



(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)



2-0003214

(51) **C12Q 1/6858**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00484

(22) 05/10/2020

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/04/2021 397

(73) Trường Đại học Dược Hà Nội (VN)

13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Phùng Thanh Hương (VN); Phạm Trần Thu Hà (VN); Trần Quang Bình (VN).

(54) **BỘ MÔI DÙNG ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ PHÂN BIỆT THỂ ĐỒNG HỢP TỬ VÀ DỊ HỢP TỬ
CỦA ALLEN HLA-C*0302 VÀ PHƯƠNG PHÁP PCR ĐẶC HIỆU ALLEN (AS-PCR) SỬ
DỤNG BỘ MÔI NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử và xét nghiệm gen, cụ thể là đề cập đến bộ môi dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp PCR đặc hiệu alen dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* và các ứng dụng xét nghiệm phát sinh mà sử dụng bộ môi này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử và xét nghiệm gen, cụ thể là đề cập đến phương pháp PCR đặc hiệu alen dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* cũng như đề xuất các môi thu được từ phương pháp này để sử dụng cho các ứng dụng xét nghiệm phát sinh khác.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hệ thống kháng nguyên bạch cầu người (*HLA*) là một họ gen mã hóa cho phức hợp kháng nguyên phù hợp tổ chức chính của người (MHC) đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của hệ miễn dịch. *HLA* lần đầu tiên được phát hiện khi nghiên cứu hiện tượng thải ghép (Andrew J, George T (1995), "Disease susceptibility, transplantation and the MHC", *Immunology Today*, 5(16), 209-211.). Khi cấy mô ghép cho một cơ thể khác không giống nhau về các kháng nguyên này (tức là không hòa hợp với tổ chức) thì chúng sẽ kích thích cơ thể khởi phát đáp ứng miễn dịch, dẫn đến thải loại mô ghép. Các gen thuộc họ *HLA* nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6, chiều dài tổng cộng là 3.600 kb hoặc $4,6 \times 10^6$ bazơ nitơ, bao gồm 224 gen, trong đó có 128 gen có chức năng và 96 gen không có chức năng. Cho đến nay, *HLA* được coi là họ gen phức tạp nhất và đa hình (polymorphism) nhất của con người. Họ gen này được chia thành 3 lớp I, II, III trong đó lớp I gồm các gen *HLA-A, B, C, E, F, G*.

HLA lớp I, typ C (*HLA-C*) nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 tại vị trí 6p21.33 (Hình 1) có kích thước 3.388 bazơ, bắt đầu từ nucleotit 31.268.749 - 31.272.136 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-C#snp>) và là vùng gen có sự đa hình lớn với 6067 alen *HLA-C* và 2523 SNP đã được ghi nhận theo số liệu cập nhật tới tháng 7/2020 của cơ sở dữ liệu IMGT/HLA (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>) và cơ sở dữ liệu GeneCards (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-C#snp>). Các nghiên cứu chuyên sâu sàng lọc hàng loạt alen *HLA* lớp I đã phát hiện *HLA-C*0302* là một alen có liên quan tới nguy cơ các phản ứng có hại trên da nghiêm trọng (SCARs) do allopurinol gây ra (Hung S. I., Chung W. H., et al. (2005), "*HLA-B*5801 allele as a genetic marker*

for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol", Proc Natl Acad Sci U S A, 102(11), pp. 4134-9; Kang H. R., Jee Y. K., et al. (2011), "Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans", Pharmacogenet Genomics, 21(5), pp. 303-7). Allopurinol là thuốc điều trị tăng axit uric máu được dùng phổ biến trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Tuy nhiên, đây cũng là một trong những thuốc đứng đầu danh sách được báo cáo liên quan tới các phản ứng quá mẫn cả trong và ngoài nước. Các phản ứng có hại trên da nghiêm trọng (SCARs) do allopurinol rất nguy hiểm, với nhiều tổn thương nặng nề và tỷ lệ tử vong cao (Lương Đức Dũng ", (2015), "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch của hội chứng Steven-Johnson và Lyell do dị ứng thuốc", Luận án Tiến sỹ Y học, Đại học Y Hà Nội, tr. 63-65); Fan W. L., Shiao M. S., et al. (2017), "HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions", J Immunol Res, 2017, pp. 3186328;; Nguyen K. D., Tran T. N., et al. (2019), "Drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Vietnamese spontaneous adverse drug reaction database: A subgroup approach to disproportionality analysis", J Clin Pharm Ther, 44(1), pp. 69-77; Ramasamy S. N., Korb-Wells C. S., et al. (2013), "Allopurinol hypersensitivity: a systematic review of all published cases, 1950-2012", Drug Saf, 36(10), pp. 953-80). Tại Việt Nam, một nghiên cứu thực hiện trên 60 bệnh nhân SJS/TEN (Hội chứng Steven-Sohson/Hoại tử thượng bì nhiễm độc) điều trị nội trú tại Trung tâm Dị ứng – Miễn dịch lâm sàng, bệnh viện Bạch Mai, từ 7/2013 đến 7/2014 ghi nhận allopurinol là thuốc đứng đầu trong danh sách 33 thuốc gây SJS/TEN, chiếm 21,7% (13/60) các trường hợp điều trị tại tâm trung tâm này (Lương Đức Dũng (2015), "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch của hội chứng Steven-Johnson và Lyell do dị ứng thuốc", Luận án Tiến sỹ Y học, Đại học Y Hà Nội, tr. 63-65). Một nghiên cứu khác tổng quan từ cơ sở dữ liệu các báo cáo phản ứng có hại của thuốc (ADR) của Việt Nam giai đoạn 2010 – 2015 cho thấy trong 28.698 báo cáo ghi nhận 136 trường hợp về SJS và TEN. Các trường hợp SJS/TEN liên quan tới allopurinol là 15/136 (11,03%), đứng thứ 3 trong số các thuốc được báo cáo nhiều nhất, với tỷ suất chênh ghi nhận (ROR) (95%CI) là 4,2 (2,2-7,59) (Nguyen K. D., Tran T. N., et al. (2019), "Drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in vietnamese spontaneous adverse drug reaction database: A subgroup approach to disproportionality analysis", J Clin Pharm Ther, 44(1), pp. 69-77).

Tuy nhiên, hiện nay tại Việt Nam chưa có một nghiên cứu chuyên sâu nào đánh giá mối liên quan của alen *HLA-C*0302* tới nguy cơ SCAR do allopurinol trong khi đó alen này có tần suất đáng kể trong cộng đồng người Kinh Việt Nam là 6,8% (Hoa BK, Hang NTL, et al. (2008), "*HLA-A,-B,-C,-DRB1 and-DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam*", *Tissue antigens*, 71(2), pp. 127-134). Vì vậy, một nghiên cứu bệnh – chứng toàn diện đánh giá mối liên quan giữa alen *HLA-C*0302* với nguy cơ SCARs do allopurinol là cần thiết. Điều kiện tiên quyết để thực hiện nghiên cứu là cần có một phương pháp phát hiện alen *HLA-C*0302* để thực hiện với chi phí thấp và có thể dễ dàng áp dụng trên lâm sàng từ đó có thể góp phần ngăn ngừa nguy cơ SCARs khi sử dụng allopurinol.

