



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0037197

(51)⁸ C12Q 1/68; G01N 33/533

(13) B

(21) 1-2018-04025

(22) 15/02/2017

(86) PCT/KR2017/001632 15/02/2017

(87) WO/2017/142297 24/08/2017

(30) 10-2016-0017359 15/02/2016 KR; 10-2017-0020238 14/02/2017 KR

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/12/2018 369A

(73) NURIBIO CO., LTD. (KR)

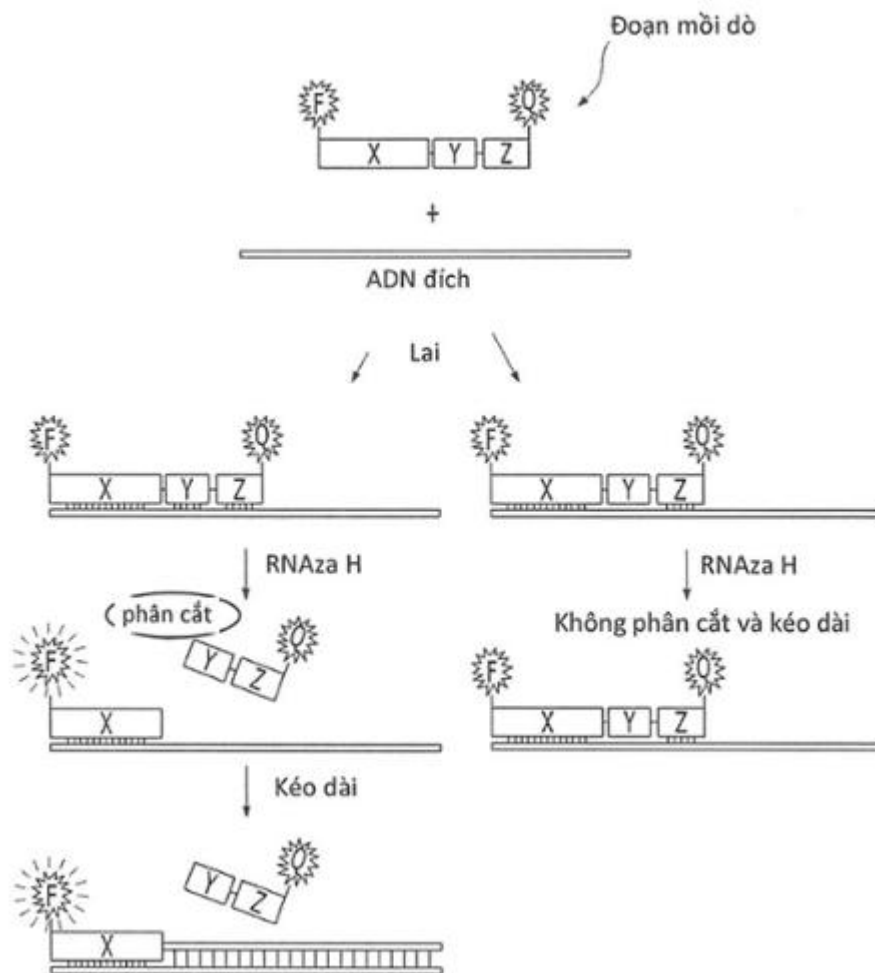
#204, 107, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 16229, Republic of Korea

(72) NAM, Young Hyeon (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) ĐOẠN MÔI DÒ PHÁT HIỆN AXIT NUCLEIC HOẶC PROTEIN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN AXIT NUCLEIC HOẶC PROTEIN SỬ DỤNG ĐOẠN MÔI DÒ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến đoạn môi dò có cấu trúc X-Y-Z và có chứa chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào cả hai đầu hoặc bên trong đoạn môi dò và cũng được sử dụng đồng thời làm đoạn môi và đầu dò trong khi phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực; phương pháp phát hiện axit nucleic theo thời gian thực, bao gồm khuếch đại axit nucleic cần phát hiện bằng cách sử dụng đoạn môi dò theo sáng chế, và sau đó đo số lượng các mảnh của đoạn môi dò được phân cắt; và phương pháp phát hiện protein theo thời gian thực sử dụng đoạn môi dò theo sáng chế. Phương pháp phát hiện axit nucleic hoặc protein theo sáng chế sử dụng một lượng nhỏ các oligo so với các phương pháp phát hiện thông thường đã biết mà không yêu cầu đầu dò riêng để phát hiện theo thời gian thực, và do đó có thể phát hiện axit nucleic hoặc protein cần phát hiện theo thời gian thực một cách đơn giản và tiết kiệm chi phí. Ngoài ra, các đột biến ở vùng Y có thể được phát hiện thông qua phản ứng khuếch đại sau khi phân cắt vùng Y của đoạn môi dò, và có thể phát hiện đa môi số lượng các axit nucleic hoặc protein phát hiện được lớn hơn số phân tử huỳnh quang được gắn vào đoạn môi dò. Do đó, sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để chẩn đoán các bệnh khác nhau và chẩn đoán tiên lượng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến đoạn mồi dò có thể được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực, và phương pháp phát hiện axit nucleic hoặc protein trong theo thời gian thực bằng cách sử dụng đoạn mồi dò.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Như đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, các phương pháp được sử dụng rộng rãi để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực bao gồm phân tích chip sinh học, phản ứng chuỗi polymeraza theo thời gian thực RT-PCR (real-time polymerase chain reaction), phản ứng chuỗi polymeraza định lượng theo thời gian thực qRT-PCR (quantitative real-time polymeraza chain reaction), và các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt chẳng hạn như khuếch đại đẳng nhiệt dựa trên trình tự axit nucleic NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), khuếch đại chu kỳ quay RCA (Rolling Circle Amplification), khuếch đại ADN qua trung gian phiên mã TDMA (Transcription DNA Mediated Amplification) hoặc phương pháp tương tự.

Các phương pháp phát hiện axit nucleic hoặc protein này đòi hỏi phải sử dụng các đoạn mồi xuôi/mồi ngược và tác nhân bám sợi đôi ADN dạng xen kẹp (chẳng hạn như SYBR) hoặc dạng đầu dò chẳng hạn như đầu dò Taqman, đầu dò kẹp tóc (molecular beacon), đầu dò MGB, đầu dò huỳnh quang có thể phân cắt xúc tác (CataCleave probe) hoặc các đầu dò tương tự để phát hiện theo thời gian thực. Tuy nhiên, các phương pháp phát hiện này có một số giới hạn, ví dụ, để phân tích axit nucleic có chiều dài ngắn chẳng hạn như miRNA, cần phải tạo ra các đoạn mồi thời gian thực dạng vòng hoặc đuôi poly(A) cho quá trình tổng hợp ADN bổ sung cADN và để kéo dài thêm oligonucleotit sau đuôi poly(A). Do đó, việc phân tích axit nucleic có chiều dài ngắn chẳng hạn như miRNA yêu cầu quy trình phức tạp, tăng thêm chi phí và thời gian phát hiện dài. Thêm nữa, các phương pháp đó có hạn chế ở chỗ một miRNA được phát hiện có thể được đánh dấu với chỉ một tín hiệu huỳnh quang, và trong các hệ thống được sử dụng hiện nay để phát hiện các tín hiệu huỳnh quang, số lượng các kênh huỳnh quang có thể được phân tích tại một thời điểm thường chỉ giới hạn từ 4 đến 7, và vì lý do này, cần phải lặp lại

hai hoặc nhiều lần cùng một thao tác để phân tích 8 hoặc nhiều miRNA hơn.

Theo ví dụ khác được giới hạn ở phương pháp hiện có, oligonucleotit được khuếch đại để phân tích axit nucleic đích cần phải có chiều dài ít nhất 60-70 bp (base pair: cặp bazơ) phụ thuộc vào chiều dài của các cặp đoạn mỗi xuôi/ngược và đầu dò. Trong trường hợp này, cần có ít nhất ba trình tự đặc hiệu.

Theo ví dụ khác nữa, để đo chỉ số đột biến của nucleotit tại vị trí đơn lẻ, chẳng hạn như SNP (single nucleotit polymorphism: đa hình nucleotit đơn), ái lực liên kết ở vị trí đột biến đặc hiệu của đoạn mỗi hoặc đầu dò nên được tăng lên bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau chẳng hạn như công nghệ PNA (Peptide Nucleic Acid: axit nucleic peptit) hoặc công nghệ LNA (Locked Nucleic Acid: axit nucleic dạng khóa) để xác định kiểu gen điểm cuối. Điều này làm cho việc thiết kế đoạn mỗi và đầu dò trở nên khó khăn và cần nhiều thời gian cũng như chi phí.

Mặt khác, Patent Hoa Kỳ số 5,763,181 bộc lộ phương pháp phát hiện các axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực. Kỹ thuật CataCleave khác với đầu dò Taq-Man ở chỗ sự tách đầu dò được thực hiện bởi enzym thứ cấp mà không có hoạt động polymeraza. Đầu dò CataCleave có trình tự nằm trong phân tử đích của enzym endonucleaza chẳng hạn như, ví dụ, enzym giới hạn hoặc RNaza. Theo một phương án, đầu dò CataCleave có cấu trúc khảm trong đó các đầu 5' và 3' của đầu dò được tạo thành từ ADN và vị trí phân cắt được tạo thành từ ARN. Phần trình tự ADN của đầu dò được đánh dấu với cặp FRET ở hai đầu hoặc bên trong. Phản ứng PCR gồm enzym RNaza H cho phép phân cắt riêng phần trình tự ARN của sợi đôi ARN-ADN. Sau khi phân cắt, tất cả đầu dò được phân cắt được tách từ sản phẩm sau khi khuếch đại amplicon đích ở nhiệt độ phản ứng và được phân tán trong dung dịch phản ứng. Khi các phân tử phát huỳnh quang donor và phân tử nhận huỳnh quang được tách rời, FRET được thay đổi theo cách giống như đầu dò Taq-Man và donor giải phóng có thể được theo dõi. Sự phân cắt và phân ly sẽ tái tạo lại vị trí để đầu dò CataCleave bổ sung bám vào. Theo cách này, amplicon đơn lẻ có thể được sử dụng để lặp lại sự phân cắt đầu dò nhiều lần như trình tự đích, đến khi đoạn mỗi được kéo dài đến vị trí bám của đầu dò CataCleave.

Tuy nhiên, phương pháp phát hiện theo thời gian thực bằng cách sử dụng đầu dò Catacleave được bộc lộ trong patent Mỹ nêu trên có một số hạn chế như sau:

Thứ nhất, giá trị huỳnh quang nền tăng liên tục do sự phân cắt lặp đi lặp lại của

đầu dò Catacleave trong quá trình phát hiện. Theo đó, rất khó để đo chính xác giá trị chu kỳ ngưỡng Ct, và cần có các thao tác riêng biệt để bù trừ giá trị Ct.

Thứ hai, đầu dò Catacleave đòi hỏi trình tự đích cần khuếch đại dài ít nhất 60-70 bp.

Thứ ba, rất khó để phân tích SNP bằng cách sử dụng đầu dò Catacleave. Mặt khác, đầu dò Catacleave rất khó áp dụng kỹ thuật xác định kiểu gen điểm cuối hiện có, và phương pháp lai trực tiếp tại vị trí đột biến điểm thiếu chính xác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, để khắc phục các vấn đề và hạn chế nêu trên của các giải pháp kỹ thuật đã có, mục đích của sáng chế là đề xuất đoạn mồi dò được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp để phát hiện ARN theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện ADN theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện protein theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất đoạn mồi dò được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu để phát triển phương pháp phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực với độ chính xác, khả năng tái tạo, và độ phân giải cao và đòi hỏi thời gian và chiều dài khuếch đại ngắn. Kết quả là, các tác giả đã thiết kế được đoạn mồi dò có cấu trúc X-Y-Z và có thể được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò trong quá trình phát hiện axit nucleic hoặc protein, và đã phát hiện được rằng số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được phân cắt ra trong quá trình khuếch đại axit nucleic sử dụng đoạn mồi dò hoặc quy trình lai với protein sử dụng đoạn mồi dò được đo đặc, axit nucleic hoặc protein cần phát hiện có thể được phát hiện chính xác và nhanh chóng, qua đó sáng chế được hoàn thành.

Theo sáng chế, đoạn mồi dò có thể có cấu trúc X-Y-Z và chứa một hoặc nhiều chỉ thị có thể phát hiện gắn vào cả hai đầu hoặc bên trong nó. Ở đây, các vị trí của chỉ thị

có thể phát hiện được gắn vào đó không chỉ giới hạn ở các vị trí đặc hiệu mà còn có thể ở các vị trí bất kỳ mà tại đó các chỉ thị có thể phát hiện được tách ra khi vùng Y của đoạn mồi dò được phân cắt bởi enzym đặc hiệu.

Ngoài ra, đoạn mồi dò có thể tạo phức hợp bằng cách gắn vào vùng đặc hiệu của axit nucleic đích hoặc protein đích cần phát hiện theo thời gian thực. Khi vùng Y được phân cắt bởi enzym đặc hiệu, các vùng Y và Z của đoạn mồi dò có thể được cắt riêng từ vùng đặc hiệu của axit nucleic đích hoặc protein đích, nhưng vùng X không bị phân cắt mà vẫn giữ lại phức hợp và được sử dụng như là đoạn mồi dùng để khuếch đại.

Cấu trúc axit nucleic được phát triển bởi các tác giả sáng chế được gọi là “đoạn mồi dò” theo sáng chế. Sau đây, trừ khi có chỉ định khác, thuật ngữ “đoạn mồi dò” được dùng để chỉ cấu trúc axit nucleic có thể được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò.

Đoạn mồi dò theo sáng chế có cấu trúc X-Y-Z, và mỗi vùng X, Y, và Z có thể có số lượng nucleotit khác nhau.

Theo một ví dụ, vùng X của đoạn mồi dò là ADN hoặc ARN chứa từ 1 đến 60 nucleotit, tốt hơn là từ 1 đến 30 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 2 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 3 đến 30 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 4 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 5 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 6 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 7 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 8 đến 30 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 10 đến 30 nucleotit. Nếu vùng X của đoạn mồi dò chứa nhiều hơn 60 nucleotit, phản ứng không đặc hiệu sẽ xảy ra trong quá trình phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực.

Theo một ví dụ, vùng Y của đoạn mồi dò là ADN hoặc ARN chứa từ 1 đến 10 nucleotit, tốt hơn là từ 1 đến 9 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 1 đến 8 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 7 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 5 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 2 nucleotit. Khi vùng Z của đoạn mồi dò không chứa trình tự nucleotit, vùng Y của đoạn mồi dò gồm ít nhất 3 nucleotit, tốt hơn là từ 3 đến 10 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 3 đến 9 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 3 đến 8 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 3 đến 7 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 3 đến 6 nucleotit, thậm chí

còn tốt hơn nữa là từ 3 đến 5 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 3 đến 4 nucleotit. Khi vùng Z của đoạn mỗi dò chứa một trình tự nucleotit, vùng Y của đoạn mỗi dò chứa ít nhất 2 nucleotit, tốt hơn là từ 2 đến 10 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 2 đến 9 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là từ 2 đến 8 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 7 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 6 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 5 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 4 nucleotit, thậm chí còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 nucleotit. Nếu số lượng nucleotit tạo ra vùng Y của đoạn mỗi dò nằm ngoài khoảng được mô tả ở trên, phản ứng không đặc hiệu sẽ xảy ra trong quá trình phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực làm giảm độ nhạy của phản ứng.

Theo một ví dụ, vùng Z của đoạn mỗi dò là ADN hoặc ARN chứa từ 0 đến 10 nucleotit, tốt hơn là từ 1 đến 10 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 2 đến 10 nucleotit. Nếu số lượng nucleotit tạo ra vùng Z nằm ngoài khoảng được mô tả ở trên, vùng Z bám vào axit nucleic hoặc protein đích sẽ không được tách khỏi axit nucleic hoặc protein đích sau khi cắt vùng Y, và do đó không thể phát hiện được axit nucleic hoặc protein.

Đồng thời, khi vùng bất kỳ trong các vùng X, Y và Z của đoạn mỗi dò là ADN, thì một hoặc hai vùng còn lại là ARN. Tốt hơn là, X, Y và Z tương ứng là ADN, ARN và ADN, hoặc tương ứng là ARN, ADN và ARN.

Theo một ví dụ cụ thể, khi vùng X là ADN, vùng bất kỳ trong các vùng Y và Z là ARN. Ví dụ, Y là ARN và Z là ADN, hoặc Y là ADN và Z là ARN. Trong đó, số lượng ADN và ARN có thể nhiều hơn 0, và như được xác định ở trên đối với các vùng X, Y và Z.

Theo ví dụ cụ thể khác, khi X là ARN, vùng bất kỳ trong các vùng Y và Z là ARN. Ví dụ, Y là ARN và Z là ADN, hoặc Y là ADN và Z là ARN. Trong đó, số lượng ADN và ARN có thể nhiều hơn 0, và như được xác định ở trên đối với các vùng X, Y và Z.

Theo ví dụ cụ thể khác nữa, khi Z không có trình tự nucleotit, vùng bất kỳ trong các vùng X và Y là ADN, và vùng còn lại là ARN. Trong đó, số lượng ADN và ARN có thể nhiều hơn 1, và như được xác định ở trên đối với X và Y.

