



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

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

(11)



2-0003007

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

(13) **Y**

(21) 2-2022-00096

(22) 01/07/2020

(67) 1-2020-03843

(45) 25/11/2022 416

(43) 26/10/2020 391A1

(73) Viện công nghệ ADN và Phân tích di truyền (VN)

Chung Cư F5, Khu Đô Thị Mới Yên Hòa, phường Yên Hòa, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Phạm Thị Trà (VN); Võ Thị Thương Lan (VN).

(54) QUY TRÌNH THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR ĐA MÔI VÀ QF-PCR ĐA MÔI SỬ DỤNG MÔI HUỲNH QUANG ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 8 ĐỘT BIẾN MẮT ĐOẠN VÙNG AZF TRÊN NHIỄM SẮC THỂ Y LIÊN QUAN ĐẾN VÔ SINH Ở NAM GIỚI

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện ứng PCR đa môi để phát hiện 8 đột biến trên 4 vùng AZFa,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y bao gồm các bước:

i) thiết kế 10 cặp môi cho phản ứng đa môi đặc hiệu từng vùng AZFa,b,c,d

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm bằng kit tách ADN và chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/μl

iii) thực hiện phản ứng PCR đa môi sau đó điện di sản phẩm của phản ứng PCR đa môi trên gel acrylamit và nhuộm ethidium bromit, chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel có tia tử ngoại UV bước sóng 260 nm.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi bằng cách sử dụng 10 cặp môi với trình tự như đã được thể hiện trong bước i) nêu trên, khác biệt ở chỗ tất cả các môi xuôi có đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5' của mỗi môi và sản phẩm của phản ứng QF-PCR được điện di mao quản trên máy phân tích di truyền.

Các quy trình này đã thiết kế được các môi đặc hiệu để sử dụng trong 1 phản ứng PCR đa môi (hoặc QF-PCR đa môi) nhằm mục đích sàng lọc, chẩn đoán được nam giới mang đột biến ở vùng AZFa,b,c,d liên quan đến bệnh vô sinh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học – sinh y. Cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng PCR đa môi và phản ứng QF-PCR đa môi sử dụng các môi gắn huỳnh quang phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn xảy ra ở vùng các gen AZF trên nhiễm sắc thể Y có liên quan đến khả năng sinh sản của nam giới. Quy trình này được áp dụng để sàng lọc, chẩn đoán nam giới có khả năng bị hiếm muộn hoặc vô sinh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một trong các nguyên nhân nam giới không có hoặc có rất ít tinh trùng dẫn đến bệnh hiếm muộn hoặc vô sinh là vùng AZF (vùng chứa các gen liên quan đến khả năng sinh sản) trên nhiễm sắc thể giới tính Y bị đột biến. Có 4 vùng AZF là AZFa, AZFb, AZFc và AZFd có thể mang các đột biến mất đoạn khác nhau (Hình 1). Các đột biến này có thể được di truyền từ thế hệ trước hoặc phát sinh mới trong quá trình tinh trùng trưởng thành và phụ thuộc vào tuổi của nam giới. Xét nghiệm xác định các vùng AZF bình thường hay đột biến có giá trị quan trọng giúp bác sĩ chuyên khoa đưa ra phác đồ điều trị chứng hiếm muộn hay quyết định các biện pháp thụ tinh nhân tạo.

Hiện nay, các bộ sinh phẩm thương mại sử dụng kỹ thuật PCR đa môi để phát hiện các đột biến AZF. Nguyên tắc của kỹ thuật này là sử dụng đồng thời nhiều cặp môi để khuếch đại các đoạn ADN của 4 vùng AZF từ ADN tổng số của từng người (nam giới). Tùy thuộc vào sự có mặt hoặc thiếu vắng các sản phẩm khuếch đại để kết luận cụ thể số lượng vùng gen AZF bình thường hay bị đột biến. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa hoặc gel acrylamit, nhuộm với ethidium bromit và quan sát dưới tia tử ngoại UV bước sóng 260 nm. Ngoài ra, khi các môi được đánh dấu huỳnh quang thì phản ứng PCR được gọi là QF-PCR và sản phẩm được phát hiện bằng kỹ thuật điện di mao quản trên các hệ thống máy phân tích di truyền ABI3100, ABI3500.

Trên thị trường phổ biến bộ sinh phẩm phát hiện đột biến AZF bằng kỹ thuật PCR và điện di trên gel agarosa do công ty Promega cung cấp (Y Chromosome Deletion Detection System, Version 2.0. No.: MD1531) và bộ sinh phẩm sử dụng kỹ thuật QF-PCR do công ty Devyser cung cấp (Devyser AZF v2 Art. No.: 8-A019.2). Bên cạnh đó, Hiệp hội Nam khoa EU (the European Academy of Andrology-EAA) và hệ thống chất lượng di truyền phân tử châu Âu (the European Molecular Genetics Quality Network-EMQN) có đưa ra hướng dẫn quy trình phát hiện các đột biến AZF bằng kỹ thuật PCR đa môi, điện di sản phẩm trên gel agarosa (Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. Andrology, 2014). Các bộ sinh phẩm thương mại cũng như hướng dẫn EAA/EMQN lựa chọn hầu hết các

trình tự giống nhau trên 4 vùng AZF để thiết kế mồi. Tuy nhiên, bộ sinh phẩm thương mại cũng như quy trình của EAA/EMQN đều thực hiện nhiều phản ứng đa mồi riêng rẽ hoặc phải có các bộ sinh phẩm hỗ trợ nhau. Ví dụ như Devyser cung cấp 2 bộ sinh phẩm: bộ cơ bản phát hiện 6 đột biến cho 3 vùng AZFa,b,c và bộ mở rộng phát hiện 11 đột biến bao gồm vùng AZFd. Nguyên nhân là do việc phối hợp nhiều mồi trong cùng một phản ứng không phải lúc nào cũng thực hiện được vì một số lý do chính như sau:

- Các mồi cần có giá trị Tm phù hợp với nhau;
- Các mồi không được có trình tự bổ sung với nhau, đặc biệt ở đầu 3';
- Các băng ADN cần có kích thước khác biệt nhau để quan sát được rõ trên gel điện di nhưng sự sai khác không quá lớn để dễ dàng khuếch đại trong cùng điều kiện PCR.

Ở Việt Nam, một số công bố đã xây dựng quy trình sử dụng kỹ thuật PCR hoặc QF-PCR để phát hiện đột biến mất đoạn vùng AZF chẳng hạn như công bố của các tác giả Cao Thị Tài Nguyên, Nguyễn Trung Kiên, Trịnh Thị Bích Liên, Vũ Thị Nhuận, Nguyễn Chung Viêng, Nguyễn Đắc Khoa, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trịnh Minh Thiết, Cao Lương Bình, Nguyễn Phan Vinh, Nguyễn Văn Khuôn liên quan đến “Sử dụng kỹ thuật QF-PCR trong chẩn đoán một số nguyên nhân di truyền thường gặp ở nam giới vô sinh” (Tạp chí Công nghệ Sinh học 16(2): 241-252, 2018). Ngoài ra, các tác giả Huỳnh Thị Kim Phương, Huỳnh Kiều Thanh, Võ Trí Nam, Nguyễn Lê Tuấn Anh, Nguyễn Đức Hoàng, Phan Thị Phượng Trang, Nguyễn Vạn Thông, Phạm Hà Giang cũng đã nghiên cứu “Xây dựng quy trình phát hiện đột biến vi mất đoạn nhiễm sắc thể giới tính Y trên bệnh nhân nam chẩn đoán mắc bệnh Azoospermia bằng kỹ thuật Multiplex-PCR (Tạp chí Phát triển KH&CN, 8: T5-2015). Tuy nhiên, các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở việc đánh giá đột biến mất đoạn ở 3 vùng là AZF a,b,c mà chưa có công bố về việc thực hiện 1 phản ứng đa mồi để phát hiện đồng thời các đột biến ở 4 vùng AZFa,b,c,d.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên, tức là đề xuất quy trình phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn thuộc 4 vùng AZF a,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bằng phản ứng PCR đa mồi và QF-PCR đa mồi sử dụng các mồi huỳnh quang.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng PCR đa mồi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước sau:

i) thiết kế bộ mồi cho phản ứng PCR đa mồi gồm 10 cặp mồi trong đó bao gồm:

8 cặp mồi đặc hiệu cho 8 trình tự nucleotit lựa chọn từ 4 vùng AZFa,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y (8 trình tự đó gồm sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY152, BPY2) (xem Hình 1);

2 cặp mồi làm nội chuẩn trong đó 1 cặp mồi đặc hiệu dựa vào trình tự gen SRY chỉ xuất hiện trên nhiễm sắc thể Y (trình tự sY14) và 1 cặp mồi đặc hiệu cho trình tự gen AMEL xuất hiện ở cả 2 nhiễm sắc thể giới tính X và Y; trong đó trình tự các cặp mồi và kích thước băng ADN được khuếch đại bởi các cặp mồi như sau:

Bảng 1: Trình tự tự nucleotit của các môi được thiết kế theo phần mềm OligoCalc

Vùng trình tự đích	Tên môi	Kí hiệu	Trình tự nucleotit (5'-3')	Tm (°C)
sY84	sY84-F	SEQ ID NO:1	GAG AAG GGT CTG AAA GCA G	57,5
	sY84-R	SEQ ID NO:2	GCC TAC TAC CTG GAG GCT	58,4
sY86	sY86-F	SEQ ID NO:3	GGG TGA CAC ACA GAC TAT G	57,5
	sY86-R	SEQ ID NO:4	ACA GAG GGA CAA CCC TGT G	59,5
sY127	sY127-F	SEQ ID NO:5	AGC ACC CAC TGG AAT CTA C	57,5
	sY127-R	SEQ ID NO:6	CAT GGC TAC ACA GAC AGG G	58,2
sY134	sY134-F	SEQ ID NO:7	TTA GAG GAA TAG TAC AGG TCA AA	57,6
	sY134-R	SEQ ID NO:8	TAA CAA CCA CTG CCA AAA CTT TC	59,2
sY254	sY254-F	SEQ ID NO:9	CTG GGT GTT ACC AGA AGG C	59,5
	sY254-R	SEQ ID NO:10	TGA ACC GTA TCT ACC AAA GCA	57,5
sY255	sY255-F	SEQ ID NO:11	CGT GCT GAG TTA CAG GAT TC	58,4
	sY255-R	SEQ ID NO:12	GTG CTC GTC ATG TGC AGC	58,4
sY152	sY152-F	SEQ ID NO:13	GAC AGT CTG CCA TGT TTC AC	58,4
	sY152-R	SEQ ID NO:14	CAG GAG GGT ACT TAG CAG TA	58,4
BPY2	BPY2-F	SEQ ID NO:15	GCC ATA TCT CTG AGC ACA TAA	57,5
	BPY2-R	SEQ ID NO:16	TTC CCT CTT TAC GCA TGA CC	58,4
SRY (sY14)	sY14-F	SEQ ID NO:17	GAA TAT TCC CGC TCT CCG G	59,5
	sY14-R	SEQ ID NO:18	GCT GGT GCT CCA TTC TTG A	57,5
AMEL	AMEL-F	SEQ ID NO:19	TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	57,5
	AMEL-R	SEQ ID NO:20	TCA GAG CTT AAA CTG GGA AGC	57,5

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm bằng cách sử dụng kit tách ADN sau đó chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/μl

iii) thực hiện phản ứng PCR đa môi với các điều kiện như được thể hiện ở Bảng 2

Bảng 2: Các thành phần và điều kiện để thực hiện phản ứng PCR đa môi

PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (μl)	
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μM, đệm MgCl ₂	12,5	98°C trong 5 phút - Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi

3mM (2x iProof HF Master Mix)		chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây • 72°C trong 5 phút
SEQ ID NO:1 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:3 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:5 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:6 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:7 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:9 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:11 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:13 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:15 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:17 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 µM)	0,5	
SEQ ID NO:19 (2 µM)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 µM)	0,5	
ADN tổng số (10-30 ng/µl)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm của phản ứng PCR đa môi được điện di trên gel acrylamit 10% và nhuộm ethidium bromit (0,5mg/L) trong 5 phút và quan sát dưới tia tử ngoại bước sóng 260nm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước sau:

i) thiết kế môi cho phản ứng QF-PCR đa môi bằng cách sử dụng 10 cặp môi với trình tự giống như 10 cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR đa môi nêu trên, khác biệt ở chỗ tất cả các môi xuôi có đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5' của mỗi môi.