Cho đến nay, đã có nhiều phương pháp PCR được dùng để xét nghiệm gen nói chung như SSP-PCR, real-time PCR, v.v... Cụ thể, để phát hiện hàng loạt alen của gen *HLA-C*, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thường sử dụng phương pháp SSP-PCR là phương pháp PCR dùng mỗi đặc hiệu với trình tự gen (Invitrogen (2012), "*AllSet+™ Gold SSP*", pp. 1-26; Bunce M, O'Neill CM, et al. (1995), "*Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)*", 46(5), pp. 355-367; GeneBOX (2010), "*HLA-C single 1.0 Typing Kit*", pp. 1 – 25). Tuy nhiên, phương pháp này chỉ phù hợp cho nghiên cứu hàng loạt các alen *HLA-C* để phát hiện đồng thời nhiều alen/nhóm alen *HLA-C*. Nhược điểm khác của phương pháp SSP-PCR là sử dụng số lượng lớn các cặp mồi nhằm mục đích nghiên cứu sàng lọc một loạt các alen để tìm ra alen ứng viên liên quan tới bệnh, dị ứng thuốc, nghiên cứu vacxin, nghiên cứu dịch tễ hoặc phát hiện alen đa hình mới. Việc sử dụng nhiều cặp mồi đồng nghĩa với chi phí cao và mất nhiều thời gian. Do đó, các phương pháp này không phù hợp để sử dụng trên lâm sàng với mục đích sàng lọc, cần cho kết quả nhanh, chính xác và chi phí thấp. Như vậy, tồn tại nhu cầu phát triển một phương pháp mới nhằm phát hiện đặc hiệu alen *HLA-C*0302* với độ nhạy 100% để không bỏ sót bệnh nhân nào mang alen *HLA-C*0302* nhằm hạn chế tối đa nguy cơ SCARs do allopurinol. Mặt khác nhược điểm chung của các phương pháp PCR xác định kiểu gen *HLA* là thường không phân biệt được kiểu gen đồng hợp tử/ dị hợp tử do đặc điểm đa hình quá cao và phức tạp của họ gen này. Trong khi đó, nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự khác biệt về mức độ nghiêm trọng của ADR ở những người mang alen nguy cơ có kiểu gen đồng hợp tử và dị hợp tử.

Vì vậy, mục đích của giải pháp hữu ích này là đề xuất phương pháp PCR mới khắc phục được các thiếu sót trên, cụ thể là phát hiện và phân biệt được alen *HLA-C*0302* ở thể đồng hợp tử hay dị hợp tử với độ nhạy 100% để không bỏ sót bệnh nhân nào mang alen *HLA-C*0302* nhằm hạn chế tối đa nguy cơ SCARs do allopurinol. Đây là phương pháp PCR đặc hiệu alen (AS-PCR), cụ thể là đặc hiệu với alen *HLA-C*0302*. Phương pháp AS-PCR mới này khác biệt với SSP-PCR và các phương pháp PCR truyền thống khác bởi các ưu điểm sau: (i) bộ môi được thiết kế có sự khác biệt để tăng tính đặc hiệu với alen mục tiêu và phân biệt được alen *HLA-C*0302* ở thể đồng hợp tử hay dị hợp tử cũng như luôn vai trò nội kiểm, điều mà các phương pháp PCR khác trước đây thường không có và (ii) phương pháp sử dụng số lượng cặp môi ít hơn hẳn nên các hóa chất liên quan như thuốc thử, sinh phẩm cũng dùng ít hơn, dẫn đến chi phí thấp hơn đáng kể, cách thức thực hiện cũng đơn giản hơn và theo đó thời gian trả kết quả nhanh hơn (trong ngày).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất các bộ môi được thiết kế đặc hiệu nhằm phát hiện alen *HLA-C*0302* có thể sử dụng cho các ứng dụng xét nghiệm phát sinh khác, chẳng hạn như sử dụng trong các bộ kit xét nghiệm nhanh alen *HLA-C*0302*.

Mục đích nữa của giải pháp là đề xuất phương pháp mới để phát hiện đặc hiệu alen, cụ thể hơn là đề xuất phương pháp PCR đặc hiệu alen (AS-PCR) dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*. Phương pháp này có độ nhạy 100% và tăng tính đặc hiệu với alen mục tiêu xét trên khía cạnh mức độ tương đồng về trình tự giữa các alen *HLA-C* là rất cao.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh thứ nhất của giải pháp hữu ích đề xuất bộ môi bao gồm bốn cặp môi dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*, đặc trưng ở chỗ:

- (i) cặp môi thứ nhất có tác dụng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 - exon 3 của các alen *HLA-C*, và mỗi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí ngay cạnh nucleotit đầu 3' tận, có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 1 và SEQ ID No: 2;
- (ii) cặp môi thứ hai có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 3 và SEQ ID No: 4;

- (iii) cặp mồi thứ ba có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, và mồi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' tận, có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 5 và SEQ ID No: 6; và
 - (iv) cặp mồi thứ tư có tác dụng khuếch đại đặc hiệu alen *HLA-C*0302*, và mồi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí nucleotit ngay cạnh nucleotit đầu 3' tận, có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 7 và SEQ ID No: 6;
- trong đó mỗi cặp mồi được liệt kê lần lượt tương ứng với mồi xuôi và mồi ngược theo chiều 5' đến 3'.

Khía cạnh thứ hai của giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp PCR đặc hiệu alen (AS-PCR) dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* có các bước:

- (i) thực hiện phản ứng PCR lần (1) là phản ứng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 - exon 3 của alen *HLA-C*, trong đó sử dụng cặp mồi thứ nhất để cho ra sản phẩm PCR thứ nhất;
- (ii) thực hiện phản ứng PCR lần (2) bao gồm 3 phản ứng PCR tiến hành song song, là khuếch đại sản phẩm PCR thứ nhất sau khi được pha loãng, trong đó sử dụng các cặp mồi thứ hai, thứ ba và thứ tư để cho ra các sản phẩm PCR tương ứng;
- (iii) đọc kết quả các sản phẩm PCR thu được ở bước (ii) để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là vị trí của vùng gen *HLA* và vị trí cụ thể của gen *HLA* lớp I typ C (*HLA-C*) trên nhiễm sắc thể số 6.

Hình 2 là vị trí gắn mồi đặc hiệu alen ở bước PCR thứ hai của Ví dụ 1 trong đó khung vuông là vị trí gắn của các mồi trên khuôn ADN: A là vị trí gắn của mồi xuôi SEQ ID No: 5 và SEQ ID No: 7 trên khuôn ADN. Các nucleotit không bổ sung với khuôn ADN được tô màu nền đậm; B là Vị trí gắn của mồi ngược SEQ ID No: 6 và SEQ ID No: 4 trên khuôn ADN. Các nucleotit khác nhau giữa 2 mồi được tô màu nền đậm.

Hình 3 là sơ đồ thực hiện phương pháp PCR-AS của Ví dụ 1 và cách đọc kết quả điện di phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/ dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo một phương án ưu tiên, bộ mỗi bao gồm bốn cặp mỗi được thiết kế đặc hiệu để phát hiện alen *HLA-C*0302*.