Ngoài ra, X, Y và Z của đoạn mỗi dò có thể được tổng hợp theo cách được methyl hóa toàn bộ hoặc một phần để ngăn chặn sự phân cắt không đặc hiệu.

Theo sáng chế, thuật ngữ “axit nucleic” có nghĩa là ADN hoặc ARN cần được phát

hiện theo thời gian thực trong mẫu.

Theo sáng chế, chỉ thị có thể phát hiện có thể là chất phát huỳnh quang bám vào đoạn môi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang là phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

Phân tử phát huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, rhodamin, TAMRA, FAM, FITC, Flo X, ROX, Texas Red, ORNAge green 488X, ORNAge green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor ORNAge 546, Calfluor red 610, Quasar 670 và biotin, nhưng không giới hạn ở đây. Ngoài ra, phân tử dập tắt huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có DDQ-1, Dabcyl, Eclipase, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 và MGBNFQ, nhưng không giới hạn ở đây.

Khi cặp huỳnh quang được sử dụng làm chỉ thị có thể phát hiện theo sáng chế, phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang có thể được gắn trong vùng X hoặc vùng Z hoặc trong vùng Y, và vị trí của nó không bị giới hạn ở vị trí bất kỳ nào. Theo một ví dụ, phân tử phát huỳnh quang có thể được gắn ở vùng X, và phân tử dập tắt huỳnh quang có thể được gắn ở vùng Y hoặc vùng Z.

Đoạn môi dò theo sáng chế có thể được sử dụng như là đoạn môi hoặc đầu dò sau đây để phát hiện axit nucleic hoặc protein: i) môi phiên mã ngược RT để tổng hợp cADN từ ARN trong số các axit nucleic; ii) đoạn môi xuôi để khuếch đại cADN được tổng hợp từ ADN hoặc ARN; iii) đoạn môi ngược để khuếch đại cADN được tổng hợp từ ADN hoặc ARN; iv) đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược để khuếch đại cADN được khuếch đại từ ADN hoặc ARN; hoặc v) đầu dò để phát hiện axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc protein theo thời gian thực.

Theo một phương án cụ thể, đoạn môi dò theo sáng chế có thể được sử dụng như là: i) môi phiên mã ngược RT để tổng hợp cADN từ ARN (bao gồm ARN nhỏ chẳng hạn như miRNA), và đầu dò; hoặc ii) đoạn môi xuôi để khuếch đại cADN tổng hợp được, và đầu dò; hoặc iii) đoạn môi ngược để khuếch đại cADN tổng hợp được, và đầu dò; hoặc iv) đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược để khuếch đại cADN tổng hợp được, và đầu dò.

Cụ thể là, khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn mồi phiên mã ngược RT để tổng hợp cADN từ ARN (bao gồm ARN nhỏ chẳng hạn như miRNA), đoạn mồi xuôi và đầu dò, hoặc đoạn mồi ngược và đầu dò, quy trình tổng hợp mồi phiên mã ngược dạng vòng để tổng hợp cADN hoặc gắn đuôi poly(A) là không yêu cầu, và đoạn mồi dò có thể tổng hợp cADNc bằng cách lai với ARN cần phát hiện và có thể khuếch đại và phát hiện ARN (bao gồm ARN nhỏ chẳng hạn như miRNA) cần phát hiện theo thời gian thực.

Theo phương án cụ thể khác, đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được sử dụng như là đoạn mồi và đầu dò sau đây để phát hiện ADN đặc hiệu trong mẫu: i) đoạn mồi xuôi và đầu dò; ii) đoạn mồi ngược và đầu dò; hoặc iii) đoạn mồi xuôi, đoạn mồi ngược và đầu dò.

Theo các phương án cụ thể, vùng Y của đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được phân cắt bằng enzym cắt vùng Y, và sau đó các vùng Y và Z có thể được tách rời khỏi mạch khuôn, và vùng X có thể được sử dụng như là đoạn mồi bằng cách giữ lại phức hợp với với axit nucleic đích để tổng hợp và khuếch đại axit nucleic. Ngoài ra, vì chỉ có vùng Y của đoạn mồi dò được phân cắt bởi enzym cắt vùng Y, đoạn mồi dò theo sáng chế có thể phát hiện axit nucleic hoặc protein cần phát hiện một cách chính xác hơn, so với đầu dò thông thường bị phân hủy bởi enzym ADN polymeraza.

Cụ thể là, vị trí phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào là đầu 3' của vùng Y hoặc vùng Z của đoạn mồi dò theo sáng chế, sự khuếch đại axit nucleic đích hoặc axit nucleic đặc hiệu của protein đích bằng enzym polymeraza có thể được ngăn chặn, trừ khi vùng Y bị cắt. Do đó, đoạn mồi dò theo sáng chế có thể phát hiện chính xác các đột biến chẳng hạn như đột biến điểm, đột biến thêm đoạn hoặc đột biến mất đoạn.

Theo đó, khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng để phát hiện axit nucleic hoặc protein, thời gian phân tích và chi phí có thể được giảm xuống, và axit nucleic hoặc protein có thể được phát hiện chính xác hơn và phát hiện đặc hiệu hơn so với phương pháp thông thường. Qua đó, đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được sử dụng như là bộ kit phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực.

Khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng như là bộ kit để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực, tốt hơn là, ngoài đoạn mồi dò theo sáng chế, bộ kit còn

bao gồm enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

Theo sáng chế, enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò có thể là enzym bất kỳ có khả năng cắt đặc hiệu vùng Y của đoạn mồi dò. Ví dụ, khi vùng Y là ADN, tốt nhất là, enzym có thể cắt vùng Y là ADN nucleaza (DNaza), cụ thể là DNaza I, DNaza II, S1 nucleaza, nucleaza P1, AP endonucleaza, hoặc UvrABSC nucleaza. Khi vùng Y là ARN, tốt nhất là, enzym có thể cắt vùng Y là ribonucleaza (RNaza), cụ thể là RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

Khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng làm bộ kit phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực, ngoài đoạn mồi dò theo sáng chế và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò, bộ kit có thể còn bao gồm các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại ADN.

Các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại bao gồm, ví dụ, lượng ADN polymeraza thích hợp (ví dụ, ADN polymeraza có thể chịu nhiệt có nguồn gốc từ *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* hoặc *Phyrococcus furiosus* (Pfu)), yếu tố phối hợp ADN polymeraza (Mg^{2+}), đệm, các deoxyribonucleotit triphosphat dNTP (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và nước cất (dH_2O). Ngoài ra, đệm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đây, lượng thích hợp Triton X-100, dimethylsulfoxit (DMSO), Tween 20, nonidet P40, PEG 6000, formamit và albumin huyết thanh bò (BSA).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện ARN theo thời gian thực bằng cách sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế.

Phương pháp có thể bao gồm các bước:

(a) tách chiết ARN từ mẫu; (b) bổ sung mồi phiên mã ngược (mồi RT) hoặc đoạn mồi dò theo sáng chế vào ARN tách chiết được ở bước (a), và tổng hợp cADN; (c) bổ sung bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế, và/hoặc đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược có trình tự nucleotit bổ sung cho cADN vào cADN tổng hợp được ở bước (b), và khuếch đại cADN bằng cách kéo dài mạch; và (d) đo số lượng các mảnh của đoạn mồi dò cắt được ở bước (c).

Mỗi bước của phương pháp phát hiện ARN theo thời gian thực theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Bước (a) là bước tách chiết ARN từ mẫu.

Theo sáng chế, mẫu có thể là mẫu sinh học, hoặc ARN hoặc mảnh ARN được tách từ mẫu sinh học. Cụ thể là, mẫu có thể là một hoặc nhiều loại bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có máu, nước bọt, nước tiểu, phân, mô, tế bào và các mẫu sinh thiết, hoặc cũng có thể là ARN hoặc mảnh ARN được tách từ mẫu sinh học lưu trữ nhưng không bị giới hạn ở đây.

Mẫu sinh học lưu trữ có thể được lưu trữ bằng phương pháp thông thường bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mẫu có thể được lưu trữ trong thời gian lâu hơn một tuần hoặc lâu hơn hơn một năm, ví dụ, từ 1 đến 10 năm. Ngoài ra, mẫu có thể có nguồn gốc từ mô được lưu trữ đông lạnh hoặc từ mô được cố định bằng formalin được lưu trữ ở nhiệt độ phòng.

Theo sáng chế, quá trình tách chiết ARN từ mẫu có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Theo một ví dụ, quá trình tách chiết này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng trizol hoặc Triton X-100.

Bước (b) là bước tổng hợp cADN từ ARN.

Cụ thể là, bước (b) theo phương pháp theo sáng chế là bước bổ sung môi RT vào ARN, được tách chiết ở bước (a), để tổng hợp cADN.

Theo sáng chế, môi RT là axit nucleic có từ 5 đến 30 nucleotit, tốt hơn là từ 10 đến 30 nucleotit, có thể bắt cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của ARN cần phát hiện. Do đó, môi RT có thể làm đoạn môi RT thường được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, hoặc đoạn môi dò theo sáng chế.

Theo sáng chế, đoạn môi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn môi RT, đoạn môi dò có thể bao gồm trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của axit nucleic cần phát hiện.

Theo sáng chế, quá trình tổng hợp cADN có thể được thực hiện bằng các phương pháp khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Theo một ví dụ, quá trình tổng hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ARN thu được từ mẫu làm mạch khuôn, enzym phiên mã ngược và ADN polymeraza. Mặt khác, khi đoạn môi dò được mô tả ở trên không được sử dụng làm đoạn môi RT, có thể phân tích ARN bằng

cách sử dụng đoạn mồi dò, thậm chí cả khi cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng đuôi poly(A), đoạn mồi đặc hiệu và đoạn mồi ngẫu nhiên.

Bước (c) là bước khuếch đại cADN.

Cụ thể là, bước (c) theo phương pháp theo sáng chế là bước bổ sung bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế, và/hoặc đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược có trình tự nucleotit bổ sung cho cADN, vào cADN được tổng hợp ở bước (b), và khuếch đại cADN bằng cách kéo dài mạch.

Bộ kit chứa đoạn mồi dò là bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

Enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò có thể là enzym bất kỳ cắt đặc hiệu vùng Y của đoạn mồi dò. Ví dụ, khi vùng Y là ADN, enzym có thể phân cắt vùng Y tốt nhất là ADN nucleaza (DNaza), cụ thể là DNaza I, DNaza II, S1 nucleaza, nucleaza P1, AP endonucleaza, hoặc UvrABSC nucleaza. Khi vùng Y là ARN, enzym có thể phân cắt vùng Y tốt nhất là ribonucleaza (RNaza), cụ thể là RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

Theo sáng chế, đoạn mồi dò chứa trình tự nucleotit có thể bất cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của ADNc được tổng hợp ở bước (b) để khuếch đại cADN, đoạn mồi dò có thể được sử dụng như là: i) đoạn mồi xuôi và đầu dò; hoặc ii) đoạn mồi ngược hoặc đầu dò; hoặc iii) đoạn mồi xuôi, đoạn mồi ngược và đầu dò. Ngoài ra, đoạn mồi dò theo sáng chế có cấu trúc X-Y-Z và gồm một hoặc nhiều chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào tất cả các đầu và bên trong của nó. Khi vùng Y của đoạn mồi dò được phân cắt bởi enzym đặc hiệu, các vùng Y và Z được tách rời khỏi mạch khuôn, và vùng X đóng vai trò là đoạn mồi mà không tách rời khỏi mạch khuôn. Cấu trúc của đoạn mồi dò này như được mô tả ở trên.

Chỉ thị có thể phát hiện ở trên có thể là phân tử phát huỳnh quang bám vào đoạn mồi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang là phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

Phân tử phát huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, rhodamine, TAMRA, FAM, FITC, Flo X, ROX, Texas Red, ORNage green

488X, ORNAge green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor ORNAge 546, Calfluor red 610, Quasar 670 và biotin, nhưng không giới hạn ở đây. Ngoài ra, phân tử dập tắt huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm DDQ-1, Dabcyl, Eclipase, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 và MGBNFQ, nhưng không giới hạn ở đây.

Theo một ví dụ cụ thể, trong đó đoạn môi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn môi xuôi và đầu dò hoặc đoạn môi ngược và đầu dò, đoạn môi dò có thể chứa trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của cADN được tổng hợp ở bước (b).

Theo một ví dụ cụ thể khác, trong khi đoạn môi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn môi xuôi và đầu dò hoặc đoạn môi ngược hoặc đầu dò, có thể sử dụng thêm đoạn môi xuôi hoặc đoạn môi ngược riêng biệt ngoài đoạn môi dò. Theo ví dụ này, đoạn môi xuôi hoặc đoạn môi ngược riêng biệt là ADN có thể bắt cặp bổ sung với cADN được tổng hợp ở bước (b) và có chứa từ 5 đến 30 nucleotit, tốt hơn là từ 10 đến 30 nucleotit. Qua đó, đoạn môi ngược có thể giống với môi RT được sử dụng ở bước (b).

Theo một ví dụ cụ thể khác nữa, trong đó đoạn môi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn môi xuôi, đoạn môi ngược và đầu dò, đoạn môi dò được sử dụng làm đoạn môi ngược có thể giống với đoạn môi dò được sử dụng ở bước (b), và các chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào tất cả các đầu hoặc bên trong của đoạn môi dò có thể giống hoặc khác với các chỉ thị của đoạn môi dò được sử dụng ở bước b).

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại cADN được thực hiện ở nhiệt độ đẳng nhiệt mà tại đó cADN ủ với (A) đoạn môi dò theo sáng chế, khi được sử dụng làm đoạn môi xuôi và đầu dò hoặc như đoạn môi ngược và đầu dò, và đoạn môi xuôi hoặc đoạn môi ngược như thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, hoặc (B) đoạn môi dò theo sáng chế, khi được sử dụng làm đoạn môi xuôi, đoạn môi ngược và đầu dò, và tại đó hoạt tính của enzyme được sử dụng không bị ức chế đáng kể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhiệt độ đẳng nhiệt” nghĩa là không có chu kỳ nhiệt, và thuật ngữ này không nhất thiết có nghĩa là nhiệt độ vật lý tương đương.

Theo một ví dụ cụ thể, nhiệt độ đẳng nhiệt tại đó phản ứng khuếch đại theo sáng chế được thực hiện có thể là từ 40°C đến 80°C, tốt hơn là từ 55°C đến 75°C, tốt hơn nữa

là từ 60°C đến 75°C.

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại cADN có thể được thực hiện bằng một phương pháp được chọn từ nhóm gồm có phản ứng chuỗi polymeraza, khuếch đại chu kỳ quay, khuếch đại thay thế sợi, và khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic, nhưng không nhất thiết giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại cADN có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại, ngoài bộ kit có chứa đoạn mồi dò theo sáng chế. Các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại có thể bao gồm, ví dụ, các lượng cần thiết ADN polymeraza (ví dụ, ADN polymeraza có thể chịu nhiệt có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* (Taq), vi khuẩn *Thermus thermophilus* (Tth), vi khuẩn *Thermus filiformis*, vi khuẩn *Thermis flavus*, vi khuẩn *Thermococcus litoralis* hoặc vi khuẩn *Phyrococcus furiosus* (Pfu)), yếu tố phối hợp ADN polymeraza (Mg^{2+}), đệm, các dNTP (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và nước cất (dH_2O). Ngoài ra, đệm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở đây, một lượng thích hợp Triton X-100, dimetylsufoxit (DMSO), Tween 20, nonidet P40, PEG 6000, formamit và albumin huyết thanh bò (BSA).

Bước (d) là bước đo số lượng các mảnh được phân cắt ra bởi enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

Theo sáng chế, số lượng các mảnh của đoạn mồi dò có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện khác nhau. Cụ thể là, số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được phân cắt theo sáng chế được đo sau khi hoàn thành phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược RT-PCR hoặc khuếch đại, và có thể được xác định bằng cách đo sự thay đổi cường độ huỳnh quang hoặc đo hóa phát quang.

Việc đo sự thay đổi cường độ huỳnh quang hoặc hóa phát quang có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống đo lường bất kỳ có thể phát hiện phân tử phát huỳnh quang đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, việc đo có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy PCR thời gian thực, máy dò đa điểm TRIAD, đầu đọc đĩa huỳnh quang Wallac/Victor, máy phát quang phổ kế Perkin-Elmer LB50B, LightCycler 96, máy PCR thời gian thực Applied Biosystems 7500, hoặc máy luân nhiệt PCR thời gian thực Biorad CFX96, nhưng không giới hạn ở đó.

Phương pháp để đo và phát hiện số lượng các mảnh của mồi dò được phân cắt theo

sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào loại nhãn hoặc chỉ thị có thể phát hiện được đưa vào đoạn mồi dò hoặc dung dịch phản ứng.

Ví dụ, đoạn mồi dò trong đó phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X và phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z được lai với axit nucleic đích, huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang gắn vào đầu vùng X bị giảm đáng kể bởi phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z trước khi các vùng Y và Z được phân cắt bởi enzym có thể phân cắt vùng Y. Tuy nhiên, khi vùng X không bị tách ra bởi enzym có thể cắt vùng Y, và chỉ các vùng Y và Z bị tách rời khỏi axit nucleic đích và phân tán vào dung dịch phản ứng, huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X tăng lên mà không bị ảnh hưởng bởi phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z. Lúc đó, có thể phát hiện axit nucleic đích theo thời gian thực bằng cách đo phát xạ huỳnh quang tăng lên của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X sử dụng các thiết bị được mô tả ở trên.