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm bằng cách sử dụng kit tách ADN sau đó chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/µl

iii) thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi các điều kiện như được thể hiện ở Bảng 3

Bảng 3: Thành phần và điều kiện phản ứng QF-PCR đa môi với các môi được đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5'

QF-PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (µl)	

Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5	• 98°C trong 5 phút • Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây • 72°C trong 5 phút
5' FAM - SEQ ID NO:1 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:3 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:5 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:6 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:7 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:9 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:11 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:13 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:15 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:17 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:19 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 μ M)	0,5	
ADN tổng số (10-30 ng/ μ l)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm của phản ứng QF-PCR đa môi được điện di mao quản trên hệ thống máy phân tích di truyền để xác định tín hiệu huỳnh quang.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Sơ đồ vị trí 4 vùng AZFa,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y có các đột biến mất đoạn liên quan đến khả năng sinh sản ở nam giới và một số trình tự sử dụng để thiết kế các mồi cho phản ứng PCR nhằm phát hiện các đột biến mất đoạn xảy ra ở các vùng đó.

Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR đa môi phát hiện đột biến trên 4 vùng AZF trên gel acrylamit 10%. Mẫu DC(-): không có ADN khuôn. Mẫu 1 đến mẫu 5: mẫu sinh phẩm. Mẫu DC(+): ADN không có đột biến. Mẫu M: thang chuẩn ADN 100 bp. Tất cả các mẫu sinh phẩm và đối chứng dương đều có băng nội chuẩn sY14 đặc hiệu cho nhiễm sắc thể Y và 2 băng AMEL(X) và AMEL(Y) đặc hiệu cho 2 nhiễm sắc thể giới tính X, Y. Kết quả đột biến các vùng AZF được ghi ở trên kí hiệu mẫu sinh phẩm.

Hình 3: Kết quả điện di mao quản sản phẩm QF-PCR đa môi trên hệ thống máy ABI3500. Mẫu đối chứng dương của nam giới bình thường (đã sinh con) (A) và của các mẫu sinh phẩm (B-C) đều có tín hiệu huỳnh quang của nội chuẩn sY14 và

AMEL(X), AMEL(Y). (A) Mẫu đối chứng người bình thường có 11 tín hiệu tương ứng với 11 sản phẩm khuếch đại trong phản ứng QF-PCR. (B) Mẫu sinh phẩm có 10 tín hiệu, thiếu tín hiệu tương ứng với trình tự sY127 nên có đột biến vùng AZFb. (C) Mẫu sinh phẩm có số 5 tín hiệu huỳnh quang trong đó 3 tín hiệu nội chuẩn và 2 tín hiệu của AZFa, như vậy có đột biến vùng AZFb,c,d.

Hình 4: kết quả QF-PCR sàng lọc mất đoạn AZF trên 12 mẫu ADN từ mẫu sinh phẩm, điện di trên gel polyacrylamit 12%. Đối chứng âm không khuôn ADN; M1-M12: các mẫu ADN; + mẫu người nam bình thường; M: thang chuẩn 1kb Invitrogen.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước sau:

i) thiết kế môi cho phản ứng PCR đa môi

- Thiết kế môi cho các trình tự đích của vùng AZF

Dựa vào 8 trình tự nucleotit của 4 vùng AZFa,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y đã có trong dữ liệu Databank của Trung tâm dữ liệu thông tin Công nghệ Sinh học (National Center for Biotechnology Information-NCBI) để lựa chọn các vị trí thiết kế 8 cặp môi. Mỗi cặp môi bao gồm môi xuôi và môi ngược. Môi xuôi được thiết kế theo đúng trình tự có trong Databank, môi ngược được thiết kế dựa vào trình tự bổ sung. Mỗi vùng AZF sẽ lựa chọn 2 trình tự để thiết kế 2 cặp môi. 8 trình tự nucleotit của 4 vùng AZFa,b,c,d được lựa chọn là sY84, sY86, sY127, sY1334, sY254, sY255, sY152, BYP2.

Sử dụng chương trình OligoCalc tra cứu miễn phí (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) để thiết kế môi. Môi được kí hiệu theo tên của trình tự lưu trữ trong DataBank. Ví dụ cặp môi đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự sY84 sẽ được kí hiệu là sY84-F (môi xuôi) và sY84-R (môi ngược).

- Thiết kế môi nội chuẩn

Dựa vào trình tự nucleotit của gen SRY là trình tự đặc hiệu chỉ có mặt trên nhiễm sắc thể Y (trong dữ liệu DataBank) để thiết kế cặp môi nội chuẩn khẳng định sự có mặt của nhiễm sắc thể Y trong mẫu phân tích.

Dựa vào trình tự nucleotit của gen AMEL là trình tự có trên cả 2 nhiễm sắc thể giới tính X và Y (trong dữ liệu DataBank) để thiết kế cặp môi nội chuẩn khẳng định sự có mặt của cặp nhiễm sắc thể giới tính XY trong mẫu phân tích của người nam.

Như vậy có 10 cặp môi được thiết kế, trong đó sẽ bao gồm 8 cặp môi đặc hiệu cho 8 vùng trình tự đích và 2 cặp môi sử dụng là nội chuẩn.

Chiều dài (số nucleotit) của từng môi được chọn thỏa mãn:

(1) đảm bảo cho giá trị T_m của môi giữ trong dung dịch có muối NaCl nồng độ 50 mM (tính theo OligoCalc) đều lớn hơn 55°C và

(2) giá trị T_m của tất cả các môi không chênh lệch nhau quá 3°C.

Điều này cho phép các môi gắn đặc hiệu với khuôn và khả năng gắn của tất cả môi với các khuôn xảy ra như nhau. Sản phẩm khuếch đại của 10 cặp môi phải đảm bảo sai khác nhau ít nhất 5 bp, sản phẩm có kích thước bé nhất phải đạt 80 bp và lớn nhất không quá 500 bp. Đáp ứng yêu cầu này sẽ cho phép quan sát được rõ ràng các đoạn ADN được khuếch đại bởi mỗi cặp môi.

Các môi được đặt mua từ các hãng sản xuất (IDT, Sigma, Invitrogen,...) và được cung cấp dưới dạng đông khô. Các môi được pha về nồng độ gốc 100 μ M theo hướng dẫn chi tiết trong đơn giao hàng và được bảo quản ở -20°C .

Bảng 4: Trình tự nucleotit của các môi được thiết kế theo phần mềm OligoCalc

Vùng trình tự đích	Tên môi	Kí hiệu	Trình tự nucleotit (5'-3')	T _m (°C)
sY84	sY84-F	SEQ ID NO:1	GAG AAG GGT CTG AAA GCA G	57,5
	sY84-R	SEQ ID NO:2	GCC TAC TAC CTG GAG GCT	58,4
sY86	sY86-F	SEQ ID NO:3	GGG TGA CAC ACA GAC TAT G	57,5
	sY86-R	SEQ ID NO:4	ACA GAG GGA CAA CCC TGT G	59,5
sY127	sY127-F	SEQ ID NO:5	AGC ACC CAC TGG AAT CTA C	57,5
	sY127-R	SEQ ID NO:6	CAT GGC TAC ACA GAC AGG G	58,2
sY134	sY134-F	SEQ ID NO:7	TTA GAG GAA TAG TAC AGG TCA AA	57,6
	sY134-R	SEQ ID NO:8	TAA CAA CCA CTG CCA AAA CTT TC	59,2
sY254	sY254-F	SEQ ID NO:9	CTG GGT GTT ACC AGA AGG C	59,5
	sY254-R	SEQ ID NO:10	TGA ACC GTA TCT ACC AAA GCA	57,5
sY255	sY255-F	SEQ ID NO:11	CGT GCT GAG TTA CAG GAT TC	58,4
	sY255-R	SEQ ID NO:12	GTG CTC GTC ATG TGC AGC	58,4
sY152	sY152-F	SEQ ID NO:13	GAC AGT CTG CCA TGT TTC AC	58,4
	sY152-R	SEQ ID NO:14	CAG GAG GGT ACT TAG CAG TA	58,4
BPY2	BPY2-F	SEQ ID NO:15	GCC ATA TCT CTG AGC ACA TAA	57,5
	BPY2-R	SEQ ID NO:16	TTC CCT CTT TAC GCA TGA CC	58,4
SRY (sY14)	sY14-F	SEQ ID NO:17	GAA TAT TCC CGC TCT CCG G	59,5
	sY14-R	SEQ ID NO:18	GCT GGT GCT CCA TTC TTG A	57,5
AMEL	AMEL-F	SEQ ID NO:19	TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	57,5
	AMEL-R	SEQ ID NO:20	TCA GAG CTT AAA CTG GGA AGC	57,5

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm

Tách chiết ADN từ mẫu sinh phẩm của người nam. Mẫu sinh phẩm được sử dụng là mẫu máu. Lượng máu và quy trình tách chiết ADN từ máu tuân thủ đúng hướng dẫn của các hãng sản xuất bộ sinh phẩm. Trong quy trình này sử dụng kit thương mại của QIAamp ADN Mini Kit của Qiagen.

Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (OD_{260}); độ sạch của ADN được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Các giá trị OD được đo trên máy đo NanoDrop. Khi tỷ lệ này dao động từ 1,8 đến 2,0 thì ADN đủ chất lượng cho phản ứng PCR. Căn cứ vào giá trị OD_{260} để tính nồng độ ADN theo công thức sau:

$$[ADN] = OD_{260} \times n \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Trong đó OD_{260} : độ hấp thụ của ADN ở bước sóng 260 nm

n : số lần pha loãng mẫu

50 : nồng độ ADN ứng với $OD_{260} = 1$.