Alen này có tần suất 6,8%, xếp thứ 4 trong số 18 alen *HLA-C* được phát hiện ở cộng đồng người Kinh Việt Nam (*Hoa BK, Hang NTL, et al. (2008), "HLA-A,-B,-C,-DRB1 and-DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam", Tissue antigens, 71(2), pp. 127-134*). Vì vậy, việc thiết kế các cặp mỗi đặc hiệu nêu trên được dựa trên trình tự nucleotit của alen *HLA-C*0302* dưới đây (SEQ ID No: 8):

```

atgcgggtca tggcgccccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggcctgacc 60
gagacctggg ccggtgagtg cggggttggg agggaatcgg cctctgcgga gaggagcgag 120
gggcccggcc gccgagggcg caggaccggg ggagccgcgc agggaggagg gtcgggcggg 180
tctcagcccc tcctcgcccc caggctccca ctccatgagg tatttctaca ccgctgtgtc 240
ccggcccggc cgcggggagc ccacttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt 300
cgtgcggttc gacagcgacg ccgcgagtc gagaggggag ccgcgggcgc cgtgggtgga 360
gcaggagggg ccggagtatt gggaccggga gacacagaag tacaagcgcc aggcacagac 420
tgaccgagtg agcctgcgga acctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggtgagtg 480
accccggccc ggggcgcagg tcacgacccc tcctcatccc ccacggacgg cccgggtcgc 540
cccaagtctc ccggtctgag atccacccc aggtctgcgga acccgcccag accctcgacc 600
ggagagagcc ccagtcacct ttaccgggtt tcattttcag tttaggccaa aatccccgcg 660
ggttggtcgg ggcggggcgg ggctcggggg acggggctga ccgcgggggc ggggcccagg 720
tctcacatcc tccagaggat gtatggctgc gacgtggggc ccgacgggcg cctcctccgc 780
gggtatgacc agtccgccta cgacggcaag gattacatcg ccctgaacga ggatctgcgc 840
tcctggaccg ccgcggacac ggcggctcag atcaccagc gcaagtggga ggcggcccgt 900
gaggcggagc agctgagagc ctacctggag ggcctgtgcg tggagtggct ccgcagatac 960
ctgaagaatg ggaaggagac gctgcagcgc gcgggtacca ggggcagtgg ggagccttcc 1020
ccatctcctg tagatctccc gggatggcct ccacgagga ggggaggaaa atgggatcag 1080
cgctagaata tcgccctccc ttgaatggag aatgggatga gttttcctga gtttcctctg 1140

```

agggccccct ctgctctcta ggacaattaa gggatgaagt ccttgaggaa atggagggga 1200
 agacagtccc tagaatactg atcaggggtc ccctttgacc actttgacca ctgcagcagc 1260
 tgtggtcagg ctgctgacct ttctctcagg ccttgttctc tgcctcacgc tcaatgtgtt 1320
 tgaaggtttg attccagctt ttctgagtc ttcggcctcc actcaggtca ggaccagaag 1380
 tcgctgttcc tccctcagag actagaactt tccaatgaat aggagattat cccaggtgcc 1440
 tgtgtccagg ctggcgtctg ggttctgtgc ccccttcccc accccaggtg tcctgtccgt 1500
 tctcaggatg gtcacatggg cgctgttgga gtgtcgcaag agagatacaa agtgtctgaa 1560
 ttttctgact cttcccgta gaacacccaa agacacacgt gaccacccat cccgtctctg 1620
 accatgaggc caccctgagg tgctgggccc tgggcttcta ccctgoggag atcacactga 1680
 cctggcagtg ggatggggag gaccaaactc aggacactga gcttgtggag accaggccag 1740
 caggagatgg aaccttccag aagtgggcag ctgtggtggg gccttctgga gaagagcaga 1800
 gatacacgtg ccatgtgcag cacgaggggc tgccggagcc cctcaccctg agatggggta 1860
 aggaggggga tgaggggtga tgtgtcttct cagggaagc agaagtcctg gagcccttca 1920
 gccaggtcag ggctgaggct tgggggtcag ggccctcac cttccctcc tttcccagag 1980
 ccatcttccc agcccacat ccccatcgtg ggcacgttg ctggcctggc tgtcctggct 2040
 gtccatagctg tcctaggagc tgtggtggct gttgtgatgt gtaggaggaa gagctcaggt 2100
 agggaagggg tgaggagtgg ggtctgggtt ttcttgttcc actgggagtt tcaagcccca 2160
 ggtagaagtg tgccccacct cgttactgga agcaccatcc acacatgggc catcccagcc 2220
 tgggaccctg tgtgccagca cttactctgt tgtgaagcac atgacaatga aggacagatg 2280
 tatcaccttg atgattatgg tggtggggtc cttgattcca gcattcatga gtcaggggaa 2340
 ggtccctgct aaggacagac cttaggaggg cagttgctcc agaaccaca gctgctttcc 2400
 ccgtgtttcc tgatcctgcc ctgggtctgc agtcatagtt ctggaaactt ctcttgggtc 2460
 caagactagg aggttcccct aagatcgcat ggccctgact cctccctgtc ccctcacagg 2520
 gcattttctt cccacaggtg gaaaaggagg gagctgctct caggctgcgt gtaagtgatg 2580
 gcggtgggag tgtggaggag ctcaccacc ccataattcc tcttgtccca catctcctgc 2640
 gggctctgac caggtctttt ttttgttct accccagcca gcaacagtgc ccagggtctt 2700
 gatgagtctc tcacgcttg taaaggtgag attctgggga gctgaagtgg tcgggggtgg 2760

ggcagagggga aaaggcctag gtaatgggga tcctttgatt gggacgtttc gaatgtgtgg 2820
 tgagctgttc agagtgtgat cacttaccat gactgacctg aatttgttca tgactattgt 2880
 gttctgtagc ctga 2894

Cấu trúc alen *HLA-C*0302* này gồm 8 exon và 7 intron, không có vùng UTR và UTR' (xem Bảng 1 dưới đây)

Bảng 1. Cấu trúc alen *HLA-C*0302*

Vùng mã hóa	Vị trí	Vùng không mã hóa	Vị trí	Thành phần nucleotit		
E1	1 – 73	I1	74 – 203	a	540	18,7 %
E2	204 – 473	I2	474 – 718	c	826	28,5 %
E3	719 – 994	I3	995 – 1581	g	933	32,2 %
E4	1582 – 1857	I4	1858 – 1978	t	595	20,6 %
E5	1979 – 2098	I5	2099 – 2537	Tổng	2894	100%
E6	2538 – 2570	I6	2571 – 2677			
E7	2678 – 2725	I7	2726 – 2889			
E8	2890 – 2894					

trong đó trình tự đoạn exon 2 – exon 3 của 3 alen *HLA-C *0302, 0303 và 0304* rất giống nhau, và khác tất cả các alen *HLA-C* còn lại ở các vị trí như Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Vị trí các nucleotit đặc trưng của nhóm 3 alen *HLA-C*0302, 0303, 0304*

Alen \ Vị trí nucleotit	1263	1443-1444	1473	1478
<i>HLA-C*0302, 0303, 0304</i>	g	ct	a	t
<i>HLA-C còn lại</i>	c	ac	g	c

Dựa trên đặc điểm cấu trúc nêu trên, bộ bốn cặp mồi được thiết kế dùng cho phương pháp AS-PCR theo giải pháp hữu ích này có thứ tự sau: (1) cặp mồi thứ nhất có tác dụng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2- exon 3 của gen *HLA-C*, (2) cặp mồi thứ hai có

tác dụng khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, (3) cặp mỗi thứ ba có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, và (4) cặp mỗi thứ tư có tác dụng khuếch đại đặc hiệu alen *HLA-C*0302*. Việc thiết kế bộ bốn cặp mỗi với thứ tự như trên làm cho phương pháp theo giải pháp hữu ích có độ nhạy 100% và tính đặc hiệu cao. Số lượng mỗi như vậy là ít hơn ba đến bốn lần so với các phương pháp trước đây (cần ít nhất 15 cặp mỗi trở lên) và vì vậy chi phí hóa chất phát sinh được tiết kiệm đáng kể cũng như rút ngắn đáng kể thời gian trả kết quả (trong ngày). Cặp mỗi thứ nhất được thiết kế có thể kiêm luôn cả vai trò nội kiểm, điều không có ở các phương pháp PCR khác.