Theo một ví dụ cụ thể, cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng mồi RT bắt cặp bổ sung với ARN nhỏ, và sau đó cADN được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế bắt cặp bổ sung với cADN và có phân tử phát huỳnh quang FAM được gắn vào đó làm đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược. Kết quả là, đường cong khuếch đại xuất hiện trong khi khuếch đại cADN, không như các trường hợp cADN được khuếch đại sử dụng đoạn mồi xuôi thông thường không có chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp dùng để phát hiện ADN theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế.

Phương pháp có thể bao gồm các bước:

(a) tách chiết ADN từ mẫu; (b) bổ sung bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế, và/hoặc đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược có trình tự nucleotit bổ sung cho ADN được tách chiết ở bước (a), và khuếch đại ADN bằng cách kéo dài mạch; và (c) đo số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được phân cắt ở bước (b).

Mỗi bước của phương pháp phát hiện ADN theo thời gian thực theo sáng chế sẽ được mô tả sau đây.

Bước (a) là bước tách chiết ADN từ mẫu.

Theo sáng chế, mẫu có thể là mẫu sinh học, hoặc ADN hoặc một mảnh của ADN, được tách từ mẫu sinh học. Cụ thể là, mẫu có thể là một hoặc nhiều mẫu bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có máu, nước bọt, nước tiểu, phân, mô, tế bào và mẫu sinh thiết, hoặc cũng có thể là ADN hoặc mảnh của ADN được tách từ mẫu sinh học được lưu trữ, nhưng không nhất thiết bị giới hạn ở đây.

Mẫu sinh học lưu trữ có thể được lưu trữ bằng phương pháp thông thường đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Mẫu có thể được lưu trữ trong thời gian hơn một năm, ví dụ, từ 1 đến 10 năm. Ngoài ra, mẫu có thể có nguồn gốc từ mô được lưu trữ đông lạnh hoặc từ mô được cố định bằng formalin được lưu trữ ở nhiệt độ phòng.

Theo sáng chế, quá trình tách chiết ADN từ mẫu có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Theo một ví dụ, quá trình tách chiết có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cloroform hoặc etanol.

Bước (b) là bước khuếch đại ADN.

Cụ thể, bước (b) theo phương pháp theo sáng chế là bước bổ sung bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế, và/hoặc đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược có trình tự nucleotit bổ sung vào ADN tách chiết được ở bước (a), và khuếch đại ADN bằng cách kéo dài mạch.

Theo sáng chế, bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế là bộ kit có chứa đoạn mồi dò theo sáng chế và enzym có thể phân cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

Theo sáng chế, enzym có thể phân cắt vùng Y của đoạn mồi dò có thể là enzym bất kỳ có khả năng cắt đặc hiệu vùng Y của đoạn mồi dò. Ví dụ, khi vùng Y là ADN, enzym có thể cắt vùng Y tốt nhất là enzym ADN nucleaza (DNaza), cụ thể là DNaza I, DNaza II, S1 nucleaza, nucleaza P1, AP endonucleaza, hoặc UvrABSC nucleaza. Khi vùng Y là ARN, enzym có thể phân cắt vùng Y tốt nhất là ribonucleaza (RNaza), cụ thể là RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

Như được mô tả ở trên, đoạn mồi dò có chứa trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của ADN thu được ở bước (a). Để khuếch đại ADN, đoạn mồi dò có thể được sử dụng làm: i) đoạn mồi xuôi và đầu dò; hoặc ii) đoạn mồi ngược và đầu dò; hoặc iii) đoạn mồi xuôi, đoạn mồi ngược và đầu dò. Ngoài ra,

đoạn mồi dò theo sáng chế có cấu trúc X-Y-Z và chứa một hoặc nhiều chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào tất cả các đầu hoặc bên trong đoạn mồi dò. Khi vùng Y của đoạn mồi dò được cắt bởi enzym đặc hiệu, các vùng Y và Z được tách rời khỏi mạch khuôn, và vùng X đảm nhận vai trò làm đoạn mồi mà không tách rời khỏi mạch khuôn. Cấu trúc của đoạn mồi dò này như được mô tả ở trên.

Chỉ thị có thể phát hiện ở trên có thể là phân tử phát huỳnh quang bám vào đoạn mồi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang là phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

Phân tử phát huỳnh quang có thể là, ví dụ, một phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, rhodamine, TAMRA, FAM, FITC, Flo X, ROX, Texas Red, ORNAge green 488X, ORNAge green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor ORNAge 546, Calfluor red 610, Quasar 670 và biotin, nhưng không nhất thiết bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, phân tử dập tắt có thể là, ví dụ, một phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có DDQ-1, Dabcyl, Eclipase, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 và MGBNFQ, nhưng không nhất thiết bị giới hạn ở đó.

Theo một ví dụ cụ thể, khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn mồi xuôi và đầu dò hoặc làm đoạn mồi ngược và đầu dò, đoạn mồi dò có thể chứa trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần của trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a).

Theo một ví dụ cụ thể khác, khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn mồi xuôi và đầu dò hoặc làm đoạn mồi ngược và đầu dò, và có thể sử dụng thêm đoạn mồi ngược hoặc đoạn mồi xuôi riêng biệt khác ngoài đoạn mồi dò theo sáng chế. Theo ví dụ này, đoạn mồi ngược hoặc đoạn mồi xuôi riêng là ADN có thể bắt cặp bổ sung với ADN tách chiết được ở bước (a) và có chứa 5-30 nucleotit, tốt hơn là 10-30 nucleotit.

Theo một ví dụ cụ thể khác, khi đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng làm đoạn mồi xuôi, đoạn mồi ngược và đầu dò, đoạn mồi dò có chứa trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a), và không cần thiết sử dụng đoạn mồi ngược hoặc đoạn mồi xuôi riêng ngoài đoạn mồi dò theo sáng chế.

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại ADN tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ đẳng nhiệt mà tại đó cADN được ủ với (A) đoạn mồi dò theo sáng chế khi được sử dụng làm đoạn mồi xuôi và đầu dò hoặc làm đoạn mồi ngược và đầu dò, và đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược thường được sử dụng trong lĩnh vực này, hoặc (B) đoạn mồi dò theo sáng chế khi được sử dụng làm đoạn mồi xuôi, đoạn mồi ngược và đầu dò, và tại đó hoạt tính của enzym được sử dụng không bị ức chế đáng kể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhiệt độ đẳng nhiệt” nghĩa là không có chu kỳ nhiệt, và thuật ngữ không nhất thiết có nghĩa là nhiệt độ vật lý tương đương.

Theo một ví dụ cụ thể, nhiệt độ đẳng nhiệt tại đó phản ứng khuếch đại theo sáng chế được thực hiện có thể là từ 40°C đến 80°C, tốt hơn là từ 55°C đến 75°C, tốt hơn nữa là từ 60°C đến 75°C.

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại ADN có thể được thực hiện bằng một phương pháp được chọn từ nhóm gồm có phản ứng chuỗi polymeraza, khuếch đại chu kỳ quay, khuếch đại thay thế sợi, và khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic, nhưng không nhất thiết giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, phản ứng khuếch đại ADN có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại, ngoài bộ kit chứa đoạn mồi dò theo sáng chế. Các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại có thể bao gồm, ví dụ, một lượng ADN polymeraza thích hợp (ví dụ, ADN polymeraza có thể chịu nhiệt có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* hoặc *Phyrococcus furiosus* (Pfu)), yếu tố phối hợp ADN polymeraza (Mg^{2+}), đệm, các dNTP (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và nước cất (dH_2O). Ngoài ra, đệm có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đây, một lượng thích hợp Triton X-100, dimethylsulfoxit (DMSO), Tween 20, nonidet P40, PEG 6000, formamit và albumin huyết thanh bò (BSA).

Bước (c) là bước đo số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được cắt bởi enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

Theo sáng chế, số lượng các mảnh của đoạn mồi dò có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện khác nhau. Cụ thể là, số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được phân cắt theo sáng chế tốt hơn là được đo sau khi hoàn thành phản ứng chuỗi PCR phiên mã ngược hoặc khuếch đại, và có thể được xác định bằng cách đo sự thay

đổi cường độ huỳnh quang hoặc phát quang hóa học.

Việc đo sự thay đổi cường độ huỳnh quang hoặc phát quang hóa học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống đo lường bất kỳ có thể phát hiện phân tử phát huỳnh quang đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, việc đo có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy PCR thời gian thực, máy dò đa điểm TRIAD, đầu đọc đĩa huỳnh quang Wallac/Victor hoặc máy phát quang phổ kế Perkin-Elmer LB50B, LightCycler 96, máy PCR thời gian thực Applied Biosystems 7500, hoặc máy luận nhiệt PCR thời gian thực Biorad CFX96, nhưng không giới hạn ở đây.

Phương pháp để đo và phát hiện số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được cắt theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào loại phân tử phát huỳnh quang hoặc chỉ thị có thể phát hiện được đưa vào đoạn mồi dò hoặc dung dịch phản ứng.

Ví dụ, đoạn mồi dò trong đó phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X và phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z được lai với axit nucleic đích, huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X bị giảm đáng kể bởi phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z trước khi các vùng Y và Z được cắt bởi enzym có thể phân cắt vùng Y. Tuy nhiên, khi vùng X không bị tách rời bởi enzym có thể phân cắt vùng Y, và chỉ các vùng Y và Z được tách rời khỏi axit nucleic đích và phân tán vào dung dịch phản ứng, huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X tăng lên mà không bị ảnh hưởng bởi phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z. Lúc đó, có thể phát hiện axit nucleic đích theo thời gian thực bằng cách đo mức phát xạ huỳnh quang tăng lên của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X bằng cách sử dụng các thiết bị được mô tả ở trên.

Phương pháp phát hiện axit nucleic sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế đề xuất các cải tiến sau so với các phương pháp thông thường.

1. Theo phương pháp thông thường, các axit nucleic được phát hiện theo thời gian thực bằng cách lần lượt thiết kế và sử dụng các đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược và đầu dò. Tuy nhiên, sáng chế có thể phát hiện các axit nucleic theo thời gian thực bằng cách thiết kế và sử dụng một đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi dò ngược, và một đoạn mồi xuôi hoặc đoạn mồi ngược, hoặc bằng cách thiết kế và sử dụng một đoạn mồi xuôi và đoạn mồi dò ngược. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích đơn giản và tiết

kiệm chi phí nhờ chỉ cần sử dụng một lượng nhỏ oligo so với phương pháp phát hiện axit nucleic theo thời gian thực thông thường. Cụ thể là, đầu dò Cleave thông thường chỉ được sử dụng làm các đầu dò và không phải làm các đoạn mồi, nhưng đoạn mồi dò theo sáng chế được sử dụng đồng thời làm các đoạn mồi và đầu dò (như được thể hiện trên Fig.1).

2. Phương pháp thông thường yêu cầu đầu dò riêng biệt để phát hiện theo thời gian thực và yêu cầu đoạn khuếch đại có ít nhất từ 60 đến 70 bp. Tuy nhiên, vì đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò, phương pháp theo sáng chế không yêu cầu đầu dò riêng để phát hiện theo thời gian thực, và qua đó có thể phát hiện theo thời gian thực dù đoạn khuếch đại ngắn hơn. Ví dụ, phương pháp phân tích đã biết trong lĩnh vực này yêu cầu đoạn khuếch đại ít nhất từ 60 bp đến 70 bp, nhưng với phương pháp sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế, chỉ yêu cầu đoạn khuếch đại là 40 bp hoặc dài hơn. Điều này giúp phương pháp phát hiện theo sáng chế đơn giản và nhanh chóng hơn, vì không yêu cầu kéo dài oligo bổ sung trong quá trình phân tích axit nucleic nhỏ chẳng hạn như miRNA. Cụ thể là, khi sử dụng đầu dò Cleave thông thường, vị trí cắt được cắt bởi enzym cắt, và sau đó phần trước và phần sau vị trí cắt được tách rời khỏi axit nucleic đích và protein. Tuy nhiên, đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời làm đoạn mồi và đầu dò, vì vùng X duy trì phức hợp với axit nucleic đích và chỉ các vùng Y và Z được tách khỏi axit nucleic đích sau khi cắt vùng Y.

3. Bước khuếch đại sau khi cắt vùng Y của đoạn mồi dò theo sáng chế tạo điều kiện phát hiện các đột biến ở vùng Y, và qua đó đoạn mồi dò theo sáng chế có thể phát hiện số lượng các đột biến qua khuếch đại axit nucleic sau đó. Đó là, khi bước lai giữa vùng Y của đoạn mồi dò theo sáng chế và vùng đột biến của axit nucleic đích được hoàn thành, vùng Y chỉ được cắt khi vùng Y bắt cặp chính xác với vùng đột biến của axit nucleic đích, và sau đó phản ứng khuếch đại được thực hiện. Lúc đó, đột biến của axit nucleic đích có thể được xác định rõ ràng. Cụ thể là, nếu vùng Y của đoạn mồi dò theo sáng chế và vùng đột biến của axit nucleic đích được phép lai, vùng Y không bị cắt và phản ứng khuếch đại không xảy ra trong trường hợp vùng Y không bắt cặp bổ sung. Điều này có nghĩa là không có đột biến nào được phát hiện trong axit nucleic đích. Ngược lại, nếu vùng Y của đoạn mồi dò theo sáng chế và vùng đột biến của axit nucleic đích không bị đột biến được cho phép lai, vùng Y không bị cắt và phản ứng khuếch đại

không xảy ra trong trường hợp vùng Y không bắt cặp bổ sung. Điều này có nghĩa là không có đột biến nào được phát hiện trong axit nucleic đích.

4. Theo phương pháp thông thường, đầu dò Catacleave thể hiện xu hướng tăng lên liên tục của cường độ huỳnh quang nền bằng các phân đoạn lặp lại như được thể hiện trên Fig.18, do đó rất khó để đo chính xác giá trị Ct (giá trị chu kỳ ngưỡng) và cần một thao tác riêng biệt để đo giá trị Ct. Tuy nhiên, theo sáng chế có thể thực hiện phép đo một cách chính xác mà không cần phải có thao tác riêng biệt để đo giá trị Ct.

5. Đầu dò thủy phân đã biết trong lĩnh vực tương ứng, chẳng hạn như đầu dò Catacleave và đầu dò Taqman, không tạo ra các chỉ thị huỳnh quang chính xác như lượng được khuếch đại qua một phản ứng khuếch đại. Ví dụ, trong trường hợp đầu dò TaqMan hoặc đầu dò MGB, đầu dò được lai nên được cắt trong quá trình tổng hợp các oligonucleotit, nhưng chúng có thể bị tách rời mà không bị cắt. Trong trường hợp đầu dò Catacleave, sự phân cắt và lai lặp lại tạo ra lượng chỉ thị huỳnh quang nhiều hơn so với phản ứng khuếch đại của axit nucleic đích thực tế. Tuy nhiên, sau khi một axit nucleic riêng lẻ (đoạn mồi dò theo sáng chế) được lai với axit nucleic đích, một chỉ thị huỳnh quang được tạo ra nhờ sự phân cắt vị trí Y và đoạn oligonucleotit được tổng hợp. Nhờ đó, số lượng chỉ thị huỳnh quang khớp chính xác với số axit nucleic đích cần được khuếch đại.

6. Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện đa mồi (multiplex detection) cải tiến sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế đồng thời làm đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược. Mặc dù có thể sử dụng loại phân tử phát huỳnh quang thường được sử dụng đối với phương pháp phát hiện đa mồi thông thường đã biết, phương pháp theo sáng chế có thể sử dụng các loại phân tử phát huỳnh quang giống nhau hoặc khác nhau gắn vào cùng một đoạn mồi dò theo sáng chế để phát hiện nhiều loại axit nucleic hơn. Thông thường, sử dụng hai phân tử phát huỳnh quang có thể phát hiện đa mồi năm axit nucleic, sử dụng ba phân tử phát huỳnh quang có thể phát hiện đa mồi chín axit nucleic, và sử dụng bốn phân tử phát huỳnh quang có thể phát hiện đa mồi mười bốn axit nucleic.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện protein theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế.

Phương pháp bao gồm các bước:

(a) chuẩn bị kháng thể có gắn axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn

mỗi dò theo sáng chế; (b) gắn kháng thể, được chuẩn bị ở bước (a), vào mẫu chứa protein cần phát hiện, qua đó tạo thành phức hợp protein-kháng thể; c) lai bộ kit có chứa đoạn mỗi dò theo sáng chế với phức hợp protein-kháng thể được tạo ở bước (b), qua đó tạo phức hợp protein-kháng thể-đoạn mỗi dò; và d) đo số lượng các mảnh của đoạn mỗi dò được phân cắt qua bước (c).

Mỗi bước của phương pháp phát hiện protein theo sáng chế sẽ được mô tả sau đây.

Bước (a) là bước chuẩn bị kháng thể có gắn axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mỗi dò theo sáng chế.

