolabs), khuôn (Khuôn_BA, Số trình tự 10), tác nhân gây bệnh (Tác nhân gây bệnh_BA_Not Phosp, Số trình tự 14), và 0,8 pmol mỗi sản phẩm trong số các sản phẩm thu được trong bước thao tác (1) đến (3) được nạp tải và cho chạy điện di, các kết quả được minh họa trong FIG.4.

Tham khảo FIG.4, khuôn thường có dạng tuyến tính, tức là, là khuôn tuyến tính

(xem phần a của FIG.4). Trong khuôn này, các vùng liên kết bổ sung trên khuôn để tạo thành dạng hình quả tạ liên kết bổ sung với một vùng khác để được gắn trong các điều kiện tự lắp ráp, do đó tạo thành dạng tự lắp ráp, tức là, khuôn tự lắp ráp (xem phần b của FIG.4). Khi gen đích, ví dụ, gen gây bệnh, liên kết với vùng liên kết bổ sung với gen đích trên khuôn tự lắp ráp, khuôn này được tạo thành khuôn dạng hình quả tạ dạng đóng kín có điểm cắt biến mất và được nối (xem phần c của FIG.4). Sau đó, sản phẩm nối được khuếch đại vòng lăn tròn RCA.

<Phương án thí nghiệm 2> Xác định hình ảnh SEM của sản phẩm RCA

(1) Xác định *Bacillus anthracis*

20 μ l sản phẩm RCA, thu được bằng cách sử dụng Khuôn_B_A được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1 theo phương pháp (4) của phương án thí nghiệm 1, được trộn với 2 μ l $MgCl_2$ 2M và được làm lạnh từ từ (từ 95°C xuống 4°C trong một giờ), sao cho khối ADN hình cầu nhỏ màu trắng cỡ khoảng 1 mm được tạo thành.

Làm khô khối ADN này trong 24 giờ trên kính thủy tinh (MARIENFELD), gắn với mica (các tấm mica Pelco, Ted Pella Corp.), và được chụp ảnh bằng SEM (kính hiển vi để bàn Tm3030, Hitachi High-Tech). Như được thể hiện trong FIG.5, khối ADN mạch đơn dạng mảnh được tạo thành.

(2) Xác định virus Ebola

20 μ l sản phẩm RCA, thu được bằng cách sử dụng Khuôn_E được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1 theo phương pháp (3) của phương án thí nghiệm 1, được trộn với NH_4OAc 40 5M (SIGMA-Aldrich), và thêm EtOH 500 100% vào hỗn hợp này, tiếp theo làm lạnh hỗn hợp trong 20 phút. Chạy ly tâm sản phẩm thu được (10.000 vòng trên phút, 20 phút, 4°C), và thực hiện phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm với 40 μ l dịch nổi trên bề mặt (BRANSON 5510) trong 30 phút. Làm khô sản phẩm này trong 24 giờ trên kính thủy tinh, được gắn với mica (các tấm mica Pelco, Ted Pella Corp.), và được chụp ảnh bằng SEM (kính hiển vi để bàn Tm3030, Hitachi High-Tech). Như được thể hiện trong FIG.6, sản phẩm gen được khuếch đại là khối mạch rời được tạo thành.

<Phương án thí nghiệm 3> Xác định sự tạo thành hydrogel của sản phẩm gen RCA

Tiến hành một thí nghiệm để xác định liệu sản phẩm gen được khuếch đại thu

được nhờ kỹ thuật RCA theo phương án thí nghiệm 1 có tạo thành hydrogel hay không. *Bacillus anthracis* (tác nhân gây bệnh_BA Not Phosp, Số trình tự 14) và virus Ebola (tác nhân gây bệnh_E Not Phosp, Số trình tự 15) được sử dụng làm các tác nhân gây bệnh.

Theo phương án thí nghiệm 3, thí nghiệm này đơn giản được thực hiện trong ống để xác định phản ứng giữa khuôn theo phương án chuẩn bị 1 và các tác nhân gây bệnh. Ngoài ra, máy luân nhiệt được sử dụng cho các thử nghiệm trong các điều kiện phản ứng khác nhau.

Về việc đo độ nhớt do sự tạo thành hydrogel, độ nhớt và phép đo độ nhớt quay được thực hiện bằng cách sử dụng ống và đầu pipet.

(1) Đo độ nhớt bằng cách sử dụng ống và đầu pipet

Độ chảy loãng của chất lỏng phản ứng (dung dịch chứa sản phẩm RCA thu được trong bước thao tác (4) phương án thí nghiệm 1) được đo trong khi làm nghiêng ống 90 độ so với trục chính của ống này. Việc không xác định được độ chảy loãng trong 60 giây chỉ ra rằng gen đích, ví dụ, gen gây bệnh (Khuôn_BA hoặc Khuôn_E), được phát hiện.

Ngoài ra, khi chất lỏng phản ứng (dung dịch chứa sản phẩm RCA thu được trong bước thao tác (4) phương án thí nghiệm 1) được rút (hút) ra bằng cách sử dụng đầu pipet, chất lỏng phản ứng (dung dịch chứa sản phẩm RCA thu được trong bước thao tác (4) phương án thí nghiệm 1) được hút lên dọc theo bề mặt của đầu pipet do sự thay đổi độ nhớt. Khi chất lỏng này có độ nhớt tương tự độ nhớt của nước, không có chất lỏng nào được hút lên dọc theo đầu này. Tuy nhiên, khi độ nhớt của chất lỏng này tăng, vật liệu được hút lên thêm dọc theo đầu này và chảy ngược lại (xem phần a của FIG.7).

Trong quá trình khuếch đại RCA sử dụng Khuôn_BA hoặc Khuôn_E, được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1, sản phẩm này có độ nhớt đến mức hầu như không thể hiện độ chảy loãng trong 60 giây, tạo khả năng phát hiện gen đích, ví dụ, gen gây bệnh (Khuôn_BA hoặc Khuôn_E). Ngoài ra, xác định được rằng hydrogel có độ nhớt lớn hơn được tạo thành bằng cách sử dụng Khuôn_E có chiều dài lớn hơn bổ sung với tác nhân gây bệnh so với việc sử dụng Khuôn_BA.

(2) Đo bằng nhớt kế quay

Sự thay đổi độ nhớt của sản phẩm gen được khuếch đại thu được từ quá trình

RCA được bọc lộ theo phương án thí nghiệm 1 bằng cách sử dụng Khuôn_E, khuôn này được sản xuất theo phương án chuẩn bị 1, được đo bằng cách sử dụng nhót kế quay. Sự tăng dần về mức thay đổi độ nhót của chất lỏng phản ứng (dung dịch chứa sản phẩm RCA thu được trong bước thao tác (4) của phương án thí nghiệm 1) và tỷ lệ giữa mô đun dự trữ (G') và mô đun tổn thất (G'') được đo, các kết quả đo được minh họa trong phần b của FIG.7 (trục x: tần số (Hz), trục y: Pascal (Pa)). Sự tăng dần về mức thay đổi độ nhót do tạo thành hydrogel cho thấy khả năng phát hiện gen đích, ví dụ, virus Ebola.

<Phương án thí nghiệm 4> Xác định hiệu quả của lớp phủ của kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích

Sau khi thực hiện phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo phương pháp của phương án 3-1, kênh thứ hai được quan sát bằng kính hiển vi đầu dò nguyên tử (AFM, NX-10, Park System). Sau khi thực hiện phương pháp phát hiện gen đích (phương pháp của phương án 3-1) sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất được sản xuất theo phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích duy nhất của phương án 2-1 ngoại trừ không thực hiện quá trình theo Bước thao tác 2 (không có quá trình phủ kênh thứ hai bằng 5-hydroxydopamin HCl), kênh thứ hai được quan sát bằng kính hiển vi đầu dò nguyên tử (AFM, NX-10, Park System).

Kết quả là, khi đoạn môi được cố định mà không có quá trình phủ sử dụng 5-hydroxydopamin HCl (quá trình tiền xử lý sử dụng 5-hydroxydopamin HCl) (phần a của FIG.8), đoạn môi này gần như không được gắn vào bề mặt của tấm này, và do đó không có quá trình khuếch đại xảy ra trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích. Ngược lại, khi gen đích (axit nucleic) được khuếch đại sau khi thực hiện quá trình phủ sử dụng 5-hydroxydopamin HCl (quá trình tiền xử lý sử dụng 5-hydroxydopamin HCl) và cố định đoạn môi (phần b của FIG.8), axit nucleic được khuếch đại mạnh mẽ trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích. Do vậy, điều đó chỉ ra rằng 5-hydroxydopamin HCl cố định hữu hiệu đoạn môi ADN trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích.