Sử dụng nước cất 2 lần đã khử trùng để pha loãng ADN, chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/ μ l. Tất cả ADN được bảo quản ở - 20°C.

iii) thực hiện phản ứng PCR đa môi

- Thực hiện phản ứng PCR đa môi với thành phần là 10 cặp môi trong cùng một phản ứng sử dụng khuôn là ADN tổng số được tách từ mẫu sinh phẩm.

- Hỗn hợp các thành phần cho phản ứng PCR đa môi được cung cấp bởi các hãng thương mại (Qiagen, Invitrogen, BioRad...). Trong quy trình này sử dụng iProof HF Master Mix của Hãng BioRad (Code 1725310) bao gồm các thành phần ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM. Tất cả các ống iProof HF Master Mix được giữ lạnh trên đá trước khi bổ sung ADN khuôn và các môi đặc hiệu.

Các điều kiện thực hiện phản ứng PCR đa môi được thể hiện ở Bảng 5

Bảng 5: Thành phần và điều kiện phản ứng PCR đa môi

PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (μ l)	
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5	98°C trong 5 phút - Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây 72°C trong 5 phút
SEQ ID NO:1 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:3 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:5 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:6 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:7 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 μ M)	0,5	

SEQ ID NO:9 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:11 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:13 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:15 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:17 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:19 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 μ M)	0,5	
ADN tổng số (10-30 ng/ μ l)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm của phản ứng PCR đa môi được điện di trên gel acrylamit 10% và nhuộm ethidium bromit (0,5mg/L) trong 5 phút và quan sát dưới tia tử ngoại bước sóng 260 nm. Sản phẩm PCR gồm các băng ADN được khuếch đại bởi 10 cặp môi. Có thể thay thế ethidium bromit bằng chất nhuộm RedSafe theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lưu ý rằng sản phẩm khuếch đại bằng 2 cặp môi nội chuẩn của phản ứng PCR đa môi phải luôn dương tính; chỉ cần 1 sản phẩm âm tính thì sẽ phải thực hiện lại phản ứng. Sau khi khẳng định kết quả dương tính của 2 cặp môi nội chuẩn, sẽ xem xét đến sản phẩm của 8 cặp môi để phát hiện đột biến. Sự thiếu vắng sản phẩm của cặp môi nào sẽ kết luận đột biến ở vùng AZF tương ứng. Có thể thiếu một hay nhiều sản phẩm trong phản ứng đa môi.

Phân tích kết quả PCR đa môi để phát hiện đột biến AZF: Sản phẩm PCR đa môi được điện di trên gel acrylamit 10% và nhuộm ethidium bromit, quan sát dưới tia tử ngoại bước sóng 260 nm. Đối với mẫu sinh phẩm bình thường không có đột biến sẽ quan sát được đầy đủ các băng ADN có kích thước khác nhau khuếch đại bởi 10 cặp môi. Các băng này được ký hiệu theo tên của cặp môi khuếch đại, ví dụ băng ADN sY84 là sản phẩm khuếch đại bởi cặp môi sY84-F/sY84-R. Các băng ADN nội chuẩn luôn dương tính ở tất cả các mẫu phân tích. Nếu thiếu bất kỳ băng nội chuẩn nào đều phải lặp lại phản ứng PCR. Căn cứ vào sự thiếu các băng ADN là sản phẩm của các cặp môi thiết kế trên 4 vùng AZFa,b,c,d để xác định đột biến ứng với từng vùng AZF.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước sau:

i) thiết kế môi cho phản ứng QF-PCR đa môi

Phản ứng QF-PCR đa môi sử dụng 10 cặp môi với trình tự giống như 10 cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR đa môi nêu trên, khác biệt ở chỗ tất cả các môi xuôi có đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5' của mỗi môi.

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm

Tách chiết ADN từ mẫu sinh phẩm của người nam. Mẫu sinh phẩm được sử dụng là mẫu máu. Lượng máu và quy trình tách chiết ADN từ máu tuân thủ đúng hướng dẫn của các hãng sản xuất bộ sinh phẩm. Trong quy trình này sử dụng kit QIAamp ADN Mini Kit của Qiagen.

Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (OD_{260}); độ sạch của ADN được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Các giá trị OD được đo trên máy đo NanoDrop. Khi tỷ lệ này dao động từ 1,8 đến 2,0 thì ADN đủ chất lượng cho phản ứng PCR. Căn cứ vào giá trị OD_{260} để tính nồng độ ADN theo công thức sau:

$$[ADN] = OD_{260} \times n \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Trong đó OD_{260} : độ hấp thụ của ADN ở bước sóng 260 nm

n : số lần pha loãng mẫu

50 : nồng độ ADN ứng với $OD_{260} = 1$.

Sử dụng nước cất 2 lần đã khử trùng để pha loãng ADN. Chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/ μ l. Tất cả ADN được bảo quản ở - 20°C.

iii) Thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi

Sử dụng iProof HF Master Mix cung cấp bởi Hãng BioRad (Code 1725310) là hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM.

Phản ứng QF-PCR đa môi có tổng thể tích là 25 μ l được thực hiện theo điều kiện trình bày trong Bảng 6. Khi thực hiện phản ứng đều phải làm thêm một mẫu đối chứng âm (không có khuôn ADN để khẳng định không có kết quả dương tính giả do bị nhiễm ADN ngoại lai). Phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy khuếch đại GeneAmp PCR System 9700 hoặc Eppendorf MasterCycle PCR theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 6: Thành phần và điều kiện phản ứng QF-PCR đa môi với các môi được đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5'

QF-PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (μ l)	
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5	98°C trong 5 phút - Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây 72°C trong 5 phút
5' FAM - SEQ ID NO:1 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:3 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:5 (1 μ M)	0,5	

SEQ ID NO:6 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:7 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:9 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:11 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:13 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:15 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:17 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 μ M)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:19 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 μ M)	0,5	
ADN tổng số (10-30 ng/ μ l)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm của phản ứng QF-PCR đa môi được điện di mao quản trên hệ thống máy phân tích di truyền ABI3100 hoặc ABI3500 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với mẫu sinh phẩm bình thường không có đột biến sẽ quan sát được đầy đủ các tín hiệu huỳnh quang tương ứng với kích thước sản phẩm QF-PCR khuếch đại bởi 10 cặp môi. Các tín hiệu này được ký hiệu theo tên của cặp môi khuếch đại, ví dụ tín hiệu sY84 là sản phẩm khuếch đại bởi cặp môi sY84-F/sY84-R. Các tín hiệu của cặp môi nội chuẩn luôn dương tính ở tất cả các mẫu phân tích. Nếu thiếu bất kỳ tín hiệu nội chuẩn nào đều phải lặp lại phản ứng QF-PCR. Căn cứ vào sự thiếu các tín hiệu huỳnh quang là sản phẩm của các cặp môi thiết kế trên 4 vùng AZFa,b,c,d để xác định đột biến ứng với từng vùng AZF.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình thực hiện phản ứng PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới.

Quy trình bao gồm các bước chi tiết như được mô tả dưới đây.

i) thiết kế môi cho phản ứng PCR đa môi

Nguyên tắc thiết kế: Khai thác 10 trình tự nucleotit trên nhiễm sắc thể Y trong ngân hàng dữ liệu NCBI để thiết kế 10 cặp môi. Các trình tự này được trình bày trong Bảng 1. Tám trình tự thuộc 4 vùng AZFa,b,c,d được khai thác để thiết kế 8 cặp môi nhằm phát hiện 8 đột biến ở 4 vùng AZFa,b,c,d. Mỗi vùng AZF được thiết kế 2 cặp môi. Các trình tự này gồm sY84, sY86 (vùng AZFa); sY127, sY134 (vùng AZFb); sY254, sY255 (vùng AZFc) và sY152, BPY2 (vùng AZFd). Ngoài ra trình tự nucleotit sY14 của gen SRY trên nhiễm sắc thể Y được lựa chọn để thiết kế cặp môi nội chuẩn đặc hiệu cho nhiễm sắc thể Y. Trình tự của gen *amelogenin* (AMEL) cùng tồn tại trên

2 nhiễm sắc thể X, Y được lựa chọn để thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho 2 nhiễm sắc thể giới tính. Tất cả 10 cặp mồi được sử dụng trong 1 phản ứng PCR.

Lưu ý rằng dựa vào tính đa hình của gen AMEL ở 2 nhiễm sắc thể X và Y để lựa chọn vị trí thiết kế cặp mồi sao cho kích thước đoạn ADN khuếch đại từ gen AMEL trên nhiễm sắc thể X khác với kích thước đoạn khuếch đại từ gen AMEL trên nhiễm sắc thể Y. Do đó, 1 cặp mồi AMEL sẽ khuếch đại được 2 băng ADN nội chuẩn có kích thước khác nhau, từ đó nhận biết được sự có mặt của cả 2 nhiễm sắc thể giới tính trong mẫu phân tích của nam giới. Hai băng ADN này được kí hiệu là AMEL(X) và AMEL(Y). Như vậy, trong trường hợp không có đột biến, 10 cặp mồi sẽ ứng với 11 sản phẩm khuếch đại là 11 băng ADN có kích thước khác nhau.

Các cặp mồi được kí hiệu theo tên của trình tự lưu trữ trong NCBI; mỗi cặp gồm 1 mồi xuôi (kí hiệu là F) và 1 mồi ngược (kí hiệu là R). Ví dụ cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự sY84 sẽ được kí hiệu là sY84-F (mồi xuôi) và sY84-R (mồi ngược). Tất cả 10 cặp mồi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng PCR đa mồi.