Cặp mỗi thứ nhất có tác dụng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2- exon 3 của các alen *HLA-C*. Đây là vùng tập trung phần lớn SNP đặc trưng cho từng alen *HLA*. Cặp mỗi thứ nhất này gồm mỗi xuôi SEQ ID No: 1 và mỗi ngược SEQ ID No: 2. Điểm khác biệt ở đây là mỗi SEQ ID No: 1 được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN (thay g bằng t, *chỗ in đậm trong trình tự dưới đây*) vào vị trí ngay cạnh nucleotit tận cùng đầu 3' để tăng tính đặc hiệu của mỗi này với các alen *HLA-C*, tránh khuếch đại không đặc hiệu các alen *HLA* thuộc typ khác như *HLA-A*, *B*, *E*, *F*, *G*. Trình tự của các mỗi được trình bày dưới đây

SEQ ID No. 1	5'-gcgaggtgcc cgcccggc t a-3'
SEQ ID No. 2	5'-gagatgggga aggctcccca ct-3'

Cặp mỗi thứ hai được thiết kế có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*. Dựa vào thông tin ở Bảng 2 nêu trên, tác giả lựa chọn sử dụng vị trí 1443 – 1444 với 2 SNP liên tiếp nhau để thiết kế mỗi đặc hiệu alen nhằm phân biệt nhóm 3 alen *HLA-C *0302*, *0303* và *0304* và nhóm 15 alen *HLA-C* còn lại. Cặp mỗi thứ hai này gồm mỗi xuôi SEQ ID No: 3 và mỗi ngược SEQ ID No: 4 khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*. Trình tự của các mỗi được trình bày dưới đây.

SEQ ID No: 3	5'-ggagacacag aagtacaagc-3'
SEQ ID No: 4	5'-gagccactcc acgcacgt-3'

Cặp mỗi thứ ba gồm mỗi xuôi SEQ ID No: 5 và mỗi ngược SEQ ID No: 6 có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, là 2 alen có trình tự tương đồng cao với alen *HLA-C*0302*. Việc thiết kế cặp mỗi này nhằm tránh khả năng cho kết

quả dương tính giả. Đặc biệt, để tăng tính đặc hiệu của mỗi đặc hiệu alen này, mỗi xuôi SEQ ID No: 5 được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN (thay t bằng c, *chỗ in đậm trong trình tự dưới đây*) ở vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' tận. Trình tự của các mồi được trình bày dưới đây.

SEQ ID No: 5 5' -ggccaggggtc tcaca**c**ca-3'
 SEQ ID No: 6 5' -gagccactcc acgcacag-3'

Cuối cùng, cặp mồi thứ tư có tác dụng khuếch đại đặc hiệu alen *HLA-C*0302* được thiết kế. Cặp mồi này gồm mỗi xuôi SEQ ID No: 7 và mỗi ngược SEQ ID No: 6 khuếch đại đặc hiệu cho alen *HLA-C*0302* trong đó khác biệt ở chỗ mỗi xuôi SEQ ID No: 7 được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN (thay c bằng t, *chỗ in đậm trong trình tự dưới đây*) tại vị trí nucleotit ngay cạnh nucleotit đầu 3' tận để tăng tính đặc hiệu của mỗi đặc hiệu alen này. Trình tự của các mồi được trình bày dưới đây.

SEQ ID No: 7 5' -ggccaggggtc tcacat**t**c-3'
 SEQ ID No: 6 5' -gagccactcc acgcacag-3'

Như đã nêu trên, điểm khác biệt của bộ bốn cặp mồi được thiết kế theo giải pháp hữu ích này là việc thay thế một nucleotit không bổ sung với khuôn ADN vào các mồi xuôi trong đó thay thế một nucleotit không bổ sung với khuôn ADN tại vị trí thứ 2 hoặc thứ 3 kể từ nucleotit tận cùng đầu 3' của mồi. Quy tắc bổ sung nucleotit không bổ sung với khuôn ADN trên mỗi AS là tùy thuộc vào các SNP của các alen mục tiêu (*You Frank M, Huo Naxin, et al. (2008), "BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design", 9(1), pp. 253*). Cụ thể, quy tắc này được thể hiện ở Bảng 3 dưới đây:

Bảng 3 - Nucleotit không bổ sung với khuôn ADN tại vị trí 3' tận và quy tắc thêm nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ hai trên mỗi AS [13]

Mã IUPAC của 1 SNP	Alen mang SNP	Nucleotit không bổ sung với khuôn ADN giữa mỗi và khuôn ADN tại vị trí 3' tận (Mỗi xuôi/ngược)	Mức độ mạnh yếu của nucleotit không bổ sung với khuôn ADN giữa mỗi và khuôn ADN tại vị trí 3' tận	Nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ 2 được thêm vào mỗi ở vị trí thứ 3 (hoặc vị trí khác) kể từ nucleotit đầu 3' tận
r	g/a	g/t a/c	Yếu Yếu	g/a, t/ca/g, c/t
y	t/c	g/t a/c	Yếu Yếu	g/a, t/c a/g, c/t
s	g/c	g/g c/c	Trung Bình Trung Bình	c/c, a/a, g/g, t/t c/c, a/a, g/g, t/t
w	a/t	a/a t/t	Trung Bình Trung Bình	c/c, a/a, g/g, t/t c/c, a/a, g/g, t/t
k	g/t	g/a t/c	Mạnh Mạnh	g/t, a/c t/g, c/a
m	a/c	g/a t/c	Mạnh Mạnh	g/t, a/c t/g, c/a

Từ bảng quy tắc thay thế nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ hai cho mỗi AS này, nhóm tác giả thiết kế các mỗi xuôi nêu trên như sau:

- Mỗi xuôi SEQ ID No: 7 là mỗi AS để phát hiện alen *HLA-C*0302* có 1 nucleotit không bổ sung với khuôn ADN với khuôn ADN của 2 alen *HLA-C*0303*, *0304* tại vị trí 3' tận là t/c – đây là nucleotit không bổ sung với khuôn ADN mạnh. Như vậy mỗi xuôi SEQ ID No: 7 cần thêm 1 nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ 2 tại vị trí nucleotit ngay bên cạnh đầu 3' tận: thay nucleotit c bằng t để tăng tính đặc hiệu với alen *HLA-C*0302*, ta có mỗi xuôi AS – SEQ ID No: 7 có trình tự là:

SEQ ID No: 7 5'-ggccaggggtc tcacattc-3'

- Mỗi xuôi SEQ ID No: 5 là mỗi AS để phát hiện 2 alen *HLA-C*0303*, *0304* có 1 nucleotit không bổ sung với khuôn ADN của alen *HLA-C*0302* tại vị trí 3' tận là g/a – đây là nucleotit không bổ sung với khuôn ADN mạnh. Như vậy mỗi xuôi SEQ ID No: 5 cần thay thế 1 nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ 2 tại vị trí thứ 3 từ dưới lên kể từ đầu 3' tận: thay nucleotit t bằng c để tăng tính đặc hiệu với 2 alen *HLA-C*0303*, *0304*, ta có mỗi xuôi AS có trình tự:

SEQ ID No: 5 5'-ggccaggggtc tcacacca-3'

Nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thứ 2 của mỗi SEQ ID No: 5 không lựa chọn đặt tại vị trí ngay cạnh đầu 3' tận vì sẽ tạo thành 4 nucleotit a-t liên tiếp nhau (ggccaggggtc tcac**atta**) dẫn tới hiệu suất khuếch đại của mỗi thấp, khó bắt cặp với khuôn ADN của 2 alen mục tiêu.