Theo sáng chế, axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mỗi dò theo sáng chế được tổng hợp bằng phản ứng khuếch đại PCR thông thường sử dụng trình tự nucleotit của đoạn mỗi dò theo sáng chế làm khuôn mẫu.

Như được mô tả ở trên, đoạn mỗi dò theo sáng chế có cấu trúc X-Y-Z và có chứa một hoặc nhiều chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào cả hai đầu hoặc bên trong. Khi vùng Y của đoạn mỗi dò được cắt bởi enzym đặc hiệu, các vùng Y và Z được tách rời khỏi mạch khuôn, và vùng X đảm nhiệm vai trò như đoạn mỗi. Cấu trúc đoạn mỗi dò này đã được mô tả ở trên.

Chỉ thị có thể phát hiện ở trên có thể là phân tử phát huỳnh quang gắn vào đoạn mỗi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không phải liên kết cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang gồm phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

Phân tử phát huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, rhodamine, TAMRA, FAM, FITC, Flo X, ROX, Texas Red, ORNAge green 488X, ORNAge green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor ORNAge 546, Calfluor red 610, Quasar 670 và biotin, nhưng không nhất thiết giới hạn ở đây. Ngoài ra, phân tử dập tắt huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm DDQ-1, Dabcyl, Eclipase, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 và MGBNFQ, nhưng không nhất thiết được giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, kháng thể có cấu trúc trong đó trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mỗi dò theo sáng chế được liên kết với vùng Fc của kháng thể nhờ cầu nối. Ở đây, cầu

nổi thường là ADN gồm có từ 1 đến 10 nucleotit.

Theo sáng chế, để liên kết kháng thể với axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mồi dò theo sáng chế, thường có thể sử dụng hai phương pháp. Theo phương pháp thứ nhất, ADN có đầu 5' biến đổi thiol được liên kết với các gốc amino tự do của kháng thể sử dụng một thuốc thử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có succinimidyl-4-(N-maleimidometil)xyclohexan-1-carboxylat (SMMCC), sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidometil)xyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC), n-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat (SPDP), N-succinimidyl-6-(3'-(2-pyridyldithio)-propionamido)hexanoat (NHS-Ic-SPDP), và sulfo-succinimidyl-6-(3'-(2-pyridyldithio)-propionamido)hexanoat (Sulfo-NHS-Ic-SPDP). Các thuốc thử này có chiều dài không gian và độ tan trong nước khác nhau. Nếu cần thiết, đối với thao tác bổ sung, vùng nổi có thể được phân cắt sử dụng thuốc thử thio hóa giải phóng ADN.

Theo phương pháp thứ hai, vùng nổi được tạo ra giữa kháng thể và ADN bởi protein strepavidin bậc 4, trong đó protein đủ để hình thành liên kết không thuận nghịch với biotin. Các gốc amino tự do của kháng thể được đánh dấu với biotin bằng cách phản ứng với biotin-N-hydroxysuccinimit. Biotin hóa ADN có thể được thực hiện bằng cách sử dụng 5'-biotin phosphoramidit hoặc phản ứng biotin-n-hydroxysuccinimit sau gốc amin ở đầu 5'. Một liên hợp ADN, strepavidin và kháng thể có thể được tạo ra bằng cách bổ sung 1 mol đương lượng liên hợp ADN-strepavidin.

Theo phương pháp được mô tả ở trên, kháng thể đã được gắn axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được thực hiện phản ứng ở 4°C trong thời gian 1 giờ, sau đó được tinh sạch với cột gel Superdex 200, qua đó thu được liên hợp kháng thể-axit nucleic.

Kháng thể được tạo ra theo sáng chế có thể nhận diện đặc hiệu protein cần phát hiện, trong khi đó đoạn mồi dò theo sáng chế có thể lai với kháng thể. Do đó, kháng thể có thể được sử dụng dễ dàng để phát hiện protein cần phát hiện theo thời gian thực.

Bước (b) là bước tạo phức hợp protein-kháng thể.

Cụ thể là, bước (b) theo phương pháp theo sáng chế là bước gắn kháng thể được tạo ra ở bước (a) vào mẫu chứa protein cần phát hiện để tạo phức hợp protein-kháng thể.

Theo sáng chế, mẫu có thể là mẫu sinh học có chứa protein cần phát hiện. Cụ thể

là, mẫu có thể là một mẫu bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có máu, nước bọt, nước tiểu, phân, mô, tế bào và mẫu sinh thiết, hoặc có thể là mẫu sinh học lưu trữ chứa protein cần phát hiện, nhưng không nhất thiết được giới hạn ở đó.

Mẫu sinh học lưu trữ có thể được lưu trữ bằng phương pháp thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Mẫu có thể được lưu trữ trong hơn 1 năm, ví dụ, từ 1 đến 10 năm. Ngoài ra, mẫu có thể có nguồn gốc từ mô được bảo quản đông lạnh hoặc mô được cố định formalin được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Theo sáng chế, việc gắn kháng thể vào protein có thể được thực hiện bằng cách trộn kháng thể được tạo ở bước (a) với mẫu có chứa protein cần được phát hiện.

Bước (c) là bước tạo phức hợp protein-kháng thể-đoạn môi dò.

Cụ thể, bước (c) theo phương pháp theo sáng chế là bước lai bộ kit có chứa đoạn môi dò theo sáng chế với phức hợp protein-kháng thể được tạo ở bước (b), qua đó tạo phức hợp protein-kháng thể-đoạn môi dò.

Theo sáng chế, bộ kit có chứa đoạn môi dò là bộ kit có chứa đoạn môi dò theo sáng chế và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò. Theo sáng chế, enzym cho phép cắt vùng Y của đoạn môi dò có thể là enzym bất kỳ có thể cắt đặc hiệu vùng Y của đoạn môi dò. Ví dụ, khi vùng Y là ADN, enzym có thể cắt vùng Y tốt nhất là ADN nucleaza (DNaza), cụ thể là DNaza I, DNaza II, S1 nucleaza, nucleaza P1, AP endonucleaza, hoặc UvrABSC nucleaza. Khi vùng Y là ARN, enzym có thể cắt vùng Y tốt nhất là ribonucleaza (RNaza), cụ thể là RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

Theo sáng chế, việc lai bộ kit có chứa đoạn môi dò theo sáng chế với phức hợp protein-kháng thể có thể được thực hiện bằng cách bổ sung bộ kit có chứa đoạn môi dò theo sáng chế vào phức hợp protein-kháng thể.

Bước (d) là bước phát hiện protein bằng cách tính số lượng các mảnh của đoạn môi dò được cắt bởi enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò.

Theo sáng chế, việc đo số lượng các mảnh của đoạn môi dò có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện khác nhau. Cụ thể là, số lượng các mảnh của đoạn môi dò được phân cắt theo sáng chế tốt nhất là được đo sau khi hoàn thành phản ứng PCR phiên mã ngược RT-PCR hoặc phản ứng khuếch đại, và có thể được xác

định bằng cách đo sự thay đổi cường độ huỳnh quang hoặc phát quang hóa học.

Việc đo sự thay đổi về cường độ huỳnh quang hoặc phát quang hóa học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống đo bất kỳ có thể phát hiện phân tử phát huỳnh quang đã biết trong lĩnh vực tương ứng. Ví dụ, việc đo có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy PCR thời gian thực, máy dò đa điểm TRIAD, đầu đọc đĩa huỳnh quang Wallac/Victor, máy phát quang phổ kế Perkin-Elmer LB50B, LightCycler96, máy PCR thời gian thực Applied Biosystems 7500, hoặc máy luân nhiệt PCR thời gian thực Biorad CFX96, nhưng không giới hạn ở đây.

Phương pháp dùng để đo và phát hiện số lượng các mảnh của đoạn mồi dò được cắt theo sáng chế có thể khác nhau phụ thuộc vào loại phân tử đánh dấu hoặc chỉ thị có thể phát hiện được đưa vào đoạn mồi dò hoặc dung dịch phản ứng.

Ví dụ, đoạn mồi dò, trong đó phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X và phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn ở đầu của vùng Z, được lai với kháng thể tạo phức hợp với protein cần phát hiện, và huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn ở đầu của vùng X giảm đáng kể do phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn ở đầu của vùng Z trước khi các vùng Y và Z được tách rời bởi enzym có thể cắt vùng Y. Tuy nhiên, khi vùng X không được tách rời mà chỉ có các vùng Y và Z được tách rời khỏi kháng thể và được phân tán trong dung dịch phản ứng bởi enzym có thể phân cắt cùng Y, huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X tăng lên mà không bị ảnh hưởng bởi phân tử dập tắt huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng Z. Lúc đó, có thể phát hiện protein đích theo thời gian thực bằng cách sử dụng các thiết bị được mô tả ở trên để tăng phát xạ huỳnh quang của phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đầu của vùng X.

Theo một ví dụ, chỉ thị có thể phát hiện nêu trên có thể là phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đoạn mồi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang gồm phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

Phân tử phát huỳnh quang có thể là, ví dụ, một phân tử đánh dấu bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, rhodamine, TAMRA, FAM, FITC, Flo X, ROX, Texas Red, ORNAge green 488X, ORNAge green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor ORNAge 546, Calfluor red 610, Quasar 670

và biotin, nhưng không nhất thiết giới hạn ở đây. Ngoài ra, phân tử dập tắt huỳnh quang có thể là, ví dụ, phân tử bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có DDQ-1, Dabcyl, Eclipase, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 và MGBNFQ, nhưng không nhất thiết được giới hạn ở đây.

Phương pháp phát hiện protein theo sáng chế có ưu điểm ở chỗ tốc độ phát hiện cũng như độ chính xác của việc phát hiện protein cần phát hiện có thể tăng bằng cách sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế và kháng thể có gắn axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn mồi dò theo sáng chế. Đó là, như được mô tả ở trên, đoạn mồi dò theo sáng chế có tốc độ phát hiện protein nhanh hơn và chính xác nhờ được liên kết với phức hợp protein-kháng thể với chu kỳ khuếch đại ngắn và tính đặc hiệu cao.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Như được mô tả ở trên, phương pháp phát hiện axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc protein sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế sử dụng một lượng nhỏ oligo so với phương pháp phát hiện thông thường và không yêu cầu đầu dò riêng biệt đối với phát hiện theo thời gian thực. Do đó, theo phương pháp theo sáng chế, axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc protein cần phát hiện có thể được phát hiện theo thời gian thực một cách đơn giản và tiết kiệm chi phí.

Ngoài ra, các đột biến trong vùng Y có thể được phát hiện qua bước khuếch đại sau khi cắt vùng Y của đoạn mồi dò, và có thể phát hiện đa mồi với số lượng các axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc các protein phát hiện được lớn hơn số phân tử phát huỳnh quang được gắn vào đoạn mồi dò.

Do đó, đoạn mồi dò theo sáng chế và phương pháp phát hiện axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc protein theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò có thể phân biệt các đột biến điểm khác nhau xảy ra ở các gen KRAS, BRAF, EGFR, v.v., và qua đó có thể được sử dụng thuận lợi để chuẩn đoán các bệnh khác nhau và để chuẩn đoán tiên lượng và có thể được sử dụng hiệu quả đối với các vi khuẩn khác nhau, chẳng hạn như vi khuẩn kháng kháng sinh xảy ra đột biến điểm, và vi rút.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa quy trình phát hiện axit nucleic đích sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế;

Fig.2 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và 7, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen CK-18 trong dòng tế bào người SW620 và tế bào đơn nhân máu ngoại vi PBMC (peripheral blood mononuclear cell);

Fig.3 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 và 8, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen CK-19 trong dòng tế bào người SW620 và tế bào PBMC;

Fig.4 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và 9, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen GAPDH trong dòng tế bào người SW620 và tế bào PBMC;

Fig.5 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen CK-18 trong dòng tế bào người SW620 và tế bào PBMC;

Fig.6 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi xuôi có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 và đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 4, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen CK-19 trong dòng tế bào người SW620 và tế bào PBMC;

Fig.7 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 5 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 6, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ biểu hiện của gen GAPDH trong dòng tế bào người SW620 và tế bào PBMC;

Fig.8 thể hiện phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ đột biến G12D ở gen KRAS;

Fig.9 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ đột biến G12V

ở gen KRAS;

Fig.10 thể hiện các kết quả phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế, để đo mức độ đột biến G12D ở gen KRAS;

Fig.11 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến T529C ở gen OPN1MW sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng đoạn mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 19, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.12 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến T529C ở gen OPN1MW sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 19, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.13 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến T529C ở gen OPN1MW sau khi thực hiện phản ứng chuỗi bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 16 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 19, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.14 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến T529C ở gen OPN1MW sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 17 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 19, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.15 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến T529C ở gen OPN1MW sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 18 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 19, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.16 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến G12D ở gen KRAS sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế;

Fig.17 thể hiện các kết quả phát hiện đột biến G12V ở gen KRAS sau khi thực

hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng cặp mồi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 và đoạn mồi ngược có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế theo ví dụ của sáng chế; và

Fig.18 thể hiện kết quả xác nhận đoạn Salmonella Set 33 có được khuếch đại hay không sử dụng đầu dò Cataleave theo giải pháp kỹ thuật đã biết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ. Rõ ràng là các ví dụ này chỉ có mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tương ứng.

Ví dụ 1: phân tích axit nucleic theo thời gian thực sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế

Để đo sự biểu hiện của các gen CK-18 (xytokeratin-18), CK-19 (xytokeratin-19) và GAPDH (glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza), các đoạn mồi dò theo sáng chế và các mồi được thiết kế bởi IDT (Integrated ADN Technologies, Hoa Kỳ) như được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây (xem Bảng 1). Ở đây, đối với các đoạn mồi dò, FAM (fluorescein suxinimidyl este) được gắn vào đầu 5', và 3IABkFG được gắn vào đầu 3'. Đối với axit ribonucleic (ARN), chữ cái "r" được thêm vào trước trình tự để phân biệt với axit deoxyribonucleic (ADN). Đối với đối chứng, các mồi được sử dụng trong phương pháp SYBR được thiết kế bởi IDT như được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 1

Đoạn mồi xuôi gen người CK18	5'-ATCTTGGTGATGCCTTrGrGAC-3'	SEQ ID NO: 1
Đoạn mồi ngược gen người CK18	5'-CCTGCTTCTGCTGGCTTAAT-3'	SEQ ID NO: 2
Đoạn mồi xuôi gen người CK18	5'-GTCACAGCTGAGCATGAAAG -3'	SEQ ID NO: 3
Đoạn mồi ngược gen người CK19	5'-TCACTATCAGCTCGCArCrATC-3'	SEQ ID NO: 4
Đoạn mồi xuôi gen người GAPDH	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGrUrCAA-3'	SEQ ID NO: 5
Đoạn mồi ngược gen người GAPDH	5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'	SEQ ID NO: 6

Bảng 2

Đoạn mồi xuôi gen người CK18	5'-ATCTTGGTGATGCCTTGGAC-3'	SEQ ID NO: 7
------------------------------	----------------------------	--------------

Đoạn mồi ngược gen người CK18	5'-CCTGCTTCTGCTGGCTTAAT-3'	SEQ ID NO: 2
Đoạn mồi xuôi gen người CK19	5'-GTCACAGCTGAGCATGAAAG-3'	SEQ ID NO: 3
Đoạn mồi ngược gen người CK19	5'-TCACTATCAGCTCGCACATC-3'	SEQ ID NO: 8
Đoạn mồi xuôi gen người GAPDH	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'	SEQ ID NO: 9
Đoạn mồi ngược gen người GAPDH	5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'	SEQ ID NO: 6

ARN từ mỗi tế bào SW620 và PMBC thu được từ máu người là đối tượng của phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR) để tổng hợp các cADN. 10 ng mỗi cADN, 10 triệu đơn vị RNaza H chịu nhiệt và 4 μ l AptaTaq DNA master (Roche) được nạp vào ống, và bổ sung nước cất ba lần đến tổng thể tích 20 μ l. Tiếp theo, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) đối với cADN được thực hiện với sự có mặt của 1 μ l dung dịch có nồng độ 10 μ M của mỗi đoạn mồi dò và mỗi mồi như được thể hiện ở bảng 1 và bảng 2. Ở đây, các phản ứng PCR được thực hiện 40 chu kỳ (đối với phương pháp SYBR) và 45 chu kỳ (đối với đoạn mồi dò theo sáng chế), mỗi chu kỳ kéo dài trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 95°C, 60 giây ở nhiệt độ từ 62 đến 63°C và 10 giây ở nhiệt độ 95°C. Các kết quả của phản ứng PCR được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.2 đến Fig.7. Kết quả là, có thể thấy rằng, khi sự biểu hiện của các gen CK-18, CK-19 và GAPDH được đo bằng cách sử dụng phương pháp SYBR, đường cong khuếch đại không đặc hiệu đối với gen CK-18 và CK-19 trừ GAPDH được thể hiện ở đối chứng âm, và khuếch đại không đặc hiệu cũng xảy ra ở đối chứng dương (như được thể hiện ở các hình vẽ từ Fig.2 đến Fig.4). Ngược lại, khi sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế, các vấn đề chẳng hạn như khuếch đại không đặc hiệu không xảy ra không chỉ trong trường hợp gen GAPDH mà còn trong các gen CK-18 và CK-19. Do đó, có thể thấy rằng đoạn mồi dò theo sáng chế có thể được sử dụng trong biểu hiện gen và phân tích gen mà không gây ra bất kỳ phản ứng không đặc hiệu nào, không giống với phương pháp SYBR thông thường.