Bảng 7 : Trình tự nucleotit trong ngân hàng dữ liệu NCBI được khai thác để thiết kế 10 cặp mồi

Nhiễm sắc thể	Mã đăng ký (NCBI)	Trình tự	Nucleotit (5'-3')
Y Vùng AZFa	G12019.1 (sY84)	SEQ ID NO:21	TCAGCAAAGAGAAGGGTCTGAAAGCAGGT NNCTGATTTCACCCTTTACAGTTTAATACAA GGGATTTTACATACAGACATATAAGCTGAT AGTCCTGGNTTCCCTATTTGTTTTAAGGTGC CATTCTGGNGGCTCTACCTCCTTCCCCCAG TGCCCATATGGGCCTTAGTCTGCTGTAGGAT GCTCAGGCAAGCCCTTGAGCAAATTCCTT AATCTGCACGAAACATGGGCTGGAGATTCA GTGGGACCCTTTCTTTAGTGTCTGGCTAATN CAAGCTGGCTAACTCCTTTCAAAGGTTTTG TCTTGCTGATGAAGCCTCCAGGTAGTAGGC TTCAGAGNGGN
	G49207.1 (sY86)	SEQ ID NO:22	ATGGATCCCTCAGCACATGGGTGACACACA GACTATGCTTCAGCAGGTCTGTCTGGGCCC AAGACACATTGTTTCTCATCAGCTCCCAGG GGATGTCAAGGCTGCAGATCCATGGATCTC ACTTTGCAGGACAGAGACTTGTAATGGCT TCCCAGAGTTGTTACAAAGAAATCCCCAAG ACTGGGCCCCCTTAAACAACAACCTTGATTCT CACAGTCCTTGAGGCTAGAAGTCTGAGATC AAGCTATGGCCAGGGCTGGTTCCTCCTGAG GCCTCTCTCCTTGGGTTGTAGATGCTGTCTT CTCCCTGTGTCCTCACAGGGTTGTCCCTCTG

			TGTGTGTCTGTGTCCTCATCTCCTCTTCTTAT GAGGTGTCTTAGTCCATTTTCAGGCTGCTGTC ACAGCATGCCGTAGACTGGGTGGC
Y Vùng AZFb	G11998.1 (sY127)	SEQ ID NO:23	GGCCTGGGAATATAGCCAAAATAATCAGC ATCTGAAGTAATAATTCATAGAGGCTAGGC TCACAAACGAAAAGAAAAAGATAGCACCC ACTGGAATCTACCAAAGCCCACTGTGTTCA TGCCCACAAAAAGAGAAGAACTTTTTTCAT GAGATGCTAATTATACAAAAGNCAAAGGCA TTTCTGTGTCACAGCTTGTTTCCTTATATGG GTGAGCCAGATGTTTGTNAAAGTCCTTGATT AAATGGGCTGGAGATTTCCCTGTCTGTGTA GCCATGAGCATATTTNCAGTTACAACACCC CTGTGCTATTTCCCTTATTACTGCCTGCAGC TTGATTANTTTTTTCCCAGTCAGCTTTTCTAT GTTATGTGGGAATGAGNCACTN
	G12001.1 (sY134)	SEQ ID NO:24	GAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGT ACGGGCCCCCCTCGAGGTTCGACGGTATCG ATAAGCTTAAAATGTTTGAGAAGCCTTCAG AAAGACTACAAAACGTCTGCCTCACCATA AAACGTTTATCTTTTAGAGGAATAGTACAG GTCAAAGGAAATAAATAGATGGGGTTGATA CTAAAGTTTAAAACATCTGGAACATTCTACT TGAAGCGTTCTGTGACTGAAAGAGGATATG ATAATGAAACCTTTTTTTTTTAACCTAAATC AAAACGTGAAGCTAAGTTTCTGAAGTGC ATAGCATGATGAAATTAAATGTTCTAGTTT AAATAGTGGAAAGTAGGTGTTTTGTCTTGG GTGGTACTCATGATAATTTTTTCTTGAAAGT TTTGGCAGTGGTTGTTATAACAGTTT
Y Vùng AZFc	G38349.1 (sY254)	SEQ ID NO:25	AAGGCTGGGTGTTACCAGAAGGCAAAATCG TGCCAAACACTGTTTTTGTGGTGAATTGA TGCTAGGGTATTGTATTCGTACCTCATTTTT ACCTTAACATACATCATGAACAATGGGATG TGGGCCCTGTTACAACTTAAATTTTTTTTT GTAATTCCTGGAGGTTTAGAATTGCTTTTAG GTTTGACCCATAGGTACTAAAAATATCTTTG ACAAAGGGCTGCTGGTCATTCGGGGATAAA TGGGGGAGAAATTTCCACCTCATGGTAGTA AAATTGTAGTAAAGTTGAAATTTTTGAATG CTGAATTTTTACTCTGACGTTCAAGTTCTTTTC

			CATAGATGGATGAAACTGAGATTGGAAGCT GCTTTGGTAGATACGGTTCAGTGAAAGAAG TGAA
	G65827.1 (sY255)	SEQ ID NO:26	GGTCTGAACGTGCTGAGTTACAGGATTCGG CGTGATTTGGGGCTGCAGGTAGGTTTCAGT GTTTGGATTCCGCAGACGTTCTGAAACTGTG GTGGAGGAGGAGGATTAACACCAAAGGA CGTGGCTGCACATGACGAGCACATAACTTT TGT
Y Vùng AZFd	G12039.1 (sY152)	SEQ ID NO:27	NNACNAGNTACNCAAGCTTTNATTTNACTC TGTATCTCTACAAAATNNANGAAAGACAGT CTGCCATGTTTCACCTCTTTAACAGCAAAGA TAACAAAATNNATGCTGAAACCAAGACAGG AACACCAAATCTNAGAACTNTNCTGCAGA AANGTTACTGCTAAGTACCCTCCTGTNAAA NTATTATNCNANCACTNNTNCATACTACAG NGGTCTTCNTTNCACANTNCTNNGTNTTTC NTNAANTNTNGGGTACAGTNCAGTGGTTN NNGGGGCAANCTTTTTTCNGGCAGTTGGTNT ANCCNNGGTTGNGGGCCTCGGTTGTAGCTGN GCGTGGTTCATTNNCTCCCTTTTNTTTCNC CTGNTNTTNTTNCNNNGGCNNCTGTTNCCC NGTGTGNCCTGNCC
	NG- 009862.1 (BPY2)	SEQ ID NO:28	ATACCTAAAGAAGCACCTAGGTGATATGAT TCTCTTTTTCTGCCTGATCCCTGCCTACTGGT GACATTCGGCCATATCTCTGAGCACATAAC CTATATGATGTGACTCTCTTATTCTGTCTGC GCTTTGACAATAAGAAGACTGTGAAATGTT AATGAGCCCAGCACTTAGGTAACGTAAGTC TTGTCTGGTTGCTGAACAACCCCCACAAAC AAGACTTTTGCTGTATTTACAGGGCCCAACAC CTGGATGATGTTACTCTTCTGCCTAGGTCAT GCGTAAAGAGGGAATTAGGGCATATTGCTT GGCCCAGTCCCGTAATGATATGACTCTCCTG CTTGTGCCAGAGCCACAGAAGGTATTTTGA TATATCTTGTTCCCTTTCTGTA
Y Gen SRY (sY14)	G38356.1 (sY14)	SEQ ID NO:29	CTGTGCAAGAGAATATTCCCGCTCTCCGGA GAAGCTCTTCCTTCCTTTGCACTGAAAGCTG TAACTCTAAGTATCAGTGTGAAACGGGAGA AAACAGTAAAGGCAACGTCCAGGATAGAGT GAAGCGACCCATGAACGCATTCATCGTGTG

			GTCTCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCT AGAGAATCCCAGAATGCGAAACTCAGAGAT CAGCAAGCAGCTGGGATACCAGTGGAAAAT GCTTACTGAAGCCGAAAAATGGCCATTCTT CCAGGAGGCACAGAAATTACAGGCCATGCA CAGAGAGAAATACCCGAATTATAAGTATCG ACCTCGTCGGAAGGCGAAGATGCTGCCGAA GAATTGCAGTTTGCTTCCCGCAGATCCCGCT TCGGTACTCTGCAGCGAAGTGCAACTGGAC AACAGGTTGTACAGGGATGACTGTACGAAA GCCACACACTCAAGAATGGAGCACCAGCTA GGCCACTTA
Y Gen <i>Amelogenin</i>	NG_00801 1.1 (AMEL-Y)	SEQ ID NO:30	TCTCTTTACTAATTTTGATCACTGTTTGCATT AGCAGTCCCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGT GGGTGGATTCTTCATCCCAAATAAAGTGGT TTCTCAAGTGGTCCCAATTTTACAGTTCCTA CCATCAGCTTCCCAGTTTAAGCTCTGATGGT TGGCCTCAAGCCTGTGTTGC
X Gen <i>Amelogenin</i>	NG_01204 0.1 (AMEL-X)	SEQ ID NO:31	ACTTCAGCTATGAGGTAATTTTCTCTTTAC TAATTTTGACCATTGTTTGC GTTAACAATGC CCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTGTGTTGATT CTTTATCCCAGATGTTTCTCAAGTGGTCCTG ATTTTACAGTTCCTACCACCAGCTTCCCAGT TTAAGCTCTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG TCGTCCCAGCAGCCTCCCGCCTGG

Dựa vào trình tự nucleotit đã lựa chọn trong Bảng trên để thiết kế 10 cặp mồi, sử dụng chương trình OligoCalc truy cập miễn phí (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Các mồi xuôi được thiết kế theo đúng trình tự nucleotit trong ngân hàng dữ liệu NCBI, các mồi ngược được thiết kế theo trình tự bổ sung. Chiều dài (số nucleotit) của từng mồi được chọn thỏa mãn: (1) đảm bảo cho giá trị Tm của mồi trong dung dịch có muối NaCl nồng độ 50 mM (tính theo OligoCalc) không nhỏ hơn 55°C và (2) giá trị Tm của tất cả các mồi không chênh lệch nhau quá 3°C. Sản phẩm khuếch đại của 10 cặp mồi phải đảm bảo sai khác nhau ít nhất 5 bp, sản phẩm có kích thước bé nhất phải đạt 80 bp và lớn nhất không quá 500 bp. Trình tự các mồi, nhiệt độ Tm của mồi được trình bày trong Bảng 8. Kích thước các đoạn ADN khuếch đại bởi 10 cặp mồi được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 8: Trình tự nucleotit của các mồi được thiết kế theo phần mềm OligoCalc

Vùng trình tự đích	Tên mồi	Kí hiệu	Trình tự nucleotit (5'-3')	T _m (°C)
sY84	sY84-F	SEQ ID NO:1	GAG AAG GGT CTG AAA GCA G	57,5
	sY84-R	SEQ ID NO:2	GCC TAC TAC CTG GAG GCT	58,4
sY86	sY86-F	SEQ ID NO:3	GGG TGA CAC ACA GAC TAT G	57,5
	sY86-R	SEQ ID NO:4	ACA GAG GGA CAA CCC TGT G	59,5
sY127	sY127-F	SEQ ID NO:5	AGC ACC CAC TGG AAT CTA C	57,5
	sY127-R	SEQ ID NO:6	CAT GGC TAC ACA GAC AGG G	58,2
sY134	sY134-F	SEQ ID NO:7	TTA GAG GAA TAG TAC AGG TCA AA	57,6
	sY134-R	SEQ ID NO:8	TAA CAA CCA CTG CCA AAA CTT TC	59,2
sY254	sY254-F	SEQ ID NO:9	CTG GGT GTT ACC AGA AGG C	59,5
	sY254-R	SEQ ID NO:10	TGA ACC GTA TCT ACC AAA GCA	57,5
sY255	sY255-F	SEQ ID NO:11	CGT GCT GAG TTA CAG GAT TC	58,4
	sY255-R	SEQ ID NO:12	GTG CTC GTC ATG TGC AGC	58,4
sY152	sY152-F	SEQ ID NO:13	GAC AGT CTG CCA TGT TTC AC	58,4
	sY152-R	SEQ ID NO:14	CAG GAG GGT ACT TAG CAG TA	58,4
BPY2	BPY2-F	SEQ ID NO:15	GCC ATA TCT CTG AGC ACA TAA	57,5
	BPY2-R	SEQ ID NO:16	TTC CCT CTT TAC GCA TGA CC	58,4
SRY (sY14)	sY14-F	SEQ ID NO:17	GAA TAT TCC CGC TCT CCG G	59,5
	sY14-R	SEQ ID NO:18	GCT GGT GCT CCA TTC TTG A	57,5
AMEL	AMEL-F	SEQ ID NO:19	TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	57,5
	AMEL-R	SEQ ID NO:20	TCA GAG CTT AAA CTG GGA AGC	57,5

Bảng 9: Kích thước các băng ADN được khuếch đại từ 10 trình tự nucleotit đã lựa chọn cho 4 vùng AZF và hai trình tự đặc hiệu của 2 nhiễm sắc thể X, Y.