Vì vậy, các đặc điểm thiết kế bộ bốn cặp mỗi đặc hiệu theo alen với cách chọn vị trí và số lượng nucleotit không bổ sung với khuôn ADN nêu trên là điểm khác biệt của phương pháp theo giải pháp hữu ích này. Bốn cặp mỗi này sẽ cho ra các sản phẩm PCR đặc thù của từng cặp mỗi, cho phép phát hiện và phân biệt được thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* ở quy trình PCR sau đó.

Khía cạnh tiếp theo của giải pháp hữu ích này là thực hiện quy trình gồm 3 bước:

Bước (i) thực hiện phản ứng PCR với cặp mỗi thứ nhất đã nêu trên cho ra sản phẩm PCR ở bước 1 và kiểm tra sản phẩm này bằng điện di. Đây là lần khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 – exon 3 của các alen *HLA-C*, vùng tập trung các SNP đặc trưng của các alen *HLA-C*.

Bước (ii) là để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*. Theo đó, sản phẩm PCR ở bước (i) nêu trên được pha loãng, tốt hơn nếu 01 µl sản phẩm PCR này được pha loãng 100 lần bằng nước không nucleaza và 01 µl sản phẩm pha loãng này được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR ở bước (ii) này. Theo đó, ba cặp mỗi đặc hiệu alen được sử dụng ở bước PCR thứ hai này. Ba phản ứng PCR được tiến hành song song ở 3 tube riêng biệt, tương ứng với mỗi cặp mỗi.

- Cặp mỗi thứ hai: mỗi xuôi SEQ ID No: 3 và mỗi ngược SEQ ID No: 4 khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*.

- Cặp mồi thứ ba: mồi xuôi SEQ ID No: 5 và mồi ngược SEQ ID No: 6 khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0:03*, *HLA-C*0304* – là 2 alen có trình tự ADN tương đồng cao với alen *HLA-C*0302*.
- Cặp mồi thứ tư: mồi xuôi SEQ ID No: 7 và mồi ngược SEQ ID No: 6 khuếch đại đặc hiệu cho alen *HLA-C*0302*.

Bước (iii) đọc kết quả các sản phẩm PCR thu được ở bước (ii) để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*. Sự xuất hiện của các sản phẩm PCR đặc hiệu của từng cặp mồi cho phép phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*, khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2 %.

Giải pháp này sẽ được minh họa bằng phần Ví dụ thực hiện dưới đây.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Thực hiện phản ứng khuếch đại PCR với bốn cặp mồi

Như được thể hiện trên Hình 3, sau khi thiết kế xong bốn cặp mồi với đặc điểm đã nêu, thực hiện các phản ứng PCR với bốn cặp mồi này theo ba bước.

(i) Khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 – exon 3 bằng cặp mồi đặc hiệu alen thứ nhất gồm mồi xuôi SEQ ID No: 1 và mồi ngược SEQ ID No: 2. Vùng exon 2 – exon 3 là vùng tập trung phần lớn SNP đặc trưng cho từng alen *HLA*. Sản phẩm PCR bước 1 có kích thước 912 bp, được kiểm tra bằng điện di trên gel Agarose 1% trong 20 phút.

(ii) Phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*: 01 µl sản phẩm PCR bước (i) được pha loãng 100 lần bằng nước không nucleaza. 01 µl sản phẩm pha loãng được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR ở bước (ii). Ba cặp mồi đặc hiệu alen được sử dụng ở bước (ii) (cặp mồi đặc hiệu alen thứ hai, thứ ba và thứ tư). Ba phản ứng PCR được tiến hành song song ở 3 tube riêng biệt, tương ứng với mỗi cặp mồi:

- Cặp mồi đặc hiệu alen thứ hai: mồi xuôi SEQ ID No: 3 và mồi ngược SEQ ID No: 4 khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*. Sản phẩm PCR của cặp mồi 1 là 569 bp.
- Cặp mồi đặc hiệu alen thứ ba: mồi xuôi SEQ ID No: 5 và mồi ngược SEQ ID No: 6 khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304* – là 2 alen có trình tự ADN tương đồng cao với alen *HLA-C*0302*. Sản phẩm PCR của cặp mồi 2 là 241 bp.

- Cặp mồi đặc hiệu alen thứ tư: mồi xuôi SEQ ID No: 7 và mồi ngược SEQ ID No: 6 khuếch đại đặc hiệu cho alen *HLA-C*0302*. Sản phẩm PCR của cặp mồi 3 là 241 bp.

Hình 2 thể hiện vị trí gắn của các mồi trên khuôn ADN (thể hiện bởi khung vuông) trong đó A là vị trí gắn của mồi xuôi SEQ ID No: 5 và SEQ ID No: 7 trên khuôn ADN. Các nucleotit không bổ sung với khuôn ADN được tô màu nền đậm; B là vị trí gắn của mồi ngược SEQ ID No: 6 và SEQ ID No: 4 trên khuôn ADN. Các nucleotit khác nhau giữa 2 mồi được tô màu nền đậm.

Sản phẩm PCR bước (ii) được kiểm tra bằng điện di trên gel Agarose 2 % trong 20 phút. Tổng thời gian thực hiện quy trình, kể cả thời gian chiết tách ADN là 4h. Sản phẩm PCR xuất hiện ở các giếng ở bước 2 cho phép phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* (Hình 3)

Dưới đây là tóm tắt các thông số của phương pháp PCR đã thực hiện

Bảng 4. Trình tự các mồi sử dụng

Mồi	Trình tự	Sản phẩm PCR	Tm (°C)
Step 1 PCR			
SEQ ID No: 1	5'-gcgaggtgcc cgcccggct ta -3'	912	72
SEQ ID No: 2	5'-gagatgggga aggctcccca ct -3'		72
Step 2 PCR			
SEQ ID No: 3	5'-ggagacacag aagtacaagc-3'	569	60
SEQ ID No: 4	5'-gagccactcc acgcacgt-3'		60
SEQ ID No: 5	5'-ggccagggtc tcaca cca -3'	241	60
SEQ ID No: 6	5'-gagccactcc acgcacag-3'		60
SEQ ID No: 7	5'-ggccagggtc tcacat tc -3'	241	58
SEQ ID No: 6	5'-gagccactcc acgcacag-3'		60