Do đó, khi phủ kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích bằng 5-hydroxydopamin HCl, 5-hydroxydopamin HCl phản ứng với đoạn môi chứa nhóm thiol, sao cho đoạn môi này được cố định hữu hiệu trên kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích, do đó làm tăng sự khuếch đại axit nucleic trong quá trình tiếp

theo.

<Phương án thí nghiệm 5> Phát hiện virus MERS sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích

(1) Sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen MERS đích

Như được mô tả nêu trên trong Bước thao tác 1 và Bước thao tác 2 của phương án 2, dụng cụ bao gồm cửa vào, kênh thứ nhất, ba kênh thứ hai, và các cửa ra được tạo ra ở đầu của các kênh thứ hai, được tạo ra trên tấm, được chuẩn bị như trong FIG.1. Mặc dù 5-hydroxydopamin HCl được đưa vào các kênh thứ hai để phủ các kênh thứ hai này theo phương án 2, nhưng các kênh thứ hai bằng vật liệu nhựa được phủ bằng nhóm vinyl bằng kỹ thuật lắng đọng pha hơi theo phương án thí nghiệm của sáng chế. Cũng có thể thực hiện việc phủ bằng phương pháp tương tự như theo phương án 2. Sau đó, rửa dụng cụ này bằng DDW.

Tiếp theo, như trong Bước thao tác 3 của phương án 2, dung dịch hỗn hợp gồm đoạn môi-5SS-polyA9 (Primer-5SS-polyA9) (BIONEER, Số trình tự 9) là đoạn môi và DTT được đưa vào qua cửa vào. Nhóm thiol có mặt trong đoạn môi này được cho tiếp xúc với DTT, và nhóm thiol được tiếp xúc này liên kết với lớp phủ vinyl (hoặc lớp phủ 5-hydroxydopamin HCl) trên kênh thứ hai. Tiếp theo, tiến hành rửa bằng DDW.

Thêm các dung dịch chứa 0,2 µl (=20 pmol) khuôn khác nhau 100 được pha loãng bằng 1X PBS (Gibco của hãng Life Technologies) vào đoạn môi được cố định trên ba kênh thứ hai, sao cho mỗi khuôn liên kết với đoạn môi này.

Cụ thể là, Khuôn_BA (khuôn cho *Bacillus anthracis*, Số trình tự 10) thu được trong bước thao tác (1) của phương án chuẩn bị 1 được liên kết với kênh thứ hai bên trái khi nhìn từ trên xuống. Kênh thứ hai này là đối chứng âm (NC). Mặc dù virus MERS có mặt trong mẫu được đưa vào dụng cụ vi lỏng này, thì virus MERS cũng không tương tác được với khuôn này, do đó không xảy ra quá trình khuếch đại RCA.

Khuôn cho virus MERS (MERS-CoV) được liên kết với kênh thứ hai ở giữa. Kênh thứ hai ở giữa là mẫu. Chỉ khi gen MERS có mặt trong mẫu được đưa vào dụng cụ vi lỏng này, quá trình khuếch đại RCA mới xảy ra. Khuôn cho virus MERS có trình tự sau đây.

Khuôn MERS

5'/5Phos/AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT
TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT
ACT TCG ATT ATA CCC - 3'

Trong trình tự khuôn MERS, vùng bổ sung với các gen MERS-CoV đích được xác định bởi kiểu chữ in đậm trên nền trắng, các vùng bổ sung trên khuôn được xác định bởi kiểu chữ in nghiêng có gạch dưới, và vùng liên kết bổ sung với đoạn môi này được xác định bởi kiểu chữ nghiêng có gạch dưới.

Khuôn cho virus MERS được liên kết với đoạn môi được cố định trên kênh thứ hai trên kênh thứ hai bên phải khi nhìn từ trên xuống, và khi thêm gen MERS đích để liên kết với khuôn này vào sẽ xảy ra quá trình khuếch đại RCA. Kênh thứ hai bên phải là đối chứng dương (PC).

(2) Phát hiện gen MERS đích

Tiếp theo, mẫu chứa gen virus MERS liên kết với khuôn dùng cho virus MERS được đưa vào qua cửa vào của dụng cụ vi lỏng được sản xuất trong bước thao tác (1). Sau đó, quá trình nổi xảy ra ở 25°C qua đêm, và quá trình khuếch đại RCA xảy ra ở 25°C trong bốn giờ. Thời gian nổi và thời gian RCA có thể được điều chỉnh phụ thuộc vào các điều kiện. Ví dụ, khi kết quả được xác định bằng cách sử dụng ánh sáng huỳnh quang, thời gian nổi và thời gian RCA có thể được điều chỉnh thậm chí còn ngắn hơn. Ví dụ, việc quan sát có thể được thực hiện sau hai giờ nổi và hai giờ khuếch đại RCA.

FIG.13 là sơ đồ minh họa quá trình xảy ra trong khuôn dụng cụ vi lỏng có ba kênh thứ hai, mà là đối chứng âm, mẫu, và đối chứng dương, như trong phương án thí nghiệm 5.

Kết quả được minh họa trong FIG.14. Trong FIG.14, cửa ra của kênh thứ hai bên phải là đối chứng âm không bị chặn, để mẫu chảy ra ngoài. Quá trình RCA xảy ra trên kênh thứ hai ở giữa là mẫu và kênh thứ hai bên phải là đối chứng dương để tạo thành khối hydrogel, mà chặn các cửa ra.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích bao gồm:

tấm (100);

cửa vào (101) được tạo ra trên tấm (100) và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài dụng cụ vi lỏng;

kênh thứ nhất (102) được nối với cửa vào (101) để chứa dung dịch mẫu được đưa vào;

kênh thứ hai (103) được nối với kênh thứ nhất (102);

cửa ra (104) được nối với kênh thứ hai (103);

lớp phủ bề mặt trên kênh thứ hai (103);

đoạn môi được cố định trên lớp phủ của kênh thứ hai (103); và

khuôn liên kết bổ sung với đoạn môi này,

trong đó:

- (a) khuôn này là Số nhận dạng trình tự:1, Số nhận dạng trình tự:2, Số nhận dạng trình tự:3, Số nhận dạng trình tự:4, Số nhận dạng trình tự:10, Số nhận dạng trình tự:11 hoặc Số nhận dạng trình tự:16,
- (b) khuôn này bao gồm các vùng liên kết đích bổ sung với gen đích, vùng liên kết đoạn môi bổ sung với đoạn môi này, và các vùng liên kết bổ sung trên khuôn,
- (c) các vùng liên kết đích bổ sung với gen đích được định vị riêng biệt tại hai đầu của khuôn này,
- (d) vùng liên kết đoạn môi bổ sung với đoạn môi này được định vị ở giữa các vùng liên kết bổ sung trên khuôn,
- (e) vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất trong số các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được định vị ở giữa vùng liên kết đoạn môi và vùng liên kết đích thứ nhất trong số các vùng liên kết đích,
- (f) vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai trong số các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được định vị ở giữa vùng liên kết đoạn môi và vùng liên kết đích thứ hai trong số các vùng liên kết đích, và
- (g) các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được tạo cấu hình nhằm liên kết bổ sung với nhau để tạo thành dạng hình quả tạ.

2. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó kênh thứ hai bao gồm 1 đến 20 kênh.

3. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó kênh thứ hai bao gồm 1 đến 20 kênh, các kênh thứ hai phân chia từ một đầu của kênh thứ nhất, và khuôn liên kết bổ sung với đoạn môi được cố định trên lớp phủ bề mặt của mỗi kênh thứ hai liên kết với một gen đích giống nhau hoặc khác nhau.
4. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó kênh thứ hai được phủ bề mặt bởi ít nhất một thành viên được chọn từ nhóm bao gồm 5-hydroxydopamin HCl, norepinephrin, epinephrin, pyrogallol amin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, catechin, các tanin, pyrogallol, pyrocatechol, heparin-catechol, chitosan-catechol, poly(etylen glycol)-catechol, poly(etylenimin)-catechol, poly(metyl metacrylat)-catechol, axit hyaluronic-catechol, polylysin-catechol, và polylysin.
5. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó đoạn môi có một đầu được biến đổi bởi ít nhất một thành viên được chọn từ nhóm bao gồm thiol, amin, hydroxyl, carboxyl, isothioxyanat, NHS este, aldehyt, epoxit, cacbonat, HOBt este, glutaraldehyt, carbamat, imidazol carbamat, maleimit, aziridin, sulfon, vinylsulfon, hydrazin, phenyl azit, benzophenon, anthraquinon, và dien.
6. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó lớp phủ bề mặt bao gồm 5-hydroxydopamin HCl, và đoạn môi có một đầu được biến đổi bởi nhóm thiol hoặc nhóm amin.
7. Dụng cụ vi lỏng theo điểm 1, trong đó gen đích có nguồn gốc từ ít nhất một tác nhân gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus gây bệnh cúm gia cầm, virus gây bệnh SARS, *Escherichia coli* O157:H7, vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Plasmodium*, *Salmonella*, virus Hepatitis A, B, C, D và E, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, virus Ebola, và virus MERS-Cov.
8. Bộ kit dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích bao gồm:
 - dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo điểm 1;
 - dNTP;
 - ligaza; và
 - axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt.