Cặp mồi	Khuếch đại vùng	Kích thước sản phẩm (bp)
SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2	Vùng AZFa	327
SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4	Vùng AZFa	318
SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:6	Vùng AZFb	193
SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8	Vùng AZFb	278

SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:10	Vùng AZFc	383
SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:12	Vùng AZFc	134
SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:14	Vùng AZFd	118
SEQ ID NO:15/SEQ ID NO:16	Vùng AZFd	220
SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:18	Gen SRY trên nhiễm sắc thể Y	470
SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20	Gen AMEL trên hai nhiễm sắc thể X và Y	100 (AMEL-X)
		106 (AMEL-Y)

Do cặp môi AMEL được thiết kế dựa vào tính đa dạng của gen AMEL trên 2 nhiễm sắc thể X và Y nên cặp môi này sẽ khuếch đại 2 băng ADN có kích thước khác nhau.

Các môi được đặt mua từ Hãng IDT (Mỹ). Môi ở dạng đông khô. Sử dụng nước cất hai lần khử trùng để pha loãng môi về nồng độ 100 μM theo hướng dẫn chi tiết của hãng sản xuất (nồng độ gốc 100 μM). Môi được bảo quản ở -20°C . Từ nồng độ gốc 100 μM , các môi tiếp tục được pha loãng về nồng độ thích hợp bằng nước cất hai lần khử trùng. Sau khi pha loãng, các môi được bảo quản ở -20°C . Cách pha môi được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10: Chuẩn bị nồng độ các môi thích hợp cho các phản ứng PCR

Môi	Thể tích môi gốc 100 μM (μl)	Thể tích H_2O (μl)	Nồng độ môi cuối cùng (μM)
SEQ ID NO:1	10	490	2
SEQ ID NO:2	10	490	2
SEQ ID NO:3	10	490	2
SEQ ID NO:4	10	490	2
SEQ ID NO:5	5	495	1
SEQ ID NO:6	5	495	1
SEQ ID NO:7	10	490	2
SEQ ID NO:8	10	490	2
SEQ ID NO:9	10	490	2
SEQ ID NO:10	10	490	2
SEQ ID NO:11	5	495	1
SEQ ID NO:12	5	495	1
SEQ ID NO:13	10	490	2
SEQ ID NO:14	10	490	2
SEQ ID NO:15	10	490	2
SEQ ID NO:16	10	490	2
SEQ ID NO:17	5	495	1
SEQ ID NO:18	5	495	1
SEQ ID NO:19	10	490	2
SEQ ID NO:20	10	490	2

iii) thu mẫu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm

Tách chiết ADN từ mẫu sinh phẩm của người nam. Mẫu sinh phẩm được sử dụng là mẫu máu. Lượng máu và quy trình tách chiết ADN từ máu tuân thủ đúng hướng dẫn của các hãng sản xuất bộ sinh phẩm. Trong quy trình này sử dụng kit QIAamp ADN Mini Kit của Qiagen.

Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (OD_{260}); độ sạch của ADN được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Các giá trị OD được đo trên máy đo NanoDrop. Khi tỷ lệ này dao động từ 1,8 đến 2,0 thì ADN đủ chất lượng cho phản ứng PCR. Căn cứ vào giá trị OD_{260} để tính nồng độ ADN theo công thức sau:

$$[ADN] = OD_{260} \times n \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Trong đó OD_{260} : độ hấp thụ của ADN ở bước sóng 260 nm

n : số lần pha loãng mẫu

50 : nồng độ ADN ứng với $OD_{260} = 1$.

Sử dụng nước cất 2 lần đã khử trùng để pha loãng ADN, chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/ μ l. Tất cả ADN được bảo quản ở - 20°C.

iii) Thực hiện phản ứng PCR đa môi

Sử dụng iProof HF Master Mix cung cấp bởi Hãng BioRad (Code 1725310) là hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM.

Phản ứng PCR đa môi có tổng thể tích là 25 μ l được thực hiện theo điều kiện trình bày trong Bảng 11. Khi thực hiện phản ứng đều phải làm thêm một mẫu đối chứng âm (không có khuôn ADN để khẳng định không có kết quả dương tính giả do bị nhiễm ADN ngoại lai). Phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy khuếch đại GeneAmp PCR System 9700 hoặc Eppendorf MasterCycle PCR theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 11: Thành phần và điều kiện phản ứng PCR đa môi.

PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (μ l)	
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5	98°C trong 5 phút - Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây 72°C trong 5 phút
SEQ ID NO:1 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:3 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:5 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:6 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:7 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 μ M)	0,5	

SEQ ID NO:9 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:11 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:13 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:15 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:17 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:19 (2 μ M)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 μ M)	0,5	
ADN tổng số (10-30 ng/ μ l)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm PCR đa môi điện di trên gel acrylamit 10% và nhuộm ethidium bromit, quan sát dưới tia tử ngoại bước sóng 260 nm được thể hiện trong Hình 2. Đối với mẫu sinh phẩm bình thường không có đột biến sẽ quan sát được 11 băng ADN trên gel điện di có kích thước như trình bày trong Bảng 9. Các băng này được ký hiệu theo tên của cặp môi khuếch đại, ví dụ băng ADN sY84 là sản phẩm khuếch đại bởi cặp môi sY84-F/sY84-R. Trong số 11 băng ADN gồm có 1 băng nội chuẩn sY14 và băng nội chuẩn AMEL(Y) đặc hiệu cho nhiễm sắc thể Y, băng nội chuẩn AMEL(X) đặc hiệu cho nhiễm sắc thể X và 8 băng đặc hiệu cho 4 vùng AZF (sY84 và sY86 đặc hiệu cho vùng AZFa; sY127 và sY134 đặc hiệu cho vùng AZFb; sY254 và sY255 đặc hiệu cho vùng AZFc; sY152 và BPY2 đặc hiệu cho vùng AZFd). Các băng ADN nội chuẩn (sY14, AMEL(X) và AMEL(Y)) luôn dương tính. Nếu thiếu bất kỳ băng nội chuẩn nào đều phải lặp lại phản ứng PCR. Căn cứ vào sự thiếu các băng ADN có kích thước như trình bày trong Bảng 12 để xác định đột biến ứng với từng vùng AZF.

Bảng 12: Kết luận đột biến vùng AZF dựa vào sự có mặt hoặc không có các băng điện di sản phẩm PCR đa môi trên gel điện di acrylamit 10%

Vùng AZF	Sản phẩm PCR của cặp môi	Kích thước (bp)	Băng ADN trên gel điện di	
			Có	Không
Vùng AZFa	SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2	327	Bình thường	Đột biến AZFa
Vùng AZFa	SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4	318	Bình thường	Đột biến AZFa
Vùng AZFb	SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:6	193	Bình thường	Đột biến AZFb
Vùng AZFb	SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8	278	Bình thường	Đột biến AZFb
Vùng AZFc	SEQ ID NO:9/SEQ ID	383	Bình	Đột biến

	NO:10		thường	AZFc
Vùng AZFc	SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:12	134	Bình thường	Đột biến AZFc
Vùng AZFd	SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:14	118	Bình thường	Đột biến AZFd
Vùng AZFd	SEQ ID NO:15/SEQ ID NO:16	220	Bình thường	Đột biến AZFd
Gen SRY (sY14) trên nhiễm sắc thể Y	SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:18	470	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng
Gen AMEL trên nhiễm sắc thể X	SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20	100 (AMEL-X)	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng
Gen AMEL trên nhiễm sắc thể Y	SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20	106 (AMEL-Y)	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng

Ví dụ 2: Quy trình thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới.

Quy trình này bao gồm các bước sau:

i) thiết kế môi cho phản ứng QF-PCR đa môi:

Phản ứng QF-PCR đa môi sử dụng 10 cặp môi với trình tự giống như 10 cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR đa môi đã nêu ở Ví dụ 1, khác biệt ở chỗ tất cả các môi xuôi có đánh dấu huỳnh quang ở đầu 5' của mỗi môi. Quy trình theo sáng chế sử dụng chất đánh dấu huỳnh quang FAM.

ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm

Tách chiết ADN từ mẫu sinh phẩm của người nam. Mẫu sinh phẩm được sử dụng là mẫu máu. Lượng máu và quy trình tách chiết ADN từ máu tuân thủ đúng hướng dẫn của các hãng sản xuất bộ sinh phẩm. Trong quy trình này sử dụng kit QIAamp ADN Mini Kit của Qiagen.

Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (OD_{260}); độ sạch của ADN được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Các giá trị OD được đo trên máy đo NanoDrop. Khi tỷ lệ này dao động từ 1,8 đến 2,0 thì ADN đủ chất lượng cho phản ứng PCR. Căn cứ vào giá trị OD_{260} để tính nồng độ ADN theo công thức sau:

$$[ADN] = OD_{260} \times n \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Trong đó OD_{260} : độ hấp thụ của ADN ở bước sóng 260 nm

n : số lần pha loãng mẫu

50 : nồng độ ADN ứng với $OD_{260} = 1$.

Sử dụng nước cất 2 lần đã khử trùng để pha loãng ADN, chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/μl. Tất cả ADN được bảo quản ở - 20°C.

iii) Thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi

Sử dụng iProof HF Master Mix cung cấp bởi Hãng BioRad (Code 1725310) là hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μM, đệm MgCl₂ 3mM.