Ví dụ 2: xác định đột biến sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế

Các đột biến G12D và G12V ở gen KRAS được xác định sử dụng đoạn mồi dò theo sáng chế. Cụ thể là, các đoạn mồi dò theo sáng chế và đoạn mồi ngược được thiết kế bởi IDI như được thể hiện ở bảng 3 dưới đây. Đối với các đoạn mồi dò theo sáng chế, FAM (floresxein suxinimidyl este) được gắn vào đầu 5', và 3IABkFG được gắn vào đầu

3'. Đối với axit ribonucleic (ARN), chữ cái “r” được thêm vào phía trước trình tự để phân biệt với axit deoxyribonucleic (ADN).

Bảng 3

Đoạn mồi xuôi G12D	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGrATG-3'	SEQ ID NO: 10
Đoạn mồi xuôi G12V	5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGrATG-3'	SEQ ID NO: 11
Đoạn mồi ngược phổ dụng	5'-CATATTCGTCCACAAAATGATTCTG-3'	SEQ ID NO: 12

Ngoài ra, gen KRAS cần đo được thu dưới dạng ADN tổng số từ mỗi dòng tế bào SW620 và dòng tế bào LS174T. Đối với kiểu gen hoang dã, ADN tổng số được thu từ máu của người bình thường theo cách tương tự. Ở đây, dòng tế bào SW620 được biết đến là dòng tế bào đột biến G12V, và dòng tế bào LS174T được biết đến là dòng đột biến G12D.

Tiếp theo, 10 triệu đơn vị RNaza H chịu nhiệt, 4 µl AptaTaq ADN Master (Roche), 40 ng ADN tổng số được tách chiết từ tế bào SW620, và mỗi 4 pg, 40 pg, 400 pg, và 4 ng ADN tổng số được tách chiết từ tế bào LS174T được nạp vào các ống tương ứng, và bổ sung nước cất ba lần đến tổng thể tích mỗi ống là 20 µl. Sau đó, sử dụng 1 µl dung dịch nồng độ 10 µM của mỗi đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, được thiết kế như mô tả ở trên, để thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza để đo đột biến G12D được biết như là đột biến LS174T. Ở đây, phản ứng PCR được thực hiện trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 95°C, 60 giây ở nhiệt độ từ 62 đến 63°C và 10 giây ở nhiệt độ 95°C. Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.8.

Ngoài ra, đột biến G12V được biết như là đột biến SW620 được đo khi có sự có mặt của đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12 dưới cùng các điều kiện như được mô tả ở trên, ngoại trừ mỗi lượng 4 pg, 40 pg, 400 pg, và 4 ng ADN tổng số được tách chiết từ tế bào SW620 được bổ sung vào 40 ng ADN tổng số được tách chiết từ tế bào LS174T, thay vì bổ sung ADN tổng số được tách chiết từ LS174T vào ADN tổng số được tách chiết từ tế bào SW620. Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.9.

Ngoài ra, đột biến G12D được biết là đột biến LS174T được đo khi có sự có mặt của đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12 dưới các điều kiện giống như được mô tả ở trên, ngoại trừ 40 pg ADN tổng số

được tách chiết từ dòng tế bào LS174T được bổ sung vào 40 ng ARN tổng số từ người bình thường, thay vì thêm ADN tổng số được tách chiết từ tế bào SW620 vào ADN tổng số được tách chiết từ tế bào LS174T. Các kết quả đo được được thể hiện trên Fig.10.

Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng khi đoạn môi dò theo sáng chế được sử dụng, có thể đo được các đột biến với độ nhạy và đặc hiệu cao.

Cụ thể là, trong xác định kiểu gen điểm cuối được sử dụng rộng rãi như phương pháp để đo các đột biến điểm, chỉ có sự hiện diện hoặc vắng mặt của đột biến tương ứng có thể được xác định qua phản ứng PCR theo thời gian thực. Tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng đoạn môi dò theo sáng chế, có thể thấy rằng loại đột biến và tỷ lệ đột biến có thể được phân tích thông qua phản ứng PCR thời gian thực như được mô tả ở trên. Ngoài ra, trong trường hợp phương pháp thông thường, chỉ có thể xác định các gen có mức đột biến tối đa từ 1 đến 0,1%, nhưng trong trường hợp theo sáng chế, có thể phân tích với các mức đột biến chỉ 0,01%.

Ví dụ 3: xác định kích thước tối ưu của đoạn môi dò theo sáng chế

Gen OPN1MW (gen opsin-1 nhạy với bước sóng trung bình) nằm ở cánh dài (Xq28) của nhiễm sắc thể X là gen liên quan đến rối loạn màu sắc và mù màu, và các đột biến xảy ra ở bốn vị trí nucleotit của gen này gây ra hội chứng mù màu đỏ-xanh. Các vị trí đột biến như thế là C282A, T529C, T607C và G989A.

Theo đó, để đánh giá khả năng phát hiện đột biến của đoạn môi dò theo sáng chế theo độ dài của nó, các tác giả sáng chế đã thiết kế plasmit chứa gen (xem trình tự ADN có mã nhận biết SEQ ID NO: 13) thu được bằng cách gây đột biến ở vị trí T529C ở các nucleotit từ 241 đến 1030 của gen OPN1MW, và sau đó plasmit này được pha loãng ở các nồng độ 10 fM, 1 fM, 100 aM và 10 aM. Lấy 1 µl mỗi nồng độ pha loãng và sau đó thực hiện phân tích mỗi trình tự pha loãng sử dụng năm đoạn môi dò theo sáng chế và môi ngược do IDT thiết kế như được thể hiện trên bảng 4 dưới đây. Ở đây, FAM (florescein succinimidyl ester) được gắn vào đầu 5' của năm đoạn môi dò được thiết kế, và 3IABkFG được gắn vào đầu 3'. Đối với axit ribonucleic (ARN), chữ cái "r" được thêm vào trước trình tự để phân biệt với axit deoxyribonucleic (ADN). Các kết quả thu được bằng cách sử dụng đoạn môi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 (như được thể hiện trên Fig.11) và các kết quả thu được bằng cách sử dụng đoạn môi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và mỗi đoạn môi dò lần lượt có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15,

16, 17, và 18 (như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.12 đến Fig.15) được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.11 đến Fig.15.

Bảng 4

Đoạn mỗi dò 529CA1	5'-TGGGCATTGCCTTCTCCrCGG-3'	SEQ ID NO: 14
Đoạn mỗi dò 529CA2	5'-GCCTTCTCCrCGG-3'	SEQ ID NO: 15
Đoạn mỗi dò 529CA3	5'-CAAGCTGGCCATCGTGGGCATTGCCTTCTCCrCGG-3'	SEQ ID NO: 16
Đoạn mỗi dò 529CA4	5'-TGGGCATTGCCTTCTCCrCGGATCTGGGC-3'	SEQ ID NO: 17
Đoạn mỗi dò 529CA5	5'-TGGGCATTGCCTTCTCCrCGGATCTGGGCTGCTGTG-3'	SEQ ID NO: 18
Đoạn mỗi ngược	5'-GTACCTGCTCCAACCAAAGA-3'	SEQ ID NO: 19

Như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.11 đến Fig.15, khi vùng X trong cấu trúc X-Y-Z của đoạn mỗi dò theo sáng chế gồm có 9 nucleotit, vùng X cũng được tách khỏi mạch khuôn sau khi cắt vùng Y, và do đó nó chỉ đóng vai trò là đầu dò mà không có chức năng làm đoạn mỗi (như được thể hiện trên Fig.12), và khi vùng X gồm có 31 nucleotit, quan sát thấy phản ứng khuếch đại không đặc hiệu (như được thể hiện trên Fig.13). Ngoài ra, khi vùng Z gồm có 2 hoặc 10 nucleotit, chỉ có vùng Z được tách khỏi mạch khuôn sau khi cắt vùng Y, trong khi vùng X không được tách ra, và do đó xảy ra phản ứng khuếch đại thông thường (như được thể hiện trên các hình vẽ Fig.11 và Fig.14), nhưng khi vùng Z gồm có 17 nucleotit, vùng Z không được tách khỏi mạch khuôn sau khi cắt vùng Y, và do đó không xảy ra phản ứng khuếch đại thông thường (như được thể hiện trên Fig.15). Như được mô tả ở trên, có thể thấy rằng khi các vùng X và Z của đoạn mỗi dò theo sáng chế có số lượng nucleotit cụ thể phản ứng khuếch đại đặc hiệu có thể xảy ra.

Ngoài ra, đột biến trên gen KRAS được đo theo cách tương tự như ở thí nghiệm ở ví dụ 2, ngoại trừ, như được thể hiện trong bảng 5 dưới đây, vùng Y gồm có một ARN và vùng Z gồm có một hoặc hai ADN. Cụ thể là, 1 μ l mỗi dung dịch nồng độ 10 μ M của đoạn mỗi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 20 và đoạn mỗi có mã nhận biết SEQ ID NO: 10, hoặc 1 μ l mỗi dung dịch 10 μ M của đoạn mỗi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 21 và đoạn mỗi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, 10 triệu đơn vị RNase H chịu nhiệt, 4 μ l AptaTaq ADN master (Roche), và mỗi 120 pg và 1,2 ng ADN tổng số được tách chiết

từ tế bào LS174T được nạp vào các ống nghiệm tương ứng, và bổ sung nước cất ba lần đến tổng thể tích mỗi ống là 20 μ l. Tiếp theo, thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 95°C, 60 giây ở nhiệt độ từ 62°C đến 63°C và 10 giây ở nhiệt độ 95°C, qua đó đo được đột biến G12D được biết là đột biến LS174T. Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.16.

Ngoài ra, 1 μ l dung dịch 10 μ M của mỗi đoạn mỗi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và đoạn mỗi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, hoặc 1 μ l dung dịch 10 μ M của mỗi đoạn mỗi dò có mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và đoạn mỗi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12, 10 triệu đơn vị RNaza H chịu nhiệt, 4 μ l AptaTaq DNA master (Roche), và mỗi 120 pg và 1,2 ng ADN tổng số được tách từ tế bào SW620 được nạp vào ống nghiệm, và bổ sung nước cất ba lần đến tổng thể tích mỗi ống là 20 μ l. Tiếp theo, thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 95°C, 60 giây ở nhiệt độ từ 62°C đến 63°C và 10 giây ở nhiệt độ 95°C, qua đó xác định được mức độ đột biến G12V được biết là đột biến SW620. Các kết quả đo được thể hiện trên Fig.17.

Bảng 5

Đoạn mỗi dò-xuôi G12D loại rY	5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGrAT-3'	SEQ ID NO: 20
Đoạn mỗi dò-xuôi G12D loại rYY	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGrATG-3'	SEQ ID NO: 21
Đoạn mỗi dò-xuôi G12V loại rY	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGrUT-3'	SEQ ID NO: 22
Đoạn mỗi dò-xuôi G12V loại rYY	5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGrUTG-3'	SEQ ID NO: 23
Đoạn mỗi ngược phổ dụng	5'-CATATTCGTCCACAAAATGATTCTG-3'	SEQ ID NO: 12

Như được thể hiện trên các hình vẽ Fig.16 và Fig.17, khi khoảng cách giữa vùng Y được cắt và vùng Z có chiều dài ít nhất 2 bp, phản ứng khuếch đại sử dụng đoạn mỗi dò theo sáng chế xảy ra suôn sẻ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Đoạn mồi dò được sử dụng đồng thời như là đầu dò và đoạn mồi để phát hiện axit nucleic hoặc protein theo thời gian thực, có cấu trúc X-Y-Z, chứa ít nhất một chỉ thị có thể phát hiện được gắn vào cả hai đầu hoặc bên trong đoạn mồi dò, và tạo phức hợp bằng cách bám vào axit nucleic đích hoặc vùng đặc hiệu của protein đích cần phát hiện theo thời gian thực,

trong đó khi vùng Y của đoạn mồi dò được cắt bởi enzym đặc hiệu, vùng X đóng vai trò làm đoạn mồi trong việc duy trì phức hợp với axit nucleic đích hoặc protein đích và các vùng Y và Z được tách khỏi vùng đặc hiệu của axit nucleic hoặc protein đích,

trong đó X là ADN gồm có từ 10 đến 30 nucleotit,

trong đó Y là ARN gồm có từ 1 đến 10 nucleotit,

trong đó Z là ADN gồm có 2 hoặc 3 nucleotit.

2. Đoạn mồi dò theo điểm 1, trong đó chỉ thị có thể phát hiện là phân tử phát huỳnh quang bám vào đoạn mồi dò bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, hoặc cặp huỳnh quang bao gồm phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang.

3. Đoạn mồi dò theo điểm 1, trong đó X, Y và Z của đoạn mồi dò được tổng hợp theo cách được metyl hóa toàn bộ hoặc một phần để tránh sự phân cắt không đặc hiệu.

4. Đoạn mồi dò theo điểm 1, trong đó enzym là ribonucleaza (RNaza) của bất kỳ một trong số RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

5. Bộ kit dùng để phát hiện axit nucleic bao gồm: đoạn mồi dò theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3; và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn mồi dò.

6. Bộ kit theo điểm 5, trong đó enzym là ribonucleaza (RNaza) của bất kỳ một trong số RNaza II, RNaza III, RNaza IV, RNaza H, hoặc RNaza T2.

7. Bộ kit theo điểm 5, trong đó bộ kit còn bao gồm các hóa chất cần thiết cho phản ứng khuếch đại ADN.

8. Phương pháp phát hiện ADN theo thời gian thực bao gồm các bước:

(a) tách chiết ADN từ mẫu;

(b) bổ sung, vào ADN tách chiết được ở bước (a), (i) bộ kit bao gồm đoạn mồi dò

theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3; và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò, trong đó đoạn môi dò có trong bộ kit có trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a) và đóng vai trò làm đoạn môi xuôi và đầu dò, và đoạn môi ngược có trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tổng hợp được ở bước (a); hoặc (ii) bộ kit bao gồm đoạn môi dò theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3; và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò, trong đó đoạn môi dò trong bộ kit có trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a) và đóng vai trò làm đoạn môi ngược và đầu dò, và đoạn môi xuôi có trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a); hoặc (iii) bộ kit bao gồm đoạn môi dò theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3; và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò, trong đó đoạn môi dò có chứa trong bộ kit có trình tự nucleotit có thể bắt cặp bổ sung với một phần trình tự nucleotit của ADN tách chiết được ở bước (a) và đóng vai trò làm đoạn môi xuôi, đoạn môi ngược và đầu dò, và khuếch đại ADN bằng cách kéo dài mạch; và

(c) đo số lượng các mảnh của đoạn môi dò được cắt ở bước (b).

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước (b) là bước trong đó vùng Y của đoạn môi dò bám vào ADN tách chiết được ở bước (a) được cắt bởi enzym chứa trong bộ kit sao cho các vùng Y và Z được tách khỏi ADNc và vùng X đóng vai trò làm đoạn môi cho phản ứng khuếch đại.

10. Phương pháp phát hiện protein trong mẫu theo thời gian thực bao gồm các bước:

(a) chuẩn bị kháng thể đã được gắn với axit nucleic có trình tự nucleotit bổ sung cho đoạn môi dò theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3;

(b) gắn kháng thể chuẩn bị được ở bước (a) vào mẫu có chứa protein cần phát hiện, qua đó tạo thành phức hợp protein-kháng thể;

(c) lai bộ kit bao gồm đoạn môi dò theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3; và enzym có thể cắt vùng Y của đoạn môi dò với phức hợp protein-kháng thể ở bước (b), qua đó tạo ra phức hợp protein-kháng thể-đoạn môi dò; và

(d) đo số lượng các mảnh của đoạn môi dò được cắt ở bước (c).

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó bước (d) là bước trong đó vùng Y của đoạn

mồi dò gắn với kháng thể đã được chuẩn bị ở bước (a) được cắt bởi enzym chứa trong bộ kit sao cho các vùng Y và Z được tách khỏi ADNc và vùng X đóng vai trò làm đoạn mồi cho phản ứng khuếch đại.