9. Bộ kit dụng cụ vi lỏng theo điểm 8, trong đó ligaza là ADN ligaza, và axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt này là phi29 polymeraza.

10. Bộ kit dụng cụ vi lỏng theo điểm 8, còn bao gồm thuốc nhuộm, dung dịch muối nồng độ cao, hoặc thuốc thử huỳnh quang.

11. Phương pháp sản xuất dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo điểm 1 bao gồm:

(S1) chuẩn bị dụng cụ vi lỏng bao gồm tấm (100), cửa vào (101) được tạo ra trên tấm (100) và qua đó dung dịch mẫu được đưa vào từ bên ngoài dụng cụ vi lỏng, kênh thứ nhất (102) được nối với cửa vào (101) để chứa dung dịch mẫu được đưa vào này, kênh thứ hai (103) được nối với kênh thứ nhất (102), và cửa ra (104) được nối với kênh thứ hai (103);

(S2) phủ kênh thứ hai (103) của dụng cụ vi lỏng để tạo ra kênh thứ hai được phủ;

(S3) cố định đoạn mồi để liên kết với khuôn trên kênh thứ hai (103) được phủ; và

(S4) liên kết, với đoạn mồi này, khuôn bao gồm các vùng liên kết đích bổ sung với gen đích, vùng liên kết đoạn mồi bổ sung với đoạn mồi này, và các vùng liên kết bổ sung trên khuôn,

trong đó:

(a) các vùng liên kết đích bổ sung với gen đích được tạo thành riêng biệt tại hai đầu của khuôn này,

(b) vùng liên kết đoạn mồi bổ sung với đoạn mồi này được tạo thành giữa các vùng liên kết bổ sung trên khuôn,

(c) vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ nhất trong số các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được định vị ở giữa vùng liên kết đoạn mồi và vùng liên kết đích thứ nhất trong số các vùng liên kết đích,

(d) vùng liên kết bổ sung trên khuôn thứ hai trong số các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được định vị ở giữa vùng liên kết đoạn mồi và vùng liên kết đích thứ hai trong số các vùng liên kết đích, và

(e) các vùng liên kết bổ sung trên khuôn được tạo cấu hình nhằm liên kết bổ sung với nhau để tạo thành dạng hình quả tạ..

12. Phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo điểm 1 bao gồm các bước:

(S1) chuẩn bị dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích theo điểm 1;

(S2) đưa dung dịch mẫu vào kênh thứ nhất; và

(S3) thêm dNTP, ligaza, và enzym axit nucleic polymeraza đẳng nhiệt vào kênh thứ hai của dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích.

13. Phương pháp theo điểm 12, bao gồm bước (S4) cho phép các sản phẩm gen được khuếch đại kết bông để tạo thành hydrogel có đường kính trong khoảng từ 50 μm đến 5 mm trên kênh thứ hai (103) và cửa ra (104).

14. Phương pháp theo điểm 13, còn bao gồm bước (S5) thêm thuốc nhuộm, dung dịch muối nồng độ cao, hoặc thuốc thử huỳnh quang.