Bảng 5. Thành phần phản ứng

Thành phần	Bước 1	Bước 2
▪ Nước không nucleaza	6,0 µl	7,0 µl
▪ PCR Master mix (2x)	10,0 µl	10,0 µl
▪ Môi xuôi (10 µM/ µl)	1,0 µl	1,0 µl
▪ Môi ngược (10 µM/ µl)	1,0 µl	1,0 µl
▪ ADN	2,0 µl (ADN mẫu nồng độ 20 ng/ul)	1,0 µl (sản phẩm PCR bước 1 pha loãng 100 lần)
Tổng lượng	20,0 µl	20,0 µl

Bảng 6. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
<i>Phản ứng PCR bước 1: Khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 – exon 3 các alen HLA-C</i>			
Biến tính	95 ⁰ C	3 phút	1
Biến tính	95 ⁰ C	30 giây	28
Gắn môi	65 ⁰ C	30 giây	
Kéo dài	72 ⁰ C	1 phút	
Kéo dài	72 ⁰ C	7 phút	1
Ổn định	25 ⁰ C	∞	1
<i>Phản ứng PCR bước 2: Phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-C*0302. Chu trình touch down</i>			
Biến tính	95 ⁰ C	3 phút	1
Biến tính	95 ⁰ C	30 giây	05
Gắn môi	70 ⁰ C	30 giây	
Kéo dài	72 ⁰ C	30 giây	
Biến tính	95 ⁰ C	30 giây	05
Gắn môi	67 ⁰ C	30 giây	
Kéo dài	72 ⁰ C	30 giây	
Biến tính	95 ⁰ C	30 giây	10
Gắn môi	65 ⁰ C	30 giây	
Kéo dài	72 ⁰ C	30 giây	

Biến tính	95°C	30 giây	20
Gắn mồi	58°C	30 giây	
Kéo dài	72°C	30 giây	
Kéo dài	72°C	7 phút	1
Ổn định	25°C	∞	1

Ví dụ 2. Thực hiện lấy mẫu và khuếch đại phát hiện alen *HLA-C*0302* bằng phương pháp PCR-AS của giải pháp

Lấy mẫu

- Lấy mẫu máu: thu 3ml máu tĩnh mạch toàn phần vào ống nghiệm tráng chất chống đông EDTA. Mẫu máu được bảo quản ở -20°C cho tới khi được chiết tách ADN.
- Chiết tách ADN từ máu toàn phần bằng bộ kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek, Atlanta, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. ADN được tinh sạch theo công nghệ cột HiBind® Mini Column.

Kiểm tra hàm lượng và độ tinh sạch của ADN bằng thiết bị Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nano drop technologies, USA), đo độ hấp thụ UV ở 260 nm, tỷ số độ hấp thụ A260nm/A280 nm, tỷ số A260/230. Giới hạn chấp nhận là 1,6-2,0 đối với A260/A280, 1,5-2,0 đối với A260/A230.

Đánh giá độ nguyên vẹn của ADN bằng điện di trên gel agarose

Các mẫu ADN được bảo quản ở -80°C tới khi thực hiện PCR.

Thực hiện khuếch đại phát hiện alen *HLA-C*0302* bằng phương pháp AS-PCR của giải pháp

Mẫu thu được theo mô tả phía trên được lấy để thực hiện khuếch đại đặc hiệu alen *HLA-C*0302* bằng phương pháp của giải pháp. Các bước tiến hành giống như Ví dụ 1 nêu trên bao gồm các thông số như mồi, trình tự thực hiện, thành phần PCR, chu trình nhiệt, v.v..

Tài liệu tham khảo

1. Invitrogen (2012), "AllSet+™ Gold SSP", pp. 1-26.
2. Lương Đức Dũng ", , (2015), "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch của hội chứng Steven-Johnson và Lyell do dị ứng thuốc", *Luận án Tiến sỹ Y học*, Đại học Y Hà Nội, pp. tr. 63-65.
3. Bunce M, O'Neill CM, et al. (1995), "Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)", 46(5), pp. 355-367.
4. Fan W. L., Shiao M. S., et al. (2017), "HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions", *J Immunol Res*, 2017, pp. 3186328.
5. Gaudet Muriel, Fara Anna-Giulia, et al. (2009), "Allele-specific PCR in SNP genotyping", *Single Nucleotide Polymorphisms*, Springer, pp. 415-424.
6. GeneBOX (2010), "HLA-C single 1.0 Typing Kit", pp. 1 - 25.
7. Hoa BK, Hang NTL, et al. (2008), "HLA-A,-B,-C,-DRB1 and-DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam", *Tissue antigens*, 71(2), pp. 127-134.
8. Hung S. I., Chung W. H., et al. (2005), "HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol", *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(11), pp. 4134-9.
9. Kang H. R., Jee Y. K., et al. (2011), "Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans", *Pharmacogenet Genomics*, 21(5), pp. 303-7.
10. Koehler Rebecca N, Walsh Anne M, et al. (2010), "High-throughput high-resolution class I HLA genotyping in East Africa", 5(5), pp. e10751.
11. Nguyen K. D., Tran T. N., et al. (2019), "Drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in vietnamese spontaneous adverse drug reaction database: A subgroup approach to disproportionality analysis", *J Clin Pharm Ther*, 44(1), pp. 69-77.
12. Ramasamy S. N., Korb-Wells C. S., et al. (2013), "Allopurinol hypersensitivity: a systematic review of all published cases, 1950-2012", *Drug Saf*, 36(10), pp. 953-80.
13. You Frank M, Huo Naxin, et al. (2008), "BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design", 9(1), pp. 253.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bộ mỗi dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* bao gồm bốn cặp mỗi, đặc trưng ở chỗ:

cặp mỗi thứ nhất có tác dụng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 - exon 3 của các alen *HLA-C*, và mỗi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí ngay cạnh nucleotit đầu tận cùng 3', có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 1 và SEQ ID No: 2;

cặp mỗi thứ hai có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 15 alen *HLA-C* khác ngoài 3 alen *HLA-C*0302*, *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 3 và SEQ ID No: 4;

cặp mỗi thứ ba có tác dụng khuếch đại đặc hiệu 2 alen *HLA-C*0303*, *HLA-C*0304*, và mỗi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu tận cùng 3', có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 5 và SEQ ID No: 6; và

cặp mỗi thứ tư có tác dụng khuếch đại đặc hiệu alen *HLA-C*0302*, và mỗi xuôi được thay thế một nucleotit bằng một nucleotit khác không bổ sung với khuôn ADN ở vị trí nucleotit ngay cạnh nucleotit đầu tận cùng 3', có trình tự như được nêu trong SEQ ID No: 7 và SEQ ID No: 6;