Phản ứng QF-PCR đa môi có tổng thể tích là 25 μl được thực hiện theo điều kiện trình bày trong Bảng 13. Khi thực hiện phản ứng đều phải làm thêm một mẫu đối chứng âm (không có khuôn ADN để khẳng định không có kết quả dương tính giả do bị nhiễm ADN ngoại lai). Phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy khuếch đại GeneAmp PCR System 9700 hoặc Eppendorf MasterCycle PCR theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 13: Thành phần và điều kiện phản ứng QF-PCR đa môi với các môi được đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5'

QF-PCR đa môi		Điều kiện
Thành phần	Thể tích (μl)	
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μM, đệm MgCl ₂ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5	98°C trong 5 phút - Lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây 72°C trong 5 phút
5' FAM - SEQ ID NO:1 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:2 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:3 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:4 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:5 (1 μM)	0,5	
SEQ ID NO:6 (1 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:7 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:8 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:9 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:10 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:11 (1 μM)	0,5	
SEQ ID NO:12 (1 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:13 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:14 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:15 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:16 (2 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:17 (1 μM)	0,5	
SEQ ID NO:18 (1 μM)	0,5	
5' FAM - SEQ ID NO:19 (2 μM)	0,5	
SEQ ID NO:20 (2 μM)	0,5	

ADN tổng số (10-30 ng/μl)	2,5	
Tổng	25	

Sản phẩm QF-PCR được điện di mao quản trên hệ thống máy ABI3500 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể như sau:

Bước 1: Cho 2 μL dung dịch “560 Sizer Orange” vào 100 μL dung dịch “Hi-Di Formamit” vào tuýp 1,5 mL, trộn và ly tâm 800 vòng/phút trong 15 giây.

Bước 2: Lấy 15 μL hỗn hợp trên vào mỗi giếng trên đĩa 96.

Bước 3: Thêm vào 1,5 μL sản phẩm của phản ứng QF-PCR vào từng giếng đã có 15 μL hỗn hợp bước 2, đậy nắp, đặt vào máy phân tích di truyền ABI3500 ở điều kiện sau: “application type fragment”, “cap” 50 cm, “polymer Pop” 7, “dyeset Any5Dye”, “Oven temperature” 60 độ C, “run time” 1500 giây, “run voltage” 19,5 Kvol, “PreRun time” 180 giây, “Prerun voltage” 15 Kvol, “injection time” 8 giây, “injection voltage” 1,6 Kvol; “data delay” 1 giây.

Phân tích kết quả bằng phần mềm Genemapper ID V3.2. Kết quả minh họa sản phẩm QF-PCR phân tích trên các mẫu sinh phẩm khác nhau được trình bày trên Hình 3. Đối với mẫu sinh phẩm bình thường không có đột biến sẽ quan sát được 11 tín hiệu huỳnh quang có kích thước trình bày trong Bảng 9. Trong số 11 tín hiệu, có 2 tín hiệu nội chuẩn sY14 và AMEL(Y) đặc hiệu cho nhiễm sắc thể Y, 1 tín hiệu nội chuẩn AMEL(X) đặc hiệu cho nhiễm sắc thể X cùng với 8 tín hiệu đặc hiệu cho 4 vùng AZF (sY84 và sY86 đặc hiệu cho vùng AZFa; sY127 và sY134 đặc hiệu cho vùng AZFb; sY254 và sY255 đặc hiệu cho vùng AZFc; sY152 và BPY2 đặc hiệu cho vùng AZFd). Ba tín hiệu nội chuẩn sY14, AMEL(Y) và AMEL(X) luôn dương tính. Nếu thiếu bất kỳ bằng nội chuẩn nào đều phải lặp lại phản ứng QF-PCR. Căn cứ vào sự thiếu các tín hiệu huỳnh quang ứng với kích thước trình bày trong Bảng 14 để xác định đột biến ở vùng AZF.

Bảng 14: Kết luận đột biến vùng AZF dựa vào sự có mặt hoặc không có các tín hiệu huỳnh quang phân tích bằng phần mềm Genemapper ID V3.2

Vùng AZF	Sản phẩm PCR của cặp mỗi	Kích thước (bp)	Tín hiệu huỳnh quang	
			Có	Không
Vùng AZFa	5' FAM - SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2	327	Bình thường	Đột biến AZFa
Vùng AZFa	5' FAM - SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4	318	Bình thường	Đột biến AZFa
Vùng AZFb	5' FAM - SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:6	193	Bình thường	Đột biến AZFb
Vùng AZFb	5' FAM - SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:8	278	Bình thường	Đột biến AZFb
Vùng AZFc	5' FAM - SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:10	383	Bình thường	Đột biến AZFc
Vùng	5' FAM - SEQ ID NO:11/SEQ ID	134	Bình	Đột biến

AZFc	NO:12		thường	AZFc
Vùng AZFd	5' FAM - SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:14	118	Bình thường	Đột biến AZFd
Vùng AZFd	5' FAM - SEQ ID NO:15/SEQ ID NO:16	220	Bình thường	Đột biến AZFd
Gen SRY trên nhiễm sắc thể Y	5' FAM - SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:18	470	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng
Gen AMEL trên nhiễm sắc thể X	5' FAM - SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20	100 (AMEL-X)	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng
Gen AMEL trên nhiễm sắc thể Y	5' FAM - SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20	106 (AMEL-Y)	Bình thường	Thực hiện lại phản ứng

Ví dụ 3: Ví dụ thử nghiệm để đánh giá khả năng chẩn đoán đột biến mất đoạn AZF

Mười hai mẫu ADN đã xác định mất đoạn AZF bằng bộ kit Devyser được sử dụng làm khuôn cho phản ứng QF-PCR đa môi. Trong mỗi mẻ phản ứng đều sử dụng ADN của người nam giới bình thường làm chứng dương, ADN của người nữ giới bình thường là chứng âm và một chứng âm là nước cất để kiểm tra nhiễm chéo. Sản phẩm phản ứng được phân tích đồng thời trên gel polyacrylamit 12% (Hình 4) và điện di mao quản. Trong đó, mỗi vùng AZF bị xóa sẽ làm mất 2 băng ADN tương ứng trên kết quả điện di. Số liệu thu được từ phản ứng QF-PCR hoàn toàn trùng khớp với số liệu phân tích từ bộ kit Devyser, cho 3 vùng AZFa,b,c.

Bảng 15: Sự phù hợp kết quả giữa QF-PCR và bộ kit thương mại Devyser

Mẫu	Kiểu mất đoạn AZF	
	QF-PCR	Bộ kit Devyser
M1	abcd	abc
M2	a	a
M3	cd	c
M4	bcd	bc
M5	abcd	abc
M6	cd	c

M7	cd	c
M8	cd	c
M9	cd	c
M10	cd	c
M11	Không có mất đoạn	Không có mất đoạn
M12	abcd	abc

Đặc biệt, bộ kit Deyser được chúng tôi lựa chọn đối chiếu là vì cùng sử dụng nguyên lý là phương pháp QF-PCR. So sánh kết quả điện di mao quản giữa hai bộ xét nghiệm giúp đảm bảo kết quả chính xác, không có sai sót trong thao tác.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Các mồi được thiết kế cho phản ứng PCR đa mồi và QF-PCR đa mồi đều có khả năng gắn đặc hiệu vào khuôn để khuếch đại đồng thời 11 băng ADN bao gồm 8 băng ADN đặc hiệu cho 4 vùng AZFa,b,c,d; 2 băng ADN nội chuẩn đặc hiệu cho nhiễm sắc thể Y và 1 băng ADN đặc hiệu cho nhiễm sắc thể X.

Quy trình thực hiện 1 phản ứng PCR đa mồi hoặc 1 phản ứng QF-PCR đa mồi cho phép phát hiện đồng thời 8 đột biến ở 4 vùng AZFa,b,c,d liên quan đến sự vô sinh, hiếm muộn ở nam giới. Việc sử dụng các mồi này trong một phản ứng giúp tiết kiệm chi phí, thời gian, thao tác đơn giản có độ ổn định, chính xác cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình thực hiện phản ứng PCR đa mồi để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước:

i) thiết kế mồi cho phản ứng PCR đa mồi bao gồm 10 cặp mồi trong đó:

8 cặp mồi đặc hiệu cho 8 trình tự nucleotit lựa chọn từ 4 vùng AZFa,b,c,d trên nhiễm sắc thể Y, trong đó 8 trình tự đó gồm sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY152, BPY2;

2 cặp mồi làm nội chuẩn trong đó 1 cặp mồi đặc hiệu dựa vào trình tự gen SRY chỉ xuất hiện trên nhiễm sắc thể Y, cụ thể là trình tự sY14 và 1 cặp mồi đặc hiệu cho trình tự gen AMEL xuất hiện ở cả 2 nhiễm sắc thể giới tính X và Y; trong đó trình tự các cặp mồi và kích thước băng ADN được khuếch đại bởi các cặp mồi như sau:

Vùng trình tự đích	Tên mồi	SEQ ID NO	Trình tự nucleotit (5'-3')	Kích thước băng ADN
sY84	sY84-F	SEQ ID NO:1	GAG AAG GGT CTG AAA GCA G	327
	sY84-R	SEQ ID NO:2	GCC TAC TAC CTG GAG GCT	
sY86	sY86-F	SEQ ID NO:3	GGG TGA CAC ACA GAC TAT G	318
	sY86-R	SEQ ID NO:4	ACA GAG GGA CAA CCC TGT G	
sY127	sY127-F	SEQ ID NO:5	AGC ACC CAC TGG AAT CTA C	193
	sY127-R	SEQ ID NO:6	CAT GGC TAC ACA GAC AGG G	
sY134	sY134-F	SEQ ID NO:7	TTA GAG GAA TAG TAC AGG TCA AA	278
	sY134-R	SEQ ID NO:8	TAA CAA CCA CTG CCA AAA CTT TC	
sY254	sY254-F	SEQ ID NO:9	CTG GGT GTT ACC AGA AGG C	383
	sY254-R	SEQ ID NO:10	TGA ACC GTA TCT ACC AAA GCA	
sY255	sY255-F	SEQ ID NO:11	CGT GCT GAG TTA CAG GAT TC	134
	sY255-R	SEQ ID NO:12	GTG CTC GTC ATG TGC AGC	
sY152	sY152-F	SEQ ID NO:13	GAC AGT CTG CCA TGT TTC AC	118
	sY152-R	SEQ ID NO:14	CAG GAG GGT ACT TAG CAG TA	
BPY2	BPY2-F	SEQ ID NO:15	GCC ATA TCT CTG AGC ACA TAA	220
	BPY2-R	SEQ ID NO:16	TTC CCT CTT TAC GCA TGA CC	
SRY (sY14)	sY14-F	SEQ ID NO:17	GAA TAT TCC CGC TCT CCG G	470
	sY14-R	SEQ ID NO:18	GCT GGT GCT CCA TTC TTG A	

AMEL	AMEL-F	SEQ ID NO:19	TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	100(X) 106(Y)
	AMEL-R	SEQ ID NO:20	TCA GAG CTT AAA CTG GGA AGC	

ii) thu mẫu thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm bằng kit tách ADN và chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/μl

iii) thực hiện phản ứng PCR đa môi với thành phần và điều kiện như sau:

PCR đa môi	
Thành phần	Thể tích (μl)
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μM, đệm MgCl ₂ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5
SEQ ID NO:1 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:2 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:3 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:4 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:5 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:6 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:7 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:8 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:9 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:10 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:11 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:12 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:13 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:14 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:15 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:16 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:17 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:18 (1 μM)	0,5
SEQ ID NO:19 (2 μM)	0,5
SEQ ID NO:20 (2 μM)	0,5
ADN tổng số (10-30 ng/μl) thu được ở bước ii)	2,5
Tổng	25

tiến hành thực hiện phản ứng ở điều kiện 98°C trong 5 phút; lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây; 72°C trong 5 phút;

sau đó điện di sản phẩm của phản ứng PCR đa môi trên gel acrylamit và nhuộm ethidium bromit, chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel có tia tử ngoại UV bước sóng 260 nm.