FIG. 1

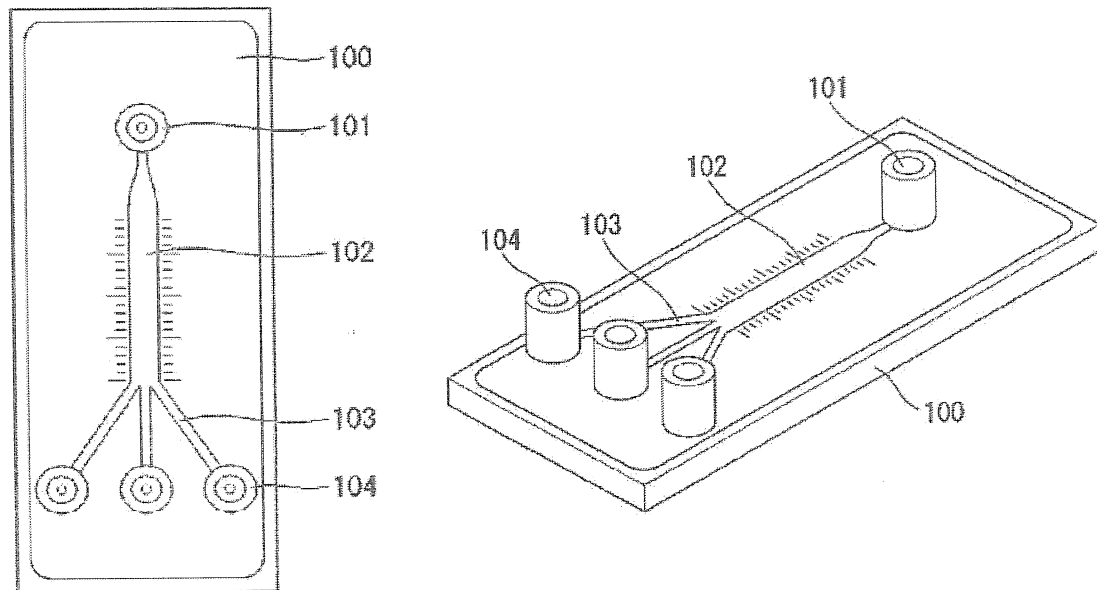


FIG. 2

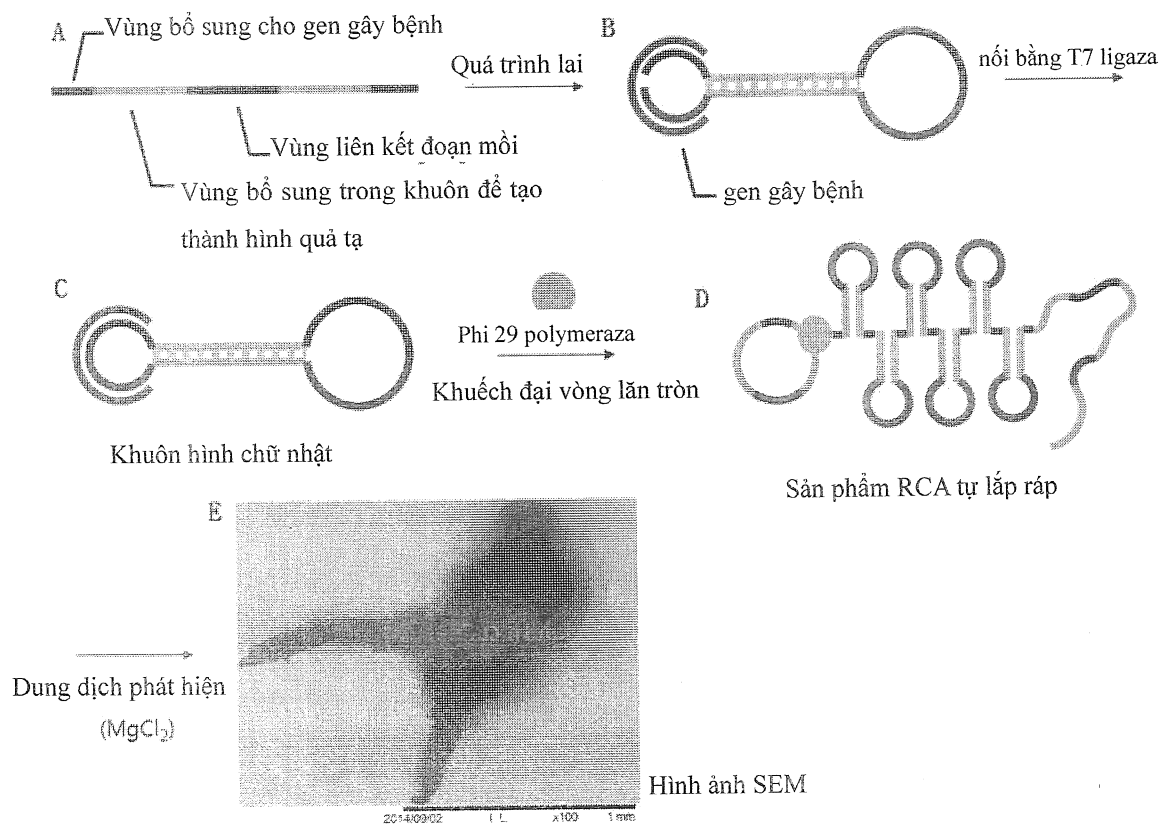


FIG. 3

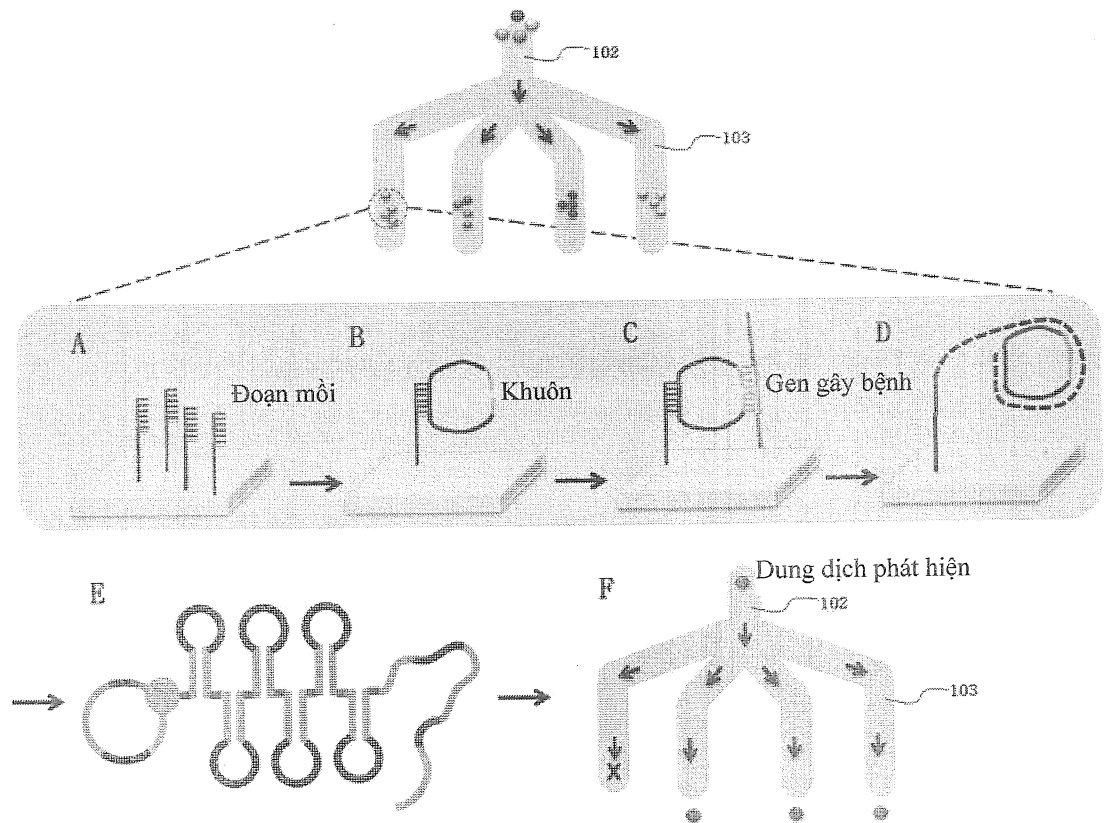


FIG. 4

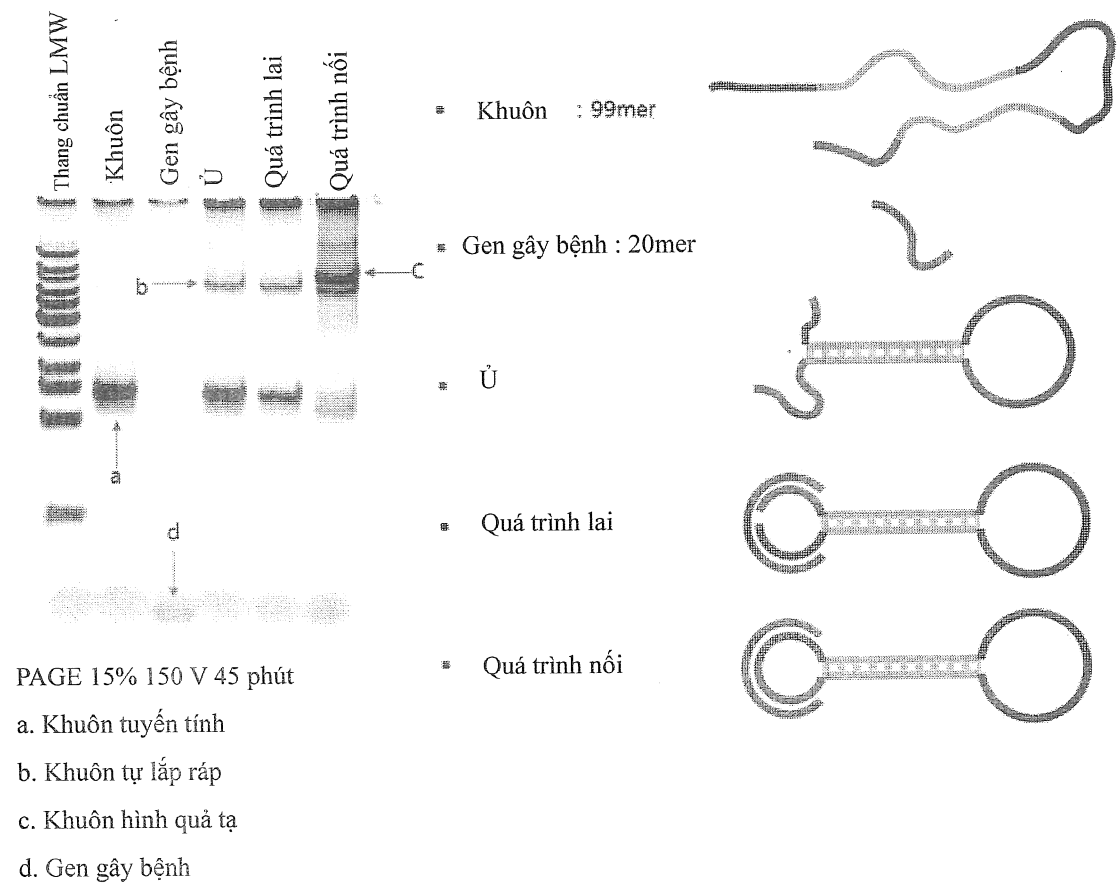


FIG. 5

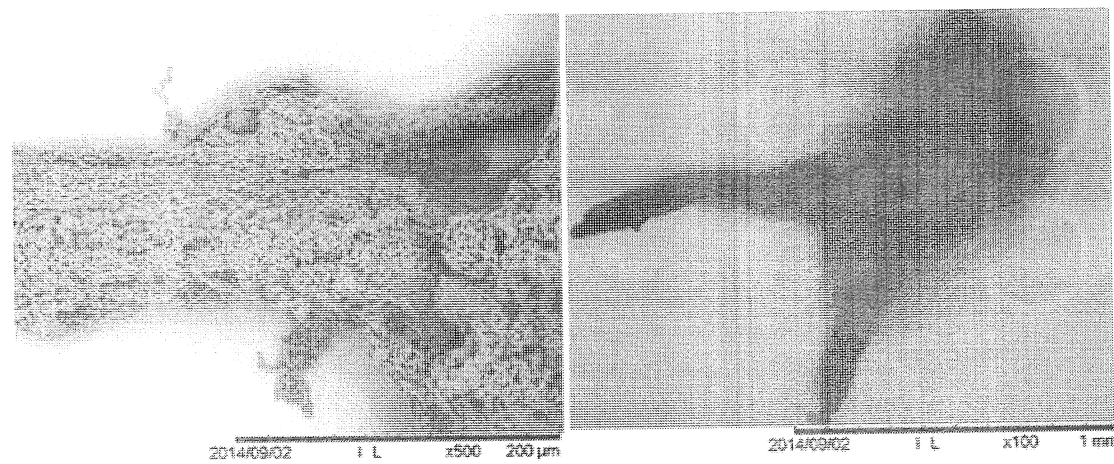


FIG. 6

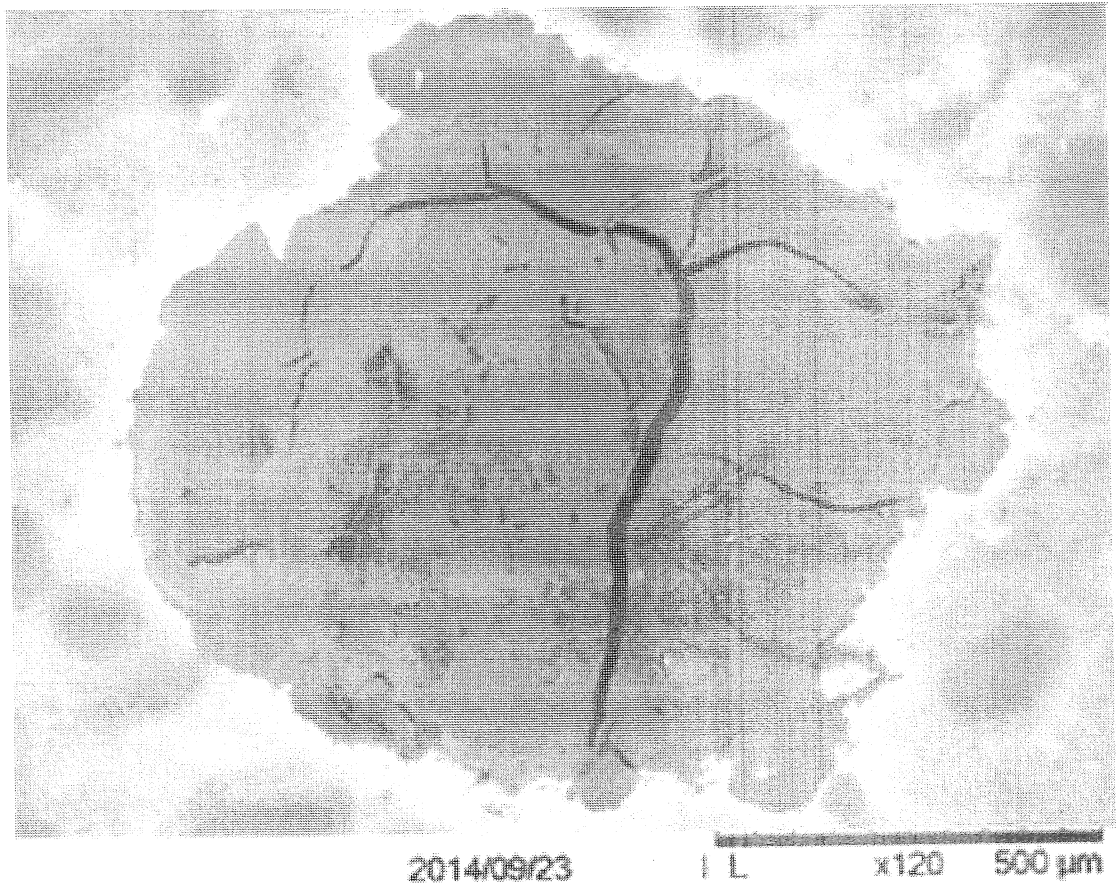


FIG. 7a

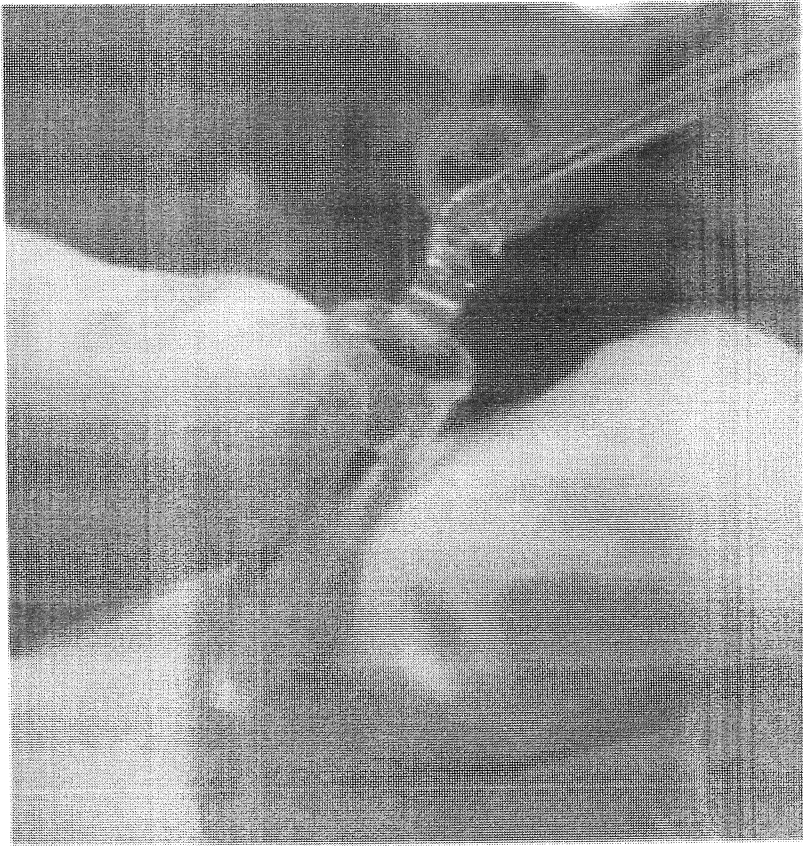


FIG. 7b

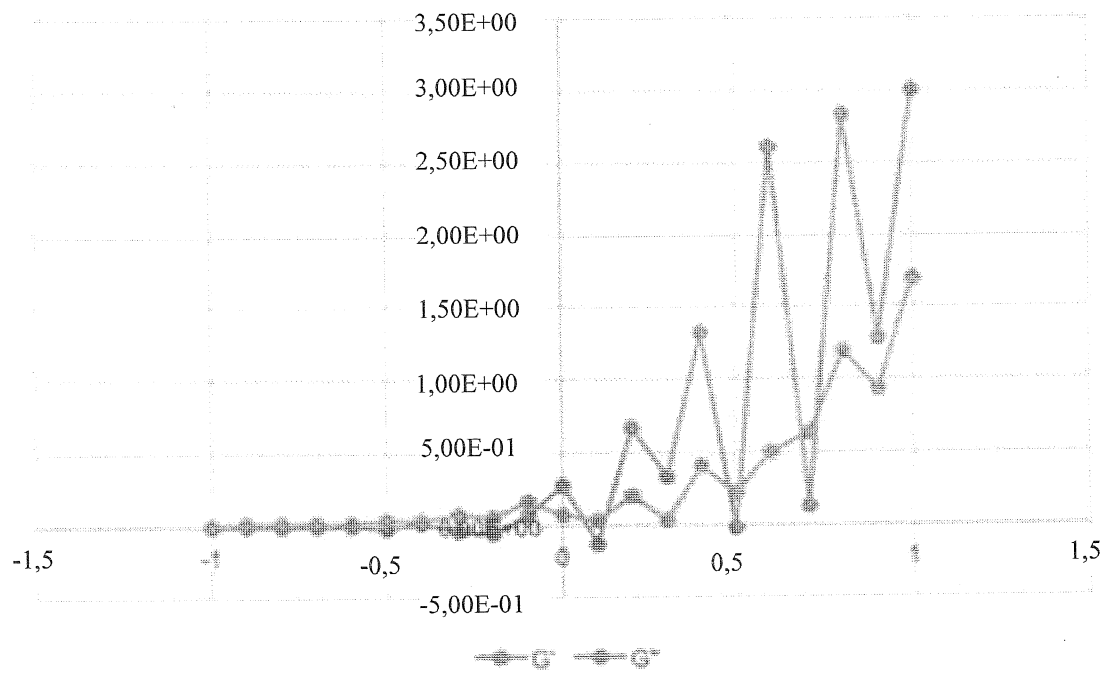


FIG. 8a

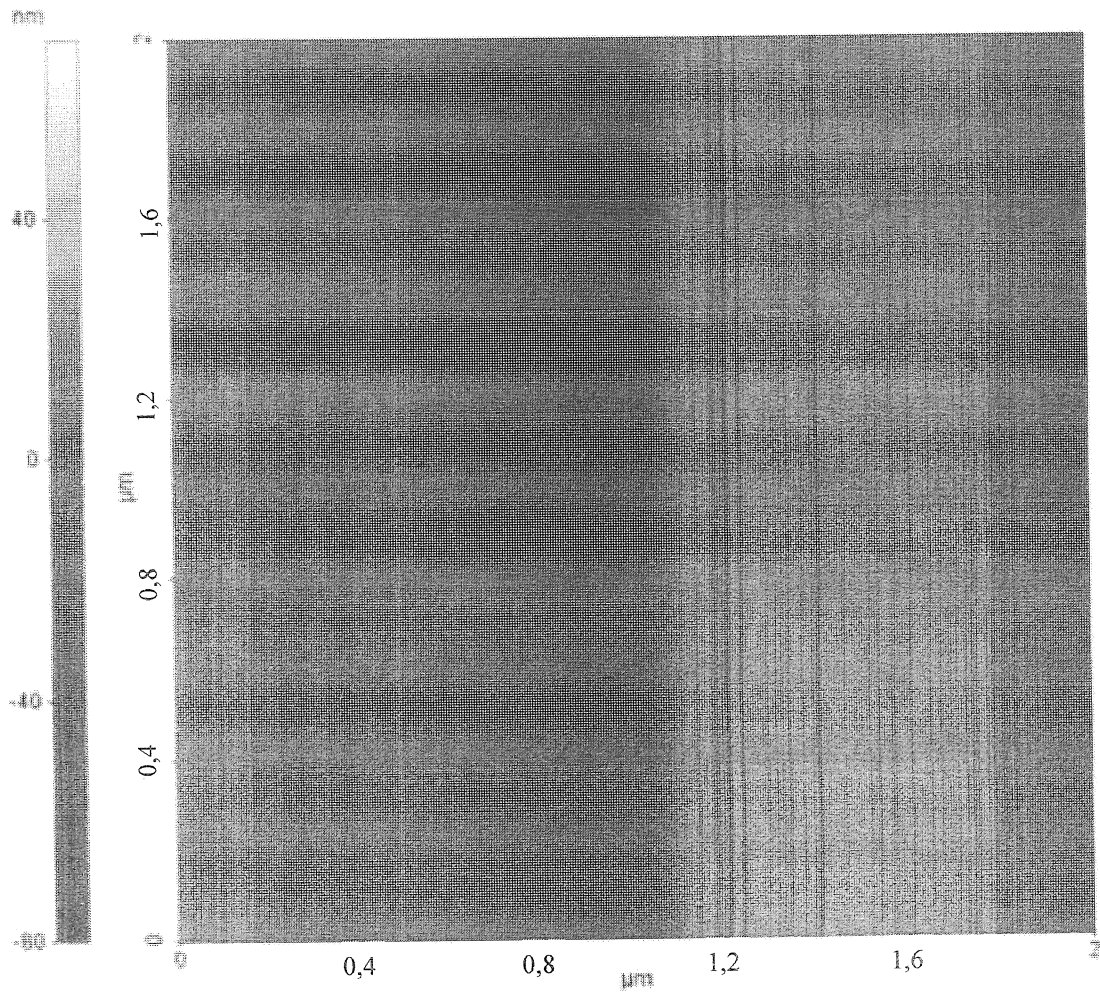


FIG. 8b

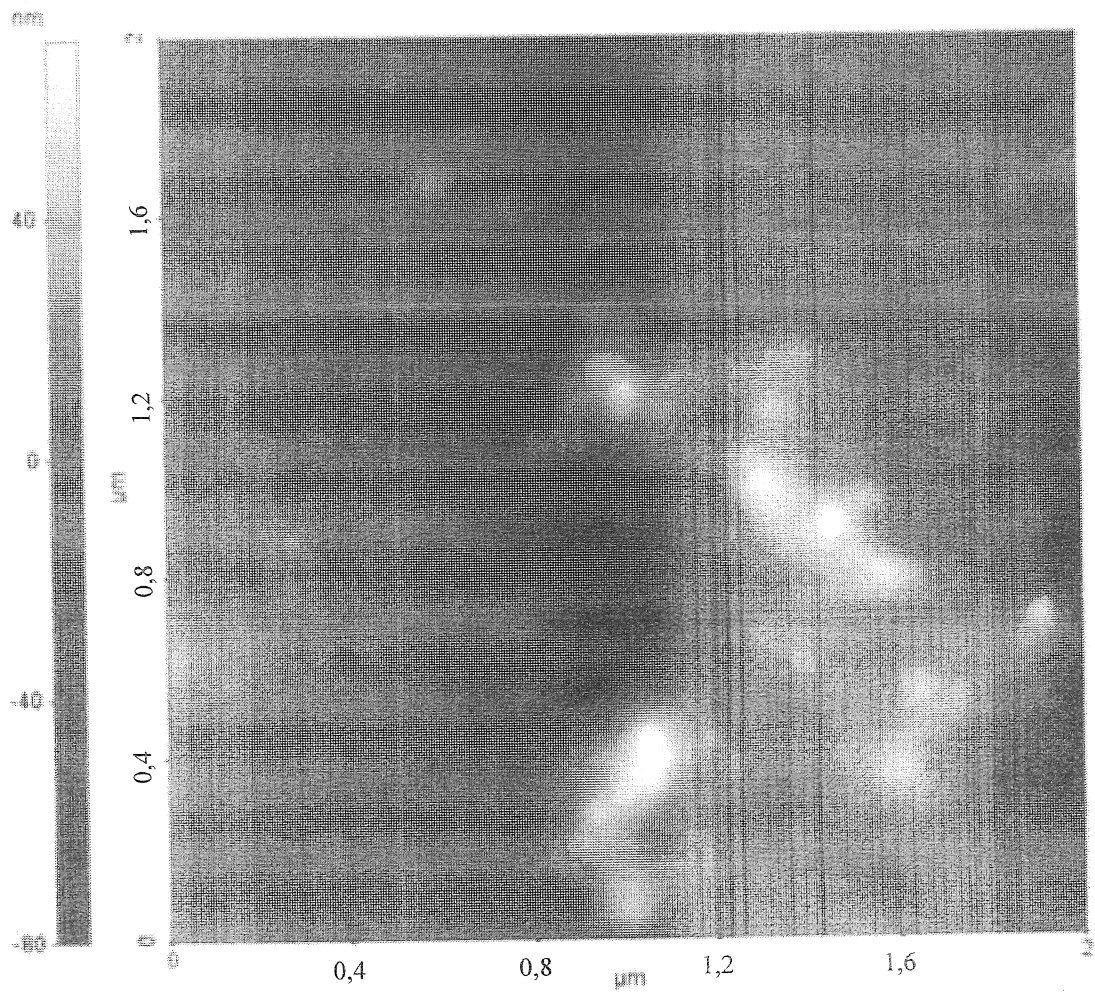


FIG. 9a

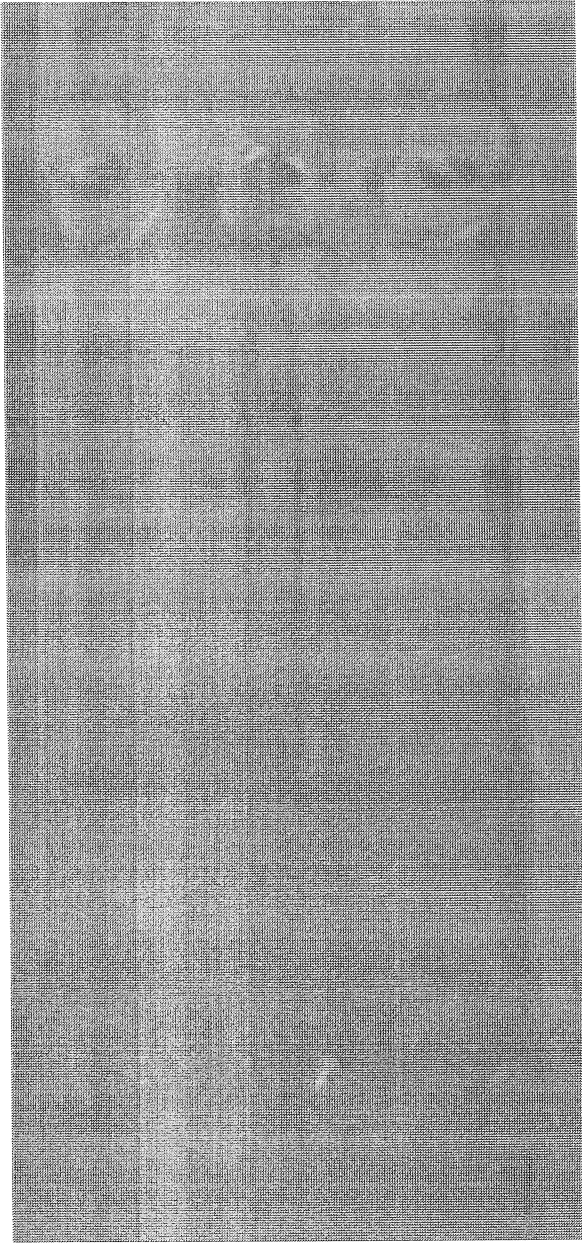


FIG. 9b

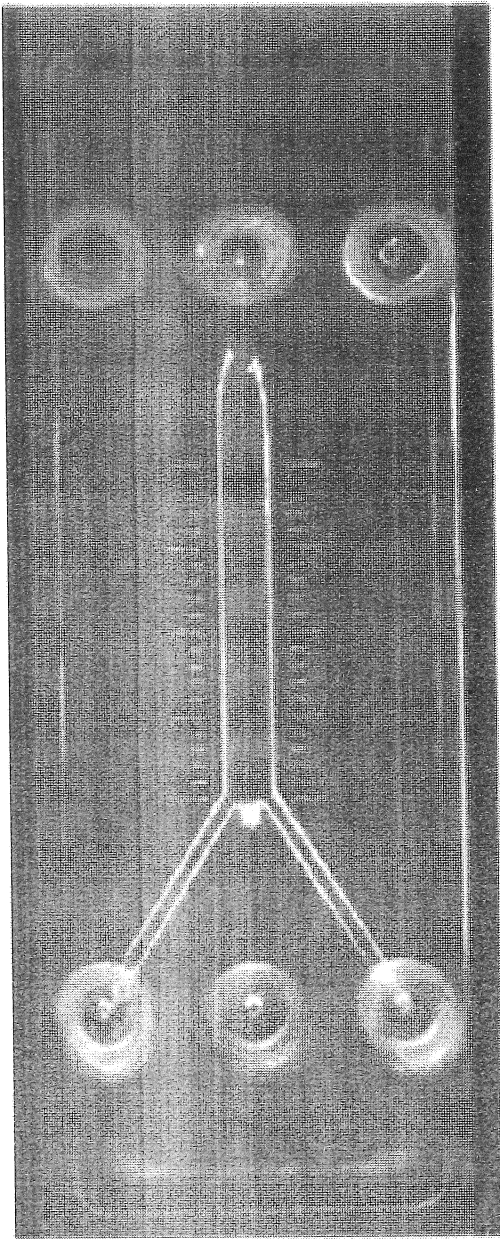


FIG. 10a

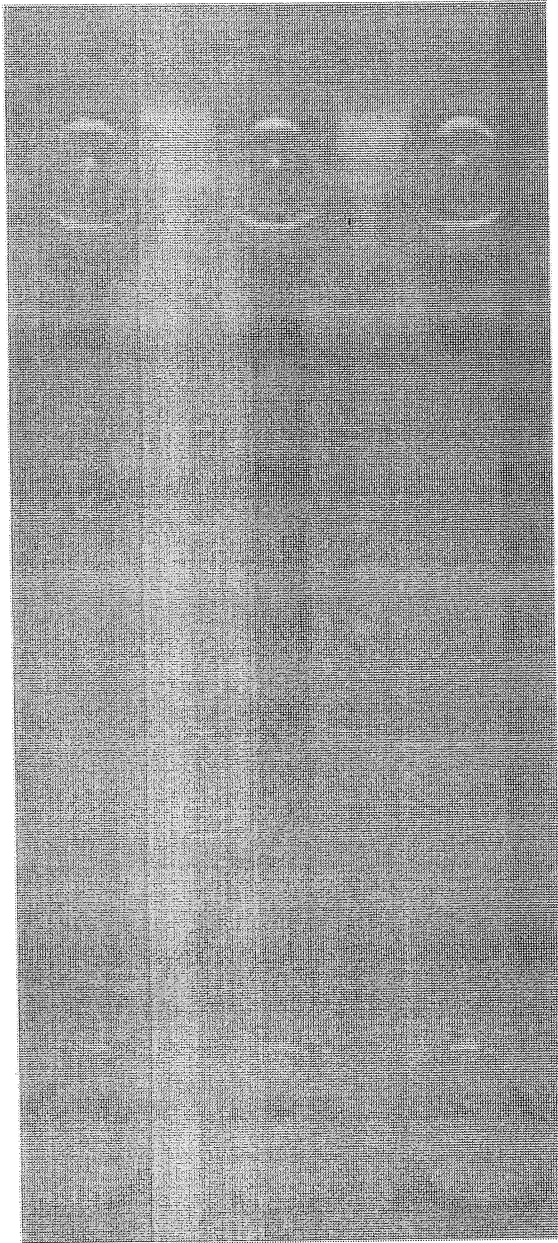


FIG. 10b

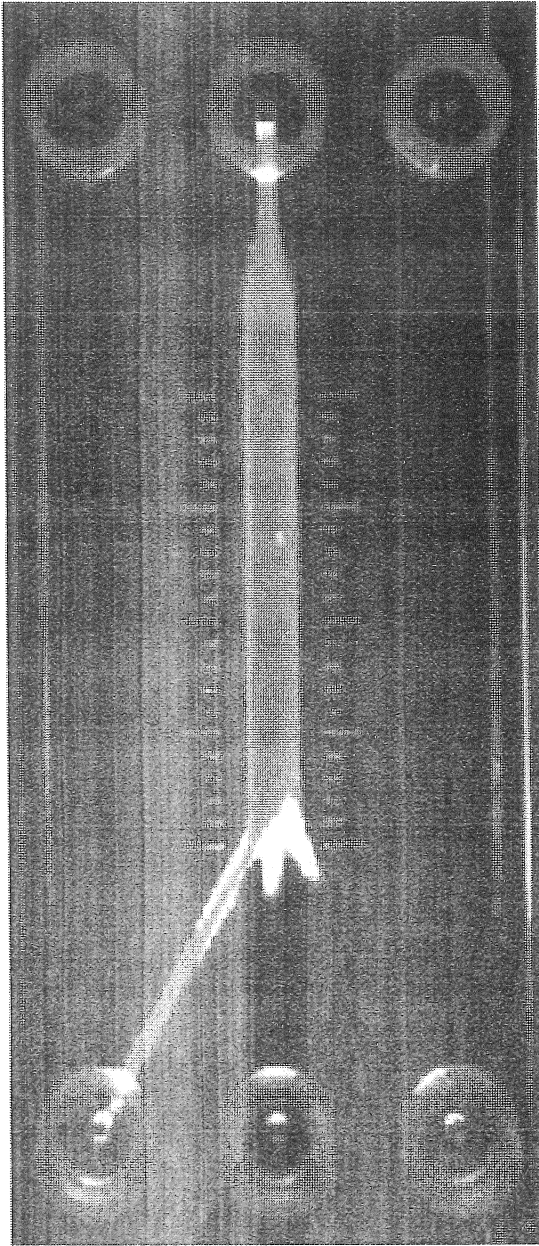


FIG. 11

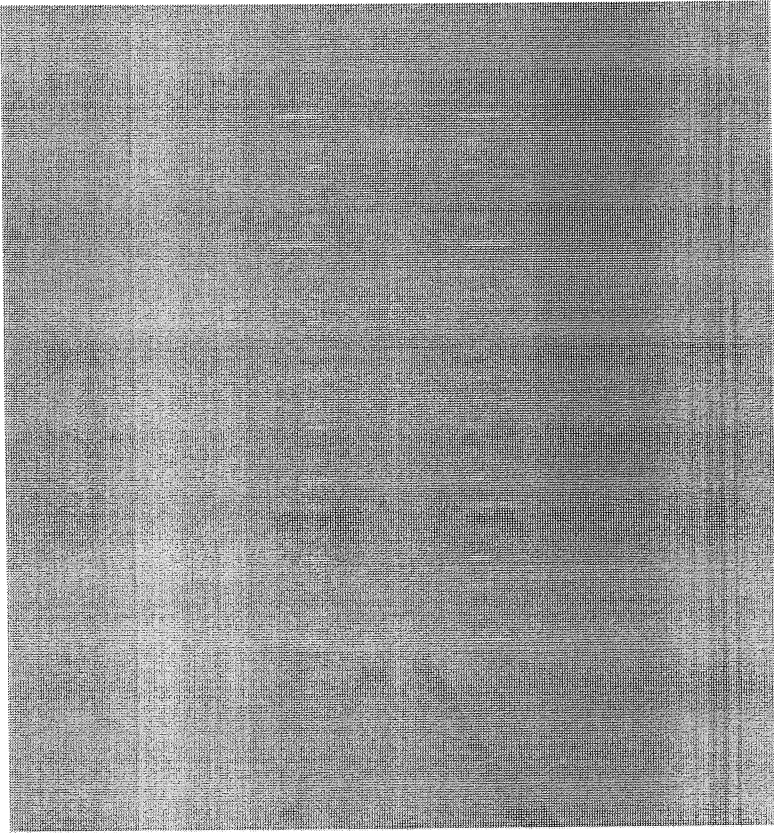


FIG. 12

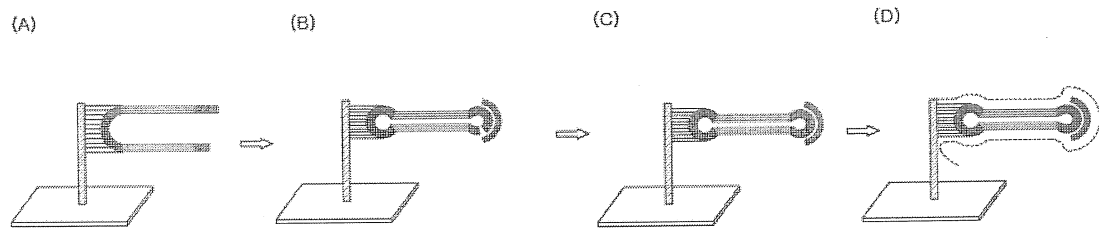


FIG. 13

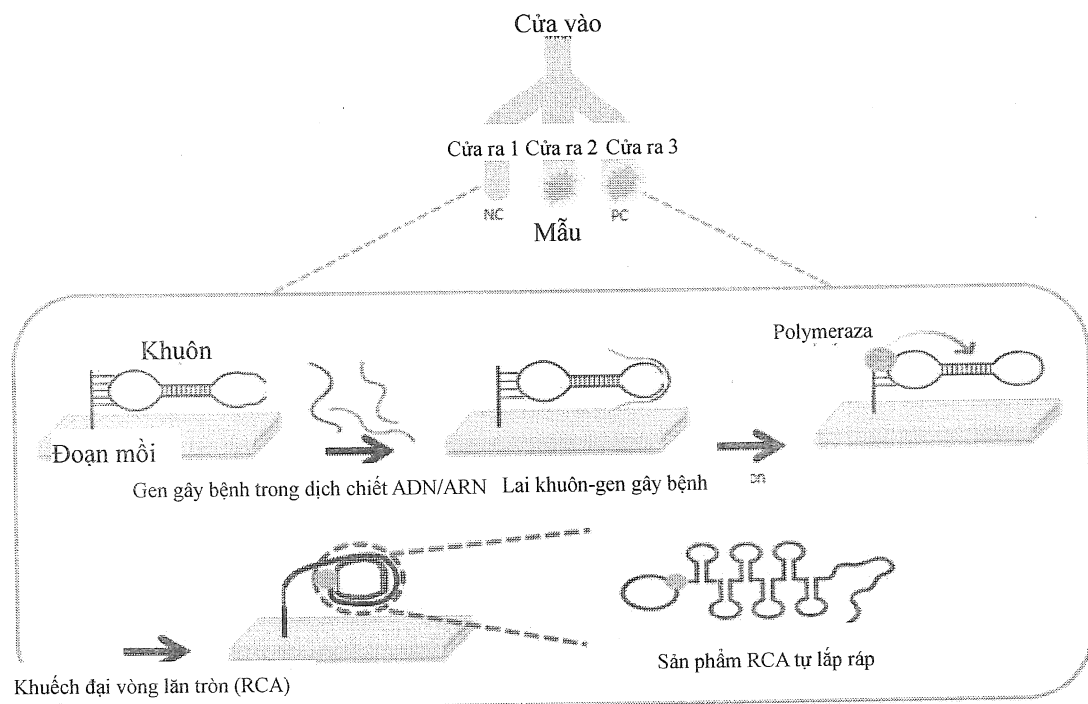
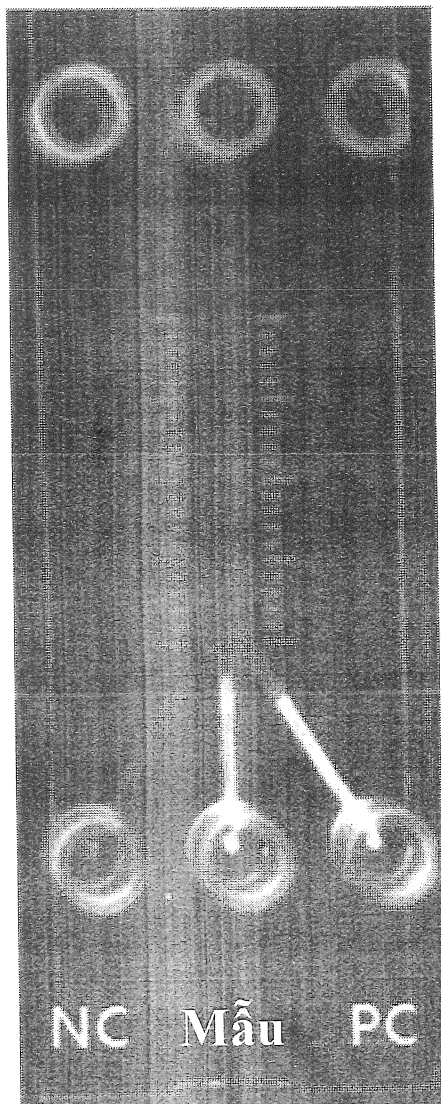


FIG. 14



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích, bộ kit dụng cụ vi lỏng phát hiện gen đích và phương pháp phát hiện gen đích sử dụng dụng cụ này

<130> P15023-EWHA

<150> KR 10-2014-0149495

<151> 2014-10-30

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 108

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuôn đặc hiệu cho Salmonella