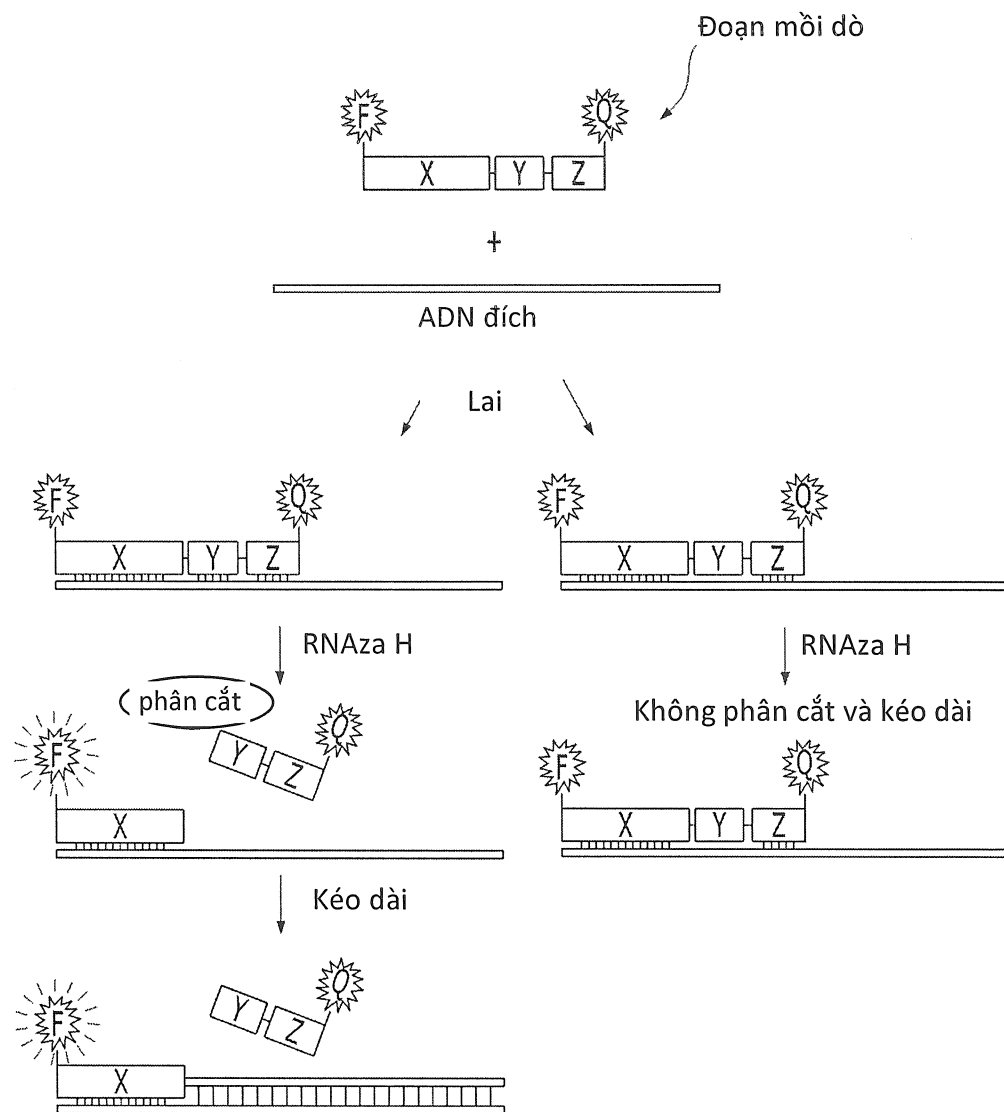


Fig.1

Biểu đồ khuếch đại

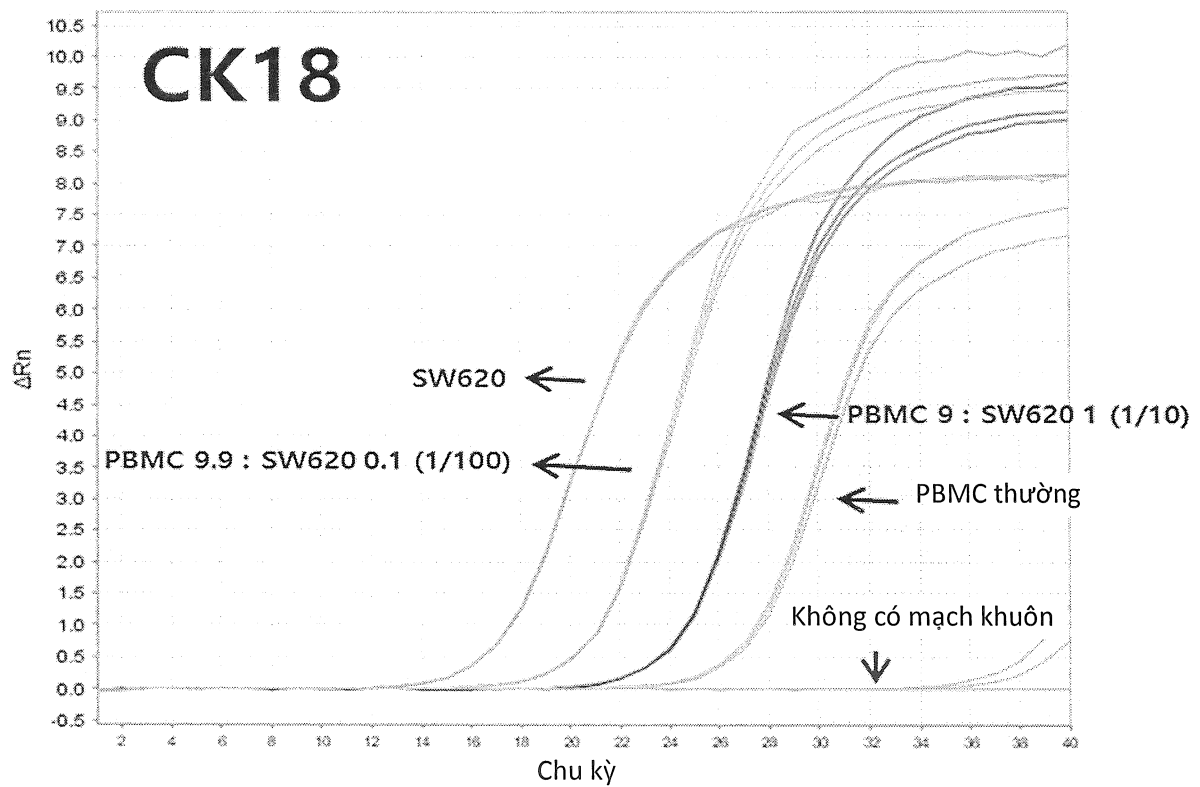


Fig.2

Biểu đồ khuếch đại

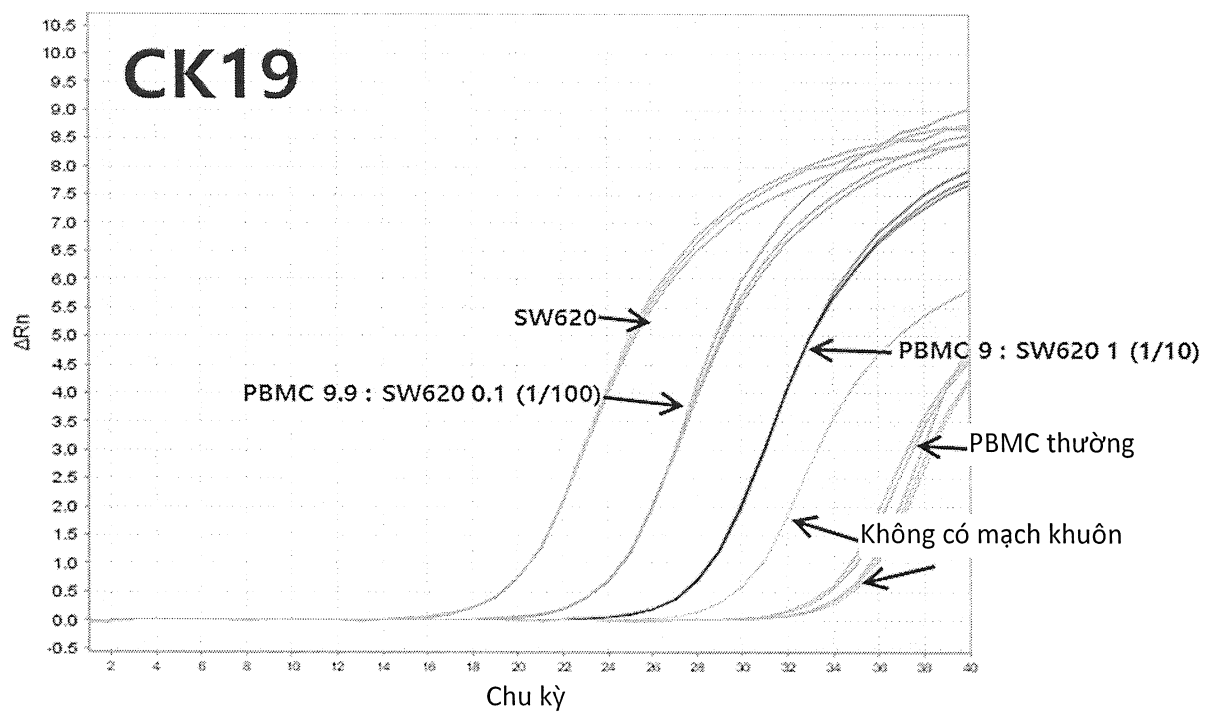


Fig.3

Biểu đồ khuếch đại

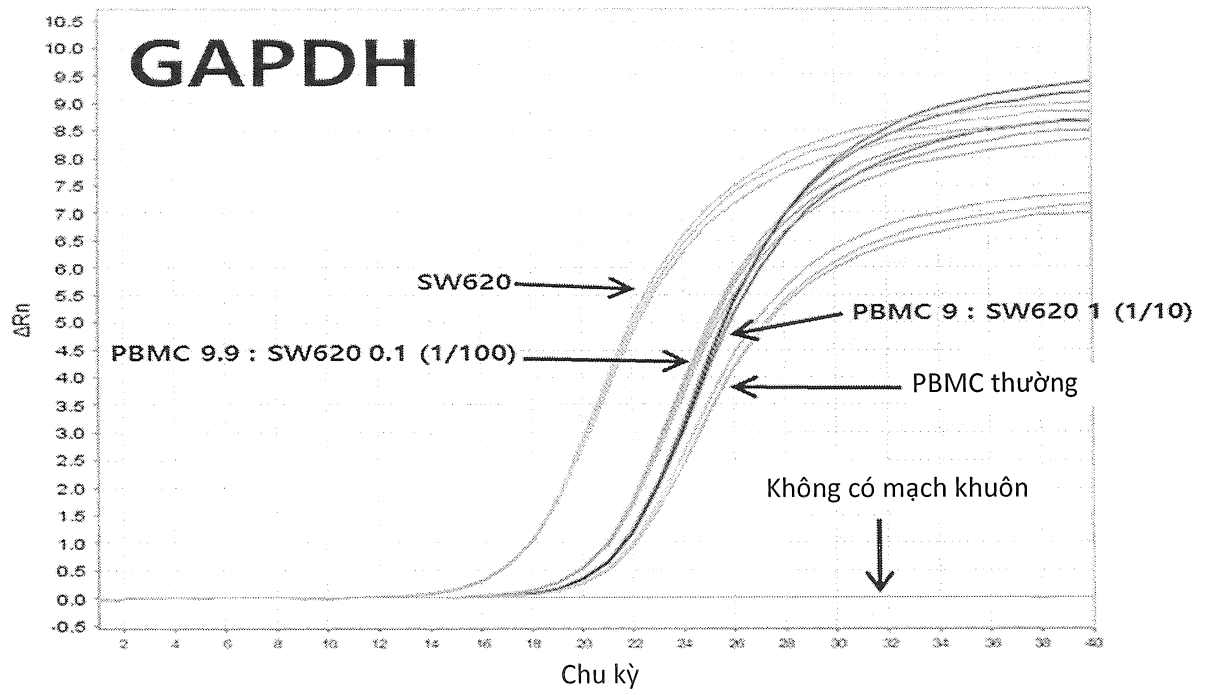


Fig.4

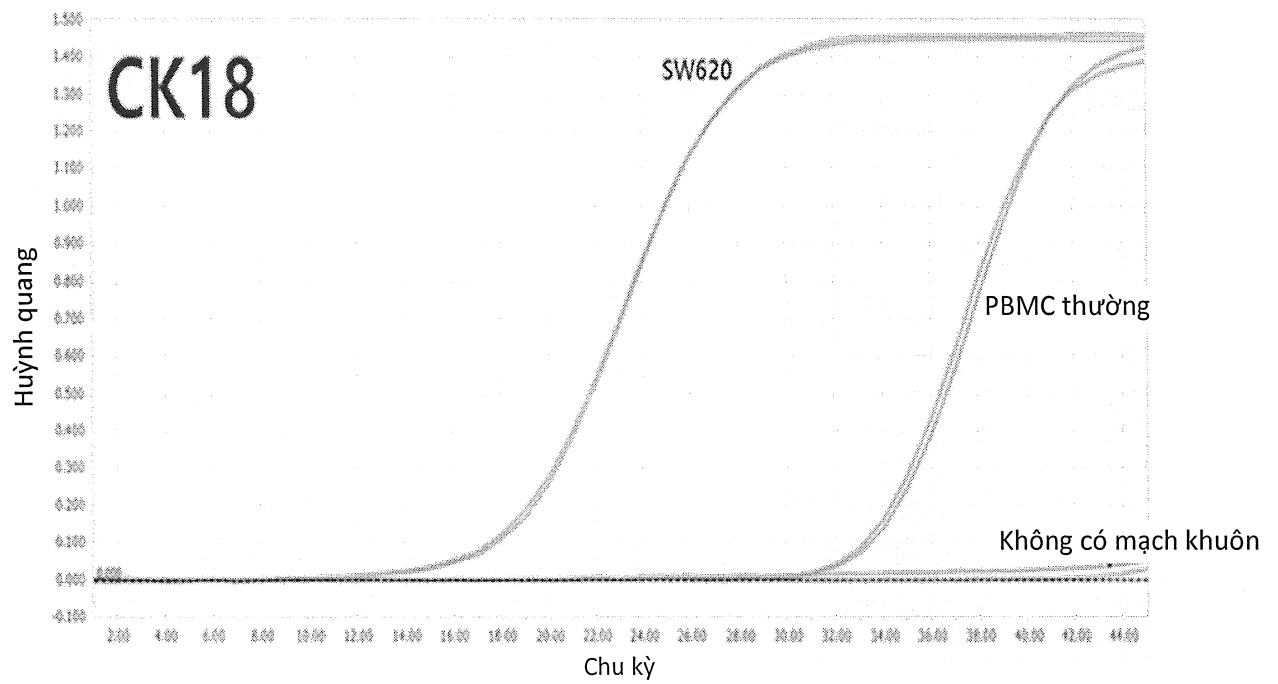


Fig.5

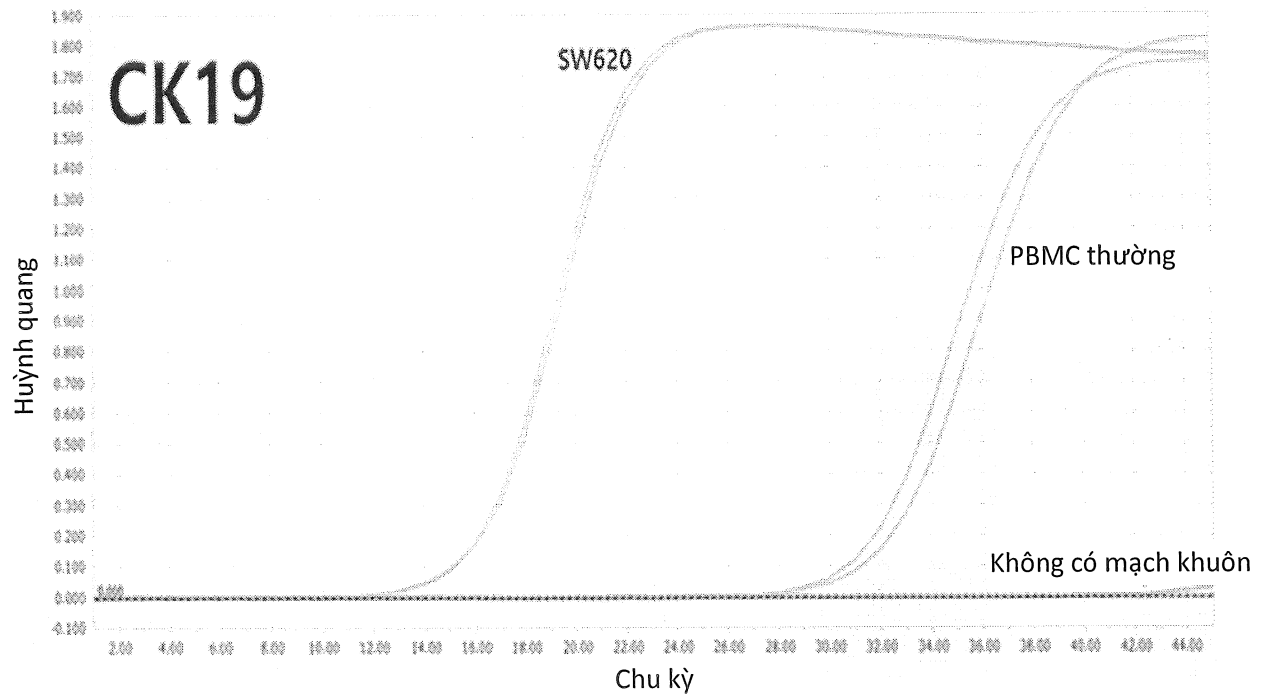


Fig.6

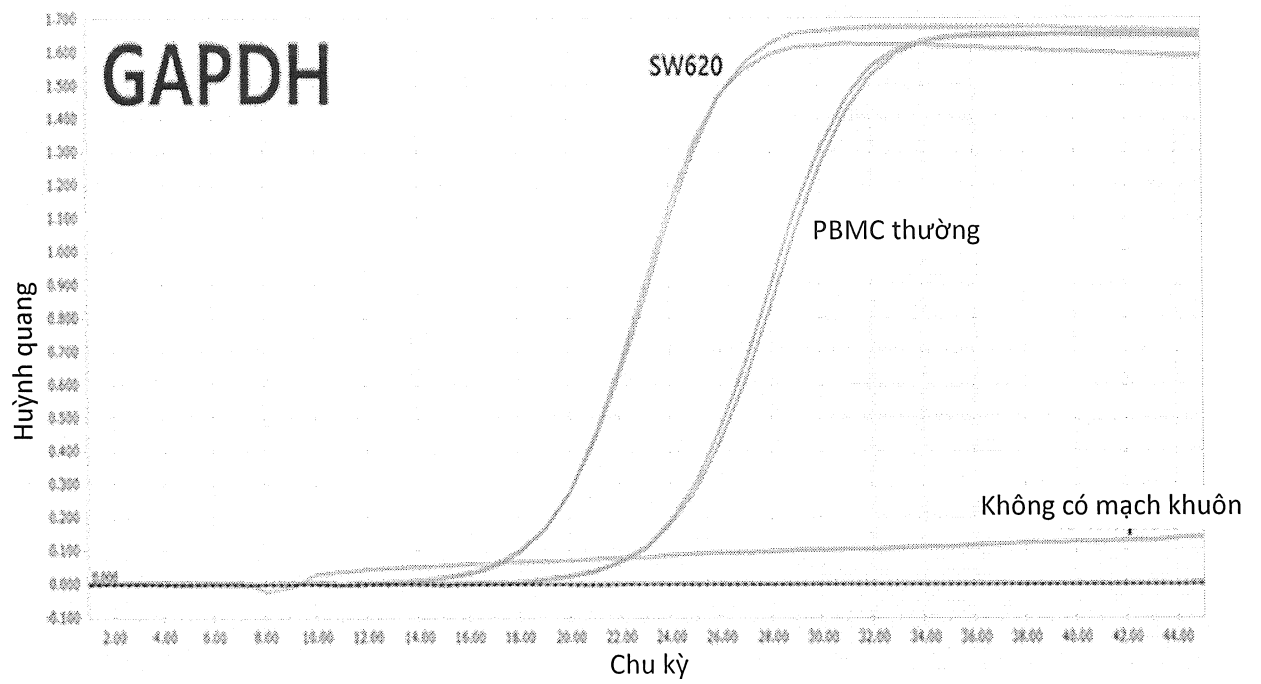


Fig.7

Đột biến G12D

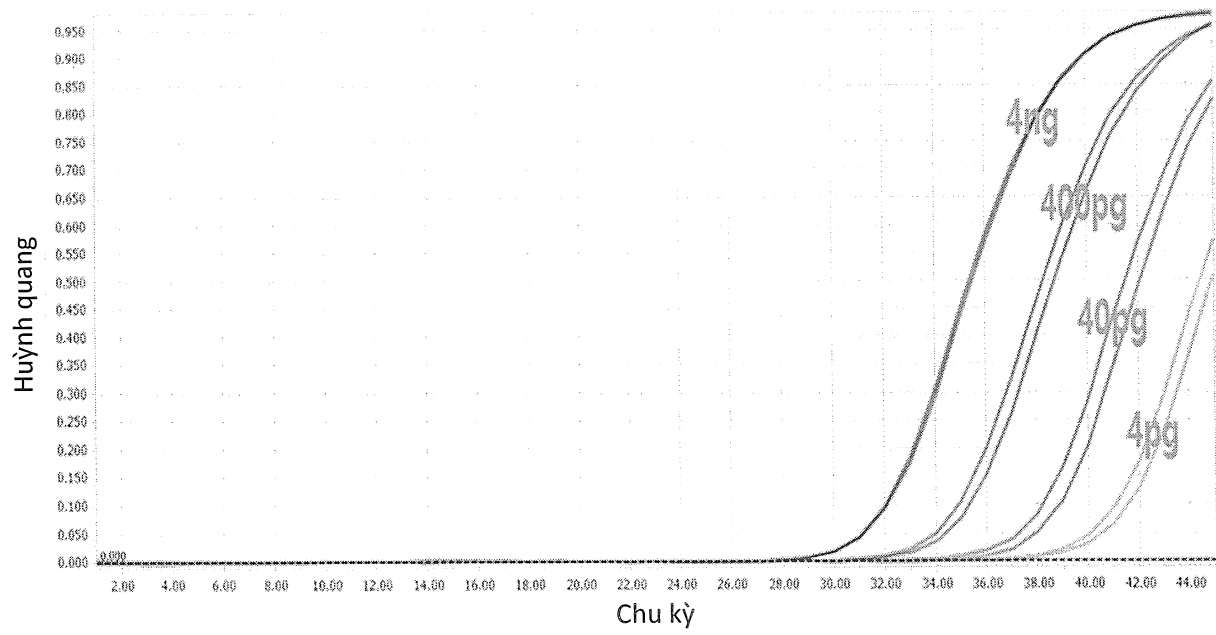


Fig.8

Đột biến G12V

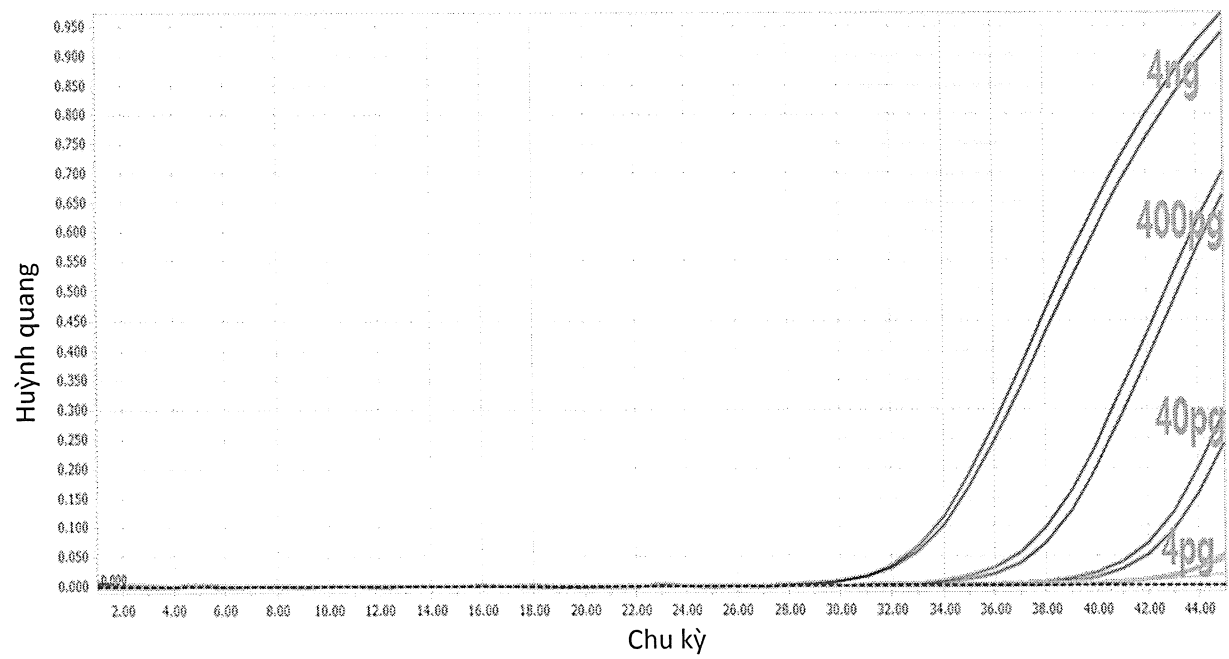


Fig.9

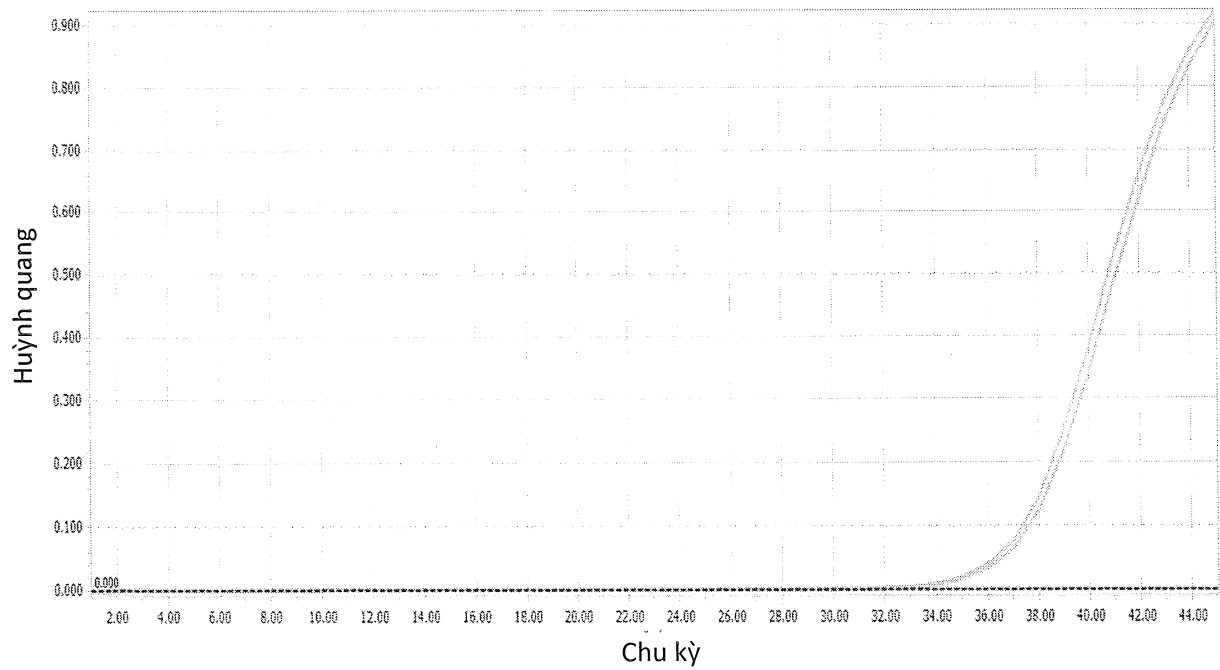


Fig.10

SEQ ID NO: 14

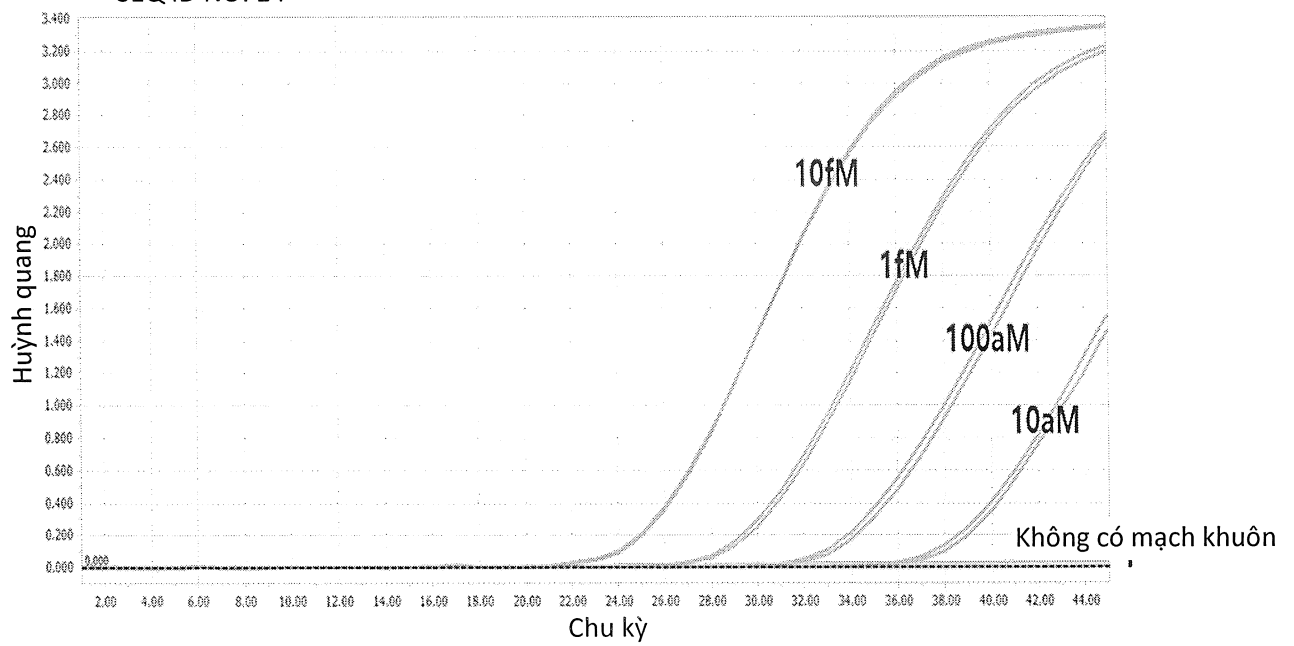


Fig.11

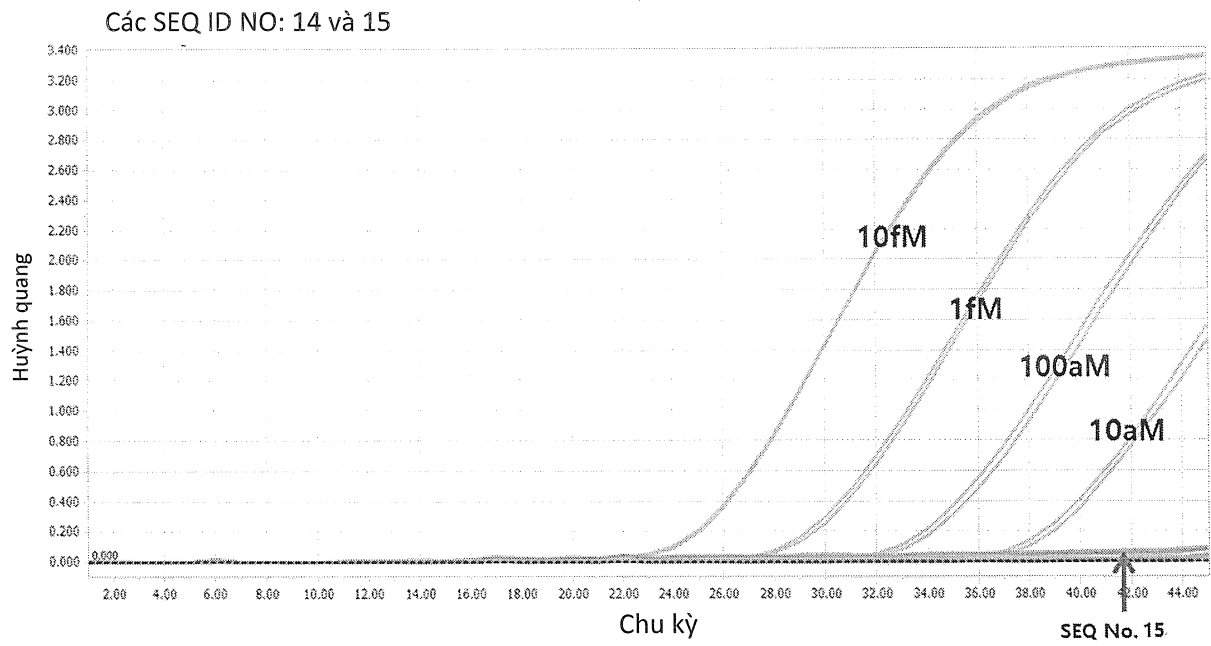


Fig.12

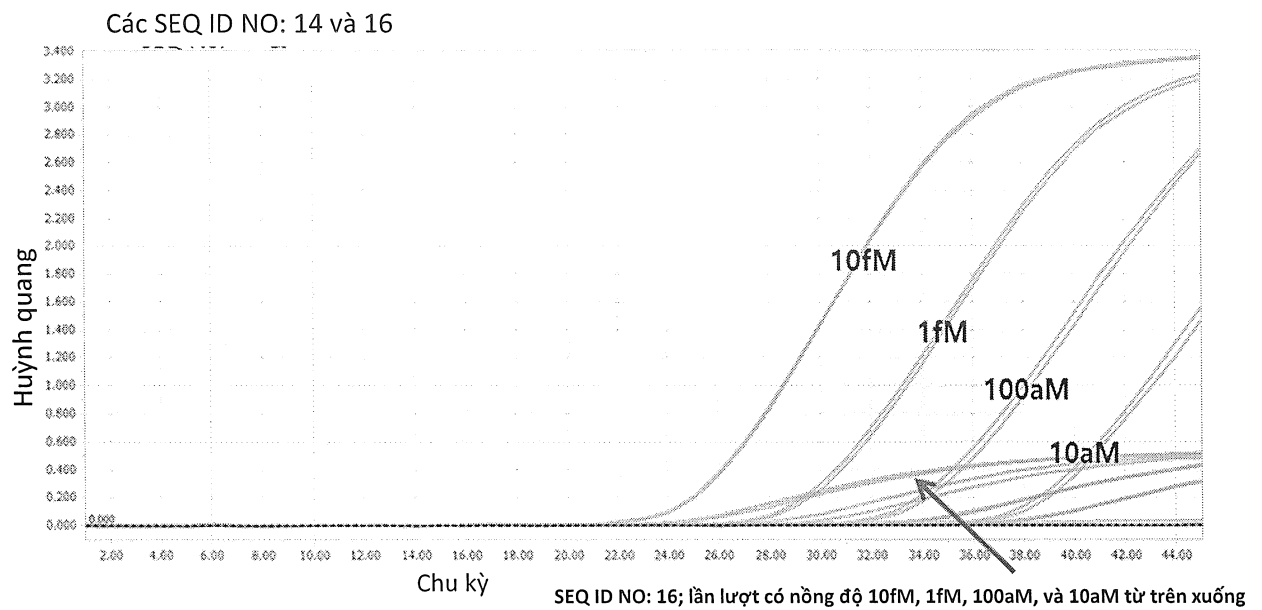


Fig.13

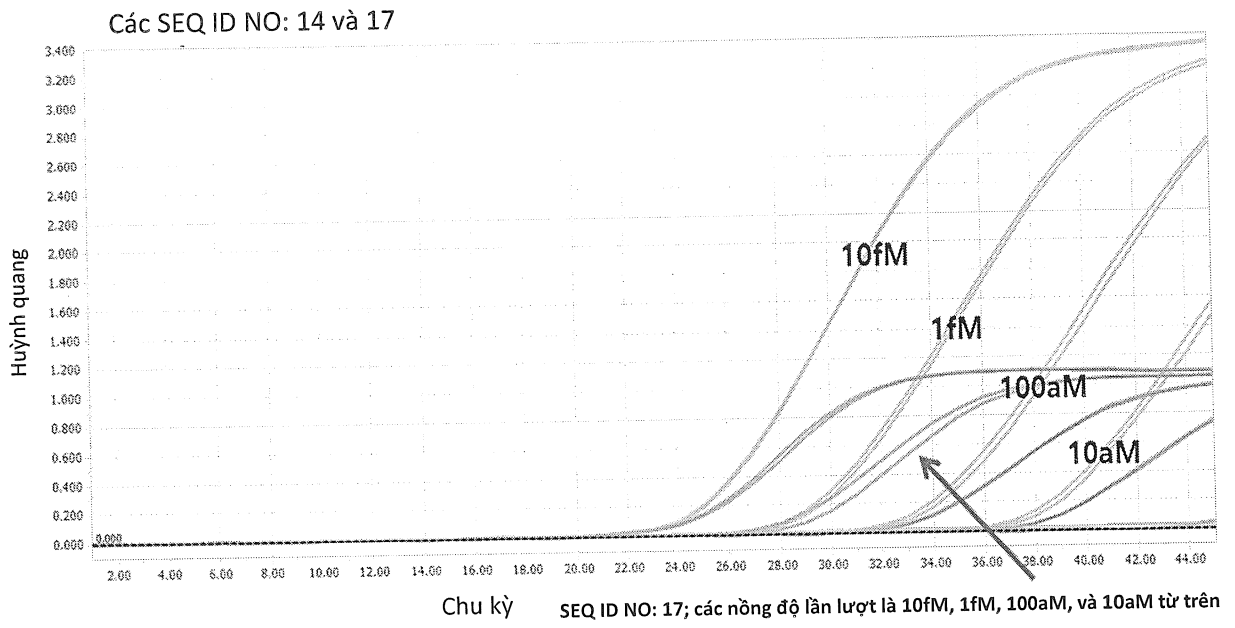


Fig.14

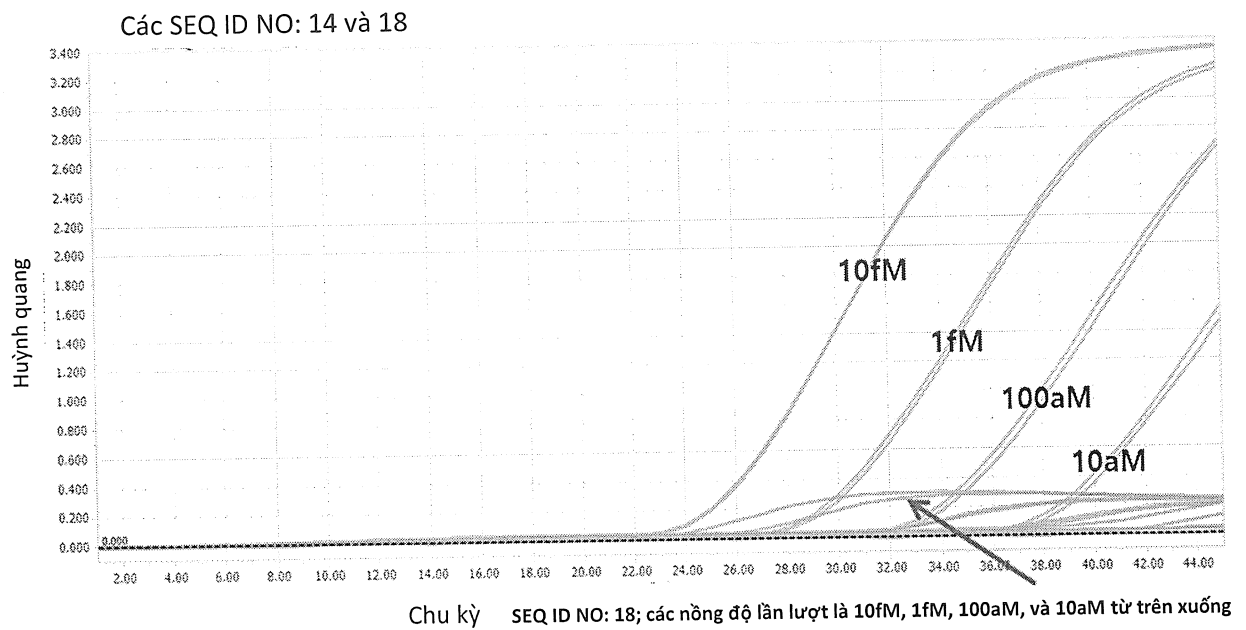


Fig.15

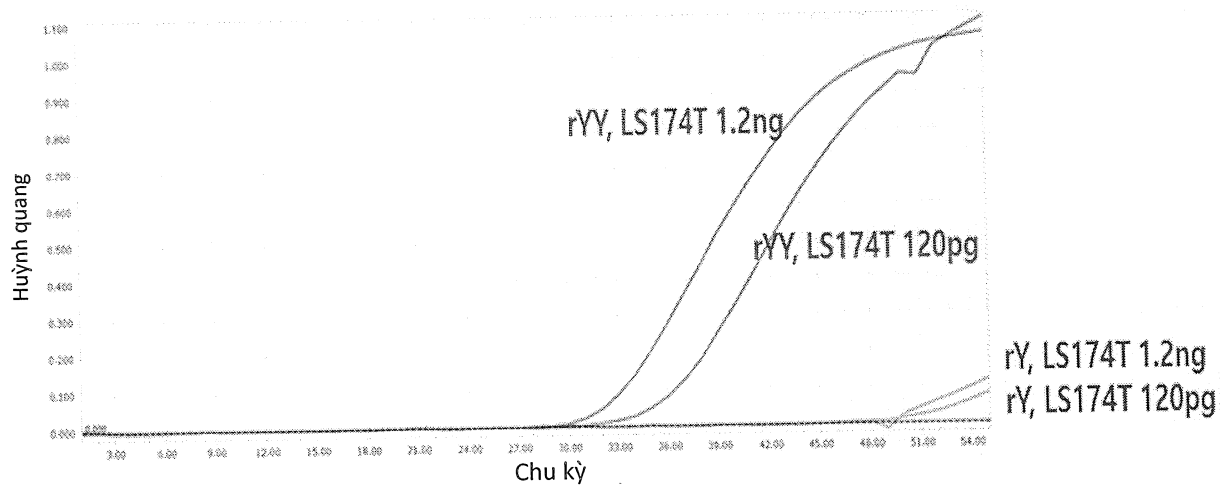
Đột biến G12D (dòng tế bào LS174T)

Fig.16

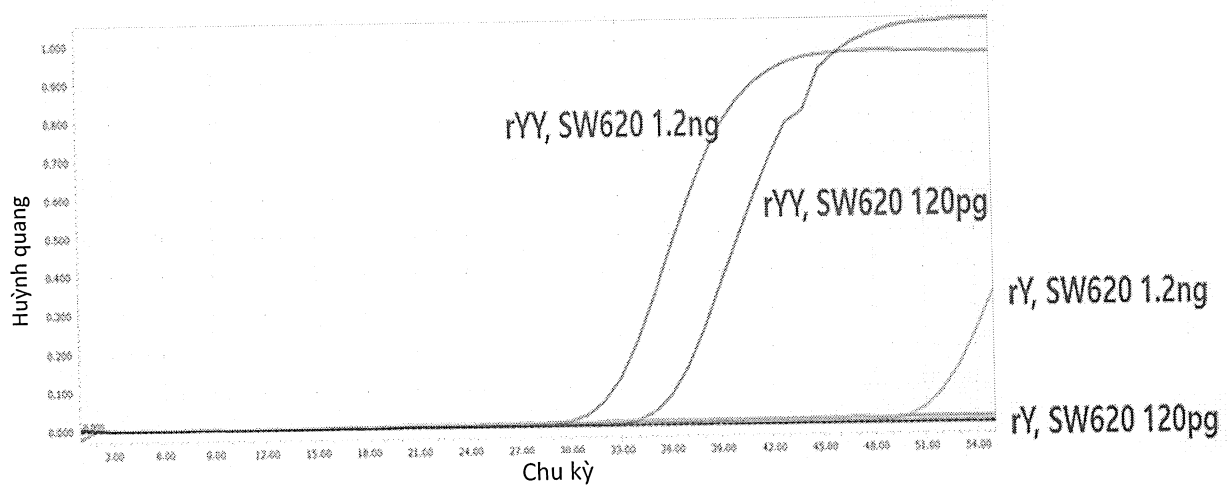
Đột biến G12V (dòng tế bào SW620)

Fig.17

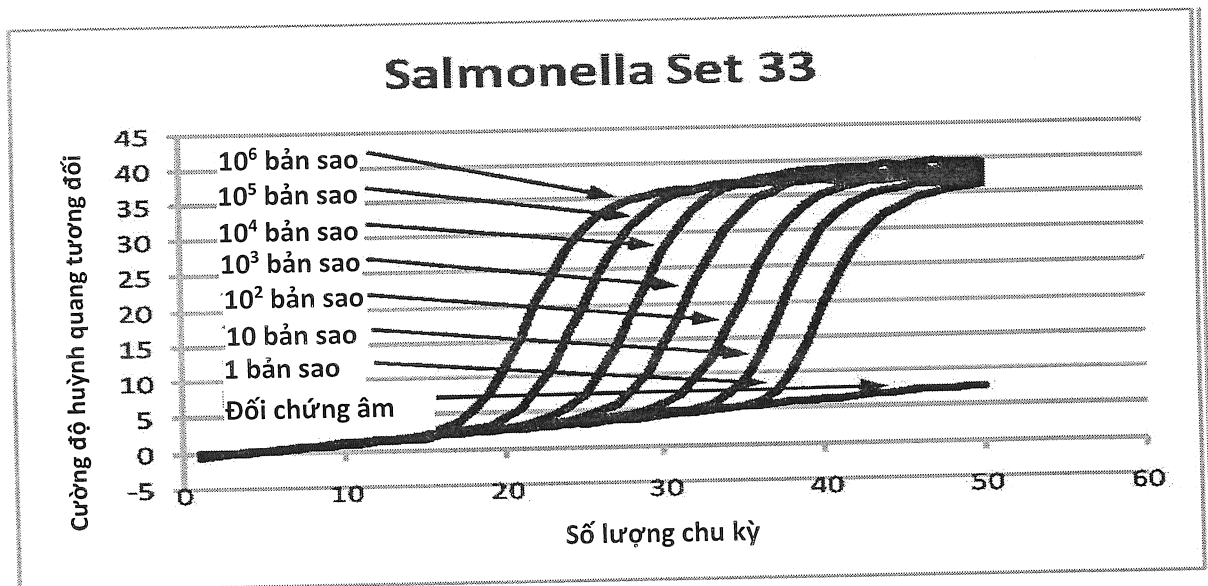


Fig.18

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Nuribio Co., Ltd.	
<120>	ĐOẠN MỖI DÒ ĐỂ PHÁT HIỆN AXIT NUCLEIC HOẶC PROTEIN, KIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN AXIT NUCLEIC HOẶC PROTEIN BẰNG ĐOẠN MỖI DÒ NÀY	
<130>	FP-17-0102	
<150>	KR 10-2016-0017359	
<151>	2016-02-15	
<150>	KR 10-2017-0020238	
<151>	2017-02-14	
<160>	23	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ADN_ARN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi dò xuôi gen người CK18	
<220>		
<223>	ARN nằm ở trình tự thứ 17 và 18.	
<400>	1	
	atcttggtga tgccttggac	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược gen người CK18	
<400>	2	
	cctgcttctg ctggcttaat	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi gen người CK19	
<400>	3	
	gtcacagctg agcatgaaag	20
<210>	4	
<211>	20	

<212>	ADN_ARN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi dò ngược gen người CK19	
<220>		
<223>	ARN nằm ở trình tự thứ 17 và 18.	
<400>	4	