2. Quy trình thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi sử dụng môi huỳnh quang để phát hiện đồng thời 8 đột biến mất đoạn vùng AZF trên nhiễm sắc thể Y liên quan đến vô sinh ở nam giới bao gồm các bước:

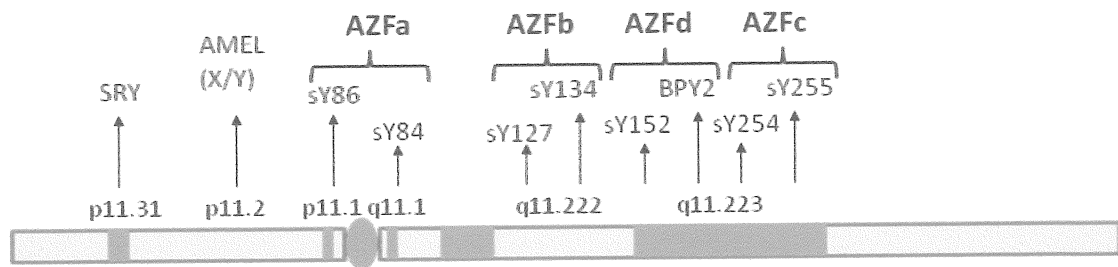
- i) thiết kế môi cho phản ứng QF-PCR đa môi bằng cách sử dụng 10 cặp môi với trình tự như đã được thể hiện trong bước i) điểm 1, khác biệt ở chỗ tất cả các môi xuôi có đánh dấu huỳnh quang FAM ở đầu 5' của mỗi môi;
- ii) thu ADN tổng số từ mẫu sinh phẩm bằng kit tách ADN và chuẩn nồng độ ADN về nồng độ 10-30 ng/ μ l
- iii) thực hiện phản ứng QF-PCR đa môi với thành phần và điều kiện phản ứng QF-PCR đa môi như sau

QF-PCR đa môi	
Thành phần	Thể tích (μ l)
Hỗn hợp các thành phần để thực hiện phản ứng PCR gồm ADN Taq polymeraza 0,04U/ml, dNTPs 400 μ M, đệm $MgCl_2$ 3mM (2x iProof HF Master Mix)	12,5
5' FAM - SEQ ID NO:1 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:2 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:3 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:4 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:5 (1 μ M)	0,5
SEQ ID NO:6 (1 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:7 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:8 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:9 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:10 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:11 (1 μ M)	0,5
SEQ ID NO:12 (1 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:13 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:14 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:15 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:16 (2 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:17 (1 μ M)	0,5
SEQ ID NO:18 (1 μ M)	0,5
5' FAM - SEQ ID NO:19 (2 μ M)	0,5
SEQ ID NO:20 (2 μ M)	0,5
ADN tổng số (10-30 ng/ μ l)	2,5
Tổng	25

tiến hành thực hiện phản ứng ở điều kiện 98°C trong 5 phút; lặp lại 27 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm 98°C 10 giây, 63°C 30 giây, 72°C 20 giây; 72°C trong 5 phút;

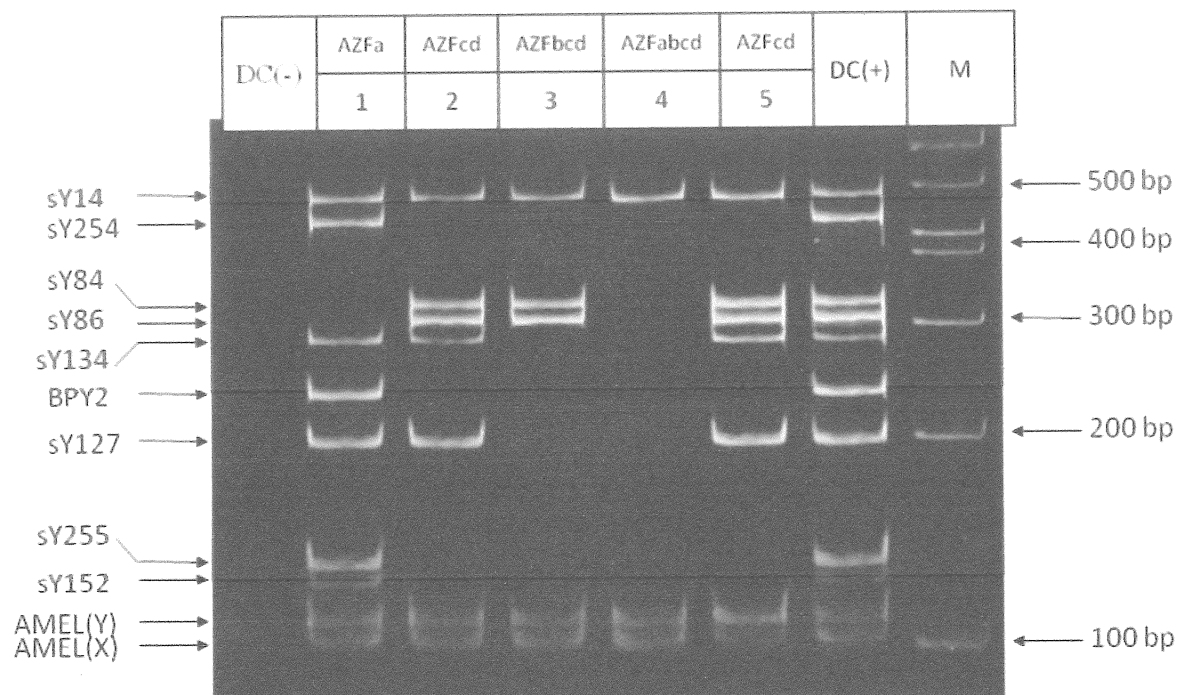
sau đó điện di mao quản sản phẩm của phản ứng QF-PCR đa môi để xác định tín hiệu huỳnh quang.