<220>

<221> bazo được cải biến

<222> (1)

<223> nhóm 5'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 1

tgctatgccg actcaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat 60

cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcga tttgagtg 108

<210> 2

<211> 110

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuôn đặc hiệu cho Yersinia enterocolitica

<220>

<221> bazo được cải biến

<222> (1)

<223> nhóm 5'OH của g được thế bằng nhóm phosphat

<400> 2

gctcacccca gtaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat 60

cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcga ttagctttac 110

<210> 3

<211> 112

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuôn đặc hiệu cho *Francisella tularensis*

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)

<223> nhóm 5'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 3

tgtttccagt atttaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat 60

cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcga ttttcctcc ga 112

<210> 4

<211> 111

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuôn đặc hiệu cho *Yersinia pestis*

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)

<223> nhóm 5'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 4

tcgaatgccca acaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat 60

cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcga ttctctgaac a 111

<210> 5

<211> 20

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự của *Salmonella* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Salmonella*

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (20)

<223> nhóm 3'OH của a được thế bằng nhóm phosphat

<400> 5

gagtcggcat agcacactca

20

<210> 6
 <211> 22
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của *Yersinia enterocolitica* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Yersinia enterocolitica*

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (22)
 <223> nhóm 3'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 6
 ttactggggt gagcgtaaag ct 22

<210> 7
 <211> 24
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của *Francisella tularensis* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Francisella tularensis*

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (24)
 <223> nhóm 3'OH của a được thế bằng nhóm phosphat

<400> 7
 aaatactgga aacatcggag gaaa 24

<210> 8
 <211> 23
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của *Yersinia pestis* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Yersinia pestis*