	tcactatcag ctcgcacatc	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	ADN_ARN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi dò xuôi gen người GAPDH	
<220>		
<223>	ARN nằm ở vị trí thứ 17 và 18.	
<400>	5	
	aaggtgaagg tcggagucaa	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược gen người GAPDH	
<400>	6	
	aatgaagggg tcattgatgg	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi gen người CK18	
<400>	7	
	atcttggtga tgccttggac	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		

<223> Đoạn mỗi ngược gen người CK19

<400> 8

tcactatcag ctcgcacatc

20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi gen người GAPDH

<400> 9

aaggtgaagg tcggagtcaa

20

<210> 10

<211> 22

<212> ADN_ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi dò xuôi G12D

<220>

<223> ARN nằm ở trình tự thứ 20.

<400> 10

cttgtggtag ttggagctga tg

22

<210> 11

<211> 23

<212> ADN_ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi dò xuôi G12V

<220>

<223> ARN nằm ở trình tự thứ 21.

<400> 11

acttgtggtgta gttggagctg atg

23

<210> 12

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược phổ dụng G12D và G12V

<400> 12

catattcgtc cacaaaatga ttctg

25

<210> 13

<211> 810

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> nucleotit nằm ở vị trí từ 241 đến 1030 ở gen đột biến OPN1MW T529C

<400> 13

```

ttcaagaagc tgcgccaccc gctgaactgg atcctgggtga acctggcggt cgctgacctg      60
gcagagaccg tcatcgccag cactatcagc gttgtgaacc aggtctatgg ctacttcgtg      120
ctggggccacc ctatgtgtgt cctggagggc tacaccgtct ccctgtgtgg gatcacaggt      180
ctctggtctc tggccatcat ttctggggag agatggatgg tggctctgca gccctttggc      240
aatgtgagat ttgatgccaa gctggccatc gtgggcattg ctttctcccg gatctgggct      300
gctgtgtgga cagccccgcc catctttggt tggagcaggt actggcccca cggcctgaag      360
acttcatgcy gccagacgt gttcagcggc agctcgtacc ccggggtgca gtcttacatg      420
attgtcctca tggtcacctg ctgcatcacc ccactcagca tcatcgtgct ctgctacctc      480
caagtgtggc tggccatccg agcgggtggc aagcagcaga aagagtctga atccaccag      540
aaggcagaga aggaagtgac gcgcatgggt gtggtgatgg tcctggcatt ctgcttctgc      600