Hình 1

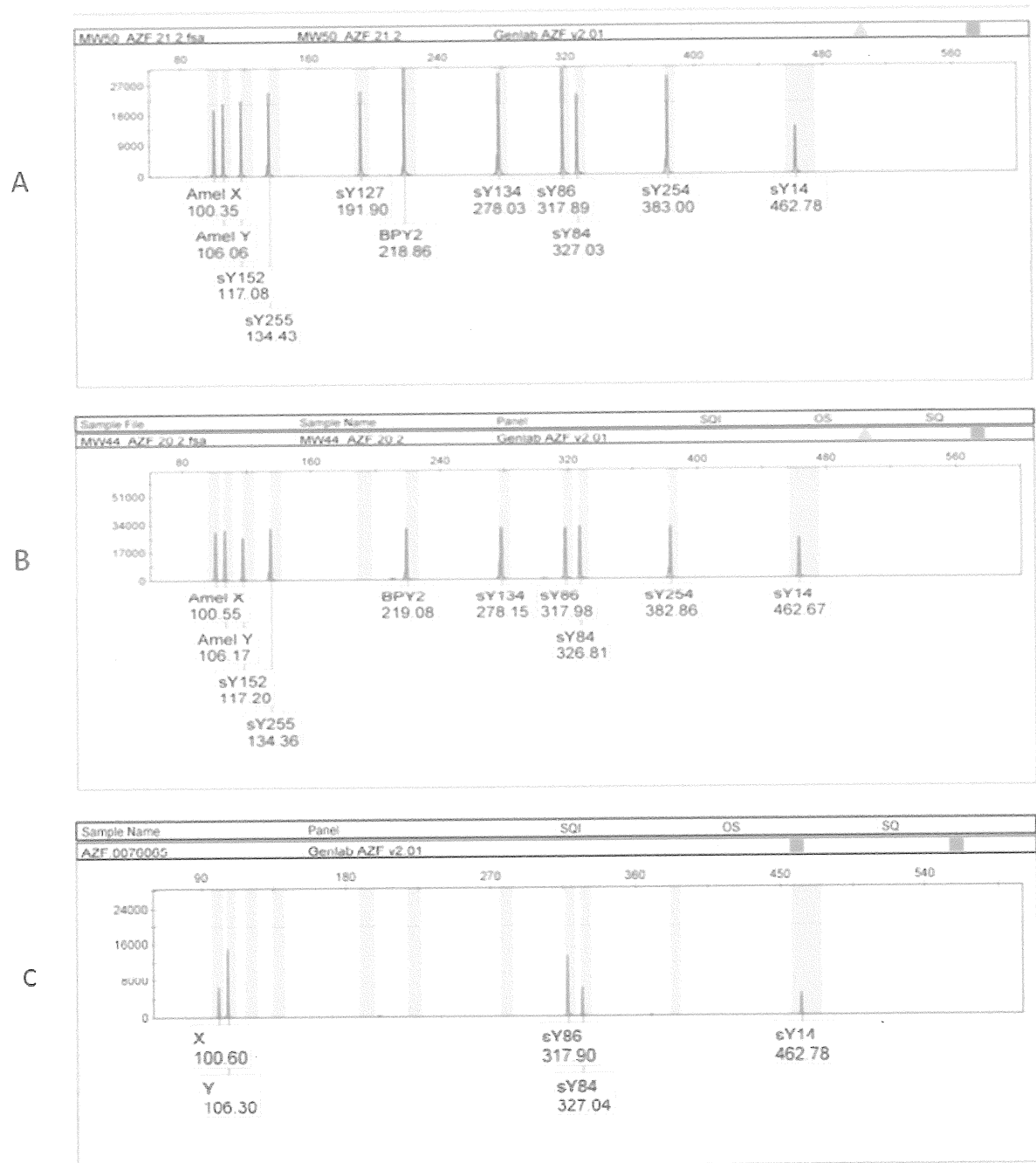


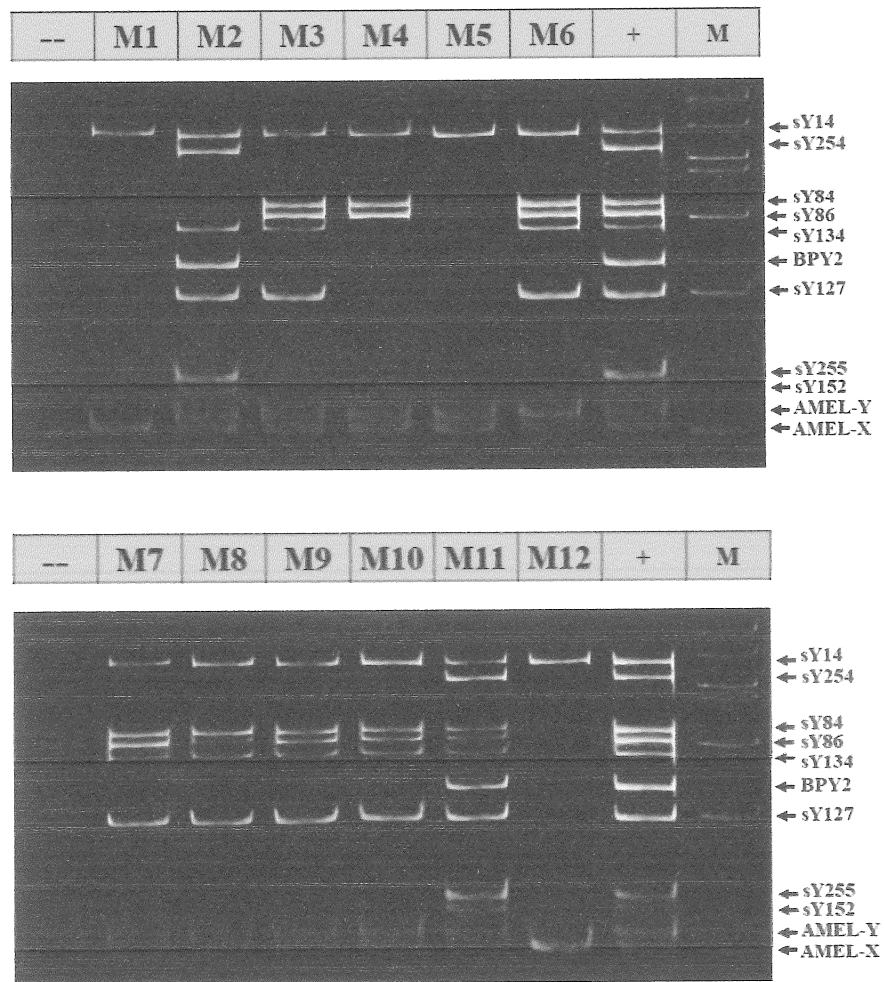
Nhiễm sắc thể Y

Hình 2



Hình 3





Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện công nghệ ADN và phân tích di truyền
 <120> QUY TRÌNH THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR ĐA MÔI VÀ QF-PCR ĐA MÔI SỬ DỤNG MÔI
 HUỖNH QUANG ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 8 ĐỘT BIẾN MẤT ĐOẠN VÙNG AZF TRÊN NHIỄM
 SẮC THỂ Y LIÊN QUAN VÔ SINH Ở NAM GIỚI

<160> 31

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>

<223> Môi

<400> 1

gagaagggtctgaaagcag

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>

<223> Môi

<400> 2

gcctactacctggaggct

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>

<223> Môi

<400> 3

gggtgacacacagactatg

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>

<223> Môi

<400> 4

acagagggacaaccctgtg

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>

<223> Mỗi
 <400> 5
 agcaccactggaatctac

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 6
 catggctacacagacaggg

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 7
 ttagaggaatagtaggtcaaa

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 8
 taacaaccactgccaaaactttc

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 9
 ctgggtgttaccagaaggc

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 10
 tgaaccgtatctaccaaagca

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mời
 <400> 11
 cgtgctgagttacaggattc

<210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mời
 <400> 12
 gtgctcgtcatgtgcagc

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mời
 <400> 13
 gacagtctgccatgtttcac

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mời
 <400> 14
 caggagggtacttagcagta

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mời
 <400> 15
 gccatatctctgagcacataa

<210> 16
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 16
 ttccctctttacgcatgacc

<210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 17
 gaatattcccgcctctccgg

<210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 18
 gctgggtgctccattcttga

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 19
 ctgggctctgtaaagaatagt

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi
 <400> 20
 atcagagcttaaactgggaag

<210> 21
 <211> 346
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại
 <220>

<223> Trình tự sY84 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G12019.1)

<400> 1

tcagcaaaagagaagggctctgaaagcaggttnnctgatttcaccctttacagtttaatacaagggattttacataca
gacatataagctgatagtcctggnttccctatttgttttaaggtgccattcctggnggctctacctccttcccc
agtgcccatatgggccttagtctgtctgtaggatgctcaggcaagcccttgagcaaattcccttaatctgcacgaa
acatgggctggagattcagtgggaccctttcttttagtgtctggctaataatncaagctggctaactcctttcaaaagg
ttttgtcttgctgatgaagcctccaggtagtaggcttcagagnggn

<210> 22

<211> 420

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự sY86 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G49207.1)

<400> 22

atggatccctcagcacatgggtgacacacagactatgcttcagcaggtctgtctgggcccaagacacattgtttc
tcatcagctcccaggggatgtcaaggctgcagatccatggatctcactttgcaggacagagacttgtaatggct
tcccagagttgttacaaagaaatcccaaagactggggcccttaaacacaaccttgattctcacagtccttgagg
ctagaagtctgagatcaagctatggccagggctgggttcctcctgaggcctctctccttggggtgtagatgctgtc
ttctccctgtgtcctcacaggggtgtccctctgtgtgtgtgtgtgtcctcatctcctcttcttatgaggtgtctt
agtccatttcaggctgctgtcacagcatgccgtagactgggtggc

<210> 23

<211> 386

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự sY127 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G11998.1)

<400> 23

ggcctgggaatatagccaaaactaatcagcatctgaagtaataattcatagaggctaggctcacaaacgaaaaga
aaaagatagcaccactggaatctaccaaagcccactgtgttcatgccacaaaaagagaagaaactttttcatg
agatgctaattatacaaaaagncaaaggcatttctgtgtcacagcttggttccttatatgggtgagccagatgttt
gtnaaagtccttgattaaatgggctggagatttccctgtctgtgttagccatgagcatatttncagttacaacacc
cctgtgctatttcccttattactgcctgcagcttgattanttttttcccagtcagcttttctatgttatgtggga
atgagncactn

<210> 24

<211> 420

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự sY134 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G12001.1)

<400> 24

gaatacgactcactatagggcgaattgggtacgggccccccctcgaggtcgacggtatcgataagcttaaaatgt
ttgagaagccttcagaaagactacaaaactgtctgcctcaccataaaaacgtttatcttttagaggaatagtacag
gtcaaaggaaataaatagatgggggttgatactaaagtttaaaacatctggaacatttctacttgaagcgttctgtg
actgaaagaggatatgataatgaaaccttttttttaacctaaatcaaaactgaactagctaagtttctgaagt

gcatagcatgatgaaattaaatgttcctagtttaaatagtggaaagtaggtgttttgccttgggtgggtactcatg
ataatTTTTTcttgaaagTTTTggcagtggttgttataacagttt

<210> 25

<211> 401

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự sY254 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G38349.1)

<400> 25

aaggctgggtgttaccagaaggcaaaatcgtgccaaacactgtttttgttgggtggaattgatgctagggtattgt
attcgtacctcattttttacctaatacatcatgaacaatgggatgtgggccctgttaciaaacttaaattttt
tttgtacttcctggaggttttagaattgcttttaggtttgacccataggtactaaaaatctttgacaaagggct
gctggtcattcggggataaatgggggagaaatttccacctcatggtagtaaaattgtagtaaaagttgaaattttt
gaatgctgaatttttactctgacgttcagttcttttccatagatggatgaaactgagattggaagctgctttggg
agatacgggtcagtgaaagaagtga

<210> 26

<211> 153

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<213> Trình tự sY255 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G65827.1)

<400> 26

ggctctgaacgtgctgagttacaggattcggcgtgatttggggctgcaggtagggtttcagtgtttggattccgcag
acgttctgaaactgtgggtggaggaggaggaactaccaaaggacgtggctgcacatgacgagcacataacttt
tgt

<210> 27

<211> 408

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự sY152 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G65827.1)

<400> 27

nnacnagntacncaagcttttnacttctgtatctctacaaaatnnangaaagacagtctgcatgtttcacc
tctttaacagcaaagataacaaaatnnatgctgaaaccaagacaggaacaccaaactnagaaactntnctgcag
aaangttactgctaagtaccctcctgtnaaantattatncnancactnntncatactacagnggtcttcnttnca
ctantnctnngtntttcnaantntnggtacagtnacttggttttnnggggcaancTTTTcnggcagttggg
ntanccnggttgngggcctcggtttagctgngcgtgggttcatttnctccctttntttcncctgntntnttn
cnnnggcnnctgttncccggtgttgnccctgncc

<210> 28

<211> 388

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự BPY2 trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số NG_009862.1)

<400> 28

atacctaagaagcaccttaggtgatatgattctcttttctgcctgatccctgcctactgggtgacattcggccat
atctctgagcacataacctatatgatgtgactctcttattctgtctgcgctttgacaataagaagactgtgaaat
gttaatgagccagcacttaggtaacgtaagtcttgtctggttgctgaacaacccccacaaacaagacttttgct
gtatttcagggcccaacacctggatgatgttactcttctgcctaggtcatgcgtaaagaggggaattagggcatat
tgcttggcccagtcgtaatgatatgactctcctgcttgtgccagagccacagaaggatatttgatatatcttg
ttccctttctgta

<210> 29

<211> 491

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự SRY trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số G38356.1)

<400> 29

ctgtgcaagagaatattcccgcctctccggagaagctcttcttcttcttgcactgaaagctgtaactctaagtatc
agtgtgaaacgggagaaaacagtaaaaggcaacgtccaggatagagtgaagcgacccatgaacgcattcatcgtgt
ggctctgcgatcagaggcgcaagatggctctagagaatcccagaatgcgaaactcagagatcagcaagcagctgg
gataccagtggaataatgcttactgaagccgaaaaatggccattcttccaggaggcacagaaattacaggccatgc
acagagagaaaatacccgaaattataagtatcgacctcgtcgggaaggcgaagatgctgccgaagaattgcagtttgc
ttcccgcatgcccgccttcggtactctgcagcgaagtgcaactggacaacaggttgtagaggatgactgtacga
aagccacacactcaagaatggagcaccagctaggccactta

<210> 30

<211> 174

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự gen *amelogenin* trên nhiễm sắc thể Y trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số NG_008011.1)

<400> 30

tctctttactaattttgatcactgtttgcatttagcagtccttgggctctgtaaagaatagtgggtggattcttc
atcccaaataaagtgggtttctcaagtgggtcccaattttacagttcctaccatcagcttccagtttaagctctga
tggttggcctcaagcctgtgttgc

<210> 31

<211> 210

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự gen *amelogenin* trên nhiễm sắc thể X trong ngân hàng dữ liệu NCBI (mã số NG_012040.1)

<400> 31

acttcagctatgaggtaatttttctctttactaattttgaccattgtttgcgttaacaatgccctgggctctgta
aagaatagtgtgttgattctttatcccagatgtttctcaagtgggtcctgattttacagttcctaccaccagcttc
ccagtttaagctctgatgggttggcctcaagcctgtgtcgtccagcagcctccgcctgg