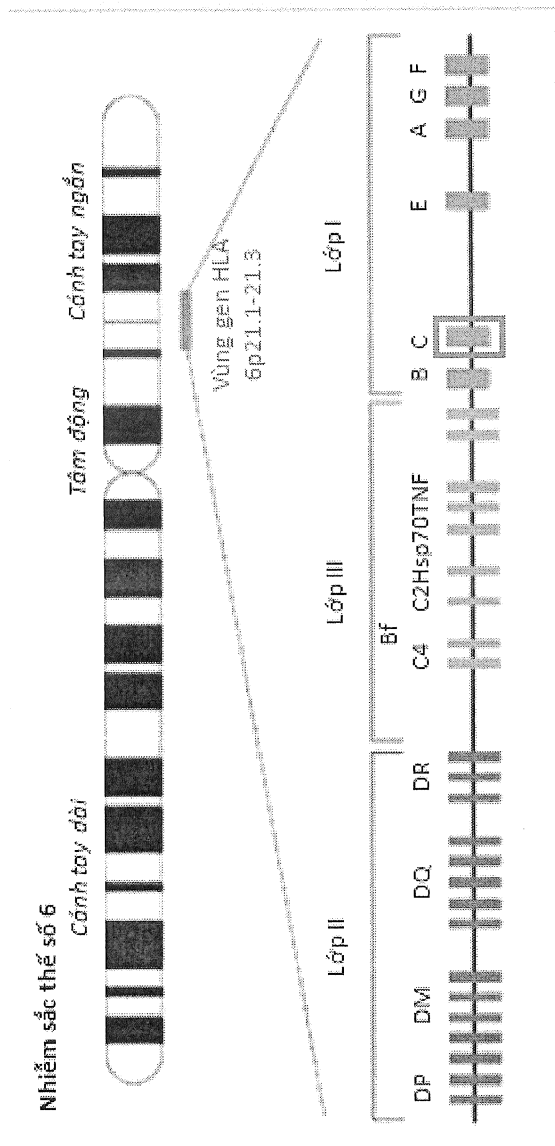
trong đó, mỗi cặp mỗi nêu trên được liệt kê lần lượt tương ứng với mỗi xuôi và mỗi ngược theo chiều 5' đến 3'.

2. Phương pháp PCR đặc hiệu alen (AS-PCR) dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302* sử dụng bộ mỗi theo điểm 1, bao gồm các bước:

(i) thực hiện phản ứng PCR lần (1) là phản ứng khuếch đại đặc hiệu đoạn exon 2 - exon 3 của alen *HLA-C*, trong đó sử dụng cặp mỗi thứ nhất để cho ra sản phẩm PCR thứ nhất;

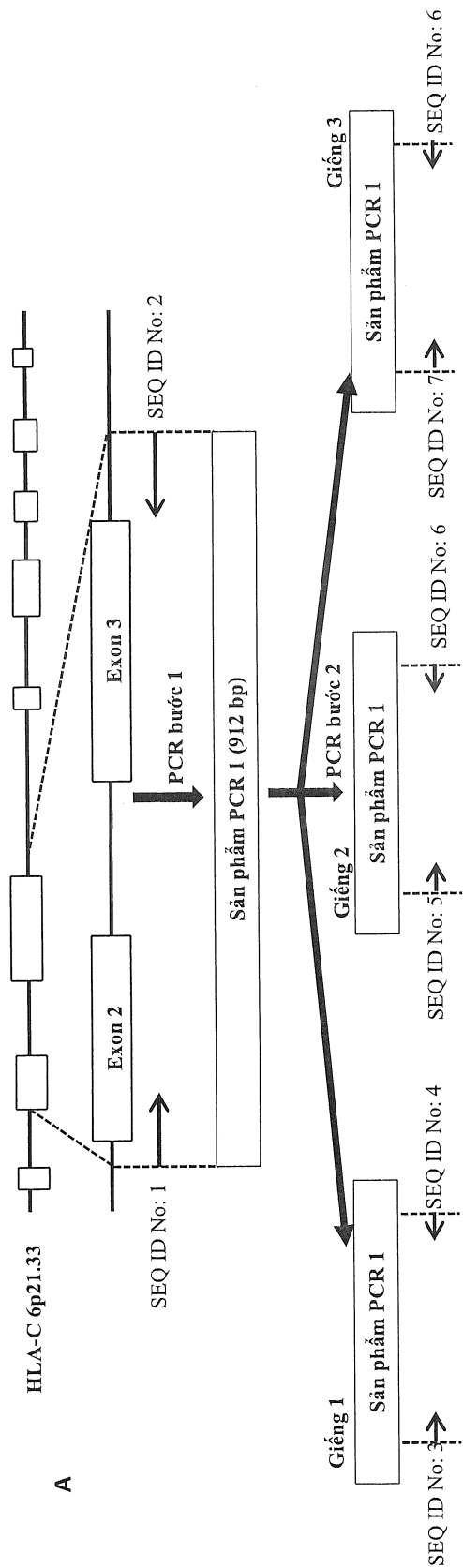
(ii) thực hiện phản ứng PCR lần (2) bao gồm 3 phản ứng PCR tiến hành song song, là các phản ứng khuếch đại sản phẩm PCR thứ nhất sau khi được pha loãng, trong đó sử dụng các cặp mỗi thứ hai, thứ ba và thứ tư để cho ra các sản phẩm PCR tương ứng;

(iii) đọc kết quả các sản phẩm PCR thu được ở bước (ii) để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen *HLA-C*0302*.



Hình 1

Hình 2



Kết quả điện di của các cặp mỗi				Kết quả
SEQ ID No: 3 và SEQ ID No: 4	SEQ ID No: 5 và SEQ ID No: 6	SEQ ID No: 7 và SEQ ID No: 6		
+	+	-	Âm tính với HLA-C*0302	
-	+	-	Âm tính với HLA-C*0302	
+	-	-	Âm tính với HLA-C*0302	
+	-	+	Dị hợp với HLA-C*0302	
-	+	+	Dị hợp với HLA-C*0302	
-	-	+	Đồng hợp với HLA-C*0302	

Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Trường Đại học Dược Hà Nội
- <120> Bộ mỗi dùng để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen Hla-C*0302 và phương pháp PCR đặc hiệu alen (AS-PCR) sử dụng bộ mỗi này
- <160> 8
- <210> 1
- <211> 20
- <212> Oligonucleotit
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Mỗi xuôi đặc hiệu alen, bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 5'-3' của gen *HLA-C* tại vị trí nucleotit 619 - 638, có một nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thay g bằng t vào vị trí ngay cạnh nucleotit tận cùng đầu 3' để tăng tính đặc hiệu của mỗi với gen *HLA-C*, cùng với mỗi ngược SEQ ID No: 2 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 912 bp.
- <400> 1
- gcgaggtgcc cgcccgcta 20
- <210> 2
- <211> 22
- <212> Oligonucleotit
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Mỗi ngược, bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 3'-5' của gen *HLA-C* tại vị trí nucleotit 1519 - 1540, cùng với

mỗi xuôi SEQ ID No: 1 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 912 bp.

<400> 2

gagatgggga aggctcccca ct 22

<210> 3

<211> 20

<212> Oligonucleotit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi xuôi đặc hiệu với nhóm 15 alen *HLA-C*, bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 5'-3' của nhóm 15 alen *HLA-C* tại vị trí nucleotit 891-910, cùng với mỗi ngược SEQ ID No: 4 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 569 bp.

<400> 3

ggagacacag aagtacaagc 20

<210> 4

<211> 18

<212> Oligonucleotit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi ngược đặc hiệu với nhóm 15 alen *HLA-C*, bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 3'-5' của nhóm 15 alen *HLA-C* tại vị trí nucleotit 1447-1464, cùng với mỗi xuôi SEQ ID No: 3 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 569 bp.