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (23)
 <223> nhóm 3'OH của g được thế bằng nhóm phosphat

<400> 8
 ttgttgatcat tcgatgttca gag 23

<210> 9
 <211> 32
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)
 <223> a được cải biến bằng nhóm thiol

<400> 9
 aaaaaaaaaag ggacgtcgat actagcatgc ta

32

<210> 10
 <211> 99
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khuôn đặc hiệu cho Bacillus anthracis

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)
 <223> nhóm 5'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 10
 ttgaaatgg agaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggtagcatg ctagtatcga
 cgtacgtacc aacttacgct gagtacttcg atttgagcg

60

99

<210> 11
 <211> 104
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khuôn đặc hiệu cho virut Ebola

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)
 <223> nhóm 5'OH của g được thế bằng nhóm phosphat

<400> 11
 gacgcacgcg aatcgaagta ctacagcgtaa gtttagaggt agcatgctag tatcgacgta

60

cgtaccaact tacgctgagt acttcgatta acgagaaatc gcac

104

<210> 12

<211> 20

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của *Bacillus anthracis* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Bacillus anthracis*

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (20)

<223> nhóm 3'OH của a được thế bằng nhóm phosphat

<400> 12

ttctccattt caaacgctca

20

<210> 13

<211> 25

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của virus Ebola liên kết với khuôn đặc hiệu cho virus Ebola

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (25)

<223> nhóm 3'OH của t được thế bằng nhóm phosphat

<400> 13

cgcggtgcgtc gtgcgatttc tcggtt

25

<210> 14

<211> 20

<212> AND

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự *Bacillus anthracis* liên kết với khuôn đặc hiệu cho *Bacillus anthracis*

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (20)

<400> 14

ttctccattt caaacgctca

20

<210> 15
 <211> 25
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự của virus Ebola liên kết với khuôn đặc hiệu cho virus Ebola

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (25)

 <400> 15
 cgctgctgcgtc gtgcgatttc tcgtt 25

 <210> 16
 <211> 99
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Khuôn đặc hiệu cho virus MER-Corona

 <400> 16
 agggcacatc tccgaatcga agtactcagc gtaagtttag aggtagcatg ctagtatcga 60
 cgtagctacc aacttacgct gactacttcg attataccc 99

 <210> 17
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự của virus MERS-Corona liên kết với khuôn đặc hiệu cho virus
 MERS-Corona

 <400> 17
 cggagaugug ccugggguau 20