tggggaccat acgccttctt cgcattgctt gctgctgcca accctggcta ccccttccac      660
cctttgatgg ctgccctgcc ggccttcttt gccaaaagtg ccactatcta caaccccggt      720
atctatgtct ttatgaaccg gcagtttcga aactgcatct tgcagctttt cggaagaag      780
gttgacgatg gctctgaact ctccagcgcc      810

```

<210> 14

<211> 20

<212> ADN_ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi dò 529CA1

<220>

<223> ARN nằm ở trình tự thứ 18.

<400> 14

tgggcattgc cttctcccg

20

<210> 15

<211> 12

<212> ADN_ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò 529CA2

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 10.

<400> 15
 gccttctccc gg 12

<210> 16
 <211> 34
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò 529CA3

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 32.

<400> 16
 caagctgggc atcgtgggca ttgccttctc ccgg 34

<210> 17
 <211> 28
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò 529CA4

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 18.

<400> 17
 tgggcattgc cttctcccgg atctgggc 28

<210> 18
 <211> 35
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò 529CA5

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 18.

<400> 18
 tgggcattgc cttctcccgg atctgggctg ctgtg 35

<210> 19

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược 529CA

<400> 19
 gtacctgctc caaccaaaga

20

<210> 20
 <211> 22
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò xuôi G12D loại rY

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 21.

<400> 20
 acttgttggtg gttggagctg at

22

<210> 21
 <211> 22
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò xuôi G12D loại rYY

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 20.

<400> 21
 cttgtggtag ttggagctga tg

22

<210> 22
 <211> 23
 <212> ADN_ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi dò xuôi G12V loại rY

<220>
 <223> ARN nằm ở trình tự thứ 22.

<400> 22
 aacttgtggt agttggagct gut

23

<210> 23

<211> 23
<212> ADN_ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi dò xuôi G12V loại rYY

<220>
<223> ARN nằm ở trình tự thứ 21.

<400> 23
acttgtggta gttggagctg utg

23