<400> 4

gagccactcc acgcacgt 18

<210>	5	
<211>	18	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Mỗi xuôi đặc hiệu với nhóm 2 alen <i>HLA-C*0303</i> và <i>HLA-C*0304</i> , bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 5'-3' của nhóm 2 alen <i>HLA-C*0303</i> và <i>HLA-C*0304</i> tại vị trí nucleotit 1226-1243, có một nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thay t bằng c vào vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' tận để tăng tính đặc hiệu của mỗi với nhóm 2 alen <i>HLA-C*0303</i> và <i>HLA-C*0304</i> , cùng với mỗi ngược SEQ ID No: 6 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 241 bp.	
<400>	5	
	ggccagggtc	18
	tcacacca	
<210>	6	
<211>	18	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Mỗi ngược đặc hiệu với nhóm 3 alen <i>HLA-C*0302</i> , <i>HLA-C*0303</i> và <i>HLA-C*0304</i> , bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 3'-5' của nhóm 3 alen <i>HLA-C*0302</i> , <i>HLA-C*0303</i> và <i>HLA-C*0304</i> tại vị trí nucleotit 1447-1464, cùng với mỗi xuôi SEQ ID No: 5 hoặc SEQ ID No: 7 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 241 bp.	
<400>	6	
	gagccactcc	18
	acgcacag	

<210>	7	
<211>	18	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Mỗi xuôi đặc hiệu với alen <i>HLA-C*0302</i> , bắt cặp bổ sung với sợi ADN chiều 5'-3' của alen <i>HLA-C*0302</i> tại vị trí nucleotit 1226-1243, có một nucleotit không bổ sung với khuôn ADN thay c bằng t tại vị trí ngay cạnh nucleotit đầu 3' tận để tăng tính đặc hiệu của mỗi với alen <i>HLA-C*0302</i> , cùng với mỗi ngược SEQ ID No: 6 tạo thành sản phẩm PCR có kích thước 241 bp.	
<400>	7	
	ggccagggtc tcacattc	18
<210>	8	
<211>	2894	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens.	
<300>		
<301>	Z.Li, H.-Y. Zou	
<302>	Trình tự đầy đủ của <i>HLA-C</i> , <i>HLA-C*03:02:01</i> .	
<303>	HLA	
<304>	91	
<305>	3	
<306>	204-207	

<307> 2018-01-30

<308> 29322676

<309> 2018-01-30

<400> 8

```

atgcgggtca tggcgccccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggcctgacc 60
gagacctggg ccggtgagtg cggggttggg agggaatcgg cctctgcgga gaggagcgag 120
gggcccggcc ggcgagggcg caggacccgg ggagccgcgc agggaggagg gtcgggcggg 180
tctcagcccc tctcgcgcc caggctccca ctccatgagg tatttctaca ccgctgtgtc 240
ccggcccggc cgcgggggagc ccacttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt 300
cgtgcggttc gacagcgacg ccgcgagtc gagaggggag ccgcgggcgc cgtgggtgga 360
gcaggagggg ccggagtatt gggaccggga gacacagaag tacaagcgcc aggcacagac 420
tgaccgagtg agcctgcgga acctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggtgagtg 480
accccggccc ggggcgcgag tcacgacccc tcctcatccc ccacggacgg cccgggtcgc 540
cccaagtctc ccggtctgag atccaccccg aggtgcgga acccgcccag accctcgacc 600
ggagagagcc ccagtcacct ttaccgggtt tcattttcag tttaggccaa aatccccgcg 660
ggttggtcgg ggcggggcgg ggctcggggg acggggctga ccgcgggggc ggggccaggg 720
tctcacatcc tccagaggat gtatggctgc gacgtggggc ccgacgggcg cctcctccgc 780
gggtatgacc agtccgccta cgacggcaag gattacatcg ccctgaacga ggatctgcgc 840
tcctggaccg ccgcggacac ggcggctcag atcaccagc gcaagtggga ggcggcccgt 900
gaggcggagc agctgagagc ctacctggag ggcctgtgcg tggagtggct ccgcagatac 960
ctgaagaatg ggaaggagac gctgcagcgc gcgggtacca ggggcagtgg ggagccttcc 1020
ccatctcctg tagatctccc gggatggcct ccacagagga ggggaggaaa atgggatcag 1080
cgctagaata tcgccctccc ttgaatggag aatgggatga gttttcctga gtttcctctg 1140
agggccccct ctgctctcta ggacaattaa gggatgaagt ccttgaggaa atggagggga 1200
agacagtccc tagaatactg atcaggggtc ccctttgacc actttgacca ctgcagcagc 1260

```

tgtggtcagg ctgctgacct ttctctcagg ccttgttctc tgcctcacgc tcaatgtggt 1320
 tgaagggttg attccagctt ttctgagtc ttcggcctcc actcagggtca ggaccagaag 1380
 tcgctgttcc tccctcagag actagaactt tccaatgaat aggagattat ccaggtgcc 1440
 tgtgtccagg ctggcgtctg ggttctgtgc ccccttcccc accccagggtg tcctgtccgt 1500
 tctcaggatg gtcacatggg cgctgttgga gtgtcgcaag agagatacaa agtgtctgaa 1560
 ttttctgact cttcccgta gaacacccaa agacacacgt gaccacccat cccgtctctg 1620
 accatgaggc caccctgagg tgctgggccc tgggcttcta ccctgcggag atcacactga 1680
 cctggcagtg ggatggggag gaccaaactc aggacactga gcttgtggag accaggccag 1740
 caggagatgg aaccttcag aagtgggcag ctgtggtggt gccttctgga gaagagcaga 1800
 gatacacgtg ccatgtgcag cacgaggggc tgccggagcc cctcacctg agatggggta 1860
 aggaggggga tgaggggtga tgtgtcttct cagggaagc agaagtcctg gagcccttca 1920
 gccaggtcag ggctgaggct tgggggtcag ggcccctcac cttcccctcc tttcccagag 1980
 ccatcttccc agcccacat ccccatcgtg ggcatcgtt ctggcctggc tgtcctggct 2040
 gtccatagctg tcctaggagc tgtggtggct gttgtgatgt gtaggaggaa gagctcagg 2100
 agggaagggg tgaggagtgg ggtctgggtt ttcttggtcc actgggagtt tcaagcccca 2160
 ggtagaagtg tgccccacct cgttactgga agcaccatcc acacatgggc catcccagcc 2220
 tgggaccctg tgtgccagca ctactctgt tgtgaagcac atgacaatga aggacagatg 2280
 tatcacctg atgattatgg tgttggggtc cttgattcca gcattcatga gtcaggggaa 2340
 ggtccctgct aaggacagac cttaggaggg cagttgctcc agaaccaca gctgctttcc 2400
 ccgtgtttcc tgatcctgcc ctgggtctgc agtcatagtt ctggaaactt ctcttgggtc 2460
 caagactagg aggttccccct aagatcgc at ggccctgact cctccctgtc cctcacagg 2520
 gcattttctt cccacagggtg gaaaaggagg gagctgctct caggctgcgt gtaagtgatg 2580
 gcggtgggag tgtggaggag ctcaccacc ccataattcc tcttgtccca catctcctgc 2640
 gggctctgac caggcttttt ttttgttct accccagcca gcaacagtgc ccagggtct 2700
 gatgagtctc tcatcgcttg taaagggtgag attctgggga gctgaagtgg tcgggggtgg 2760

ggcagagggg aaaggcctag gtaatgggga tcctttgatt gggacgtttc gaatgtgtgg 2820
tgagctgttc agagtgtgat cacttaccat gactgacctg aatttgttca tgactattgt 2880
gttctgtagc ctga 2894